

RECENTES AMELIORATIONS POUR LE DOSAGE DES GLUCOSINOLATES DES
GRAINES ET TOURTEAUX DE COLZA PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE
HAUTES PERFORMANCES

A. QUINSAC - D. RIBAILLIER

Centre Technique Interprofessionnel des
Oléagineux Métropolitains (CETIOM)
Laboratoire d'Analyses
Avenue de la Pomme de Pin
ARDON - 45160 OLIVET
FRANCE

RESUME

La chromatographie liquide hautes performances des glucosinolates désulfatés est la technique de choix pour l'analyse des glucosinolates et en particulier des indols glucosinolates. Pour ces derniers, les étapes d'extraction, de purification, et de désulfatation sont très critiques. Une méthode nouvelle est donc proposée, sur la base des techniques utilisées à ce jour, et d'améliorations résultant des travaux réalisés dans notre laboratoire.

Les conditions de préparation des dérivés désulfatés ont été revues et simplifiées, permettant ainsi une meilleure quantification. La comparaison avec les principales méthodes utilisées actuellement, souligne l'intérêt de disposer d'une technique plus simple, plus rapide et moins drastique envers les indols glucosinolates. La détermination de la 4-OH-glucobrassicine par cette nouvelle méthode est à la fois plus répétable et plus précise.

I INTRODUCTION

La chromatographie liquide hautes performances (CLHP) est désormais l'outil de choix pour l'analyse des glucosinolates (GLS).

La dégradation enzymatique ou la dérivation chimique n'est plus nécessaire car cette technique permet la séparation de presque tous les glucosinolates sous la forme intacte ou désulfatée. La chromatographie des dérivés désulfatés de par ses performances et sa simplicité a pris le pas sur la chromatographie des glucosinolates intacts. Elle n'est possible cependant qu'après traitement de l'échantillon sur un échangeur d'ions par une enzyme (aryl sulfate sulfohydrolase) pendant une durée d'au moins six heures. L'instabilité de certains glucosinolates, et en particulier de la 4-OH glucobrassicine, peut être une source importante d'erreurs. Nous avons donc essayé de simplifier cette opération de désulfatation.

Initialement, cette étape a été conçue pour assurer la concentration, la purification et la dérivation des glucosinolates avant la réaction de silylation pour la chromatographie en phase gazeuse (Thies /1978/). Les performances des colonnes CLHP permettent souvent d'éviter purification et concentration, ainsi l'analyse des extraits bruts est possible si les impuretés ne donnent pas de pics gênants sur le chromatogramme.

De ce fait, nous avons donc réalisé la désulfatation des glucosinolates dans l'extrait brut.

II MATERIEL ET PRODUITS

Le système chromatographique, la méthode de purification de la sulfatase ainsi que la préparation des divers réactifs ont été décrits précédemment (Quinsac /1986/).

III EXTRACTION DES GLUCOSINOLATES

L'emploi du méthanol à 70 % est conseillé pour l'extraction car il affaiblit les structures cellulaires et favorise donc la libération des glucosinolates. De plus l'activité de la myrosinase est considérablement réduite par la seule présence de ce solvant. La solubilité des glucosinolates est bonne dans le méthanol à 70 % quoique meilleure dans l'eau (Buchner /1986/).

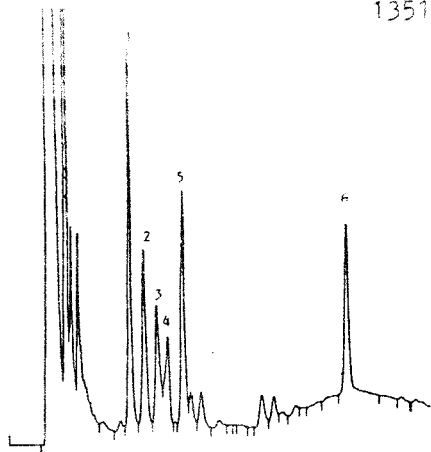
Malgré toutes ces propriétés le méthanol à 70 % ne peut être utilisé car un extrait aqueux est nécessaire pour que l'activité de la sulfatase soit maximale.

Il faut donc préciser les conditions d'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction satisfaisant des glucosinolates. Le rendement de l'extraction dépend de plusieurs facteurs : nature du solvant, température et durée d'extraction, granulométrie du broyat, agitation.

Les solvants étudiés sont : le méthanol à 70 % dans l'eau, l'eau pure et une solution aqueuse de 2-mercapto-éthanol (2-ME) 5mM et d'EDTA 1mM. La présence de 2ME est susceptible de diminuer les pertes de glucosinolates sensibles à l'oxydation (Sang /1984/).

