

ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES GLUCOSINOLATES CONTENUS DANS LES GRAINES DE COLZAS. COMPARAISON DE DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE

Wathelet J-P*, Biston R.** , Marlier M.* et Severin M.*

* Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat, B 5800 Gembloux

** Station de Haute Belgique, rue de Serpont, 48, B 6600 Libramont
BELGIQUE

INTRODUCTION

Mis en évidence depuis le siècle dernier, les glucosinolates sont présents dans toutes les espèces végétales appartenant à la famille des crucifères. Ils se dégradent facilement sous l'action de la myrosinase en isothiocyanates, vinyl thio oxazolidone, nitriles, thiocyanates, amines...

Ces produits de dégradation sont physiologiquement actifs. Ils contribuent à la flaveur de différentes plantes comme les choux, les radis et au goût particulier du raifort et de la moutarde. Initialement présents dans le parenchyme des graines de colza, ils subsistent dans les tourteaux obtenus après extraction de l'huile et provoquent des effets toxiques chez les animaux d'élevage. Ceci limite l'utilisation des tourteaux de colza notamment pour les animaux à croissance rapide comme le porc et les volailles.

En vue de valoriser au mieux le colza, plante riche en matière grasse présentant une composition en acides aminés très équilibrée, il est impératif d'une part de diminuer le taux de glucosinolates par sélection de nouvelles variétés ou par des procédés technologiques et d'autre part de les doser avec précision.

Si les glucosinolates totaux peuvent être dosés par différentes méthodes (glucose, palladium, thymol test...), il est cependant utile, d'un point de vue nutritionnel, de pouvoir les quantifier individuellement.

Le dosage des désulfoglucosinolates par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en isothermie ou programmation de température permet d'effectuer des dosages relativement précis (Thies 1980, 1983) (Heaney et al. 1980). Toutefois, le dosage, par ces techniques, des indol glucosinolates et des glucosinolates contenant du soufre pose quelques problèmes notamment lors de la silylation.

Spinks, Sones et Fenwick (1984) ainsi que Helboe, Olsen et Sørensen (1980) ont développé deux méthodes de dosage des glucosinolates par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La première équipe de scientifiques sépare les désulfoglucosinolates tandis que la seconde sépare directement les glucosinolates intacts.

De façon simplifiée, la première voie consiste à enlever l'huile, extraire les glucosinolates contenus dans le tourteau, absorber les glucosinolates sur une colonne de DEAE Sephadex A 25, faire réagir une sulfatase, éluer les désulfoglucosinolates formés et les doser par CPG ou HPLC.

La seconde voie consiste à extraire directement les glucosinolates sans délipidation, les adsorber sur une colonne d'Étateola cellulose, les éluer et les doser directement par HPLC.

La recherche réalisée peut être divisée en trois parties: l'identification par GC-MS des glucosinolates extraits de quatre variétés de colza, l'amélioration et la comparaison des deux méthodes de dosage individuel des glucosinolates et le calibrage d'un spectromètre NIR en vue de mesurer rapidement la teneur globale en glucosinolates.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Identification par GC-MS des glucosinolates contenus dans les variétés Ledos, Garant, Librador et Lirasol

Ces quatre variétés de colza ont été étudiées par GC-MS en impact électronique et en ionisation chimique; le but étant de confirmer l'identité des glucosinolates réputés présents.

Nous avons surtout mis l'accent sur la détection des ions moléculaires. Dans ce cas, il est évident que c'est l'ionisation chimique qui permet le mieux la détection de ces ions (quasimoléculaires MH⁺, dans ce cas).

Toutefois, pour les glucosinolates les plus abondants retrouvés dans les quatre variétés de colza (progoitrine, gluconapine, glucobrassicinapine, 4 OH glucobrassicine, napoléiférine et glucobrassicine), on peut observer certains ions moléculaires en impact électronique dans des conditions de travail optimum.

II. Méthodes de dosage des glucosinolates individuels

II.1. Optimisation des conditions opératoires

a) Extraction avec ou sans délipidation

La méthode d'extraction inspirée des travaux de Helboe est nettement plus rapide et évite l'utilisation de solvants coûteux en vue d'extraire les matières grasses. Nous nous sommes alors posé la question de savoir s'il était nécessaire d'effectuer une délipidation. Dans ce but, quatre colzas contenant des teneurs nettement différentes en glucosinolates ont été analysés.

