

Détermination de la teneur totale en glucosinolates des graines de colza par chromatographie en phase liquide : étude comparative de la méthode rapide isocratique et de la méthode de référence avec gradient d'élution à l'aide d'un circuit d'analyses inter-laboratoires

Alain QUINSAC¹, Mohammed KROUTI¹,
Daniel RIBAILLIER¹, Max DESCHAMPS²,
Michel HERBACH³, Joëlle LALLEMAND⁴,
Patricia LEM⁴, Christine MILLET⁵,
Nicolas MABON⁶, Michel MARLIER⁶,
Jean-Paul WATHELET⁶

1. CETIOM, Laboratoire d'analyses,
270, avenue de la Pomme de Pin,
45160 Ardon, France,

2. INRA, Station d'amélioration des plantes,
BP 29, 35650 Le Rheu, France

3. Rustica Prograin Génétique,
Le Mas des Saules, 30300 Fourques, France

4. GEVES, Saint-Pierre d'Amilly, BP 52,
17700 Surgères, France

5. Cargill Génétique Europe,
Centre de recherche de Boissay,
BP 17, 28313 Toury Cedex, France

6. Faculté universitaire des sciences
agronomiques, Passage des
Déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgique

Résumé : La chromatographie en phase liquide (CPL) avec élution isocratique sur colonne en silice greffée cyanopropyle est une méthode alternative à la CPL avec gradient d'élution sur colonne en silice greffée octadécyle utilisée dans la méthode normalisée pour le dosage des glucosinolates totaux dans les graines de colza. Elle présente pour avantages la simplicité du matériel, de l'éluant et une durée d'analyse plus faible. Dans le but d'une prochaine normalisation, ses performances de fidélité et de justesse sont comparées à la méthode de référence normalisée au cours d'un circuit d'analyses inter-laboratoires mettant en jeu trois échantillons de graines de colza et six laboratoires. L'analyse statistique des résultats selon ISO 5725 montre que les deux méthodes sont équivalentes au risque de 5% pour la détermination de la teneur totale des glucosinolates dans les graines de colza. L'examen détaillé des résultats du circuit fait apparaître que le mode d'élution (gradient ou isocratique) n'a pas une influence significative sur les résultats, contrairement à l'étalon interne utilisé dans le cas où sa pureté n'est pas connue avec précision.

Mots clés : glucosinolates, chromatographie en phase liquide, analyse, circuit inter-laboratoires.

Abstract : Isocratic liquid chromatography (LC) on cyanopropyl bonded silica column is an alternative method to gradient LC on octadecyl bonded silica column involved in the standardized method for total glucosinolates (GSL) analysis in rapeseed seeds. Its advantages consist in more simple apparatus and eluent, and a shorter analysis duration. In the aim of a next standardization of isocratic LC, the performances of both methods are compared on three rapeseed samples during a ring-test including six laboratories. Statistical treatment of the results according to ISO 5725 shows, with a risk level of 5%, the equivalency of both methods to determine total GSL content in rapeseed seeds. The elution mode appears to have no significant effect on results in opposite to the internal standard when its purity is not well-known.

Key-words : glucosinolates, liquid chromatography, analysis, ring-test.

Introduction

La teneur en glucosinolates (GSL) (*tableau 1*) est pour les graines et tourteaux de colza un paramètre essentiel dans l'évaluation de leur qualité nutritionnelle. Les variétés de colza actuelles dites « double zéro » présentent des teneurs presque toujours inférieures à 25 $\mu\text{mol/g}$ pour les graines récoltées [1], mais dans certains cas des teneurs plus fortes sont rencontrées, notamment dans le cas de repousses ou de pollutions par des adventices [2,3]. Les analyses sont donc encore d'actualité, surtout si l'on prend en compte la possibilité pour les agriculteurs d'utiliser à la place de

Tableau 1. Les glucosinolates rencontrés dans les analyses de graines de colza.