Les températures d'extraction sont légèrement inférieures aux températures d'ébullition des solvants.

Les teneurs en glucosinolates des extraits réalisés pendant les essais ont été mesurées par CLHP d'appariement d'ions (Bjerg /1986/) sans purification de l'échantillon. Il n'y a donc eu aucune perte de glucosinolates après l'extraction.



- 1 : Frogoitrine
 2 : Sinigrine
 3 : Non identifié
 4 : Gluconapine
 5 : 4-OH glucobras-
 sicine
 6 : Flavonoïde

Chromatogramme d'un extrait non purifié de GLS intacts

Colonne C18 Nucleosil 5 μ m 250 x 4 mm
 Précolonne C18 Nucleosil 5 μ m 30 x 4 mm
 Eluant : THA+ Br⁻ : 5 mM. Phosphate 10 mM pH=7
 CH₃CN : gradient de 45 % à 57 % en 20 min
 Débit 1 ml/min. Détection UV à 235 nm. Injection 20 μ l

Résultats (exprimés en unité de surface des pics : mV.s)

EXTRACTION		Ech. 1		Ech. 2		Ech. 3	
Solvant	Durée	PRO	4-OH GBC	PRO	4-OH GBC	PRO	4-OH GBC
Eau	10 min	3669	2109	2479	1764	731	2260
2-ME 5 mM EDTA 1 mM	10 min	3530	1454	2480	1710	642	2114
Méthanol 70 %	10 min	3514	1792	2523	1807	780	1975
Méthanol 70 %	2x5 min	3820	1828	2630	1654	783	2079

TABLEAU 1

Discussion des résultats

Les essais montrent que :

- l'utilisation du 2-ME pendant l'extraction est inutile
- le préchauffage du tube dans le bain d'eau à 95°C avant l'addition de l'eau bouillante est nécessaire pour inactiver brutalement la myrosinase : c'est une étape critique
- le nombre d'extractions peut se réduire à 1 si les graines sont finement broyées (1 min au moulin à café) et si le tube est fréquemment agité (5 secondes par minute)
- la durée d'extraction optimale est de 10 minutes

Il en résulte donc le protocole d'extraction suivant :

Protocole d'extraction :

- broyer l'échantillon au moulin à café pendant 1 min
- peser 100 mg de graines dans un tube en polypropylène de 5 ml
- préchauffer pendant 5 minutes à 95°C
- ajouter 2 ml d'eau bouillante, attendre 30 secondes
- ajouter 100 µl de solution d'étalon interne (sinigrine (SIN) ou glucotropaéoline (GTL)) à 7,5 mM
- agiter au vortex 5 secondes par minute pendant 10 minutes
- retirer le tube du bain et centrifuger à 3000 t/mn pendant 3 min.

L'extrait obtenu n'est pas utilisable directement. En effet, il contient des substances inhibitrices d'enzymes, qu'il faut éliminer.

IV PURIFICATION DE L'EXTRAIT

La précipitation par l'acétate de plomb et de barium 0,5 M élimine beaucoup d'impuretés et évite la baisse d'activité de la sulfatase provoquée par ces inhibiteurs (Quinsac /1986/)

Mode opératoire

- prélever 1 ml d'extrait centrifugé, ajouter 50 µl d'acétate de plomb et de barium 0,5 M
- agiter, centrifuger, prélever le surnageant
- filtrer à 0,45 µm

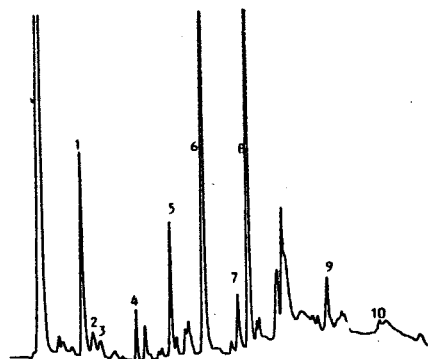
V DESULFATATION

L'extrait purifié, filtré est prêt pour la désulfatation.

Les GLS vont être désulfatés en solution dans l'eau. La vitesse de réaction est donc beaucoup plus grande que lorsque les GLS sont fixés sur un échangeur d'ions. De plus, l'addition de 2-ME permet d'éviter la dégradation du 4-OH G3C.

