

## DOSAGE DE LA S-METHYLCYSTEINE SULFOXYDE ET AUTRES ACIDES AMINES LIBRES DANS LES CRUCIFERES

A. Quinsac, K. H. Dang, L. Bonange, C. Merle, D. Ribaillier

Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains

Avenue de la Pomme de Pin

45160 Ardon, FRANCE

INTRODUCTION

La S-méthylcystéine sulfoxyde (S-MCO) est un acide aminé libre présent dans les parties végétatives de certaines crucifères (chou, colza). Ingérée par des ruminants, la S-MCO est métabolisée par des bactéries du rumen en diméthylsulfure capable de réagir avec les composés réducteurs du plasma et de provoquer ainsi une anémie hémolytique (Barry et al. 1984). Cet effet bien connu (anémie du chou) a surtout été mis en évidence avec les colzas et choux fourragers (Paul et al. 1986 ; Fales et al. 1987; Griffiths et al. 1989) ; il a également été observé chez le chevreuil confronté en hiver à une alimentation très riche en feuilles de colza (Ondersheka et al. 1987). Récemment, l'apparition de variétés de colza à faible teneur en glucosinolates, et donc à faible répulsivité, a provoqué des consommations plus importantes et aggravé le phénomène.

La détermination des teneurs en S-MCO dans les parties végétatives des colzas "00" semble indispensable à la connaissance de l'impact de cette culture améliorée, sur la faune sauvage.

Nous avons donc développé une méthode dérivée de l'analyse classique des acides aminés, mais adaptée plus particulièrement au dosage de la S-MCO dans les extraits végétaux. Nous présentons une méthode très sensible et capable, de par sa sélectivité, d'isoler la (-)S-MCO, la (+)S-MCO et la S-méthylcystéine (S-MC) de tous les composés présents dans l'échantillon. Le principe de ce dosage repose sur la propriété de l'orthophthaldialdéhyde (OPA) de former avec les acides aminés primaires des dérivés fluorescents (Lindroth and Mopper 1979). Ceux-ci sont séparés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phases inverses avec une colonne C18 et un gradient d'élution par paliers.

MATERIEL ET METHODESMatériel

- Appareillage de CLHP, à gradient par paliers basse pression, constitué d'une pompe Knauer 52, d'électrovannes de sélection pour quatre éluants (Touzart et Maignon, Vitry sur Seine, France), d'un injecteur automatique Sedex 100 (Sedere, Vitry sur Seine, France), d'un détecteur de fluorescence LS-1 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA), d'une colonne Spherisorb ODS II 5 µm (250 x 4,6 mm) (A.M.L. Chromato, Peyrelade, France), d'une précolonne Lichrospher RP 18 5 µm (4 x 4 mm) (Lichrocart-Merck), d'un four à colonne Croco-Cil (Cluzeau-Info-Labo, Ste Foy la Grande, France), d'un enregistreur intégrateur C-R3A (Shimadzu, Kyoto, Japon) et d'un système de dégazage des solvants à l'hélium
- Micro-broyeur à couteaux Culatti (Bioblock-Scientific), agitateur magnétique multipostes (Bioblock-Scientific, Illkirch, France), filtres pour échantillons liquides 0,45 µm, D : 3 mm, Acro LC 3A Gelman Sciences (Osi, Paris, France)

### Produits

Tous les réactifs sont de qualité analytique. Acide chlorhydrique 37 % (UCB, Leuven, Belgique), ammoniacque 25 % (Merck, Darmstadt, Allemagne), citrate de sodium (Merck) o-phthalaldéhyde (Fluka, Buchs, Suisse), méthanol (CH<sub>3</sub>OH) pour CLHP (UCB), acétonitrile (ACN) pour CLHP (UCB), tétrahydrofurane (THF) pour CLHP (UCB), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O (UCB), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O (UCB), Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 10 H<sub>2</sub>O (Prolabo, Paris, France), 2-mercaptoéthanol (Serva, Heidelberg, Allemagne), S-méthyl-L-cystéine (S-MC) (Fluka), peroxyde d'hydrogène 33 % (Prolabo), résine échangeuse de cations Dowex 50 W-X8 (BIO-RAD, Richmond, USA) ; acide aspartique (ASP), acide glutamique (GLU), asparagine (ASN), glutamine (GLN), sérine (SER), thréonine (THR), arginine (ARG), alanine (ALA), glycine (GLY), acide 4-amino-n-butyrique (GABA), tyrosine (TYR), valine (VAL), phénylalanine (PHE), isoleucine (ILE), leucine (LEU), lysine (LYS), ornithine (ORN) (Merck) ; DL-4-fluorophénylalanine (FPHE) (Fluka).