N°	Glucosinolate (GSL)	Nom commun	Abréviation	Présence
1	Prop-2-énylGSL	Sinigrine	SIN	Étalon interne
2	But-3-énylGSL	Gluconapine	GNA	Naturelle
3	Pent-4-énylGSL	Gluco brassicanapine	GBN	Naturelle
4	(R)-2-hydroxybut-3-énylGSL	Progoitrine	PRO	Naturelle
5	(S)-2-hydroxybut-3-énylGSL	Epi-progoitrine	EPRO	Naturelle
6	(R)-2-hydroxypent-4-énylGSL	Gluconapoléiférine	GNL	Naturelle
7	(R)-5-méthylsulfinylpentylGSL	Glucoalyssine	GAL	Naturelle
8	BenzylGSL	Glucotropaéoline	GTL	Étalon interne
9	2-phényléthylGSL	Gluconasturtine	GST	Naturelle
10	4-hydroxybenzylGSL	Sinalbine	SNB	Impureté
11	Indol-3-ylméthylGSL	Glucobrassicine	GBS	Naturelle
12	4-hydroxyindol-3-ylméthylGSL	4-OH glucobrassicine	4-OHGBS	Naturelle
13	1-méthoxyindol-3-ylméthylGSL	Néoglucobrassicine	NGBS	Naturelle

L'abréviation d'un désulfoglucosinolate est obtenue en ajoutant DS devant l'abréviation du glucosinolate.

semences certifiées, des semences de ferme dont la teneur en GSL doit être mesurée par un laboratoire et inférieure à 18 $\mu\text{mol/g}$ [4].

Les méthodes d'analyse des GSL sont nombreuses et variées mais il est reconnu que les méthodes les plus précises et fiables sont les méthodes chromatographiques car elles séparent les GSL des impuretés et font appel à un étalon interne pour la quantification. En 1990, la Commission des Communautés européennes (CEE) a choisi la chromatographie en phase liquide (CPL) avec gradient d'élution des dérivés désulfatés des GSL (désulfoglucosinolates ou DSGSL) comme méthode de référence dans la CEE [5]. La méthode a été ensuite normalisée par l'AFNOR puis par l'ISO et le CEN [6]. La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées lors de circuits d'analyses internationaux organisés par l'AFNOR [6] et l'ISO [7].

Malgré ses performances et son utilisation par divers laboratoires dans de nombreux pays, la méthode de référence pourrait être davantage appliquée si sa mise en œuvre était simplifiée et son coût abaissé. D'une part, la préparation des échantillons et des réactifs de désulfatation est assez fastidieuse et ne se révèle rentable que pour un volume d'analyses important. D'autre part, la CPL doit être réalisée en gradient d'élution, technique exigeant des solvants de haute pureté et un matériel onéreux. La simplification de la méthode et du matériel était donc souhaitable pour espérer, tout en conservant ses performances, une diffusion plus grande, notamment pour des analyses de routine réalisées en grandes séries (contrôle de récoltes ou de semences en sélection par exemple). La modification de la méthode, difficilement envisageable au niveau de l'étape critique de purification-désulfatation, a concerné principalement le mode d'élution en CPL. Des études ont montré qu'en remplaçant la colonne de CPL qui est du type silice greffée octyle (C8) ou octadécyle (C18) par une colonne de silice greffée cyanopropyle (CN), il était possible de réaliser en mode isocratique l'élution et la séparation de tous les dérivés désulfatés des principaux GSL du colza [8]. L'étalon interne dans cette nouvelle méthode est exclusivement la glucotropaéoline car le dérivé désulfaté de la sinigrine habituellement utilisée avec la méthode de référence n'est pas séparable des autres DSGSL en CPL isocratique.

