

---

---

**Colza — Détermination de la  
teneur en glucosinolates —  
Méthode spectrométrique pour les  
glucosinolates totaux par libération de  
glucose**

*Rapeseed — Determination of glucosinolate content — Spectrometric  
method for total glucosinolates by glucose release*

**(standards.iteh.ai)**

[ISO/TS 12788:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08a0fb64-357f-46aa-a1c7-3d290b8659fe/iso-ts-12788-2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08a0fb64-357f-46aa-a1c7-3d290b8659fe/iso-ts-12788-2022>



iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 12788:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08a0fb64-357f-46aa-a1c7-3d290b8659fe/iso-ts-12788-2022>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2022

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  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction .....	v
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>4</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>5</b>
<b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>5</b>
8.1    Réduction de l'échantillon pour essai en échantillon pour laboratoire .....	5
8.2    Teneur en eau et en matières volatiles .....	5
8.3    Broyage .....	5
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>5</b>
9.1    Prise d'essai .....	5
9.2    Extraction des glucosinolates .....	6
9.2.1    Généralités .....	6
9.2.2    Principe .....	6
9.2.3    Mode opératoire .....	6
9.3    Hydrolyse et collecte du glucose à partir des glucosinolates par la myrosinase et la chromatographie sur colonne .....	6
9.4    Dosage du glucose .....	7
9.4.1    Généralités .....	7
9.4.2    Dosage du glucose par la glucose oxydase/peroxydase (5.4) .....	7
9.4.3    Dosage par la glucose hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase (5.8) .....	8
<b>10</b> <b>Calcul de la teneur en glucosinolates</b> .....	<b>9</b>
<b>11</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>9</b>
<b>12</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>10</b>
12.1    Essai interlaboratoires .....	10
12.2    Répétabilité .....	10
12.3    Reproductibilité .....	10
12.4    Différence critique .....	10
12.4.1    Généralités .....	10
12.4.2    Comparaison de deux groupes de mesures dans un laboratoire .....	10
12.4.3    Comparaison de deux groupes de mesures dans deux laboratoires .....	10
<b>13</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>11</b>
<b>Annexe A (informative) Extraction et purification de la myrosinase à partir de <i>Sinapis alba</i> L., aussi appelée moutarde blanche ou jaune</b> .....	<b>12</b>
<b>Annexe B (informative) Détermination du taux de récupération des glucosinolates</b> .....	<b>16</b>
<b>Annexe C (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires</b> .....	<b>19</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>21</b>

## 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](http://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](http://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 le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html).

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*.

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](http://www.iso.org/fr/members.html).

## Introduction

Les glucosinolates sont des composants antinutritionnels et aromatisants importants des oléagineux Brassica. Ils sont particulièrement importants dans les graines de Brassica qui ont été modifiées pour réduire le niveau de glucosinolates, comme les variétés de colza à faible teneur en glucosinolates (canola). La détermination du niveau de glucosinolates dans ces graines reflète souvent la valeur commerciale, et la distinction entre les graines avec de hauts niveaux de glucosinolates et celles avec de faibles niveaux est évidemment importante à la fois pour les essais commerciaux et les études scientifiques. Le présent document fournit une méthode permettant d'estimer les glucosinolates totaux sans nécessiter d'appareil de chromatographie. Il complète l'ISO 9167, qui est la méthode de référence. Ce document est une Spécification technique car les données de précision issues de l'essai collaboratif ne sont pas suffisantes.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 12788:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08a0fb64-357f-46aa-a1c7-3d290b8659fe/iso-ts-12788-2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08a0fb64-357f-46aa-a1c7-3d290b8659fe/iso-ts-12788-2022>



# Colza — Détermination de la teneur en glucosinolates — Méthode spectrométrique pour les glucosinolates totaux par libération de glucose

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode pour la détermination de la teneur en glucosinolates totaux dans les graines de colza (colza) par spectrométrie visible, afin de déterminer le glucose libéré par les glucosinolates par hydrolyse.