D'une façon générale, on constate que les résultats sont relativement proches l'un de l'autre. Le % de 4 OH glucobrassicine, de glucobrassicine et de napoléiférine ne varie guère tandis que la concentration en progoitrine et en gluconapine augmente très légèrement lorsque l'extraction est effectuée sans délipidation.

En outre, par chromatographie sur couche mince, nous avons démontré que les lipides restaient sur la colonne de DEAE et d'Ectéolla cellulose. Les matières grasses ne risquent donc pas de polluer les colonnes HPLC.

Compte tenu des résultats obtenus, nous proposons de suivre la voie sans délipidation pour extraire les glucosinolates.

b) Colonnes de purification

Lorsque l'extraction est terminée, deux voies sont possibles; soit on désulfate les glucosinolates sur une colonne de DEAE Sephadex A 25, soit on purifie les glucosinolates sur colonne d'Ectéolla cellulose.

DEAE Sephadex A 25

Les glucosinolates sont adsorbés sur des colonnes de DEAE imprégnées d'un tampon pyridine-acétate.

Des expériences ont été réalisées en vue de déterminer si la quantité de résine placée dans la colonne influençait les résultats.

Quatre colzas ont été extraits. Des colonnes renfermant 15, 25 et 35 mgrs de résine DEAE A 25 ont été testées. Nous n'avons remarqué aucune différence significative.

La pyridine est un produit hautement toxique qui, suivant l'origine commerciale, peut donner un pic très large après environ 17 minutes d'analyse par HPLC. Cette bosse gêne considérablement la mesure de la désulfoglucobrassicine et de la désulfoglucobrassicine.

Le remplacement des tampons pyridine-acétate par des tampons acide acétique-acétate de soude 0.5 ou 0.02 M portés à pH 5 a permis de supprimer cette bosse. De plus, les deux tampons donnent quantitativement des résultats semblables.

Ectéola cellulose

En ce qui concerne la seconde méthode, les glucosinolates intacts sont adsorbés sur des colonnes d'Ectéola cellulose.

La hauteur de la colonne ainsi que la quantité du tampon au sodium utilisé pour éluer les glucosinolates jouent un rôle important. Une petite colonne ne retient pas suffisamment les alkényles glucosinolates tandis qu'une trop grande colonne ne permet pas la désorption complète de la 4 OH glucobrassicine. Il convient donc de trouver un compromis.

c) Désulfatation

L'action de la sulfatase d'*Helix pomatia* est une étape supplémentaire qui permet de transformer les glucosinolates en désulfoglucosinolates. La préparation de l'enzyme et la désulfatation doivent être bien contrôlés si on veut obtenir une bonne reproductibilité ou répétabilité.

d) HPLC des désulfoglucosinolates

Séparation des désulfoglucosinolates

Les désulfoglucosinolates obtenus après action de la sulfatase d'*Helix pomatia* sont séparés sur une colonne de Spherisorb ODS2 5 microns.

Dans ces conditions, nous avons obtenu de très belles séparations et une dérive de ligne de base négligeable.

La glucobarbarine et la glucotropaéoline conviennent très bien comme étalon interne. Il serait toutefois souhaitable de trouver une firme pour les commercialiser.

Nous avons aussi remarqué une excellente reproductibilité des temps de rétention; ce qui n'est pas à négliger lorsque l'on veut effectuer des analyses en routine avec un système d'intégration et d'injection automatique.

Les colonnes que nous utilisons dans notre laboratoire ont une durée de vie très longue; la pression de la colonne reste très stable.

Influence de la température de la colonne

Lors de nos premiers essais au laboratoire, nous avons remarqué que la teneur en 4 OH glucobrassicine n'était pas toujours reproductible alors que les concentrations en progoitrine, gluconapine, glucobrassicinapine ne variaient guère. Très vite, nous avons pu démontrer que la température de la colonne influençait fortement le dosage de la 4 OH glucobrassicine.

Il convient donc d'être extrêmement attentif et de travailler à température constante. Nous suggérons de régler le four de l'HPLC à 30°C; une température de 25°C étant difficile à stabiliser notamment en été.

Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage des désulfo-glucosinolates a été testée en analysant un colza à haute teneur en glucosinolates et en faisant varier la prise d'essai de 25 à 800 mgrs.

e) HPLC des glucosinolates intacts

Séparation des glucosinolates intacts

Les glucosinolates élués des colonnes d'Ectéola Cellulose sont, sans traitement à la sulfatase, directement injectés dans l'HPLC sur une colonne de Nucléosil 5 C18 de 12.5 cm de long.

- tampon au méthanol :

Lors de nos premiers essais, nous utilisons comme mélange tampon un tampon phosphate 0.01M à pH 7 contenant du bromure de tétraheptylammonium 5 mM et 62.5 % de méthanol. Ce système isocratique ne requiert qu'une seule pompe et, par conséquent, un équipement moins onéreux.

Dans ces conditions, nous avons obtenu des séparations satisfaisantes mais avec des pics relativement larges et trainants.

La gluconapine est éluee en même temps que d'autres produits, vraisemblablement des dérivés cinnamoyl.

La glucobarbarine convient très bien comme standard interne, toutefois, elle n'est pas commercialisée. La glucotropaeoline peut être également utilisée comme standard interne mais la glucobrassicinapine est éluee tout près et il semble que dans des cas isolés, des dérivés des glucosinolates interfèrent également.

L'utilisation d'un tel tampon au méthanol provoque une rapide hausse de pression en tête de colonne. Les colonnes doivent être régulièrement changées; ce qui coûte relativement cher notamment si on ne dispose pas de l'appareillage nécessaire au remplissage des colonnes.

- tampon à l'acétonitrile :

Le tampon au méthanol peut être avantageusement remplacé par un tampon à l'acétonitrile; le tampon étant préparé de la même façon. Dans ces conditions, la séparation est nettement améliorée.

Dosage des dérivés des glucosinolates

La méthode Sørensen permet également de mettre en évidence les dérivés des glucosinolates (cinnamoyl...) présents dans certaines graines de colza.

II.2 Choix de la méthode de dosage par HPLC

Compte tenu des remarques formulées précédemment, nous utilisons, en routine, la méthode de dosage des désulfoglucosinolates.

La séparation des désulfoglucosinolates est excellente, les temps de rétention sont très reproductibles, les colonnes HPLC ont une durée de vie très longue, la pression de ces colonnes reste très stable.

III. Comparaison entre les résultats obtenus par HPLC et CPG à programmation de température

Les glucosinolates extraits de différents colzas ont été analysés sous forme de désulfoglucosinolates par HPLC et par chromatographie en phase gazeuse.

Le tableau 1 indique les résultats obtenus. Peu de différences apparaissent pour la progoïtrine, la gluconapine et la glucobrassicapine.

IV. Calibrage d'un spectromètre de réflexion dans le proche infrarouge

Disposant d'une méthode standardisée (HPLC), nous avons étudié le potentiel analytique de l'infrarouge proche en vue de mettre au point une méthode rapide, fiable, peu coûteuse et non destructive des glucosinolates totaux.

A partir de la dérivée première des spectres NIR, nous avons observé un coefficient de corrélation multiple de 0.98 ainsi qu'une erreur standard sur les valeurs estimées de 3 micromôles par gramme de graines entières. Les longueurs d'onde retenues sont 1636, 1624 et 1640 nm.

CONCLUSIONS

Les recherches entreprises ont permis :

- de montrer que le dosage des glucosinolates par HPLC est une méthode plus performante que la chromatographie en phase gazeuse à programmation de température. La méthode par HPLC permet, en effet, de doser plus facilement les indolglucosinolates ainsi que les glucosinolates soufrés.

- de comparer deux méthodes de dosage des glucosinolates par HPLC (Méthode aux désulfoglucosinolates et méthode aux glucosinolates intacts).

Le dosage des désulfoglucosinolates par HPLC est couramment utilisé dans notre laboratoire. En effet, la séparation HPLC des désulfoglucosinolates est excellente, les temps de rétention sont très reproductibles, les colonnes HPLC ont une durée de vie très longue et la pression de la colonne reste très stable. De plus, les désulfoglucosinolates formés peuvent être directement silylés et injectés dans un chromatographe en phase gazeuse.

- de démontrer les performances du proche infrarouge (NIR) comme méthode rapide de dosage des glucosinolates totaux.

