
**Graines et tourteaux de colza —
Dosage des glucosinolates — Méthode
par chromatographie liquide à haute
performance**

*Rapeseed and rapeseed meals — Determination of glucosinolates
content — Method using high-performance liquid chromatography*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 9167:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5879b10d-7807-411f-8200-cc7f11e0b1cd/iso-9167-2019)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5879b10d-7807-411f-8200-
cc7f11e0b1cd/iso-9167-2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5879b10d-7807-411f-8200-cc7f11e0b1cd/iso-9167-2019)



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 9167:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5879b10d-7807-411f-8200-cc7f11e0b1cd/iso-9167-2019>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage	4
7 Échantillonnage	5
8 Préparation de l'échantillon pour essai	6
9 Mode opératoire	6
9.1 Prise d'essai.....	6
9.2 Extraction des glucosinolates.....	6
9.3 Essai à blanc.....	7
9.4 Préparation des colonnes échangeuses d'ions.....	7
9.5 Purification et désulfatation.....	7
9.6 Chromatographie avec élution par gradient.....	8
9.6.1 Généralités.....	8
9.6.2 Réglage de l'appareil.....	8
10 Expression des résultats	9
10.1 Calcul de la teneur de chaque glucosinolate.....	9
10.2 Facteurs de proportionnalité relatifs.....	10
10.3 Calcul de la teneur totale en glucosinolate.....	10
11 Fidélité	10
11.1 Essai interlaboratoires.....	10
11.2 Répétabilité.....	11
11.3 Reproductibilité.....	11
12 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Résultats des essais interlaboratoires — Méthode de CLHP avec élution par gradient	12
Annexe B (normative) Vérification du titre de la solution préparée d'étalon interne	14
Annexe C (normative) Préparation et analyse d'une solution purifiée de sulfatase et contrôle de l'étape de désulfatation sur colonnes échangeuses d'ions	15
Annexe D (informative) Qualification du système de CLHP et des critères de performance de la colonne	20
Annexe E (informative) Élution en mode isocratique	22
Bibliographie	29

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 2, *Graines et fruits oléagineux et farines de graines oléagineuses*.

Cette première édition annule et remplace l'ISO 9167-1:1992, qui a fait l'objet d'une révision technique. Elle incorpore également l'amendement ISO 9167-1:1992/Amd.1:2013. Les principales modifications sont les suivantes:

- les tourteaux de colza ont été ajoutés au domaine d'application, avec l'ajout d'un nouvel essai interlaboratoires;
- en 9.2, le méthanol à 70 % a été remplacé par l'éthanol à 50 % pour une toxicité moindre^[6];
- en 9.2, une seule extraction est réalisée au lieu de deux;
- en 10.2 et E.5.1, le terme «facteur de proportionnalité relatif» a été utilisé au lieu de «facteur de réponse»;
- le mode isocratique a été ajouté dans l'Annexe E.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Les glucosinolates dans les graines de colza peuvent être analysés au moyen de méthodes chromatographiques, enzymatiques ou spectroscopiques. Le présent document décrit une méthode chromatographique avec deux conditions (par gradient et isocratique) d'élution pour l'analyse qualitative et quantitative des glucosinolates individuels dans les graines et tourteaux de colza. La méthode avec élution par gradient est considérée comme la méthode de référence, tandis que la méthode avec élution isocratique est considérée comme une méthode simplifiée et est présentée dans l'[Annexe E](#) pour information.

Le présent document spécifié une méthode par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec élution par gradient comme méthode de référence. Pour le mode isocratique, le choix de l'étalon interne, les conditions chromatographiques et les résultats de séparation sont différents de la méthode de référence. Ces aspects sont discutés dans l'[Annexe E](#).

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 9167:2019](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5879b10d-7807-411f-8200-cc7f11e0b1cd/iso-9167-2019>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9167:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5879b10d-7807-411f-8200-cc7f11e0b1cd/iso-9167-2019>

Graines et tourteaux de colza — Dosage des glucosinolates — Méthode par chromatographie liquide à haute performance

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de dosage des glucosinolates individuels dans les graines et tourteaux de colza par chromatographie en phase liquide à haute performance avec élution par gradient.