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

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

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 <https://www.electropedia.org/>

### 3.1

#### **glucosinolates totaux**

quantité de glucose libérée lors de l'hydrolyse de la myrosinase et dosée de manière enzymatique

Note 1 à l'article: Les glucosinolates totaux sont exprimés en micromoles par gramme de graines.

## 4 Principe

Les glucosinolates totaux contenus dans un échantillon entier de graines de Brassica moulues peuvent être déterminés directement par une estimation du glucose libéré lors de l'hydrolyse, car l'unité de glucose est commune à tous les glucosinolates. L'hydrolyse des glucosinolates par la myrosinase libère quantitativement du glucose à partir des glucosinolates. Le glucose est analysé soit par dosage enzymatique de la glucose oxydase/peroxydase, soit par des dosages enzymatiques de la glucose hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase.

## 5 Réactifs

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

### 5.1 Acide chlorhydrique (2 M).

Dissoudre 43 ml d'acide chlorhydrique à 36 % ou 49 ml d'acide chlorhydrique à 32 % dans 250 ml d'eau.

### 5.2 Réactif de tungstate de phénol.

Dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre 5,0 g de tungstate de sodium, 5,0 g de phosphate de sodium dibasique anhydre et 9,0 g de chlorure de sodium dans environ 350 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 3,0 avec de l'acide chlorhydrique à 2 M (environ 125 ml). Ajouter 2,0 g de phénol et compléter jusqu'au trait avec de l'eau.

### 5.3 Réactifs pour le dosage du glucose.

### 5.4 Dosage de la glucose oxydase/peroxydase.

NOTE Les réactifs utilisés pour ce dosage peuvent être disponibles sous forme de kit. Dans ce dosage, le  $\beta$ -D-glucose réagit avec l'oxygène en présence de glucose oxydase pour former de la D-glucono-1,4-lactone et du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène réagit avec un colorant incolore en présence de peroxydase pour donner un composé coloré pouvant être mesuré par spectrophotométrie.

### 5.5 Tampon de phosphate de sodium.

Dans une fiole jaugée de 1 l, dissoudre 10 g de phosphate de sodium dibasique anhydre dans environ 750 ml d'eau distillée.

### 5.6 Réactif de glucose oxydase.

Ajouter 105,3 mg de glucose oxydase (EC 1.1.3.4) produite par *Aspergillus niger* ayant une activité de 25 000 unités/100 mg ou 131,7 mg de glucose oxydase ayant une activité de 20 000 unités/100 mg, dans le mélange tampon de phosphate de sodium (5.5) et agiter pour mélanger.

### 5.7 Réactif colorant de peroxydase.

Dissoudre 16,7 mg de peroxydase (EC 1.11.1.7) de type II produite à partir de raifort ayant une activité de 200 unités de pupugallen par mg de solide et 333 mg de 4-aminoantipyrine (4-amino-1,2-dihydro-1,5-diméthyl-2-phényl-3H-pyrazol-3-one, 98 %) dans un bécher avec environ 15 ml d'eau. Ajouter le contenu du bécher dans la fiole jaugée de 1 l contenant la glucose oxydase (5.6) plus le mélange de phosphate de sodium (5.5) et compléter avec de l'eau distillée pour obtenir le mélange de glucose oxydase/peroxydase. Conserver cette solution dans une bouteille brune et la réfrigérer entre 2 °C et 4 °C.

### 5.8 Dosage du glucose par la glucose hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase.

La manière la plus pratique pour réaliser ce dosage est d'utiliser les kits disponibles dans le commerce. Le glucose est d'abord phosphorylé en glucose-6-phosphate (G-6-P) en présence de l'enzyme hexokinase et d'adénosine-5-triphosphate. Le G-6-P, en présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase, est oxydé par le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) en gluconate-6-phosphate avec formation de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit (NADPH). L'augmentation de l'absorption de NADPH à 334 nm, 340 nm ou 365 nm est mesurée. Les constituants d'un kit type sont les suivants.

- a) Bouteille contenant des ingrédients secs, notamment un tampon de triéthanolamine de pH 7,6, du NADP – 110 mg, de l'ATP – 260 mg, du sulfate de magnésium, des stabilisants d'une masse totale de 7,2 g. Le contenu de cette bouteille est dilué à 45 ml avec de l'eau pour obtenir la solution 1.