La méthode isocratique a fait l'objet, au laboratoire du CETIOM, d'une validation par rapport à la méthode de référence sur des échantillons de graines de colza pures ou polluées par des adventices (sanves) [9]. Puis, dans le but de normaliser une méthode rapide de dosage par CPL des GSL du colza, un projet de norme a été préparé par l'AFNOR [10] sur la

base de la norme NF EN ISO 9167-1. Afin de consolider la méthode et d'étendre le projet de norme à l'échelle internationale, un circuit d'analyses entre six laboratoires (français et belge) a été organisé conjointement par l'AFNOR et le CETIOM. La méthodologie, les résultats détaillés, l'exploitation statistique et les éventuelles modifications du mode opératoire sont décrits et discutés.

Matériels et méthodes

Six laboratoires ont participé à l'étude : l'Institut national de la recherche agronomique (INRA, Le Rheu), Rustica Prograin Génétique (Fourques), le Groupe d'études et de contrôle des variétés et semences (GEVES, Surgères), Cargill Génétique Europe (Tourey), l'Unité de chimie générale et organique de la faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux et le Centre technique interprofessionnel des oléagineux métropolitains (CETIOM, Ardon).

Les analyses ont été réalisées avec trois répétitions sur trois échantillons de colza en utilisant la méthode de référence (CPL en gradient d'élution : NF EN ISO 9167-1) et la méthode rapide (CPL isocratique : AFNOR T 60 D - Doc 22). Les caractéristiques principales de ces deux méthodes sont :

- pour la méthode de référence (GradSIN) : elle utilise SIN comme étalon interne et la CPL avec élution par gradient,
- pour la méthode rapide (IsoGTL) : elle utilise GTL comme étalon interne et la CPL avec élution isocratique.

De plus, les extraits préparés pour la méthode rapide, avec la GTL comme étalon interne, ont été analysés par CPL avec gradient d'élution (méthode GradGTL) pour connaître l'influence de la nature de l'étalon interne ou de l'élution sur les résultats.

Les étalons internes utilisés pendant l'étude, la sinigrine et la glucotropaéoline, ont été analysés en mélange de manière à déterminer leur coefficient de réponse relatif.

Préparation des échantillons du circuit d'analyses

Les échantillons du circuit ont été préparés au laboratoire du CETIOM à Ardon. Trois lots de graines de colza dont les teneurs en GSL sont voisines de 10, 20 et 50 $\mu\text{mol/g}$ ont été débarrassés des impuretés par tamisage

Tableau 2. Conditions de préparation des extraits de DSGSL pour l'analyse en CPL.

Laboratoire	1	2	3	4	5	6
Extraction						
Broyeur	À hélice (1)	Moulin à café	Homogénéiseur	À hélice (1)	Mini-hachoir	Moulin à café
Prise d'essai	200 mg	200 mg	500 mg	200 mg	200 mg	200 mg
Nombre d'extractions	2	2	3	2	2	2
Volume final	5 mL	5 mL	10 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Étalon interne						
Origine SIN (2)	Sigma	Sigma	Sigma	Sigma	Sigma	Sigma
Concentration sol. SIN	20 mM	5 mM	20 mM	5 mM	20 mM	20 mM
Volume ajouté	0,2 mL	0,2 mL	0,5 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Origine GTL (3)	Merck	Merck	Merck	Svalöv	Svalöv	Svalöv
Concentration sol. GTL	20 mM	5 mM	20 mM	5 mM	20 mM	20 mM
Volume ajouté	0,2 mL	0,2 mL	0,5 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Purification -désulfatation						
Dimensions du lit d'échangeur d'ions	9 x 5 mm (Hxd)	10 x 5 mm (Hxd)	10 x 5 mm (Hxd)	10 x 5 mm (Hxd)	8 x 8 mm (Hxd)	8 x 8 mm (Hxd)
Volume d'extrait déposé	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Activité sulfatase	0,7 u/mL	—	> 0,5 u/mL	1,36 u/mL	0,6 u/mL	0,78 u/mL
Facteur de dilution	10	1	1	2	1	2
Volume déposé	75 µL	50 µL	50 µL	75 µL	75 µL	75 µL
Durée de réaction	15 h	16 h	15 h	15h	16 h	15 h
Température	Ambiante	Ambiante	Ambiante	Ambiante	Ambiante	Ambiante
Volume d'élution	2 mL	1,5 mL	1 mL	2 mL	2 mL	1,5 mL

(1) Broyeur à hélice «Schütt modèle 7.600 00 e » vendu par Ernst Schütt jr, Postfach 3454, 3400 Göttingen, Allemagne, ou équivalent.

