

SYNTHÈSE ET RECHERCHE DES PRODUITS DE DÉGRADATION DES GLUCOSINOLATES

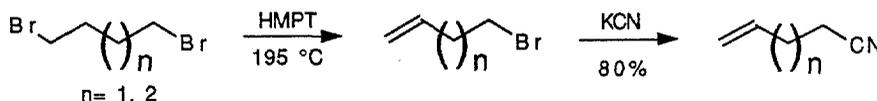
C. Gardrat(1), L. Latxague(1), J.L. Coustille(2)

(1) Université Bordeaux I, 351 Cours de la Libération
33405 Talence Cedex, FRANCE(2) Institut des Corps Gras, rue Monge
33600 Pessac, FRANCEINTRODUCTION

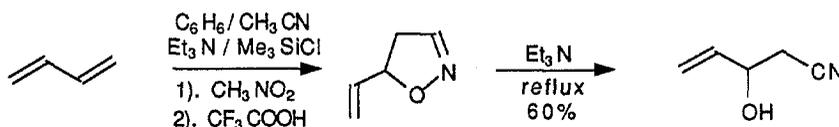
Les glucosinolates conduisent, sous l'action de la myrosinase, à différents produits dont la toxicité a été montrée chez l'animal (Tookey et al. 1980; VanEtten et Tookey 1983). Les objectifs des travaux qui sont présentés dans ce mémoire ont été de préparer les principaux produits de dégradation des glucosinolates aliphatiques et de rechercher leur présence éventuelle dans les tourteaux de colza. Pour les glucosinolates indoliques, l'étude de la dégradation enzymatique de la glucobrassicine sera décrite, ce produit étant désormais accessible par synthèse (Viaud et Rollin 1990).

RESULTATSObtention des principaux produits de dégradation des glucosinolates aliphatiques et aromatiques

Les nitriles issus de la gluconapine (pent-4-ène nitrile) et de la glucobrassicinapine (hex-5-ène nitrile), ont été synthétisés par action du cyanure de potassium sur les ω -bromo alcènes correspondants selon le schéma réactionnel suivant:



Le nitrile correspondant à la progoitrine est d'un accès plus difficile. Nous avons tenté à plusieurs reprises une substitution nucléophile à l'aide de cyanure de potassium sur le dérivé bromé correspondant (1-bromobut-3-én-2-ol), mais sans obtenir les résultats attendus, même en présence d'éther-couronne. Nous avons dû nous tourner vers une méthode de synthèse indirecte (Das et Torssell 1983), consistant à porter au reflux, un mélange 2:1 de triéthylamine et de 5-vinyl-2-isoxazoline:



Le 3-phénylpropionitrile correspondant à la gluconasturtine, est disponible dans le commerce. Tous ces nitriles possèdent une odeur forte et désagréable.

Les isothiocyanates (ITC) de but-3-ényle et de pent-4-ényle issus de la gluconapine et de la glucobrassicinapine ont été préparés par réaction en milieu basique du thiophosgène sur les amines obtenues par réduction des ω -cyano alcènes corres-

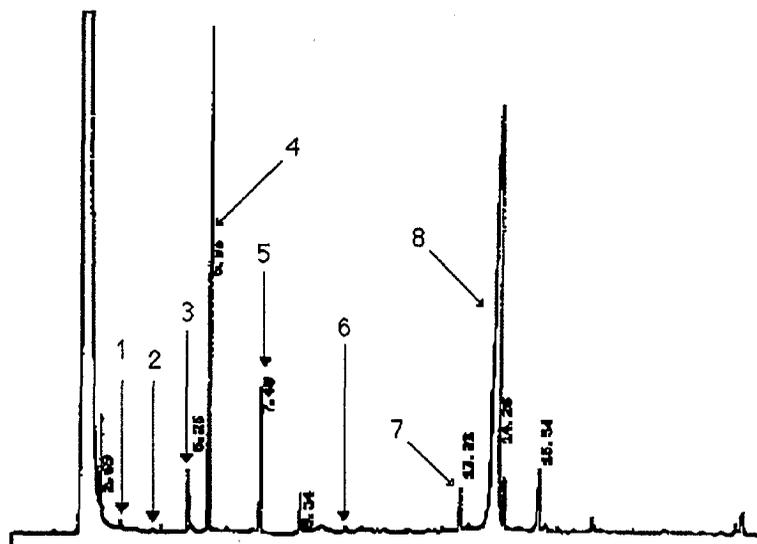


Fig. 1. Identification de produits de dégradation enzymatique des glucosinolates (colza Bienvenu, pH 7).