BIBLIOGRAPHIE

HEANEY R.K. and FENWICK G.R. 1980

The analysis of glucosinolates in Brassica species using gas chromatography. Direct determination of the thiocyanate ion precursors, glucobrassicin and neoglucobrassicin.

J. Sc. Food Agri., 31, 593-599

HELBOE P., OLSEN O. and SØRENSEN H. 1980

Separation of glucosinolates by high performance liquid chromatography Journal of Chromatography, 197, 199-205

SPINKS E., SONES K. and FENWICK G.R. 1984

The quantitative analysis of glucosinolates in cruciferous vegetables oilseeds and forage crops using high performance liquid chromatography. Fette, Seifen, Anstrichmittel, 86, 228-231.

THIES W., 1980

Analysis of glucosinolates via "on column" desulfation.

Proceedings of symposium "Analytical chemistry of rapeseed and its product " Winnipeg, 66-71

THIES W. , 1983

Optimization of the "on column" desulfation and gas chromatography of glucosinolates.

Actes du 6^{eme} Congrès International sur le colza, Paris, 1343-1349.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier vivement la CEE qui, par son assistance financière a permis de mener à bien nos recherches.

Tableau 1 : Dosage des désulfoglucosinolates.

Comparaison des résultats obtenus par HPLC et CPG.

Résultats exprimés en micromôles par gramme

	PRO		GNL		GNA		GBN		4OH		GBS		TOTAUX	
	HPLC	CPG	HPLC	CPG	HPLC	CPG	HPLC	CPG	HPLC	CPG	HPLC	CPG	HPLC	CPG
Facteur	1.15	1.0	1.05	1.0	1.17	1.0	1.21	1.0	0.29	0.31				
N° 1	5.9	6.6	0.1	0.3	3.0	3.1	0.6	0.6	1.2	0.4			11.3	10.6
2	16.8	17.6	1.0	1.5	5.3	5.0	2.1	1.2	1.1	0.2			26.6	26.3
3	39.3	38.3	1.2	1.9	16.7	13.8	4.0	3.5	1.1	0.0			62.4	57.6
4	2.2	3.7	0.1	0.2	1.5	2.1	0.2	0.4	1.3	0.2			5.5	6.4
5	14.0	14.1	0.5	0.8	4.8	4.8	1.0	0.8	1.4	0.1			21.9	20.4
6	24.7	24.7	0.6	0.9	12.3	10.6	0.7	1.1	1.4	0.2			40.0	37.2
7	11.8	13.0	1.2	1.4	4.1	4.0	3.7	3.5	1.2	0.1			22.2	22.0
8	12.1	11.1	0.9	0.9	4.6	4.2	1.3	1.4	1.6	0.2			20.7	17.5
9	11.7	12.3	0.4	0.6	3.4	3.5	0.8	1.0	1.4	0.3			18.0	17.4
10	3.7	4.4	0.4	0.3	1.4	1.6	1.0	0.5	1.1	0.2			7.8	6.9
11	6.7	6.5	0.6	0.4	2.1	2.3	0.5	0.8	1.7	0.2			11.8	10.0
12	9.3	10.5	0.7	0.8	3.3	3.5	1.3	1.2	1.6	0.1			16.4	16.1
13	3.2	3.5	0.3	0.2	1.9	2.0	0.2	0.4	2.0	0.3			7.9	6.0
14	5.6	5.9	0.4	0.6	1.3	1.7	0.2	0.8	1.6	0.1			9.2	9.0
15	6.2	5.4	0.4	0.3	2.3	2.0	0.4	0.4	1.8	0.1			11.2	8.1
16	9.4	10.0	0.5	0.6	2.1	2.4	0.4	0.3	1.5	0.2			14.1	13.4
17	6.5	6.5	0.4	0.2	3.2	3.0	0.2	0.4	1.9	0.3			12.5	10.1
18	7.6	8.3	0.3	0.2	6.1	5.7	0.4	0.4	1.6	0.1			16.2	14.5
19	7.1	8.2	1.2	0.2	5.1	5.1	0.8	0.8	1.9	0.2			16.3	14.4
20	10.7	11.6	0.3	0.6	5.4	5.1	0.7	0.8	1.8	0.2			19.1	18.1