(2) La SIN d'origine Sigma (Ref.: S-1647) est sous la forme d'un sel de potassium monohydraté (PM = 415,5 g/mol).

(3) La GTL d'origine Merck (Ref.: 24758) est sous la forme d'un sel de potassium (PM = 447,5 g/mol). La GTL d'origine « Svalöv » est vendue par Nilsson-Ehle Laboratory, Svalöv Weibull AB, S- 268081, Svalöv Suède, sous la forme d'un sel d'ammonium (PM = 426,5 g/mol).

et soufflage, puis séchés à 40 °C pendant une nuit. Des échantillons de 20 g ont été préparés au moyen d'un diviseur à rifles, conditionnés en sachets de plastique scellés, et envoyés aux différents participants du circuit.

Analyse des échantillons

Préparation des extraits de DSGSL pour l'analyse en CPL

La préparation des extraits de DSGSL à chromatographier est commune aux deux méthodes GradSIN et IsoGTL. Seul l'étalon interne est différent : la SIN pour la méthode de référence GradSIN et la GTL pour la méthode rapide IsoGTL. Les conditions opératoires précises adoptées par les six laboratoires sont décrites dans le tableau 2.

Pour les laboratoires 1, 2, 4, 5 et 6, le mode opératoire est le suivant : les graines sont broyées à sec puis extraites deux fois par un mélange méthanol/eau (70/30) bouillant. L'étalon interne est ajouté au cours de la première extraction. Les surnageants des extraits sont rassemblés et le volume total est ajusté à 5 mL. Le laboratoire 3 utilise un mode opératoire différent : les graines sont broyées dans le mélange méthanol/eau (70/30) bouillant à l'aide d'un homogénéiseur, l'extraction est réalisée trois fois et le volume final de l'extrait est ajusté à 10 mL. L'extrait (1 mL) est déposé sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE Sephadex A-25) et lavé par 2 mL d'acétate de sodium (0,02 M, pH 4,0). Un volume de 50 à 75 µL de sulfatase est déposé et après un temps de réaction d'environ 15 h à température ambiante, les DSGSL sont ensuite élués par 1 à 2 mL d'eau. L'éluat agité vigoureusement est prêt pour l'injection en CPL.

Analyse par chromatographie en phase liquide

Les conditions opératoires adoptées par les six laboratoires sont décrites dans les tableaux 3 et 4. Les figures 1 et 2 montrent, à titre d'exemple, les séparations obtenues avec élution par gradient (méthode de référence) et avec élution isocratique (méthode rapide) sur les DSGSL préparés à partir de l'échantillon B. De manière générale, dans le cas de la méthode de référence, le résultat de la teneur de chaque GSL détecté est reporté et dans le cas de la méthode rapide, les teneurs de la PRO de l'EPRO et éventuellement de la GNL sont groupées car leurs dérivés désulfatés sont mal séparés.

Exploitation statistique des résultats d'analyses

L'exploitation statistique ne se rapporte qu'aux résultats d'analyses réalisées selon les modes opératoires décrits dans NF EN ISO 9167-1 et AFNOR T 60 D - Doc 22 et ne prend en compte que les teneurs en GSL totaux. Les résultats des analyses sont traités selon la norme NF ISO 5725 à l'aide du logiciel AIL 5725 avec le protocole ISO modifié (le protocole ISO modifié correspond au protocole de l'IUPAC auquel est ajouté un test de Dixon pour l'élimination des données aberrantes). La fidélité des méthodes est évaluée à partir de deux paramètres : la répétabilité et la reproductibilité. La répétabilité correspond à l'écart entre des mesures réalisées sur le même échantillon, par le même opérateur, dans le même laboratoire avec la même méthode et dans un court intervalle de temps. La reproductibilité correspond à l'écart entre des mesures réalisées sur le même

Tableau 3. Conditions de l'analyse par CPL avec gradient d'élution (méthode de référence).