Produits: 1: pent-4-ène nitrile; 2: hex-5-ène nitrile; 3: 3-hydroxy pent-4-ène nitrile; 4: isothiocyanate de but-3-ényle; 5: isothiocyanate de pent-4-ényle; 6: 3-phényl propionitrile; 7: isothiocyanate de 2-phénéthyle; 8: goitrine.

Conditions de l'analyse chromatographique:

Colonne DB5, 30 m, Φ 0.32 mm, μ 0.2 μ m, gaz vecteur He 0.3 bar, 50° à 200°C à 10°C/min, Injecteur 250°C, détecteur TID 707°C.

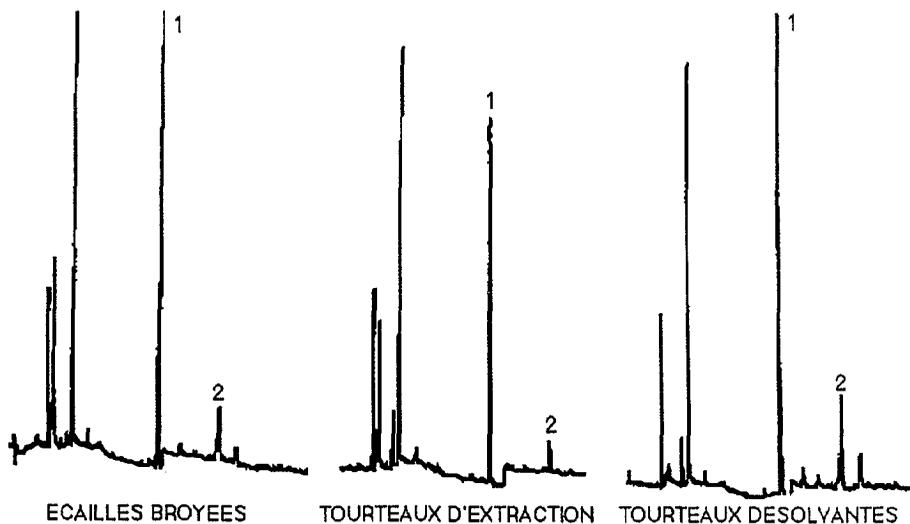


Fig. 2. Nitriles volatils dans des tourteaux de colza DARMOR
1: pent-4-ène nitrile; 2: hex-5-ène nitrile.

Conditions expérimentales: Platine DCI-GIRDEL (200 mg de tourteaux; désorption: 10 mn à 60°C) Colonne capillaire: Carbowax 400, 80°C. Détection: TID.

Un dosage de ces nitriles peut être réalisé par étalonnage externe (Gardrat et al. 1988). Les teneurs les plus élevées sont rencontrées dans les tourteaux désolvantés. Elles peuvent atteindre plusieurs centaines de ppm. Cependant, l'exposition à l'air des tourteaux favorise l'élimination des nitriles volatils (Gardrat et al. 1988).

Dégradation de la glucobrassicine par voie enzymatique et par voie thermique

Les glucosinolates indoliques constituent l'essentiel de la composition en glucosinolates des nouvelles variétés de colza 00. La dégradation de ces composés a été relativement peu étudiée (McDannell et al. 1988).

Le représentant le plus simple, la glucobrassicine, a été récemment synthétisée (Viaud et Rollin 1990).

La dégradation enzymatique de la glucobrassicine synthétique a été réalisée en milieu aqueux en présence de myrosinase à pH 3 et 7. Après extraction et silylation, les produits de dégradation ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire à l'aide d'un détecteur TID (Fig. 3). Par comparaison des temps de rétention avec ceux de produits de référence (méthode des ajouts) et par couplage CPG/spectrométrie de masse, trois produits organiques (3-indolylméthanol, 3-indolylacétonitrile et 3,3'-diindolylméthane) ont été mis en évidence.