### Méthodes

Préparation des échantillons végétaux et stockage. Les échantillons, feuilles et tiges, sont congelés dans l'azote liquide, dès la récolte puis lyophilisés. Ils sont stockés à -18°C et analysés avant trois mois. Le broyage est réalisé à l'aide d'un appareil à couteaux à passage continu pour éviter l'échauffement de l'échantillon.

Extraction de la S-MCO des échantillons à doser. Dans un bécher de 100 ml, 1 g d'échantillon broyé est extrait par 50 ml d'HCl 0,01 N pendant 2 heures à 4°C et sous agitation magnétique. L'étalon interne (0,5 ml de FPHE à 20 mM dans HCl 0,01 N) est ajouté au début de l'extraction. 1 ml d'extrait est prélevé et centrifugé à 5000 t/min. Le surnageant est filtré à 0,45 µm puis analysé en CLHP ou conservé à -18°C.

Préparation de la S-MCO pour étalonnage (selon Gustine 1985). 500 mg de S-méthyl-L-cystéine (S-MC) sont dissous dans 20 ml d'HCl 0,01 N. Un ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 33 % est ajouté, et le mélange est laissé à température ambiante pendant 24 heures. La S-MCO formée est fixée par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne Dowex 50W-X8, forme H<sup>+</sup>, de 200 x 10 mm et éluée par du citrate de sodium 0,2 M avec un gradient de pH 5,5 à pH 2,5. Les fractions éluées contenant la S-MCO sont identifiées par CLHP, puis passées de nouveau sur Dowex 50 W-X8 (200 x 10 mm), forme H<sup>+</sup>, afin d'éliminer le citrate. Après lavage par H<sub>2</sub>O, la S-MCO est éluée avec NH<sub>4</sub>OH 0,1 N puis lyophilisée.

Préparation des réactifs et éluants pour CLHP. Réactif de dérivation pré-colonne. 54 mg d'OPA sont dissous dans 1 ml de méthanol. 9 ml de tampon borate saturé à pH 9,5 et 0,1 ml de 2-mercaptoéthanol (2-ME) sont ajoutés. Le réactif conservé en flacons de 2 ml, sous azote à 4°C, doit être utilisé avant une semaine. Solution standard contenant 0,2 mMol/l de chaque acide aminé : ASP, GLU, ASN, GLN, SER, THR, S-MCO, ARG, ALA, GLY, GABA, VAL, TYR, PHE, ILE, LEU, FPHE, ORN, LYS, S-MC. Eluant A : ACN 9 %, tampon phosphate (50 mM, pH 6,6) 91 %. Eluant B : ACN 15 %, tampon phosphate (40 mM, pH 6,6) 85 %. Eluant C : THF 11 %, CH<sub>3</sub> OH 33 %, tampon phosphate (35 mM, pH 7,0) 56 %. Eluant D : CH<sub>3</sub> OH 60 %, tampon phosphate (10 mM, pH 7,0) 40 %. Tous les éluants sont filtrés à 0,22 µm avant utilisation et dégazés à l'hélium.

Analyse par CLHP. 100 µl de réactif sont ajoutés à 20 µl d'extrait à analyser. Après un temps de réaction de deux minutes, 20 µl du mélange sont injectés dans le chromatographe. Ces opérations sont réalisées par l'injecteur automatique. Les dérivés OPA sont séparés sur la colonne Sphérisorb ODS II 5 µm 250 x 4,6 mm, à 37°C avec le gradient d'éluion suivant : de 0 à 7 min : éluant A, de 7 à 29 min : éluant B, de 29 à 45 min : éluant C, de 45 à 53 min : éluant D, de 53 à 65 min : retour à l'éluant A. Le débit est de 1 ml/min. La détection fluorimétrique est effectuée avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 340 et 455 nm. Les coefficients de correction de

la réponse du détecteur pour les différents dérivés d'acides aminés sont calculés par analyse d'une solution standard contenant 0,2 mMol/l de chaque acide aminé (Fig. 1).