Laboratoire	1	2	3	4	5	6
Type de gradient	Basse pression	Basse pression	Basse pression	Basse pression	Basse pression	Basse pression
Colonne	Lichrospher 100 RP 8,5 µm 125 x 4 mm	Lichrospher 100 RP 8, 5 µm 125 x 4 mm	Lichrospher 60 RP Select B, 5 µm 125 x 4 mm	Lichrospher 100 RP 8,5 µm 125 x 4 mm	Lichrospher ODS 1,5 µm 250 x 4,6 mm	Lichrospher 100 RP 8,5 µm 125 x 4 mm
Précolonne	non	non	Lichrospher 100 RP 8, 5 µm 4 x 4 mm	non	non	non
Température colonne	25 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Forme du gradient (ACN : acétonitrile)	- de 0 à 2 min : H ₂ O =100 % - de 0 à 16 min : ACN de 0 à 25% - de 16 à 22 min : ACN 25 %	- de 0 à 1 min : H ₂ O =100 % - de 1 à 6 min : ACN de 0 à 25 % - de 6 à 9,5 min : ACN 25 %	- de 0 à 2,5 min : H ₂ O =100 % - de 2,5 à 21 min : ACN de 0 à 25 % - de 21 à 27 min : ACN 25 %	- de 0 à 2,5 min : H ₂ O =100 % - 2,5 à 18 min : ACN de 0 à 20 % - de 18 à 23 min : ACN 20 %	- de 0 à 1 min : ACN = 5 % - de 1 à 20 min : ACN de 5 à 25 % - de 20 à 25 min : ACN de 25 à 5 %	- de 0 à 16 min : ACN de 0 à 25% - de 16 à 21 min : ACN 25 %
Débit	1 mL/min	1,5 mL/min	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
Volume injecté	20 µL	20 µL	25 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Longueur d'onde de détection UV	229 nm	229 nm	229 nm	229 nm	229 nm	229 nm

Tableau 4. Conditions de l'analyse par CPL avec élution isocratique (méthode rapide).

Laboratoire	1	2	3	4	5	6
Colonne	Lichrospher 100 CN, 5 µm 250 x 4 mm	Lichrospher 100 CN, 5 µm 250 x 4 mm	Nucleosil CN 5 µm 250 x 4 mm	Lichrospher 100 CN, 5 µm 250 x 4 mm	Hypersil CN 5 µm 250 x 4,6 mm	Lichrosorb CN, 5 µm 250 x 4,6 mm
Précolonne	non	non	non	non	non	non
Température colonne	40 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Éluant	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	Acétonitrile 5 %	Méthanol 4 %	Méthanol 10 %
Débit	1 mL/min	1,5 mL/min	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
Volume injecté	20 µL	20 µL	25 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Longueur d'onde de détection UV	229 nm	229 nm	229 nm	229 nm	229 nm	229 nm

échantillon avec la même méthode mais dans des laboratoires différents. Les moyennes des résultats obtenus sur un même échantillon avec la méthode de référence (GradSIN) et la méthode rapide (IsoGTL) sont comparées pour évaluer la justesse de cette dernière par rapport à la méthode de référence. Le logiciel AIL 5725 est également utilisé pour comparer les méthodes deux à deux et tester l'égalité de leur justesse relative. Les trois méthodes GradSIN, GradGTL et IsoGTL ont donc été comparées deux à deux sur le plan de la fidélité et de la justesse.

