

EXTRACTION ET DOSAGE DE LA 5-VINYL-1,3-OXAZOLIDINE-2-THIONE (5-VOT)
DANS DES FLUIDES ET TISSUS BIOLOGIQUES

A. Quinsac (1), M. Dreux (2), D. Ribaillier (1)

(1) Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains, Avenue de la
Pomme de Pin, 45160 Ardon, FRANCE(2) Laboratoire de Chimie Bioorganique et Analytique, Rue de Chartres,
45000 Orléans, FRANCEINTRODUCTION

Le colza, source importante de protéines pour l'alimentation animale, a vu sa qualité nutritionnelle augmenter de manière sensible avec l'apparition de nouvelles variétés à teneur abaissée en glucosinolates (colza 00). En effet, sous l'action d'une enzyme endogène, la myrosinase, ou de la flore bactérienne de l'animal, ces composés peuvent être hydrolysés et donner des produits aux propriétés antinutritionnelles (Astwood et al. 1949, Greer and Deeney 1959). Le plus important semble être la 5-VOT car son action, par inhibition des hormones thyroïdiennes, provoque un fort dérèglement du métabolisme (Fenwick et al. 1983) qui est la cause principale de la diminution des performances zootechniques. De plus, le précurseur de la 5-VOT, le 2-hydroxybut-3-ényl glucosinolate ou progoitrine, reste le glucosinolate le plus abondant dans les nouvelles variétés de colza 00.

Malgré la baisse de la teneur en glucosinolates des tourteaux de colza, leur utilisation accrue dans les rations révèle encore des effets préjudiciables au rendement et à la qualité des produits des élevages. La diminution de la teneur en glucosinolates dans le colza pouvant être limitée par les exigences physiologiques de la plante (Clossais-Besnard 1991), la connaissance du métabolisme des glucosinolates et de ses produits de dégradation doit permettre de définir les conditions d'une meilleure assimilation ou d'une moindre sensibilité chez l'animal. Dans ce but, des analyses fines de ces produits doivent être réalisées sur les animaux et en particulier sur les organes cibles tels que le foie, la thyroïde, les reins, ainsi que sur les fluides physiologiques : plasma, urine et éventuellement lait (De Brabander and Verbeke 1986, Josefsson and Akerström 1979).

Une méthode d'analyse de la 5-VOT par chromatographie liquide haute performance (CLHP) est présentée. L'extraction de la 5-VOT est réalisée par l'action d'acétate de phénylmercure (PMA) dans le cyclohexane. Cet agent complexant particulièrement puissant a été utilisé précédemment (De Brabander and Verbeke 1982, 1986, Quinsac and Dreux 1991) sur des échantillons biologiques. La 5-VOT est ensuite décomplexée, purifiée, concentrée et analysée par CLHP à polarités de phases inversées avec élution isocratique et détection UV.

Des échantillons de plasma, foie, rein, thyroïde et muscle de poulets nourris avec du tourteau de colza sont analysés. Leur traitement préalable est étudié afin d'éviter les pertes de 5-VOT par dégradation ou rétention dans la matrice biologique.

MATERIEL ET METHODESMatériel

Appareillage CLHP composé d'une pompe modèle 64 (Knauer, Berlin, RFA), d'une vanne d'injection modèle 7125 (Rheodyne, Cotati, USA) avec boucle de 20 μ l, d'un spectrophotomètre UV à longueur d'onde variable, modèle 87 (Knauer), d'une colonne chromatographique Lichrospher C8 5 μ 125 x 4 mm avec raccords Manucart (Merck, Darmstadt, RFA), d'un intégrateur enregistreur modèle C-R3A (Shimadzu, Kyoto,