Cette méthode a été soumise à essai sur les graines et tourteaux de colza (*Brassica rapa*, *Brassica napus* et *Brassica juncea*), mais elle est applicable à d'autres matériaux végétaux, à condition que les glucosinolates identifiés précédemment soient décrits dans le présent document. Sinon, l'analyse quantitative du ou des glucosinolates concernés n'est pas effectuée.

NOTE Cette méthode ne dose pas les glucosinolates ayant des substituants sur la partie glucose, mais ces composés sont peu importants dans les graines et tourteaux de colza commercialisés.

L'[Annexe A](#) présente les résultats des essais interlaboratoires pour la méthode de CLHP avec élution par gradient. L'[Annexe B](#) présente comment vérifier le titre de la solution préparée d'étalon interne. L'[Annexe C](#) présente comment préparer et analyser la solution purifiée de sulfatase et contrôler l'étape de désulfatation sur la colonne échangeuse d'ions. L'[Annexe D](#) présente la qualification du système de CLHP et des critères de performance de la colonne.

Les glucosinolates des graines de colza peuvent également être dosés en utilisant un mode d'élution isocratique. Cela nécessite un certain nombre de modifications de la méthode (étalon interne, colonne de CLHP et solutions tampons pour CLHP), comme décrit dans l'[Annexe E](#).

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 664, *Graines oléagineuses — Réduction de l'échantillon pour laboratoire en échantillon pour essai*

ISO 665, *Graines oléagineuses — Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles*

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

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

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

3 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

4 Principe

Extraction des glucosinolates par un mélange eau-éthanol, puis purification et désulfatation enzymatique sur colonnes échangeuses d'ions. Détermination par chromatographie liquide en phase inverse avec élution par gradient (méthode de référence) ou élution isocratique (méthode rapide) et détection par absorptiométrie dans l'ultraviolet.

5 Réactifs

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

5.1 Éthanol, fraction volumique = 50 %.

5.2 Acétate de sodium, $c = 0,02$ mol/l à pH 4,0, préparé en mélangeant de l'acétate de sodium, $c = 0,02$ mol/l et de l'acide acétique, $c = 0,02$ mol/l pour obtenir une solution de pH = 4,0.

5.3 Sulfatase, *Helix pomatia*, type H1 purifiée et diluée comme décrit dans l'[Annexe C](#).

5.4 Formiate d'imidazole, $c = 6$ mol/l.

Dissoudre 204 g d'imidazole dans 113 ml d'acide formique dans un bécher de 500 ml. Transférer le mélange dans une éprouvette de 500 ml et compléter à 500 ml avec de l'eau.

5.5 Étalon interne

Utiliser soit la sinigrine (allylglucosinolate, sel de potassium monohydrate, $M = 415,5$ g/mol) ([5.6](#)) soit la glucotropaéoline (benzylglucosinolate, sel de potassium, $M = 447,5$ g/mol ou benzylglucosinate, sel de tétraméthylammonium, $M = 482,6$ g/mol) ([5.7](#)). La glucotropaéoline peut être utilisée sous forme hydratée, auquel cas la masse molaire et la pureté doivent être connues et prises en compte pour la préparation de la solution.

Le choix de l'étalon interne sera conditionné par sa séparation chromatographique parfaite des autres glucosinolates de l'échantillon. L'absence naturelle dans l'échantillon de l'étalon interne ou de glucosinolates non séparés de ce dernier peut être vérifiée par un essai à blanc (voir [9.3](#)).

Avec l'élution par gradient sur phases stationnaires octyle ou octadéyle, la sinigrine ou la glucotropaéoline peuvent être utilisées. Toutefois, la glucotropaéoline est parfois difficile à séparer des autres glucosinolates mineurs naturels.

Avec l'élution isocratique sur phase stationnaire cyanopropyle (voir [Annexe E](#)), la sinigrine ne peut pas être utilisée pour l'analyse des graines de colza en raison de l'absence de séparation des autres glucosinolates. Elle doit être remplacée par la glucotropaéoline.

Dans les cas les plus fréquents (c'est-à-dire lorsque l'on suppose que les graines de colza ont une teneur en glucosinolates comprise entre 10 et 50 $\mu\text{mol/g}$ inclus), l'étalon interne est utilisé sous forme de solution à 20 mmol/l. Pour les graines de colza dont la teneur supposée en glucosinolates est inférieure à 10 $\mu\text{mol/g}$ ou supérieure à 50 $\mu\text{mol/g}$, les concentrations des solutions d'étalon interne utilisées par échantillon sont fournies dans le [Tableau 1](#).

