

LA SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE X, UNE METHODE RAPIDE DE DOSAGE
DES GLUCOSINOLATES DES GRAINES DE COLZA

D. Ribaillier, C. Merle, A. Quinsac

Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains
Avenue de la Pomme de Pin
45160 Ardon, FRANCEINTRODUCTION

Les glucosinolates (GLS) sont des constituants importants de la graine de colza car ils représentent le principal facteur de limitation à l'utilisation des tourteaux de colza en alimentation animale. D'une part, ces composés soufrés rendent le produit inappétent et d'autre part leurs produits de dégradation conduisent à des effets antinutritionnels.

Afin d'éliminer ce frein, les généticiens ont sélectionné des variétés à faibles teneurs en GLS dites "OO". En Europe la Commission des Communautés Européennes attribue depuis plusieurs années une prime pour les graines "OO" et en 1993 seules les graines ayant une teneur inférieure à 20 $\mu\text{moles/g}$ de graines entières (à 9 % d'humidité) bénéficieront de l'aide à la production.

Il est donc important de disposer d'une méthode de dosage rapide et fiable, permettant d'analyser les graines dès la livraison afin d'éviter les mélanges de graines à faibles teneurs avec d'autres dépassant les tolérances.

Les tests rapides par bandelettes réactives au glucose, type test du marteau (Ribaillier et Quinsac 1988), dont l'utilisation était courante au début de la phase de sélection quand les différences entre les variétés à fortes teneurs et les variétés "OO" étaient importantes ne sont plus utilisables en raison de leur médiocre précision (± 7 à 10 $\mu\text{moles/g}$). La spectrométrie de réflexion dans le proche infra-rouge (Renard et al. 1987) peut être un outil adéquat bien que sa précision (± 4 $\mu\text{moles/g}$) soit limitée (Ribaillier 1989). Les méthodes par dosage enzymatique du glucose (Heaney and Fenwick 1981), par chromatographie en phase gazeuse (Heaney and Fenwick 1980), ou liquide haute performance (CEC 1987), sont trop longues à mettre en oeuvre.

La spectrométrie de fluorescence aux rayons X (FRX) est une méthode rapide basée sur la corrélation qui existe entre le contenu en GLS des graines et le contenu total en soufre. Ses auteurs, (Schnug and Haneklaus 1987, 1988), considèrent que la quantité de soufre provenant d'autres origines (acides aminés soufrés, soufre minéral) est relativement stable et de ce fait interfère peu. Il était important d'étudier sa fiabilité pour le dosage des GLS des graines de colza, la présentation ci-dessous rapporte les résultats obtenus dans notre laboratoire durant les années 1989 et 1990.

MATERIEL ET METHODESMatériel

Les différentes déterminations de GLS par fluorescence X ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Oxford QX. La mesure est effectuée sous atmosphère d'hélium, le rayonnement est analysé par un détecteur fonctionnant en atmosphère argon-méthane (90-10). Le spectromètre est piloté par un microordinateur IBM PS 2.30.

Les échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur à couteau IKA (modèle A10) et tassés à l'aide d'une presse manuelle Wabeco (Illit, Gmbh, Kiel), réglée à 28 kg/cm².

Méthodes

Mesure des glucosinolates par fluorescence X. En 1989, les échantillons ont été préparés par broyage des graines préalablement séchées 15 h à 103°C puis tassage manuel (Ribaillier et al. 1989) et analysés avec le spectromètre préalablement calibré à l'aide d'échantillons de graines de colza dont les teneurs en GLS avaient été déterminées par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

En 1990, la méthode en cours d'étude par l'organisation internationale de normalisation (ISO 1990) a été utilisée. Les échantillons de graines sont séchés à 80°C pendant une nuit, broyés, tassés avec la presse manuelle et analysés à l'aide du spectromètre préalablement calibré avec 3 échantillons de graines de colza ayant une teneur en soufre certifiée par le Bureau Communautaire de Référence (BCR).

La teneur en glucosinolates (A) calculée directement par l'appareil, est donnée par l'une des formules suivante :

- si concentration du soufre total inférieure à 11 mg/g de graines :

$$A = - 5,6 S + 2,8 S_2 - 0,12 S_3 + 3,5$$

- si concentration du soufre total supérieure ou égale à 11 mg/g de graines :

$$A = 14,99 S - 43,87$$

où S est la teneur en soufre des échantillons analysés, mesurée par le spectromètre.