Japon). Agitateur à mouvement alternatif, type Broyeur Dangoumau (fréquence d'agitation : 350 va-et-vient/min, amplitude du mouvement : 40 mm, avec pot de 65 ml en acier inoxydable, Prolabo, Paris). Système de préparation d'échantillons par chromatographie sur phase solide comprenant un dispositif d'élution par aspiration (modèle 10-SPE cat. n° 7018-0 Baker, Deventer, Pays Bas) et des cartouches remplies avec 200 mg de silice greffée C18 40 μm (cat n° 7020-1 Baker). Système de concentration par évaporation du solvant par balayage d'azote (Reacti Vap Evaporator, cat n° 18780 Pierce, Rockford, USA). Centrifugeuse 5000 t/min MLW T5 (Bioblock Scientific, Illkirch, France), tubes en verre 100 x 16 mm avec bouchon à vis et capsule téflon.

Produits

Pour l'extraction de la 5-VOT. Solution de phénolphthaléine (Merck) à 0,1 % dans l'éthanol. Solution d'hydroxyde de sodium (Merck) à 5 % dans l'eau. Solution de thiosulfate de sodium (Merck) 0,1 M dans l'eau. Solution saturée d'acétate de phénylmercure (PMA) dans le cyclohexane et préparée de la manière suivante : dans un ballon de 250 ml, environ 100 mg d'acétate de phénylmercure (Merck) et 150 ml de cyclohexane (Merck) sont chauffés à reflux pendant 30 min, puis après refroidissement, la solution est passée à travers une membrane filtrante en téflon de 0,22 μm . La solution est conservée à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Pour la purification des extraits par chromatographie sur phase solide. Méthanol pour chromatographie (SDS, Peypin, France). Acétonitrile pour chromatographie (Merck) à 70 % (V/V) dans l'eau.

Pour l'analyse par CLHP. Acétonitrile pour chromatographie (Merck) à 10 % (V/V) dans l'eau.

Solutions standards. 5-vinyl-1,3-oxazolidine-2-thione (5-VOT) (National Physical Laboratory, Teddington, G.B.) à 100 ppm dans l'eau, 4,4-diméthyl-1,3-oxazolidine-2-thione (4,4-DMOT) à 100 ppm dans l'eau. Ces solutions sont diluées en fonction des échantillons à analyser. La 4,4-DMOT joue le rôle d'étalon interne ; elle est synthétisée par condensation de CS₂ sur le 2-amino-2-méthylpropan-1-ol dans le dioxane (Skulski et al. 1956).

Méthodes

Préparation des échantillons. Immédiatement après leur prélèvement, les organes sont congelés puis lyophilisés (excepté le plasma) et conservés à -18°C. Les échantillons de foie, de muscle sont pulvérisés au broyeur à billes Dangoumau ; les échantillons de reins et de thyroïde sont divisés à l'aide d'un scalpel en fragments d'environ 2 ou 3 mm de dimensions. La prise d'essai (200 mg pour le foie, le rein, le muscle ; 50 mg pour la thyroïde, 0,5 ml pour le plasma) est placée dans un tube pyrex 16 x 100 mm. Après un préchauffage pendant 5 min dans un bain d'eau bouillante, 3 ml d'eau à 95°C sont versés dans le tube. L'étalon interne est ajouté à raison de 0,2 ml de solution de 4,4-DMOT à 100 ppb pour le foie et le rein ; 0,1 ml à 1 ppm pour le muscle ; 0,5 ml à 1 ppm pour la thyroïde ; 0,5 ml à 100 ppb pour le plasma. Le chauffage est maintenu pendant 10 min après agitation par vortex pour l'extraction du plasma et du foie et après homogénéisation par Ultra-Turrax pendant 1 min pour l'extraction du rein, du muscle et de la thyroïde. Les extraits sont ensuite refroidis et centrifugés à 5000 t/min pendant 5 min. Le surnageant est récupéré et placé dans un tube 16 x 100 mm.