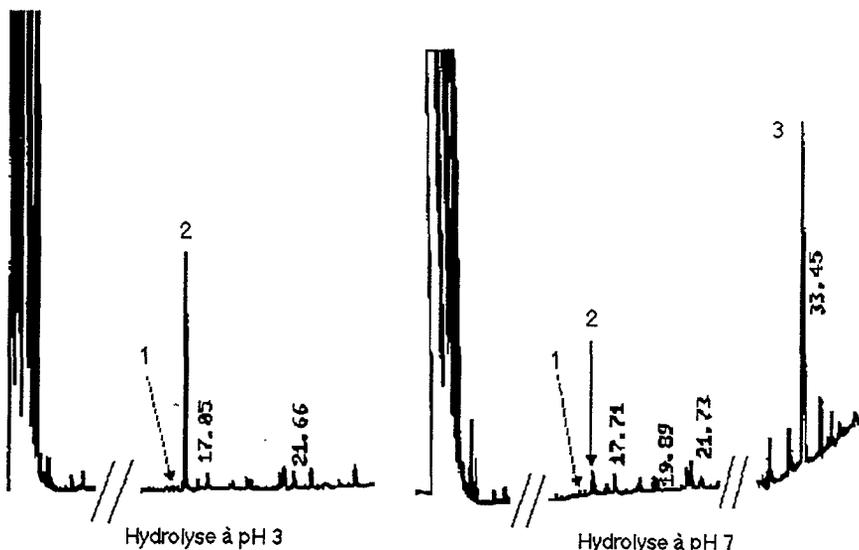


Fig.3. Produits d'hydrolyse enzymatique de glucobrassicine synthétique. 1: 3-indolylméthanol; 2: 3-indolylacétonitrile; 3: 3,3'-diindolylméthane.

Conditions de l'analyse chromatographique:
Colonne SE30 (CB), 25 m, Φ 0.32 mm, μ 0.2 μ m, gaz vecteur H₂
0.3 bar, 100° à 280°C à 5°C/min, Injecteur, détecteur 320°C.

L'influence du pH sur la formation de ces dérivés est très importante: à pH 3 on n'obtient pratiquement que le nitrile alors qu'à pH 7 on n'observe pratiquement que la présence du 3,3'-diindolylméthane provenant de l'autocondensation du 3-indolylméthanol, lui-même issu de l'isothiocyanate corres-

pendant très instable. Le schéma de dégradation observé pour la glucobrassicine synthétique (Fig. 4) est identique à celui qui a été précédemment décrit pour la dégradation de la glucobrassicine d'origine naturelle (McDannell et al. 1988).

