

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
10633-1

Première édition  
1995-11-15

---

---

**Tourteaux de graines oléagineuses —  
Dosage des glucosinolates —**

**Partie 1:**

Méthode par chromatographie en phase  
liquide à haute performance

*Oilseed residues — Determination of glucosinolates content —*

*Part 1: Method using high-performance liquid chromatography*



Numéro de référence  
ISO 10633-1:1995(F)

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 10633-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 2, *Graines et fruits oléagineux*.

L'ISO 10633 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Tourteaux de graines oléagineuses — Dosage des glucosinolates*:

— *Partie 1: Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance*

— *Partie 2: Méthode par spectrométrie de fluorescence aux rayons X*

L'annexe A fait partie intégrante de la présente partie de l'ISO 10633. L'annexe B est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1995

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

# Tourteaux de graines oléagineuses — Dosage des glucosinolates —

## Partie 1:

## Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 10633 prescrit une méthode pour le dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) des différents glucosinolates dans les tourteaux de graines de crucifères.

#### NOTES

1 Cette méthode ne dose pas les glucosinolates ayant des substituants sur la partie glucose, mais ces composés sont peu importants dans les tourteaux de graines oléagineuses commercialisées.

2 Cette méthode permet de doser les glucosinolates non dégradés. Elle ne permet toutefois pas de rendre compte de la nature et de la quantité des produits issus de la dégradation des glucosinolates durant la préparation des tourteaux. Les effets antinutritionnels de ces produits de dégradation ne peuvent pas de ce fait être pris en considération.

### 2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 10633. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 10633 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 771:1977, *Tourteaux de graines oléagineuses — Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles.*

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai.*

ISO 5502:1992, *Tourteaux de graines oléagineuses — Préparation des échantillons pour essai.*

ISO 9167-1:1992, *Graines de colza — Dosage des glucosinolates — Partie 1: Méthode par chromatographie liquide à haute performance.*

### 3 Principe

Extraction des glucosinolates par le méthanol, puis purification et désulfatation enzymatique sur résine échangeuse d'ions. Détermination par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse avec gradient d'élution et détection aux ultraviolets.

### 4 Réactifs

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau de qualité 2, conformément à l'ISO 3696.

**4.1 Méthanol**, de qualité CLHP, solution à 70 % (V/V).

**4.2 Acétate de sodium**, solution à 0,02 mol/l à pH 4,0.

**4.3 Acétate de sodium**, solution à 0,2 mol/l.

#### 4.4 Formiate d'imidazole, solution à 6 mol/l.

Dissoudre 204 g d'imidazole dans 113 ml d'acide formique dans une fiole jaugée de 500 ml. Ajuster au trait repère avec de l'eau.

#### 4.5 Étalon interne

Utiliser soit la sinigrine monohydratée (allylglucosinolate de potassium monohydraté,  $M_r = 415,49$ ) (voir A.1) soit, pour le colza dans lequel la sinigrine est présente naturellement, la glucotropaéoline (benzylglucosinolate de potassium monohydraté,  $M_r = 447,52$ ) (voir A.2).

Voir l'annexe A pour tous les détails relatifs à la préparation et à la vérification de la pureté de ces réactifs.

#### 4.6 Phases mobiles

**4.6.1 Éluant A:** eau purifiée par passage sur cartouche de charbon actif<sup>1)</sup> et passée au travers d'un filtre de 0,45 µm ou eau de pureté équivalente.

**4.6.2 Éluant B:** acétonitrile, de qualité CLHP, solution à 20 % (V/V) dans l'eau qui a été purifiée et passée au travers d'un filtre de 0,45 µm. La concentration peut être modifiée en fonction de la colonne utilisée.

#### 4.7 Résine échangeuse d'ions

**4.7.1 DEAE Sepharose CL-6B<sup>2)</sup>**, vendue en suspension prête à l'emploi, ou produit équivalent.

**4.7.2 Suspension de DEAE Sephadex A25<sup>2)</sup>**

Mélanger 10 g de résine DEAE Sephadex A25 (ou d'une résine équivalente) dans un excès d'acide acétique à 2 mol/l. Laisser décanter. Ajouter de l'acide acétique à 2 mol/l jusqu'à ce que le volume du surnageant soit égal au volume du gel décanté.

**4.8 Sulfatase**, type H1 (EC 3.1.6.1)<sup>3)</sup> d'*Helix pomatia*.

Purifier, tester et diluer la sulfatase conformément aux méthodes décrites en A.3.1 à A.3.4.

1) Le système Norganic Millipore est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 10633 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

2) DEAE Sepharose et Sephadex sont des exemples de produits disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 10633 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

3) La sulfatase S-9626 de Sigma Chemicals, dont l'activité est de 16 600 unités/g, est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 10633 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

4) Les exemples donnés sont des produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 10633 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

5) Des échantillons de référence de désulfoglucosinolate de colza peuvent être obtenus auprès du Bureau Communautaire de Référence (Bruxelles).