- b) Solution 2 (suspension): Bouteille contenant 1,1 ml de suspension d'enzyme composée d'hexokinase (EC 2.7.1.1, environ 320 U) et de glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49, environ 160 unités).

NOTE La solution 1 est stable pendant quatre semaines à +4 °C et pendant deux mois à -20 °C, et la solution 2 est stable pendant un an à 4 °C.

### 5.9 Solution de myrosinase.

Dissoudre 12,5 mg de myrosinase (bêta-thiogluco-side glucohydrolase EC 3.2.1.147, lyophilisée, 200 U/g, produite à partir de graines de moutarde blanche) par 1,0 ml d'eau distillée, soit 0,5 ml par échantillon. Il convient de préparer le jour de l'analyse une quantité suffisante de cette solution pour permettre les analyses prévues. Une méthode de préparation de la myrosinase à partir de graines de moutarde blanche (*Sinapis alba* L.) est fournie dans l'[Annexe A](#).

### 5.10 Hydroxyde de sodium (0,5 M).

Dans un bécher de 1 l, dissoudre 20 g d'hydroxyde de sodium dans environ 800 ml d'eau distillée. Transférer cette solution dans une fiole jaugée de 1 l et compléter à 1 l avec de l'eau.

### 5.11 Tampon d'acétate de sodium (0,2 M).

Dans une fiole jaugée de 1 l, ajouter 16,5 g d'acétate de sodium anhydre et 11,5 ml d'acide acétique glacial à 950 ml d'eau. Ajuster le pH à 4,9 avec de l'acide chlorhydrique à 2 M et compléter à 1 l avec de l'eau.

### 5.12 Tampon de tris-HCl. ([standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai))

Dans une fiole jaugée de 1 l, ajouter 1,6 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane à 900 ml d'eau. Ajuster le pH à 7,0 avec de l'acide chlorhydrique à 2 M et compléter à 1 l avec de l'eau.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08a0fb64-357f-46aa-a1c7-3d290b8659fe/iso-ts-12788-2022>

**5.13 Solution de glucose**, servant à préparer une courbe d'étalonnage afin de mettre en relation l'absorbance des échantillons avec l'absorbance des solutions étalons de glucose. Il convient de préparer les échantillons d'étalonnage ([5.13.2](#)) immédiatement avant le mesurage dans le spectromètre.

#### 5.13.1 Solution mère.

Sécher le D-glucose (pureté de 99 %) sous vide à 40 °C pendant 4 h. Dans une fiole jaugée de 1 l, peser environ 1 g de D-glucose sec avec une précision de 0,1 mg. Ajouter 1 g d'acide benzoïque et compléter à 1 l avec de l'eau.

#### 5.13.2 Échantillons d'étalonnage.

Mesurer avec précision des aliquotes de la solution mère de glucose ([5.13.1](#)) dans des fioles jaugées individuelles de 10 ml. Ajouter 2 ml de réactif de tungstate de phénol ([5.2](#)) dans chaque fiole jaugée de 10 ml. Remplir avec précaution les fioles jaugées jusqu'au trait de 10 ml avec de l'eau. La préparation des échantillons d'étalonnage est décrite dans le [Tableau 1](#).

Tableau 1 — Description de la préparation des échantillons d'étalonnage

Paramètre	Numéro de l'échantillon d'étalonnage						
	1	2	3	4	5	6	7
Volume de solution mère de glucose (5.13.1)	0	0,10	0,20	0,50	1,0	1,5	2,0
Volume de réactif de tungstate de phénol (5.2)	2	2	2	2	2	2	2
Concentration en glucose ( $\mu\text{g/l}$ )	0	0,010	0,020	0,050	0,100	0,15	0,200
Teneur en glucose dans une fiole de 10 ml ( $\mu\text{mol}$ )	0	0,56	1,11	2,78	5,55	8,32	11,10

## 6 Appareillage

Utiliser le matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

**6.1 Spectromètre**, capable de fonctionner dans la région visible, en particulier à 505 nm, et équipé de cellules ayant un trajet optique de 1 cm, ou, si le dosage de la glucose hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase est réalisé, un spectromètre capable de fonctionner dans la région des ultraviolets entre 334 nm et 365 nm.