Mesure des glucosinolates par chromatographie. La teneur en glucosinolates des graines a été déterminée soit par chromatographie en phase gazeuse (Heaney and Fenwick 1980), soit par chromatographie liquide haute performance (CEC 1987).

RESULTATSComparaison des résultats obtenus par CPG et fluorescence X

Le but des différents essais était de comparer les résultats obtenus par la méthode de dosage indirecte par FRX avec les méthodes chromatographiques de référence :

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- la chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Résultats 1989. 315 échantillons expérimentaux, provenant d'essais variétés récoltés manuellement ont été étudiés. Les résultats ont été regroupés par zone géographique (Tableau 1).

Au niveau national, on se rend compte que si les valeurs moyennes ne sont pas très différentes (CPG = 30,6 ; FRX = 33,1), elles cachent des différences importantes au niveau des régions, la FRX donnant généralement des résultats plus élevés sauf dans le Nord-Est.

Il est difficile de mettre en cause la calibration de l'appareil car les résultats moyens obtenus chaque jour sur 2 témoins internes, insérés dans les analyses de routine, montrent une bonne concordance entre FRX et CPG après 72 mesures (échantillon 1 : CPG = 47,3 - FRX = 48,6 ; échantillon 2 : CPG = 32,7 - FRX = 33,6).

L'étude a été reprise en 1990, en modifiant le principe de l'étalonnage de l'appareil (voir méthodes).

Résultats 1990. Les résultats obtenus sur 84 échantillons expérimentaux provenant d'essais variétés ont été regroupés par zone géographique (Tableau 2). De plus, il a été procédé à une détermination de la teneur en protéines des graines, l'influence éventuelle de ce paramètre ayant été signalée. Une déviation de 1 % (m/m) de la teneur en protéines, par rapport à la qualité normale de 22 %, conduirait lors de la mesure des GLS par FRX à une erreur maximale de 2 µmoles/g (Schnug et Haneklaus 1988). Les

Tableau 1. Mesure comparative des GLS par CPG et FRX

Région d'origine	Nbre éch. analysés	Coef. Corrél.	Méth.	GLS en $\mu\text{moles/g}$ à 7 % d'eau		
				Valeurs extrêmes en $\mu\text{moles/g}$	Valeurs moyennes en $\mu\text{moles/g}$	D
Sud-Ouest Méditerranéen	18	0,910	CPG	7,7 - 77,7	29,8	+ 4,9
			FRX	9,5 - 62,1	34,7	
Sud-Ouest Atlantique	23	0,942	CPG	10,0 - 72,2	26,9	+ 8,0
			FRX	11,0 - 76,0	34,9	
Sud - Est	27	0,952	CPG	10,9 - 79,4	29,7	+ 4,7
			FRX	12,8 - 72,8	34,4	
Centre - Centre-Est	65	0,946	CPG	10,0 - 79,8	29,0	+ 2,4
			FRX	6,8 - 70,8	31,4	
Nord	71	0,925	CPG	6,2 - 82,4	28,9	+ 0,5
			FRX	0,1 - 92,3	29,4	
Nord - Est	56	0,954	CPG	8,5 - 88,5	34,6	- 0,6
			FRX	2,1 - 88,3	34,0	
Centre Centre-Ouest	55	0,957	CPG	11,5 - 89,6	32,6	+ 4,6
			FRX	7,7 - 85,0	37,2	
France entière	315	0,934	CPG	6,2 - 89,6	30,6	+ 2,5
			FRX	0,1 - 92,3	33,1	

Tableau 2. Comparaison des teneurs en GLS mesurées par CPG et FRX avec ou sans correction par la teneur en protéines

Région	GLS en $\mu\text{moles/g}$ à 9 % d'eau					
	CPG	FRX (B)	D1 (1)	Teneur en protéines %	FRX (C)	D2 (1)
Ouest	29,68	36,79	+ 7,11	22,48	33,62	+ 3,94
Centre-Est	27,20	27,06	- 0,14	20,20	28,01	+ 0,81
Est	29,30	28,76	- 0,54	20,62	29,31	+ 0,01
Nord	25,49	21,81	- 3,68	18,26	27,35	+ 1,86
Centre	25,38	25,69	+ 0,31	22,00	23,49	- 1,89
Sud-Ouest	24,84	29,61	+ 4,77	23,27	24,35	- 0,49
Moyenne nationale	26,98	28,28	+ 1,30	21,13	27,77	+ 0,79

(1) D1 = FRX (B) - CPG

D2 = FRX (C) - CPG

corrections des teneurs brutes en GLS (FRX (B)) ont donc été effectuées (FRX (C) = teneurs corrigées).