### 5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

**5.1 Chromatographe en phase liquide à haute performance**, permettant d'obtenir un gradient d'élution et un contrôle de la température de la colonne à 30 °C, relié à un **détecteur ultraviolet** permettant les mesures à une longueur d'onde de 229 nm.

**5.2 Colonne de chromatographie pour CLHP**, de type C<sub>18</sub> ou C<sub>8</sub>, de granulométrie inférieure ou égale à 5 µm, soit par exemple<sup>4)</sup>:

colonne Lichrosorb RP18, ≤ 5 µm  
(150 mm × 4,6 mm);

colonne Spherisorb ODS2, ≤ 5 µm  
(250 mm × 4 mm; 250 mm × 5 mm);

colonne Novapak C<sub>18</sub>, ≤ 4 µm (150 mm × 4 mm);

colonne Lichrospher RP8, ≤ 5 µm  
(125 mm × 4 mm);

colonne Nucleosil C<sub>18</sub>, ≤ 5 µm (200 mm × 4 mm).

Les performances de la colonne choisie doivent être régulièrement contrôlées à l'aide, de préférence, d'un échantillon de référence de désulfoglucosinolate<sup>5)</sup> de colza. En particulier, la colonne ne doit pas dégrader l'hydroxy-4-glucobrassicine, glucosinolate important et relativement instable.

Les nouvelles colonnes doivent faire l'objet d'une mise en condition préliminaire, selon les instructions du fabricant, avant de pouvoir obtenir des résultats reproductibles.

**5.3 Spectromètre à double faisceau**, permettant d'opérer dans l'ultraviolet et à température contrôlée de 30 °C, muni de **cuves en quartz** de 1 cm de parcours optique et d'un **système enregistreur**.

**5.4 Microbroyeur**, par exemple moulin à café.

**5.5 Centrifugeuse**, convenant pour l'utilisation avec les tubes (5.6) et permettant d'obtenir une accélération centrifuge de 5 000 g.

**5.6 Tubes de polypropylène**, de 6 ml de capacité.

**5.7 Bain d'eau ou bloc de chauffage**, réglable à  $75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**5.8 Laine de verre**.

**5.9 Pipettes Pasteur**, de 150 mm de longueur, et support approprié ou tout autre dispositif adéquat.

## 6 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 10633. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 5500<sup>6)</sup>.

## 7 Préparation de l'échantillon pour essai

Réduire l'échantillon pour laboratoire conformément à l'ISO 5502 en vue d'obtenir la quantité requise d'échantillon pour essai. Broyer si nécessaire.

En prélever une partie pour déterminer la teneur en eau et en matières volatiles conformément à l'ISO 771.

Si le résultat est inférieur à 10 % (*m/m*), cette valeur sera utilisée pour le calcul (9.1). Poursuivre immédiatement avec le dosage des glucosinolates (article 8) en utilisant l'échantillon pour essai sans autre traitement.

Si la teneur en eau et en matières volatiles trouvée est supérieure à 10 % (*m/m*), sécher l'échantillon pour essai avec un courant d'air à environ  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , puis déterminer à nouveau cette teneur. Poursuivre ces opérations jusqu'à ce que la teneur en eau et en matières volatiles obtenue soit inférieure à 10 % (*m/m*). Cette valeur finale est utilisée pour le calcul. Poursuivre immédiatement avec le dosage des glucosinolates (article 8) en utilisant l'échantillon pour essai séché.

## 8 Mode opératoire

NOTE 3 S'il y a lieu de vérifier si l'exigence de répétabilité est satisfaite, effectuer deux déterminations séparées conformément aux paragraphes 8.1 à 8.4 et 8.6, dans les conditions de répétabilité.

### 8.1 Prise d'essai

Étiqueter deux tubes (5.6) A et B, introduire dans chaque tube 100 mg, pesés à 0,1 mg près, d'échantillon pour essai préparé (article 7).

### 8.2 Extraction des glucosinolates

**8.2.1** Plonger les tubes dans le bain d'eau ou le bloc de chauffage (5.7) réglé à  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  et les y laisser 1 min. Ajouter ensuite 2 ml de solution bouillante de méthanol (4.1) et immédiatement après

- dans le tube A, 200  $\mu\text{l}$  de solution d'étalon interne à 5 mmol/l (A.1.1); et
- dans le tube B, 200  $\mu\text{l}$  de solution d'étalon interne à 20 mmol/l (A.1.2).

NOTE 4 Voir 4.5 pour l'utilisation de l'une ou l'autre des solutions d'étalon interne.

**8.2.2** Poursuivre le chauffage à  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min, en agitant régulièrement. Mélanger le contenu de chaque tube et centrifuger avec une accélération de 5 000 g pendant 3 min. Transvaser le liquide surnageant de chaque tube, dans deux autres tubes (5.6) étiquetés A' et B'.

**8.2.3** Ajouter, dans chacun des deux tubes A et B contenant le résidu, 2 ml d'une solution bouillante de méthanol (4.1) et chauffer à nouveau pendant 10 min, dans le bain d'eau ou le bloc de chauffage (5.7) réglé à  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en agitant les tubes régulièrement.