Extraction par complexation-décomplexation. Après addition d'une goutte de solution de phénolphthaléine, le contenu du tube est amené à pH basique (coloration rose) avec la solution d'hydroxyde de sodium. On verse ensuite 3 ml de solution saturée en PMA dans le tube, que l'on place dans le dispositif agitateur pendant 2 min, puis dans la centrifugeuse pendant 5 min à 5000 t/min. La phase cyclohexanique est transférée dans un autre tube (100 x 16 mm) dans lequel on ajoute 3 ml de solution de thiosulfate

de sodium 0,1 M. Après agitation manuelle vigoureuse (15 s) et centrifugation (5 min à 5000 t/min) la phase aqueuse prélevée est prête pour l'analyse par CLHP dans le cas d'échantillons de thyroïde et de muscle. Pour les analyses de foie, rein, plasma, le thiosulfate de sodium doit être préalablement éliminé.

Élimination du thiosulfate de sodium et concentration de la 5-VOT. Une cartouche contenant 200 mg de silice greffée C18 est lavée avec 2 ml de méthanol et 10 ml d'eau en évitant tout passage d'air. La solution à purifier (environ 2,5 ml) est déposée dans le réservoir de la cartouche, puis percolée. La phase C18 est lavée avec 1 ml d'eau pour éliminer le thiosulfate puis l'éluat de la 5-VOT est réalisée avec 0,5 ml d'acétonitrile à 70 % (V/V) dans l'eau. L'éluat recueilli est prêt pour l'analyse CLHP si la teneur en 5-VOT dans l'échantillon de départ est supérieure à 500 ppb sinon il faut concentrer la solution par évaporation avec un courant d'azote jusqu'à 50 μ l. On atteint alors, en injectant 20 μ l sur la colonne de CLHP, une limite de détection (rapport signal/bruit = 4) de 2,5 ppb. Une limite de détection inférieure peut être atteinte en augmentant le volume injecté (50 μ l) et en augmentant la prise d'essai (de 0,2 g à 1,0 g).

Analyse par CLHP. Elution en mode isocratique avec acétonitrile à 10 % (V/V) dans l'eau à un débit de 1 ml/min à température ambiante. Dans ces conditions, les temps de rétention de la 4,4-DMOT et de la 5-VOT, dont la détection a lieu en UV à 254 ou 241 nm, sont respectivement 4,3 min et 4,9 min (Fig. 1).

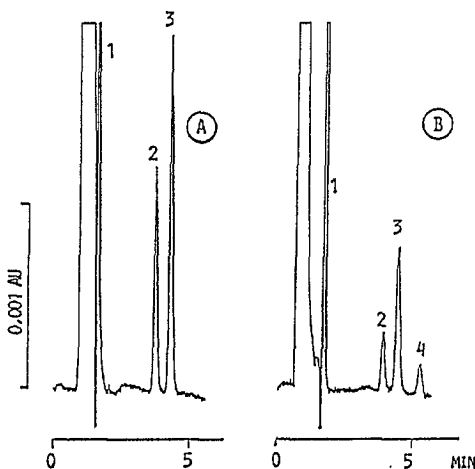


Fig. 1. Analyse par CLHP de 5-VOT dans le plasma (A) et le foie (B) de poulet. Identifications des pics :

1 : thiosulfate, 2 : 4,4-DMOT, 3 : 5-VOT, 4 : inconnu

Conditions : voir partie expérimentale

DISCUSSION

Préparation des échantillons

Les échantillons lyophilisés et décongelés ont subi des essais d'homogénéisation avant le prélèvement de la prise d'essai. Le broyeur à billes convient pour le foie et le muscle qu'il transforme en poudre fine mais est inadéquat pour le rein qui produit une pâte et pour la thyroïde qui se trouve en quantité trop faible. Pour ces deux organes, une homogénéisation en milieu liquide est préférable, la thyroïde étant analysée en totalité. Ces conditions sont aussi à recommander pour l'analyse du muscle afin

d'améliorer l'action du solvant. En revanche, avec le foie, des risques importants d'émulsion peuvent survenir et interdisent l'emploi de l'homogénéiseur.