Au niveau des résultats moyens, région par région, on retrouve des différences de comportement très marquées pour les résultats bruts. Dans l'Ouest et le Sud-Ouest, la FRX donne des résultats plus élevés, dans les autres régions, mis à part le Nord, CPG et FRX donnent des résultats proches. Dans le même temps, les teneurs en protéines varient de 18,26 à 23,27 % d'une manière inverse à la différence entre CPG et FRX ($r = 0,59$). La correction des teneurs en GLS brutes, en tenant compte de la teneur en protéines, diminue les écarts entre les deux méthodes, en particulier dans les régions où les teneurs en protéines sont les plus élevées (Ouest et Sud-Ouest) ou les plus faibles (Nord). Ceci se traduit également par une amélioration de la corrélation entre la CPG et la FRX qui passe de 0,966 à 0,979.

L'utilisation d'une nouvelle calibration et la correction due aux protéines ont amélioré d'une manière sensible les résultats par rapport à 1989.

Comparaison des résultats obtenus par CLHP et FRX

Il était important d'avoir cette comparaison avec la nouvelle méthode de référence de la CCE. Des comparaisons ont été réalisées dans le cadre d'un circuit d'intercomparaison organisé par l'ISO et le BCR sur 3 échantillons (Wathelet et al. 1991). Dans ce cadre, les résultats obtenus par FRX sont légèrement inférieurs. Dans notre laboratoire l'analyse de 250 échantillons de graines (5 variétés) est en cours et permettra d'apporter des éléments complémentaires.

Influence de la teneur en soufre et en acides aminés

Des premières mesures réalisées sur un nombre restreint d'échantillons (Tableau 3) montrent que la quantité de soufre provenant des acides aminés soufrés (méthionine + cystéine) est relativement constante comparée à la variabilité des teneurs en soufre provenant des GLS (surtout dans le cas de teneurs élevées). Les écarts importants entre les méthodes ne correspondent pas à des échantillons présentant des teneurs élevées ou faibles en acides aminés. La corrélation entre les écarts chromatographie-FRX et la quantité de soufre apportée par les acides aminés soufrés n'est pas très élevée ($r = 0,29$).

Analyses commerciales

Les résultats précédents ont été obtenus sur des échantillons expérimentaux correspondant à des variétés cultivées sur des surfaces réduites. Ces échantillons sont probablement plus contrastés que ceux issus de lots commerciaux de plusieurs tonnes de graines récoltées sur des surfaces importantes. Des analyses comparatives effectuées sur de tels échantillons (les teneurs en protéines n'ont pas été mesurées) montrent que les résultats sont moins divergents (Tableau 4), l'écart maximal étant de 4 $\mu\text{moles/g}$.

CONCLUSION

La spectrométrie de fluorescence X est une méthode rapide permettant une détermination aisée de la teneur en glucosinolates des graines de colza. Les résultats obtenus sur des échantillons expérimentaux montrent qu'il peut y avoir des écarts importants avec les résultats provenant d'analyses chromatographiques (CPG ou CLHP). Ces écarts ne sont pas dus à un biais d'étalonnage de l'appareil, puisqu'ils sont indifféremment par excès ou par défaut. Par contre, ils semblent liés à la teneur en protéines des graines ; une correction en fonction de cette teneur améliore les résultats, mais un tel procédé est difficilement envisageable car il enlève à la méthode son avantage essentiel : la rapidité.

Dans le cas d'analyses de lots commerciaux, correspondant à des mélanges de graines d'origines variables, et probablement plus constants dans leur composition chimique, les différences entre méthodes sont peu importantes.

La FRX peut être utilisée en routine pour des analyses commerciales de lots importants, en cas de litige, une analyse chromatographique permettra de connaître la valeur de référence. En revanche, elle est difficilement utilisable en analyses de recherche sur des échantillons expérimentaux. Dans ce dernier cas, il faudrait procéder à des corrections pour tenir compte de la teneur en protéines, ce qui n'est pas compatible avec un résultat fiable et la rapidité de la méthode.

REFERENCES

CEC experts group. 1987. WATHELET, J.P., BUCHNER, R., THIES, W.T., BJERG, B., SORENSEN, H., QUINSAC, A., RIBAILLIER, D., HEANEY, R.K., SPINKS, E.A. and MUUSE, B.G. Determination of the content of individual glucosinolates in rapeseed using HPLC. Report to CEC, 26 p.