Résultats et discussion

Modes opératoires pratiqués

L'examen des modes opératoires de préparation des extraits pratiqués par les six laboratoires (tableau 2) révèle pour le laboratoire 3 un écart important par rapport à la norme NF EN ISO 9167-1 ou AFNOR T 60 D – Doc 22. Cet écart se situe au niveau de l'extraction qui est une étape critique

Figure 1. Analyse par CPL avec gradient d'élution (méthode de référence GradSIN) de DSGSL préparés à partir de l'échantillon B. Colonne Lichrospher RP8, 5 μ m, 125 x 4 mm, température 30 °C. Éluant : gradient d'acétonitrile de 0 à 25% en 16 min, débit : 1 mL/min. Détection UV 229 nm. Identification des pics : voir tableau 1.

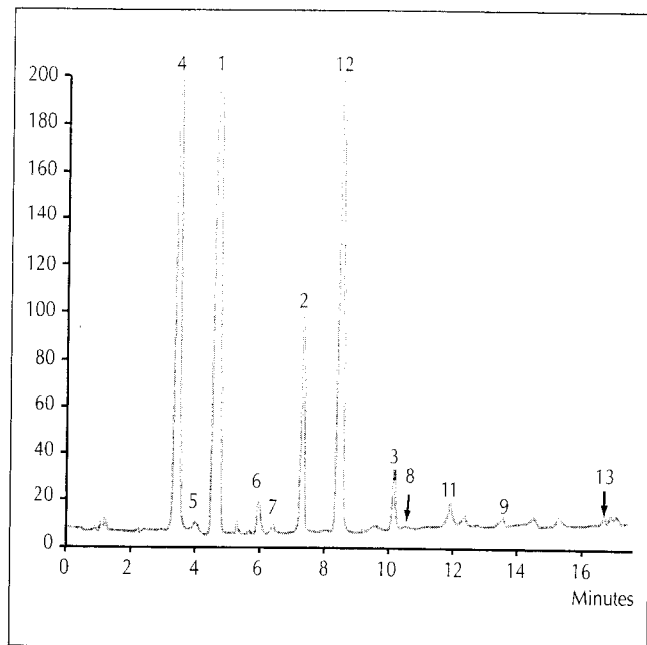
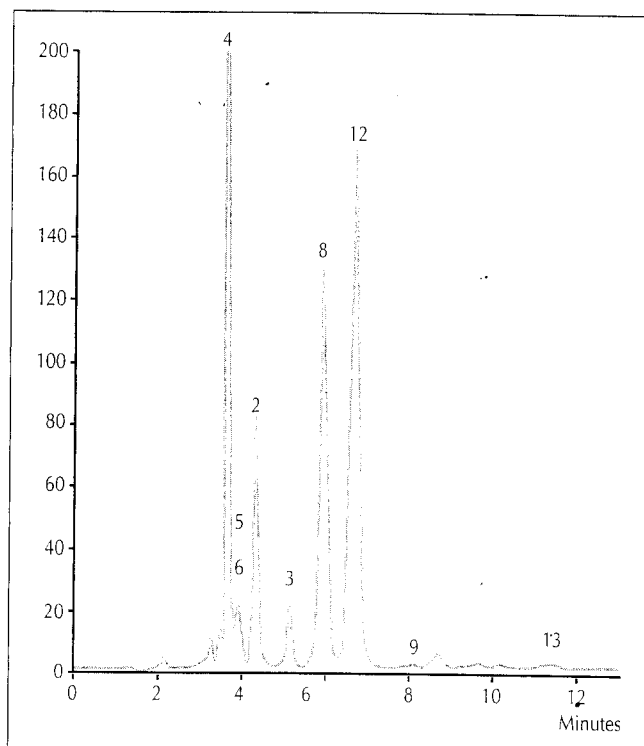


Figure 2. Analyse par CPL avec élution isocratique (méthode rapide IsoGTL) de DSGSL préparés à partir de l'échantillon de colza B. Colonne Lichrospher CN, 5 μ m, 250 x 4 mm, température 30 °C. Éluant : méthanol 10%, débit : 1 mL/min. Détection UV 229 nm. Identification des pics : voir tableau 1.