Vérifier le titre de la solution préparée d'étalon interne comme décrit dans l'[Annexe B](#).

Tableau 1 — Concentration de la solution d'étalon interne à utiliser selon la teneur supposée en glucosinolates de l'échantillon

Teneur en glucosinolates de l'échantillon μmol/g	Concentrations des solutions d'étalon interne mmol/l
< 10	5
> 10 et < 50	20
> 50	40

5.6 Solution de sinigrine

La solution de sinigrine de concentration requise (voir [Tableau 1](#)) est préparée selon le [Tableau 2](#). Peser la sinigrine à 0,5 mg près et la dissoudre dans l'eau dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au volume avec de l'eau. La solution ainsi préparée peut être conservée au réfrigérateur à environ 4 °C pendant une semaine ou au congélateur à -18 °C pendant une période plus longue.

Tableau 2 — Poids de sinigrine dans 100 ml d'eau pour la préparation de solutions à 5 mmol/l, 20 mmol/l et 40 mmol/l

Forme de sinigrine	Masse moléculaire g/mol	Masse de sinigrine		
		g		
		5 mmol/l	20 mmol/l	40 mmol/l
Potassium monohydrate	415,5	0,207 7	0,831 0	1,662 0

5.7 Solution de glucotropaéoline

La solution de glucotropaéoline de concentration requise (voir [Tableau 1](#)) est préparée selon le [Tableau 3](#). Peser la glucotropaéoline à 0,5 mg près et la dissoudre dans l'eau dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au volume avec de l'eau. La solution ainsi préparée peut être conservée au réfrigérateur à environ 4 °C pendant une semaine ou au congélateur à -18 °C pendant une période plus longue.

Tableau 3 — Masse de glucotropaéoline dans 100 ml d'eau pour la préparation de solutions à 5 mmol/l, 20 mmol/l et 40 mmol/l

Forme de glucotropaéoline	Masse moléculaire g/mol	Masse de glucotropaéoline		
		g		
		5 mmol/l	20 mmol/l	40 mmol/l
Potassium	447,5	0,223 7	0,895 0	1,790 1
Tétraméthylammonium	482,6	0,241 3	0,965 2	1,930 3

5.8 Éluant A: eau, purifiée par passage sur cartouche de charbon actif ou eau de pureté équivalente.

NOTE L'utilisation d'une eau insuffisamment purifiée peut conduire à des pics fantômes durant l'analyse, dus aux impuretés éluées lorsque la proportion d'acétonitrile dans l'éluant augmente.

5.9 Éluant B: acétonitrile, qualité gradient de CLHP, solution dans l'eau purifiée, Fraction volumique = 20 %. La concentration peut être modifiée en fonction de la colonne utilisée.

5.10 Solvant de rinçage: acétonitrile, qualité CLHP, solution dans l'eau, Fraction volumique = 70 %.

5.11 Résine échangeuse d'ions: Suspension de DEAE Sephadex A25¹⁾, préparée comme suit.

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 total soit égal à deux fois le volume du gel décanté.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

6.1 Système de CLHP avec élution par gradient ou isocratique, réglage de la température de la colonne à 30 °C et détection par absorptiométrie dans l'ultraviolet à la longueur d'onde de 229 nm et, si possible, à la longueur d'onde de 275 nm.

La régulation de la température de la colonne à 30 °C peut être impossible lorsque la température ambiante est supérieure à 25 °C. Un four avec système de refroidissement-chauffage est alors recommandé.

6.2 Colonnes de CLHP pour élution par gradient.

Colonne de CLHP contenant une phase stationnaire octyle (C8) ou octadécyle (C18), fixée à un remplissage de colonne de silice de taille de particules inférieure ou égale à 5 µm.