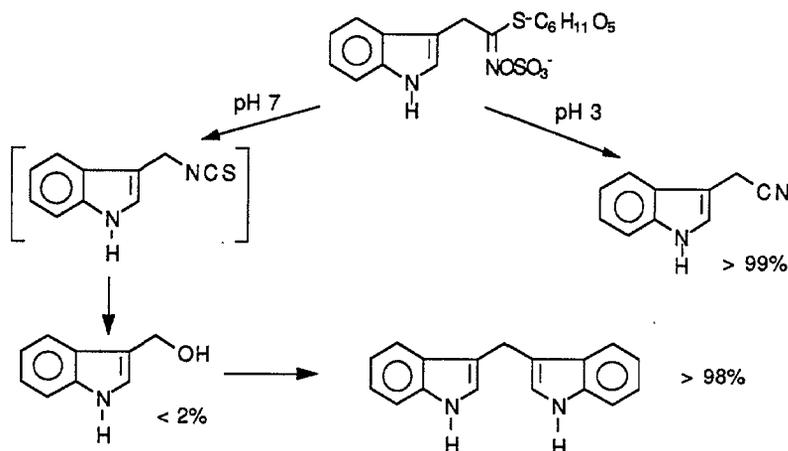


Fig. 4. Schéma de dégradation enzymatique de la glucobrassicine

Le chauffage des graines de colza entraîne la diminution de la teneur en glucosinolates en raison de la dégradation de ces composés (voir par exemple Gardrat et al. 1988; Gardrat et Mesnard 1990). En général, des nitriles sont obtenus avec les glucosinolates aliphatiques et aromatiques (McLeod et al. 1981). La dégradation de la glucobrassicine devrait conduire à la formation du 3-indolylacétonitrile. Ce dernier a été mis en évidence dans un tourteau de colza Darmor préalablement chauffé à 145°C pendant 15 heures: après extraction au dichlorométhane et silylation du résidu obtenu, l'analyse par CPG sur colonne capillaire a été réalisée à l'aide d'un détecteur TID (Gardrat et Coustille 1989). Le même type de résultats a été décrit par des auteurs canadiens (Slominski et Campbell 1988).

CONCLUSION

Les principaux produits de dégradation des glucosinolates aliphatiques ont été préparés par des voies souvent originales. Leur recherche a été effectuée dans des tourteaux de colza hydrolysés par la myrosinase à différents pH, à l'aide de la CPG en utilisant des colonnes capillaires et un détecteur thermoionique. La confirmation de la présence de ces composés a été réalisée par couplage CPG/spectrométrie de masse. La présence effective de nitriles volatils (issus de la gluconapine et de la glucobrassicinapine) dans les tourteaux de colza (plus particulièrement à la sortie du désolvant-toaster) a été mise en évidence et un dosage par espace de tête dynamique a été proposé. Le chauffage des graines, tout en diminuant considérablement la teneur en glucosinolates, favorise la formation de nitriles. La présence du 3-indolylacétonitrile a été prouvée par CPG équipée d'un détecteur thermoionique. La dégradation enzymatique de glucobrassicine synthétique a permis de confirmer l'existence de deux mécanismes différents selon le pH (neutre ou acide).

REFERENCES

- DAS, N.B. et TORSSELL, K.B.G. 1983. Silyl nitronates, nitrile oxides and derived 2-isoxazolines in organic synthesis. Functionalization of butadiene, a novel route to furans and 2-isoxazolines as an alternative to aldol-type condensation. *Tetrahedron* 39: 2247-53.
- GARDRAT, C., COUSTILLE, J.L., GAUCHET, C. et PREVOT, A. 1988. Dégradation des glucosinolates au cours du processus technologique de traitement des tourteaux de colza. Identification et dosage de nitriles volatils. *Rev. Frse. Corps Gras* 35: 99-104.
- GARDRAT, C. et COUSTILLE, J.L. 1989. Identification of 3-indolylacetonitrile in rape seeds. *J. High Res. Chrom.* 12: 626-627.
- GARDRAT, C. et MESNARD, S. 1990. Dosage des glucosinolates dans les graines et les tourteaux de colza: réexamen de la méthode via le glucose. *Rev. Frse. Corps Gras* 37: 91-96.
- GARDRAT, C., LATXAGUE, L. et PICARD, J.P. 1990. A new synthesis of DL-5-vinylloxazolidine-2-thione, a natural antithyroid factor. *J. Heterocyclic Chem.* 27: 811-812.
- McDANELL, R., McLEAN, A.E.M., HANLEY, A.B., HEANEY, R.K. et FENWICK, G.R. 1988. Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins): a review. *Fd. Chem. Toxic.* 26: 59-70.
- McLEOD, A., PANESAR, S.S. et GIL, V. 1981. Thermal degradation of glucosinolates. *Phytochemistry* 20: 977-980.
- SLOMINSKI, B.A. et CAMPBELL, L.D. 1988. Gas chromatographic determination of indoleacetonitriles in rapeseed and Brassica vegetables. *J. Chrom.* 454: 285-291.
- TOOKEY, H.L., VanETTEN, C.H. et DAXENBICHLER, M.E. 1980. Glucosinolates. In: *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Liener (ed.). Academic Press, New York. pp. 103-142.
- VIAUD, M.C. et ROLLIN, P. 1990. First synthesis of an indole glucosinolate. *Tetrahedron Lett.* 31: 1417-18.
- VanETTEN, C.H. et TOOKEY, H.L. 1983. Glucosinolates. In: *CRC Handbook of Naturally Occurring Food Toxicants*. CRC Press Inc., Boca Raton. pp. 15-30.