Les analyses de fluides physiologiques réalisées par d'autres auteurs (Kreula and Kiesvaara 1959, Josefsson and Akerström 1979) ont montré l'instabilité de la 5-VOT dans de tels milieux. Nous avons vérifié ces résultats avec le plasma de poulet. En outre, une dégradation très rapide de la 5-VOT a été constatée pendant l'homogénéisation du foie par l'eau à température ambiante, ce qui s'explique aisément par la fonction de détoxification de cet organe. D'autres essais à température élevée montrent qu'avec des échantillons de plasma et de foie, les composés responsables de la dégradation de la 5-VOT sont inactivés par la chaleur (Tableaux 1 et 2). Dans ces conditions, le rendement de récupération d'ajouts dosés de 5-VOT dans le foie est supérieure à 90 % (Tableau 2). Ces résultats démontrent également la stabilité de la 5-VOT à la chaleur. L'utilisation de ce traitement peut être ainsi étendue à tous les échantillons analysés (Tableau 3).

Tableau 1. Teneurs en 5-VOT (ppb) mesurées sur deux échantillons de plasma A et B avec homogénéisation à 25°C et 95°C (1)

Echantillon	Plasma A		Plasma B	
	25°C	95°C	25°C	95°C
Teneur en 5-VOT (2)	106	158	56	104

(1) conditions décrites dans la partie expérimentale

(2) moyenne de deux déterminations

Tableau 2. Essais d'ajouts dosés de 5-VOT dans deux échantillons de foie de poulet avec homogénéisation par l'eau à 25°C et 95°C (1)

Température	25°C		95°C	
	0	100	0	100
Ajout 5-VOT (ppb)	0	100	0	100
Foie A	0	0	126	226
Foie B	0	0	241	331

(1) Conditions décrites dans la partie expérimentale

Extraction par complexation et décomplexation

L'emploi de solvants organiques classiques (dichlorométhane, éther de diéyle) pour l'extraction de la 5-VOT a été préconisé par de nombreux auteurs (Kreula and Kiesvaara 1959, Maheswari et al. 1979) mais le coût des solvants, leur faible sélectivité nous font préférer une extraction par complexation, plus spécifique et plus puissante (De Brabander and Verbeke 1982). Le PMA forme, à pH basique, avec la 5-VOT un complexe soluble dans le cyclohexane, milieu très peu polaire. Le déplacement de la 5-VOT du complexe par le thiosulfate de sodium en solution aqueuse ramène la 5-VOT dans un milieu aqueux. Ce transfert entre des phases de polarités très différentes assure à l'extraction une sélectivité très élevée. Les conditions optimales de ces réactions ont été déterminées (Quinsac and Dreux 1991) sur des échantillons de lait de truie et sont

convenables pour les échantillons dosés dans cette étude, comme le montrent les rendements de récupération d'ajouts dosés (Tableau 3).

Tableau 3. Essais d'ajouts dosés dans les différents milieux analysés avec homogénéisation à 95°C (1)

Echantillon	Ajout (ppm)	Teneur en 5-VOT (ppm)		Récupération %
		Avant ajout	Après ajout	
rein	0,100	0,248	0,335	87
muscle	0,500	0,40	0,88	96
thyroïde	5,000	8,30	12,9	92
foie A	0,100	0,126	0,226	100
foie B	0,100	0,241	0,331	90
plasma	0,100	0,144	0,232	88

(1) Conditions décrites dans la partie expérimentale

Élimination du thiosulfate de sodium et concentration

Lorsque les teneurs en 5-VOT sont inférieures à 500 ppb dans l'échantillon, le thiosulfate de sodium présent dans la solution analysée en CLHP induit un pic dont la traînée perturbe la détection et la mesure des pics de la 5-VOT et de l'étalon interne (4,4-DMOT). L'utilisation de cartouche d'extraction sur phase solide permet d'éliminer le thiosulfate et de récupérer la 5-VOT et la 4,4-DMOT en concentration quatre à cinq fois supérieure (Quinsac and Dreux 1991). Pour des échantillons à très faible teneur en 5-VOT, cette concentration peut être augmentée par évaporation sous courant d'azote.