Il convient de contrôler régulièrement les performances de la colonne à l'aide, de préférence, d'un échantillon de référence de graines de coza. En particulier, la colonne ne doit pas dégrader la désulfo-4-hydroxyglucobrassicine, un désulfoglucosinolate important, mais relativement instable. La [Figure 1](#) montre un exemple de séparation des glucosinolates en utilisant le mode de CLHP avec gradient. 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5879b10d-7807-411f-8200-cc7f1e0b1cd/iso-9167-2019>

6.3 pH-mètre

6.4 Microbroyeur, par exemple moulin à café.

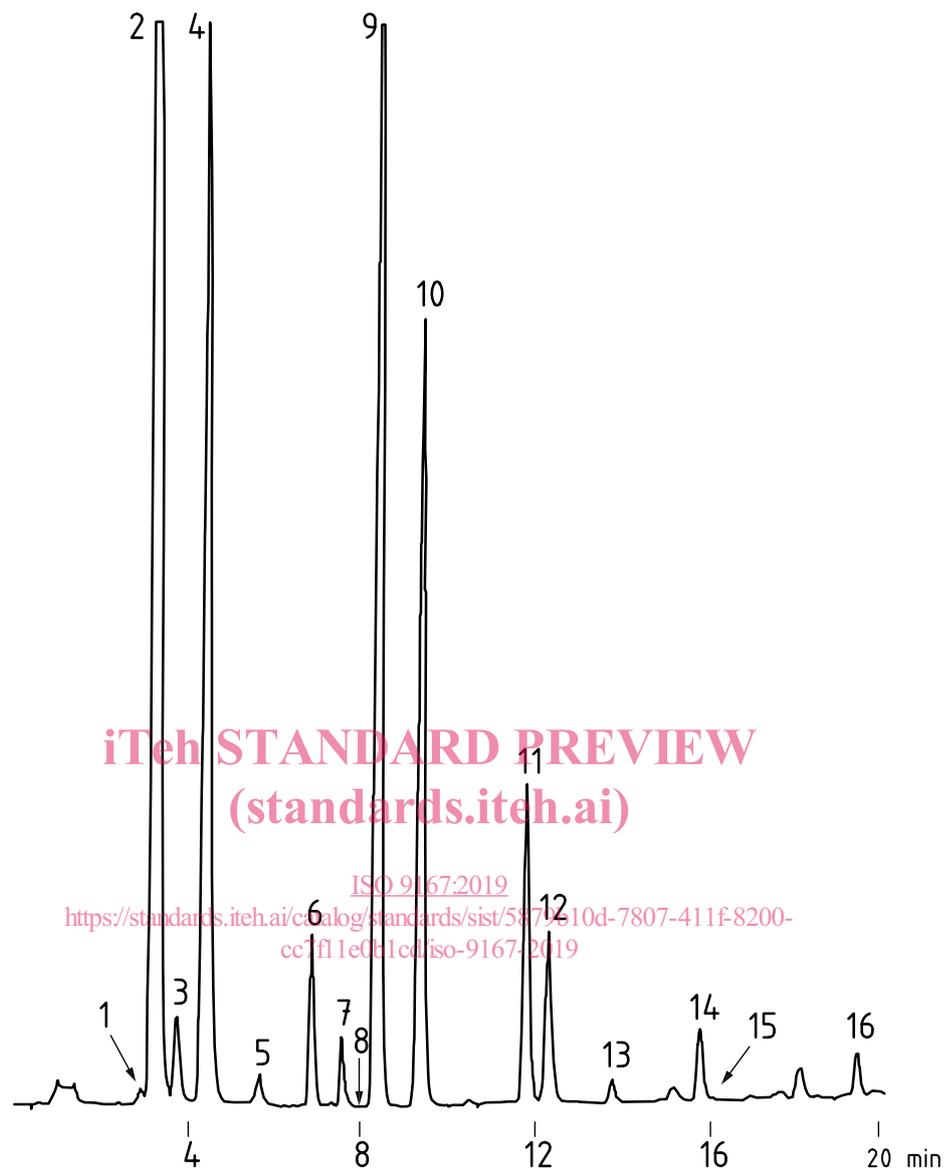
6.5 Centrifugeuse, convenant pour l'utilisation avec les tubes ([6.6](#)), permettant d'obtenir une accélération centrifuge de 5 000*g*.

6.6 Tubes en polypropylène, de 6 ml de capacité.

6.7 Bain d'eau ou bloc de chauffage, capable de maintenir une température de (75 ± 3) °C.

6.8 Pipettes Pasteur remplies de laine de verre, 150 mm de long, et support approprié, ou tout autre dispositif adéquat.

1) DEAE Sepharose A25 est un exemple de produit adapté et disponible dans le commerce. Cette information est donnée aux utilisateurs du présent document pour des raisons de commodité et ne constitue en aucun cas une recommandation de ce produit par l'ISO.