HEANEY, R.K. and FENWICK, G.R. 1980. The analysis of glucosinolates in *Brassica* species using gas chromatography. Direct determination of the thiocyanate precursors, glucobrassicine and neoglucobrassicine. *J. Sc. Food. Agric.* 31: 593-599.

HEANEY, R.K. and FENWICK, G.R. 1981. A micro column method for the rapid determination of total glucosinolates content of cruciferous material. *Z. Pflanzenzücht.*, 87: 89-95.

ISO 1990. Graines oléagineuses. Détermination de la teneur totale en glucosinolates des graines de colza. 2ème partie : méthode par spectroscopie de fluorescence X. ISO DP 9167, 4 p.

RENARD, M., BERNARD, C., DESCHAMPS, M., FURSTOSS, V., LILA, M., QUINSAC, A., REGNIER, J.M. et RIBAILLIER, D. 1987. Glucosinolates analysis in whole rapeseed by near infrared reflectance spectroscopy. In : *Glucosinolates in rapeseeds. Analytical aspects* Wathelet J.P. (ed) Nijhoff M. (pub.) pp. 173-176.

RIBAILLIER, D. 1989. Fast methods in the analysis of oleaginous seeds during plant breeding. In : *Proceedings of XII Eucarpia Congress. February 27-march 4, 1989. Göttingen. Part II*, pp. 316-317.

RIBAILLIER, D. et QUINSAC, A. 1988. Le dosage des glucosinolates à la réception des graines de colza. *Bulletin CETIOM.* 97: 11-13.

RIBAILLIER, D., QUINSAC, A., KROUTI, M. 1987. X-Ray fluorescence spectrometry: a rapid method to determine glucosinolates content in rapeseed. In : *Proceedings of Euro Food Chem V. Versailles, France, September 27-29, 1989* pp. 287-291.

SCHNUG, E. und HANEKLAUS, S. 1987. Indirekte Bestimmung des Gesamtglucosinolatgehaltes von Rapssamen mittels Röntgenfluoreszenzanalyse. *Z. Fresenius Anal. Chem.* 326: 441-445.

SCHNUG, E. and HANEKLAUS, S. 1988. Theoretical principles for the indirect determination of the total glucosinolate content in rapeseed and meal quantifying the sulphur concentration via X-ray fluorescence (X-RF method). *J. Sc. Food Agric.* 45: 243-254.

WATHELET, J.P., QUINSAC, A., MARLIER, M., SEVERIN, M., RIBAILLIER, D. and WAGSTAFFE, P.J. 1991. Collaborative studies organized by ISO and the Community Bureau of Reference (BCR-CEE) to improve analytical methods concerning glucosinolates in rapeseed. 8ème Congrès International sur le colza. Saskatoon, Canada, 9-11 Juillet 1991. A paraître.

Tableau 3. Influence de la teneur en soufre des graines sur les écarts entre méthode FRX et CLHP

Echantillon	GLS umoles/g à 9 % d'eau			Soufre en umoles/g de tourteau sec provenant	
	FRX	CLHP	D	GLS	A.Aminés
1	17,6	15,2	+ 2,3	30,3	77,9
2	21,6	19,3	+ 2,3	38,5	77,9
3	38,8	33,3	+ 5,5	66,5	85,9
4	18,7	10,3	+ 8,4	20,6	84,2
5	70,3	79,3	- 9,0	158,5	82,2
6	41,2	36,5	+ 4,7	72,9	90,0
7	26,2	21,2	+ 5,0	42,5	77,7
8	70,8	80,0	- 9,2	160,0	78,0
9	13,6	15,5	- 1,9	31,0	80,9
10	15,2	11,6	+ 3,6	23,1	86,7
11	17,2	11,6	+ 5,6	23,2	79,4

Tableau 4. Analyses d'échantillons commerciaux (résultats moyens de 3 laboratoires)

Lots	GLS en μ moles/g à 9 % d'eau		
	FX	CPG (1-11) CLHP (12-15)	D
1	58	61	- 3
2	31	30	+ 1
3	24	22	+ 2
4	52	54	- 2
5	26	24	+ 2
6	29	30	- 1
7	52	54	- 2
8	28	28	0
9	56	54	+ 2
10	28	27	+ 1
11	30	31	- 1
12	25	23	+ 2
13	104	108	- 4
14	73	76	- 3
15	71	73	- 2
Moyenne	45,8	46,3	- 0,5