Chromatographie liquide

La solution à analyser ne contenant que peu de composés à séparer (4,4-DMOT, 5-VOT, et éventuellement thiosulfate), une analyse très rapide en mode d'élution isocratique est réalisable. La grande sensibilité de l'analyse (0,2 ng sur colonne pour un rapport signal/bruit = 4) est due à la forte absorption de la 5-VOT dans l'UV ($\epsilon_{240} \approx 16000 \text{ l.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) et à la grande sélectivité des étapes d'extraction et de purification. La qualité des résultats des analyses est assurée par l'efficacité de l'extraction et l'emploi d'un étalon interne parfaitement adapté.

CONCLUSION

La détermination des conditions de la stabilité et de l'extraction complète de la 5-VOT des organes ou fluides biologiques a montré l'importance capitale que revêt le mode de préparation de l'échantillon. Les analyses révèlent la présence de 5-VOT dans tous les organes cibles de poulet nourri au tourteau de colza, à des teneurs non négligeables.

Ce type de dosage, grâce à sa sensibilité élevée, peut être utilisé pour des expérimentations sur petits animaux. La rapidité des opérations et la simplicité du matériel nécessaire le rendent accessible à tout laboratoire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient P. Rollin du Laboratoire de Chimie Bioorganique et Analytique, Orléans, FRANCE, pour la synthèse de 4,4-DMOT et M. Lessire de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Nouzilly, FRANCE, pour la fourniture des échantillons biologiques.

REFERENCES

ASTWOOD, E.B., GREER, M.A. and ETTLINGER, M.G. 1949. L-5-Vinyl-2-thioxazolidone, an antithyroid compound from yellow turnip and from Brassica seeds. J. Biol. Chem. 181: 121.

CLOSSAIS-BESNARD, N. 1991. Aspects analytiques et physiologiques de l'accumulation des glucosinolates chez le colza (Brassica napus L.). Thèse de doctorat n° 593. Université de Rennes, France. 110 p.

DE BRABANDER, H.F. and VERBEKE, R. 1982. Determination of oxazolidine-2-thiones in biological fluids in the ppb range. J. Chromatogr. 252: 225-239.

DE BRABANDER, H.F. and VERBEKE, R. 1986. Determination of 5-vinyl oxazolidine-2-thione residues in ruminant tissues. In : Proceedings of the 32th European Meeting of Meat Research Workers. Ghent. vol. 1, pp 45-48 .

FENWICK, G.R., HEANEY, R.K. and MULLIN, W.J. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 18: 123-201.

GREER, M.A. and DEENEY, J.M. 1959. Antithyroid activity elicited by the ingestion of pure progoitrin, a naturally occurring thioglucoside of the turnip family. J. Clin. Invest. 38: 1465-1474.

JOSEFFSON, E. and AKERSTRÖM, L. 1979. High performance liquid chromatographic method for the determination of 5-vinyl-2-oxazolidinethione in milk. J. Chromatogr. 174: 465-468.

KREULA, M. and KIESVAARA, M. 1959. Determination of L-5-Vinyl-2-thiooxazolidone from Plant Material and Milk. Acta Chem. Scand. 13: 1375-1382.

MAHESHWARI, P.N., STANLEY, D.W., GRAY, J.I. and VAN DE VOORT, F.R. 1979. An HPLC Method for Simultaneous Quantification of Individual Isothiocyanates and Oxazolidinethione in Myrosinase Digests of Rapeseed Meal. J. Amer. Oil Chem. Soc. 56: 837-841.

QUINSAC, A. and DREUX, M. 1991. Analysis of 5-vinyl-1,3-oxazolidine-2-thione by High Performance Liquid Chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (A paraître).

SKULSKI, M., GARMAISE, D.L. and MAC KAY, A.F. 1956. Structures and chemistry of the products from the reaction of amino alcohols with carbon disulfide. Can. J. Chem. 34: 81.