Mode opératoire

- prélever 100 µl d'extrait
- ajouter 20 µl de solution de sulfatase purifiée à 1 %
- ajouter 20 µl de solution de 2-ME 10 mM dans l'eau
- agiter doucement
- laisser reposer 20 minutes
- injecter 20 µl



- 1 : Progoitrine
- 2 : Epi-progoitrine
- 3 : Sinigrine
- 4 : Gluconapoléiférin
- 5 : Gluconapine
- 6 : 4-OH GBC
- 7 : Glucobrassicapine
- 8 : Glucotropaéoline
- 9 : Gluconasturtine
- 10 : Néo-GBC

Chromatogramme d'extrait brut désulfaté (Ech. F circuit CEE)

Conditions chromatographiques :

Colonne Sphérisorb ODS 2 - 5 μ m 250 x 4 mm
 Précolonne Sphérisorb ODS 2 - 5 μ m 30 x 4 mm
 Eluant : acétonitrile 4% pendant 2 minutes puis
 gradient de 4 % à 25 % en 16 minutes, débit 1,5 ml/min

Le rendement de la désulfatation peut être vérifié en injectant dans le chromatographe, un mélange d'étalon interne et de sulfatase en faisant varier le temps de désulfatation.

La surface maximale du pic de l'étalon interne sert de base au contrôle de la désulfatation des extraits.

Une vitesse de désulfatation plus importante peut être obtenue en augmentant la quantité de sulfatase (Quinsac /1986/) mais des pics parasites peuvent apparaître sur le chromatogramme et gêner la détermination de certains glucosinolates.

VI COMPARAISON AVEC LA DESULFATATION SUR ECHANGEUR D'IONS

Echantillons du 2ème circuit d'analyse CEE

La méthode d'analyse CEE en cours de normalisation est décrite par ailleurs (groupe d'experts CEC).

Méthode	PRO		4-OH GBC		Alkenyls GLS		Total GLS	
	CEE	DS	CEE	DS	CEE	DS	CEE	DS
Ech. B	12,6	12,7	0,33	1,44	23,1	22,5	24,4	24,1
Ech. C	52,9	52,4	0,38	1,38	79,5	77,5	80,6	79,3
Ech. D	3,30	3,39	0,44	1,26	8,09	7,71	9,32	10,21
Ech. E	13,0	12,3	0,27	1,25	25,72	24,5	26,4	26,4
Ech. F	2,70	2,90	0,33	1,98	7,75	7,07	8,71	10,8

VII CONCLUSION

Les deux méthodes donnent des résultats comparables pour tous les GLS, excepté pour le 4-OH GBC. Des valeurs supérieures sont données par la méthode de désulfatation en solution. Cependant, la teneur en 4-OH GBC n'est pas encore déterminée avec précision car il semble que les conditions chromatographiques influent sur sa stabilité. Par ailleurs, les impuretés éluées avec la glucobrassicine rendent difficile sa détermination.

L'intérêt de la méthode de désulfatation en solution réside dans sa rapidité (une heure) et dans la meilleure quantification au 4-OH GBC. Ce qui présente un réel avantage dans le cas des variétés à très faible teneur en GLS pour lesquelles la proportion d'indolylGLS est importante.

VIII BIBLIOGRAPHIE

- Bjerg, B. and H. Sørensen, 1986. Quantitative analysis of glucosinolates in oilseed rape based on HPLC of desulfoglucosinolates and HPLC of intact glucosinolates. Proceedings of CEC workshop "glucosinolates in rapeseed" Gembloux 1-3 octobre, à paraître.
- Buchner, R., 1986. Comparison of procedures for optimum extraction, purification and analysis of desulfo indolyl glucosinolates. Proceedings of CEC workshop "glucosinolates in rapeseed" Gembloux 1-3 octobre, à paraître.
- Quinsac, A. and D. Ribaillier, 1986. Optimization of glucosinolate desulphation before HPL-Chromatography. Proceeding of CEC workshop "glucosinolates in rapeseed" Gembloux 1-3 octobre, à paraître.
- Sang, J.P. and R.J.W. Truscott, 1984. Liquide chromatographic determination in rapeseed as desulfoglucosinolates. Journal of Association Official Analytical Chemists 67 : 829-833.
- Thies, W., 1978. Quantitative analysis of glucosinolates after their enzymatic desulphation on ion exchange column. Proceeding of 5th International Rapeseed Conference, Malmö, Sweden, June 12-16, 1 : 136-139
- Groupe d'experts CEC, 1987. Determination of the content of individual glucosinolates. Projet de méthode d'analyse, diffusion restreinte.