dans l'analyse des GSL. En effet, un homogénéiseur est utilisé pour le broyage et l'extraction et dans ce cas, deux phénomènes incontrôlables *a posteriori* peuvent se produire. D'une part, quelques graines peuvent échapper au broyage en étant piégées dans le tube de l'axe générateur, le broyage incomplet de l'échantillon occasionne donc un rendement moindre en GSL extraits. D'autre part, la grande inertie thermique de l'axe générateur et du tube peut ralentir l'inactivation de la myrosinase endogène et rendre possible la dégradation des glucosinolates au début de l'extraction avant l'introduction de l'étalon interne. Les tableaux 5, 6 et 7 illustrent ces phénomènes car ils montrent que, quels que soient l'échantillon et la méthode utilisée, les teneurs mesurées par le laboratoire 3 sont sensiblement plus faibles que les teneurs mesurées par les autres laboratoires.

Les conditions de l'analyse en CPL sont pour tous les laboratoires pratiquement conformes aux modes opératoires préconisés. Le laboratoire 2 utilise un gradient d'élution beaucoup plus rapide (de 0 à 25 % d'acétonitrile en 5 min au lieu de 15 min) mais les pics chromatographiques sont correctement résolus. La mise en oeuvre de la CPL avec gradient ou isocratique ne pose aucun problème aux différents laboratoires.

Résultats bruts et corrigés

Les résultats bruts des teneurs en GSL totaux envoyés par chaque laboratoire ont été corrigés de manière à être exprimés par rapport à la même unité (μ mol/g de graines sèches). Une correction supplémentaire a été réalisée sur les résultats des analyses utilisant l'étalonnage par la GTL, à l'aide du coefficient de réponse relatif de la GTL et de la SIN ($K_{GTL/SIN}$) mesuré par chaque laboratoire (tableau 8). On constate, selon les laboratoires, des écarts importants de $K_{GTL/SIN}$ qui peuvent être dus à la différence de pureté des étalons utilisés, une valeur de $K_{GTL/SIN}$ supérieure à la valeur théorique indiquant que le degré de pureté de la GTL est inférieur au degré de pureté de la SIN. Une autre cause d'erreur pouvant intervenir sur la valeur de $K_{GTL/SIN}$, se situe au niveau de la désulfatation de GTL et SIN si le rendement de la réaction est insuffisant.

Les teneurs corrigées en GSL totaux des échantillons A, B et C analysés par les six laboratoires avec les trois méthodes GradSIN, IsoGTL et GradGTL sont reportées dans les tableaux 5, 6 et 7.

Analyse statistique

Fidélité des méthodes testées

Le tableau 9 résume les performances de répétabilité et de reproductibilité des trois méthodes pour les cinq laboratoires retenus en fonction du respect des modes opératoires normalisés. Les résultats du laboratoire 3 ne sont pas traités car la méthode d'extraction utilisée par ce laboratoire (extraction des GSL des graines à l'aide d'un homogénéiseur, tableau 2) n'est pas conforme à la méthode normalisée.

Les coefficients de variation de répétabilité (CVR) et de reproductibilité (CVR) mesurés pour la méthode GradSIN peuvent être comparés à CVR et CVR obtenus dans un circuit d'analyses antérieur (tableau 10) réalisé lors de la normalisation de la méthode NF EN ISO 9167-1 (projet ISO/DP 9167). Pour les échantillons dont les teneurs en GSL sont voisines (de 14 à 26 μ mol/g), les valeurs de CVR pour GradSIN (2,5 à 3,5 %) sont inférieures aux valeurs obtenues pour le projet ISO/DP 9167 (3,3 à 8,5 %). Cette meilleure répétabilité s'explique par l'expérience acquise entre-temps par les laboratoires pour mettre en oeuvre la méthode. En revanche, les valeurs de CVR n'ont pas varié (de 10 à 20 %), ce qui laisse penser que l'étalonnage de la méthode par un matériau de référence certifié n'est toujours pas pratiqué de manière rigoureuse. La fidélité de

Tableau 5. Résultats d'analyses de l'échantillon A par les méthodes GradSIN, IsoGTL et GradGTL (GSL totaux en $\mu\text{mol/g}$ de graines sèches).