**6.2 Balance analytique**, avec une précision d'affichage de 0,000 1 g.

**6.3 Centrifugeuse**, capable de produire une accélération radiale de 5 000g, adaptée pour une utilisation avec des tubes (6.10).

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

**6.5 Tubes**, tubes à essai à bouchon vissant de (13 × 100) mm.

**6.6 Bain-marie**, réglable à une température de 37 °C et muni d'un rack pour maintenir les colonnes de chromatographie (6.9).

**6.7 Bloc chauffant**, pour maintenir les tubes (6.5) à une température de 95 °C.

**6.8 Résine échangeuse d'ions**, faible échangeur d'anions avec une forte capacité de liaison, une limite d'exclusion de 30 000 Da, un pH de travail de 2 à 9 et une capacité d'échange d'ions de 3 méq/g à 4 méq/g (la résine DEAE-Sephadex® A-25<sup>1)</sup> peut être utilisée).

**6.9 Colonnes de chromatographie**, colonnes en polypropylène de (0,8 × 4) cm (hauteur de colonne totale de 9 cm), contenant jusqu'à 2,0 ml de milieu pour chromatographie et 10 ml d'éluant ou d'échantillon dans un réservoir intégré, munies d'un robinet et d'un bouchon avec un support approprié. Des pipettes Pasteur, de 150 mm de long, garnies de laine de verre peuvent convenir.

### 6.9.1 Préparation des colonnes échangeuses d'ions:

- Placer 100 mg de résine échangeuse d'ions (6.8) dans les colonnes (6.9). Cette quantité a une capacité théorique d'au moins 300 microéquivalents.
- Attacher les robinets aux colonnes.

1) DEAE-Sephadex® A-25 est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- c) Remplir chaque colonne avec environ 10 ml d'eau distillée, en laissant passer approximativement 2,0 ml par le robinet ouvert.
- d) Fermer le robinet et boucher la colonne sans serrer.
- e) Laisser le garnissage de la colonne gonfler pendant au minimum 16 h.
- f) Faire passer dans les colonnes ce qui suit, sans laisser la colonne fonctionner à vide: 5,0 ml d'hydroxyde de sodium à 0,5 M (5.10), suivis de 10 ml d'eau distillée, puis de 5,0 ml de tampon d'acétate de sodium à 0,2 M (5.11), puis 10 ml d'eau.
- g) Desserrer le robinet et boucher la colonne sans serrer jusqu'à ce que l'échantillon soit appliqué.

**6.10 Tubes concentrateurs**, d'une capacité de 12 ml. Adaptés pour une centrifugation à 5 000g.

**6.11 Cuvettes en verre**, avec un trajet optique de 1 cm (des cuvettes à usage unique peuvent être utilisées).

## 7 Échantillonnage

Il convient que l'échantillonnage ait été réalisé conformément à l'ISO 21294. 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

### 8.1 Réduction de l'échantillon pour essai en échantillon pour laboratoire

Préparer l'échantillon pour laboratoire conformément à l'ISO 664.

### 8.2 Teneur en eau et en matières volatiles

Déterminer la teneur en eau et en matières volatiles de l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 665, avant de réaliser l'échantillonnage pour le broyage. Si les graines ont une teneur en eau et en matières volatiles supérieure à 10 % (fraction massique), les sécher à moins de 10 % (fraction massique) à l'aide d'un courant d'air à environ 45 °C. Si les graines ont été traitées, les laver au dichlorométhane et les sécher dans un courant d'air à température ambiante.

### 8.3 Broyage

Broyer les graines dans le microbroyeur (6.4) pendant 20 s. Les mélanger, puis les broyer pendant encore 5 s.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai

Peser environ 200 mg de graines moulues (voir 8.3), à 0,1 mg près, dans un tube à essai à bouchon vissant de (13 × 100) mm (6.5). Noter cette masse *m*.