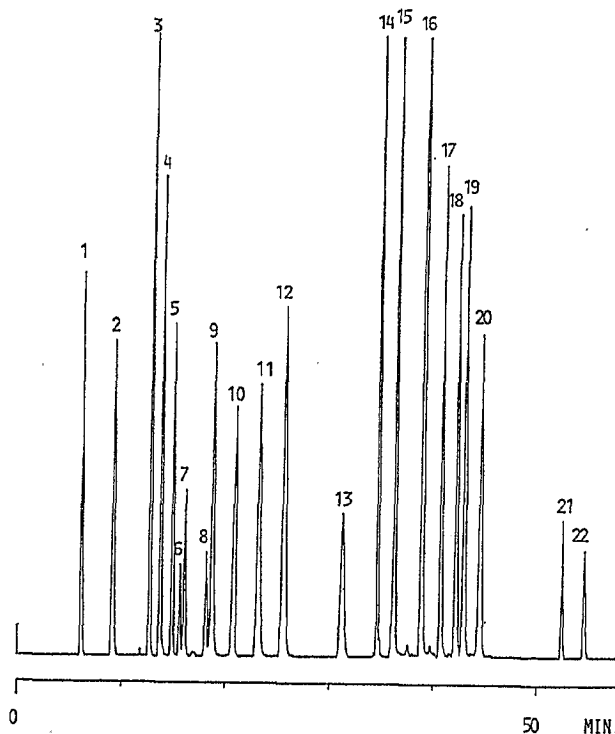


Fig. 1. Chromatogramme d'une solution standard d'acides aminés (0,2 mM)

Identification des pics : 1 : ASP ; 2 : GLU ; 3 : ASN ; 4 : SER ; 5 : GLN ;  
 6 : (+)S-MCO ; 7 : (-)S-MCO ; 8 : GLY ; 9 : THR ; 10 : S-MCO<sub>2</sub> ; 11 : ARG ;  
 12 : ALA ; 13 : GABA ; 14 TYR ; 15 : S-MC ; 16 : VAL ; 17 : PHE ;  
 18 : FPHE (étalon interne) ; 19 : ILE ; 20 : LEU ; 21 : ORN ; 22 : LYS

Conditions chromatographiques : voir partie expérimentale

### DISCUSSION

L'extraction de la S-MCO des échantillons naturels a été étudiée précédemment (Gosden 1979) : la S-MCO était extraite du chou par un tampon contenant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puis purifiée par échange d'ions. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était utilisé pour oxyder en S-MCO la S-MC éventuellement présente et non dosée par cette méthode. Nous avons modifié cette procédure car la technique chromatographique que nous décrivons permet la séparation de (+)S-MCO, (-)S-MCO, S-MC, S-MCO<sub>2</sub> et des autres acides aminés libres présents dans l'échantillon, rendant ainsi inutile la présence d'un agent oxydant. De plus, les sensibilité et sélectivité élevées de la détection fluorimétrique permettent l'analyse directe des extraits sans concentration ni purification. Quant à l'utilisation d'un

tampon, une étude de cinétique (Tableau 1) montre qu'avec 50 ml HCl 0,01 N par g d'échantillon lyophilisé et broyé, deux heures d'agitation à 4°C suffisent pour extraire la totalité de la S-MCO. Ces résultats sont aussi valables pour les autres acides aminés libres présents dans l'échantillon.

Tableau 1. Cinétique d'extraction de la S-MCO d'un échantillon de feuilles et tiges de colza par HCl 0,01 N (a)

| durée (min.)     | 30  | 60  | 120 | 180 |
|------------------|-----|-----|-----|-----|
| S-MCO (mg/g) (b) | 2,3 | 4,9 | 4,9 | 4,8 |
| Ecart-type       | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

(a) 50 ml/g de matière lyophilisée broyée avec agitation magnétique à 4 C

(b) Moyenne de 3 déterminations

Pour la préparation de solution étalon de S-MCO, le traitement de la S-MC par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 24 heures donne les deux diastéréoisomères de la S-MCO dans une proportion d'environ 35 % pour la (+)S-MCO et 65 % pour la (-)S-MCO. La S-méthylcystéine sulfone (S-MCO<sub>2</sub>) n'apparaît que si l'oxydation est prolongée (quatre jours), ce qui corrobore des résultats précédents (Gustine 1985).