Légende

1	désulfoglucoibérine	9	désulfogluconapine
2	désulfoprogoitrine	10	désulfo-4-hydroxyglucobrassicine
3	désulfoépiprogoitrine	11	désulfogluco brassicanapine
4	désulfosinigrine	12	désulfoglucotropaéoline
5	désulfoglucoraphanine	13	désulfoglucobrassicine
6	désulfogluconapoléiférine	14	désulfogluconasturtine
7	désulfoglucoalyssine	15	désulfo-4-méthoxyglucobrassicine
8	désulfosinalbine	16	désulfonéoglucobrassicine

Figure 1 — Exemple de chromatogramme-type de graines de colza avec élution par gradient

7 Échantillonnage

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

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Une méthode d'échantillonnage recommandée est fournie dans l'ISO 21294[4] pour les graines oléagineuses et dans l'ISO 5500[1] pour les tourteaux de graines oléagineuses.

Si, avant la réduction de l'échantillon pour laboratoire, on a séparé les gros corps étrangers non oléagineux, il doit en être tenu compte dans le calcul.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Réduire l'échantillon pour laboratoire selon l'ISO 664 pour les graines oléagineuses et l'ISO 5502 pour les tourteaux de graines oléagineuses.

Si les graines ont une teneur en eau et en matières volatiles supérieure à $w = 10 \%$, les sécher au préalable à l'aide d'un courant d'air à environ $(45 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$.

Le taux d'impuretés est en général de 2 % (fraction massique). Si l'on trouve de la sinigrine dans l'échantillon (avec le blanc), effectuer une analyse séparée pour les impuretés, car la sinigrine peut provenir de graines de crucifères présentes accidentellement, qui constituent des impuretés dans le colza.

Si les graines ont été traitées, les laver au dichlorométhane et les sécher dans un courant d'air à température ambiante.

Réduire l'échantillon à deux sous-échantillons de 20 g chacun.

Déterminer la teneur en eau et en matière volatiles d'un sous-échantillon conformément à l'ISO 665 pour les graines oléagineuses et à l'ISO 771 pour les tourteaux de graines oléagineuses ou un mode opératoire approprié.

Broyer les graines de l'autre sous-échantillon dans le microbroyeur (6.4) pendant 20 s. Mélanger, puis broyer pendant encore 5 s. Peser l'échantillon préparé (voir 9.1) afin d'éviter la modification de sa teneur en eau et en matières volatiles.

STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 9167:2019
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5879b10d-7807-411f-8200-cc7f1e0b1cd/iso-9167-2019>

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai

Étiqueter deux tubes (6.6) A et B et introduire dans chaque tube 200 mg pour les graines oléagineuses et 100 mg pour les tourteaux de graines oléagineuses, pesés à 0,5 mg près, de l'échantillon pour essai préparé (voir Article 8). Utiliser le tube A pour l'échantillon pour essai et le tube B comme blanc, si nécessaire.

9.2 Extraction des glucosinolates

Plonger les tubes dans le bain d'eau ou le bloc de chauffage (6.7), réglé à 75 °C et les y laisser 1 min. Ajouter ensuite 3 ml d'une solution bouillante d'éthanol (5.1) et immédiatement après, ajouter dans le tube A 200 µl à 3 µl près de solution d'étalon interne préparée en fonction du mode d'éluion de CLHP et de la teneur supposée en glucosinolate de l'échantillon (5.5).

La température de la solution d'éthanol doit être aussi proche que possible du point d'ébullition afin de garantir une dénaturation rapide de l'enzyme myrosinase généralement présente dans la prise d'essai.

NOTE La myrosinase non dénaturée peut dégrader les glucosinolates en quelques minutes.

Poursuivre le chauffage à 75 °C pendant 10 min, en agitant régulièrement. Ajuster le volume dans chaque tube A et B à environ 4 ml avec de l'eau, mélanger puis centrifuger à 5 000g pendant 3 min.

Transférer le liquide surnageant de chaque tube dans deux autres tubes (6.6) étiquetés A' et B'. Ajuster le volume dans chaque tube A' et B' à environ 5 ml avec de l'eau et mélanger.