Centrifuger pendant 3 min et ajouter le liquide surnageant des tubes A et B respectivement aux liquides surnageants des tubes A' et B' retenus en 8.2.2.

**8.2.4** Ajuster le volume des extraits combinés dans les tubes A' et B' à environ 5 ml avec de l'eau et mélanger.

Ces extraits peuvent être conservés 2 semaines à l'abri de la lumière, au congélateur à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 8.3 Préparation des colonnes échangeuses d'ions

Couper le nombre de pipettes Pasteur (5.9) approprié,

6) ISO 5500:1986, *Tourteaux de graines oléagineuses — Échantillonnage*.

soit deux pipettes par échantillon, de manière à laisser un volume de 1,2 ml au-dessus de l'étranglement et placer un tampon de laine de verre (5.8) au niveau de l'étranglement. Placer les pipettes en position verticale sur un support.

Déposer 0,5 ml de la suspension, préalablement bien mélangée, de résine échangeuse d'ions (4.7.2) dans chaque pipette, laisser décanter et écouler.

Rincer les pipettes avec 2 ml de formiate d'imidazole (4.4) puis avec deux fois 1 ml d'eau.

## 8.4 Purification et désulfatation

**8.4.1** Effectuer les opérations suivantes pour chaque extrait combiné.

**8.4.2** Déposer 1 ml d'extrait (8.2.4) sur la colonne préparée (8.3) sans modifier la surface du gel et le laisser s'écouler. Ajouter deux fois 1 ml de tampon d'acétate de sodium (4.2) en le laissant s'écouler à chaque fois.

**8.4.3** Ajouter dans la colonne 75 µl de la solution de sulfatase purifiée diluée (4.8). Laisser agir pendant une nuit à température ambiante.

**8.4.4** Placer un tube (5.6) sous la colonne pour recueillir l'éluat.

Éluer les désulfoglucosinolates obtenus avec deux fois 1 ml d'eau, en laissant l'eau s'écouler après chaque addition.

**8.4.5** Bien homogénéiser l'éluat. S'il n'est pas utilisé immédiatement pour la chromatographie, il peut être conservé à l'abri de la lumière au congélateur à -18 °C, pendant une semaine.

## 8.5 Essai à blanc

Si nécessaire (voir 9.3), effectuer un essai à blanc en suivant le même mode opératoire, sur une prise d'essai provenant du même échantillon pour essai, mais en omettant la solution d'étalon interne de sinigrine afin de détecter et de quantifier une éventuelle présence de sinigrine dans la prise d'essai.

## 8.6 Chromatographie

### 8.6.1 Réglage de l'appareil

Régler le chromatographe (5.1) comme suit:

- débit de la phase mobile (4.6): en général de l'ordre de 1 ml/min selon la nature de la colonne (voir 8.6.2);
- température de la colonne (5.2): 30 °C;
- longueur d'onde de détection: 229 nm.

### 8.6.2 Détermination

Selon les instructions relatives à l'appareillage, injecter dans le chromatographe un volume inférieur à 50 µl de la solution de désulfoglucosinolates obtenue en 8.4.4.

Utiliser un gradient d'élution approprié correspondant à la colonne utilisée.

#### NOTES

5 Les gradients d'élution suivants sont indiqués comme exemples.

- a) Pour une colonne Lichrosorb RP18, ≤ 5 µm (150 mm × 4,6 mm):
  - passer 100 % d'éluant A (4.6.1) pendant 1 min;
  - appliquer un gradient d'élution linéaire pendant 20 min jusqu'à obtention de 0 % d'éluant A et 100 % d'éluant B (4.6.2);
  - appliquer un gradient d'élution linéaire pendant 5 min jusqu'à obtention de 100 % d'éluant A et 0 % d'éluant B;
  - passer 100 % d'éluant A pendant 5 min pour équilibrer.
- b) Pour une colonne Lichrospher RP8, ≤ 5 µm (125 mm × 4 mm):
  - passer 100 % d'éluant A pendant 2 min 30 s;
  - appliquer un gradient d'élution linéaire pendant 18 min jusqu'à obtention de 0 % d'éluant A et 100 % d'éluant B;
  - passer 100 % de l'éluant B pendant 5 min;
  - appliquer un gradient d'élution linéaire pendant 2 min jusqu'à obtention de 100 % d'éluant A et 0 % d'éluant B;
  - continuer pendant 5 min pour équilibrer.

6 Les profils des gradients peuvent être modifiés pour donner des séparations optimales en fonction des colonnes utilisées.

### 8.6.3 Examen des chromatogrammes

Prendre uniquement en compte les pics dont l'aire est supérieure à 1 % de la somme totale des aires des pics.

L'ordre d'élution des pics avec une colonne du type C<sub>18</sub> et un gradient d'élution approprié (voir les exemples donnés en 8.6.2) est, en général, tel que représenté à la figure 1.

## 9 Expression des résultats

### 9.1 Calcul de la teneur en chaque glucosinolate

La teneur en chaque glucosinolate, exprimée en micromoles par gramme de matière sèche du produit,