La préparation décrite n'a pas permis l'isolement de (+)S-MCO et de (-)S-MCO ; nous avons donc utilisé le mélange pour le calcul des coefficients de correction en estimant identiques, dans le détecteur de fluorescence, la réponse des dérivés OPA de ces deux diastéréoisomères.

L'analyse par CLHP des extraits contenant la S-MCO a demandé quelques modifications de la méthode initialement prévue pour les acides aminés traditionnels. En effet, le plus souvent, les dérivés OPA des S-MCO (+) et (-) sont mal séparés des dérivés OPA de la glutamine ou de la sérine. Il faut alors modifier la nature de l'éluant, tout en conservant les séparations des dérivés des autres acides aminés et notamment de l'étalon interne. Le système de gradient basse pression avec sélection de quatre éluants permet de limiter les effets des modifications de solvants à la partie du chromatogramme où les dérivés d'acides aminés sont mal séparés. Nous avons étudié l'influence de la nature du solvant (méthanol, acétonitrile, THF) de l'éluant B sur la séparation des S-MCO (+) et (-) et d'autres acides aminés (Tableau 2). On observe que les ordres d'éluant sont très variables et que les différents dérivés OPA des acides aminés étudiés sont bien séparés, exceptés ceux de (+)S-MCO et S-MCO<sub>2</sub> en utilisant le méthanol. Le choix de l'acétonitrile est donc recommandé, le THF étant écarté pour son prix élevé. Ces différents essais ont montré que le changement de la nature du solvant dans l'éluant B interfère peu sur les séparations réalisées avec l'éluant C, notamment pour le dérivé OPA de la S-MC. La présence du THF dans l'éluant C est indispensable pour bien séparer les dérivés OPA de la 4-fluorophénylalanine (étalon interne), de l'isoleucine et de la leucine ; elle est inutile dans les éluants A et D.

A l'aide de ce système d'éluant très souple d'emploi, la séparation des dérivés d'acides aminés du colza est réalisée en une heure sur une colonne C18 (Fig. 2). Il faut cependant noter que la reproductibilité insuffisante des caractéristiques des colonnes

commerciales oblige, lorsque leur renouvellement est réalisé, à ajuster les compositions des différents éluants pour obtenir les mêmes séparations. Cet inconvénient est limité par l'usage d'une précolonne renouvelée périodiquement, permettant ainsi de procéder à plusieurs centaines d'injections sans diminution d'efficacité de la colonne analytique.

Tableau 2. Temps de rétention et ordre d'éluion ( ) des dérivés OPA de (+)S-MCO, (-)S-MCO, S-MCO<sub>2</sub>, GLN, SER, en fonction de la nature du solvant organique utilisé dans l'éluant B (a)

| Solvant                 | SER          | GLN          | (-)S-MCO     | (+)S-MCO     | S-MCO <sub>2</sub> |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------|
| CH <sub>3</sub> OH 23 % | 20,33<br>(1) | 23,66<br>(2) | 25,06<br>(3) | 26,51<br>(4) | 26,67<br>(5)       |
| ACN 15 %                | 13,53<br>(1) | 14,67<br>(2) | 15,85<br>(4) | 15,42<br>(3) | 20,83<br>(5)       |
| THF 10 %                | 17,48<br>(3) | 18,23<br>(4) | 16,57<br>(1) | 17,06<br>(2) | 20,03<br>(5)       |

(a) Conditions opératoires : voir paragraphe Analyse par CLHP

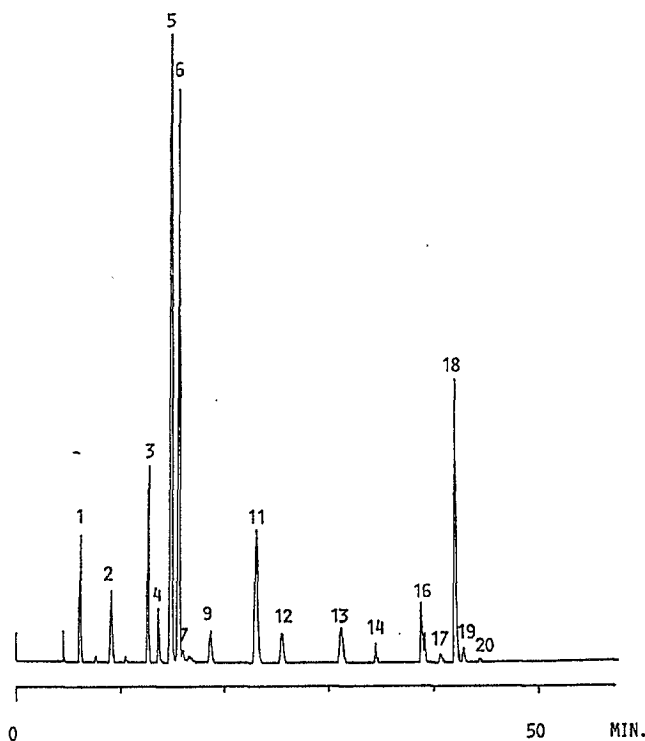


Fig. 2 : Chromatogramme d'un extrait de feuilles et tiges de colza

Identification des pics et conditions : voir figure I et partie expérimentale

L'instabilité relative des dérivés OPA impose l'utilisation d'un injecteur-préparateur automatique d'échantillons, pour une bonne répétabilité des résultats quantitatifs (CV < 5%). Ceux-ci sont contrôlés et étalonnés par l'analyse régulière de solutions standard d'acides aminés (Fig. 1)

La durée du dosage peut être considérablement raccourcie si seule la teneur en S-MCO est demandée (Gustine 1985). Une élution par deux éluants (B et D) suffirait, à condition de choisir un étalon interne différent de la DL-4-fluorophénylalanine.

### CONCLUSION

Cette méthode est élaborée à partir de matériel de CLHP classique non spécialisé dans l'analyse des acides aminés. La sensibilité et la sélectivité de la détection des dérivés OPA, alliées aux capacités de séparation du système, simplifient à l'extrême la préparation des échantillons. La méthode présentée permet l'analyse de tous les acides aminés libres présents dans les crucifères et peut être adaptée pour déterminer seulement la S-MCO.

### REFERENCES

BARRY, T.N., MANLEY, T.R., MILLAR, K.R. and SMITH, R.H. 1984. The relative feeding values of kale (Brassica oleracea) containing normal and low concentrations of S-methyl-L-cysteine sulfoxide (SMCO). *J. Agric. Sci., Camb.* 102: 635-643 .

FALES, S.L., GUSTINE, D.L., BOSWORTH, S.C. and HOOVER, R.J. 1987. Concentrations of glucosinolates and S-Methylcysteine Sulfoxide in Ensiled Rape (Brassica napus L.). *Journal of Dairy Science.* 70: 2402-2405.

GOSDEN, A.F. 1979. An automated Procedure for the Estimation of S-Methylcysteine Sulphoxide in Kale. *J. Sci. Food Agric.* 30: 892-89.

GRIFFITHS, D.W. and MACFARLANE SMITH, W. H. 1989. Variation in S-Methyl Cysteine Sulphoxide Concentration with Harvest Date in Forage Rape (Brassica napus). *J. Sci. Food Agric.* 47: 249-252.

GUSTINE, D.L. 1985. Determination of S-methyl cysteine sulfoxide in Brassica extracts by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 319: 450-453.

LINDROTH, P. and MOPPER, K. 1979. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Subpicomole Amounts of Amino Acids by Precolumn Fluorescence Derivatization with o-Phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* 51: 1667-1674.

ONDERSCHKEKA, K., TATARUCH, F., STEINECK, T., KLANSEK, E., VODNANSKY, M., WAGNER, J. und ECHSEL, H. 1987. Gehäufte Rehwildverluste nach Aufnahme von 00-Raps. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft.* 33: 191-205.

PAUL, N.K., JOHNSTON, T.D. and EAGLES, C.F. 1986. Inheritance of S-methyl-L-cysteine sulfoxide and thiocyanate contents in forage rape (Brassica napus L.). *Theor. Appl. Genet.* 72: 706-709.