Méthode	Échantillon A	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Lab. 5	Lab. 6
GradSIN Référence	Rep. 1	8,5	9,3	8,0	11,3	14,0	10,0
	Rep. 2	8,7	9,2	8,1	11,1	14,0	10,1
	Rep. 3	8,4	8,9	7,7	12,0	13,6	10,1
	Moyenne	8,5	9,1	7,9	11,5	13,9	10,1
IsoGTL Rapide	Rep. 1	9,4	10,5	5,9	13,0	11,7	11,4
	Rep. 2	9,5	10,1	7,3	13,0	12,4	11,4
	Rep. 3	10,0	10,7	6,4	12,5	11,5	11,5
	Moyenne	9,6	10,4	6,5	12,8	11,9	11,4
GradGTL	Rep. 1	7,5	11,5	7,4	11,8	12,9	10,9
	Rep. 2	7,8	11,6	7,7	11,8	11,8	10,6
	Rep. 3	8,0	11,7	7,1	11,2	12,3	10,5
	Moyenne	7,7	11,6	7,4	11,6	12,3	10,7

Tableau 6. Résultats d'analyse de l'échantillon B par les méthodes GradSIN, IsoGTL et GradGTL (GSL totaux en $\mu\text{mol/g}$ de graines sèches).

Méthode	Échantillon B	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Lab. 5	Lab. 6
GradSIN Référence	Rep. 1	20,3	17,1	13,4	21,6	23,7	20,9
	Rep. 2	19,6	18,8	14,1	22,3	24,6	20,9
	Rep. 3	19,1	19,5	15,0	22,2	23,1	20,7
	Moyenne	19,7	18,4	14,2	22,0	23,8	20,8
IsoGTL Rapide	Rep. 1	18,8	20,0	14,3	23,7	21,5	22,3
	Rep. 2	19,2	20,5	14,4	23,9	21,3	22,3
	Rep. 3	19,1	19,6	12,5	22,9	21,1	23,2
	Moyenne	19,0	20,0	13,7	23,5	21,3	22,6
GradGTL	Rep. 1	14,6	20,8	12,2	22,5	22,5	21,8
	Rep. 2	14,4	21,3	12,4	23,5	23,1	22,2
	Rep. 3	14,7	20,8	11,1	22,5	22,1	22,5
	Moyenne	14,6	21,0	11,9	22,8	22,6	22,2

Tableau 7. Résultats d'analyse de l'échantillon C par les méthodes GradSIN, IsoGTL et GradGTL (GSL totaux en $\mu\text{mol/g}$ de graines sèches).

Méthode	Échantillon C	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Lab. 5	Lab. 6
GradSIN Référence	Rep. 1	54,6	51,5	39,1	61,3	60,3	58,1
	Rep. 2	57,6	51,9	37,3	64,0	57,6	58,0
	Rep. 3	55,2	52,0	37,9	59,5	60,6	59,3
	Moyenne	55,8	51,8	38,1	61,6	59,5	58,5
IsoGTL Rapide	Rep. 1	42,2	58,7	37,7	50,9	57,6	61,1
	Rep. 2	42,9	50,3	42,6	47,1	58,5	62,3
	Rep. 3	42,7	47,5	34,3	51,9	57,6	60,7
	Moyenne	42,6	52,2	38,2	50,0	57,9	61,4
GradGTL	Rep. 1	37,1	59,3	36,4	49,9	57,3	60,2
	Rep. 2	38,0	52,2	39,7	47,9	56,4	62,1
	Rep. 3	38,6	49,7	32,7	50,5	55,7	60,3
	Moyenne	37,9	53,7	36,3	49,4	56,5	60,9

Tableau 8. Valeurs de $K_{GTL/SIN}$ mesurées dans les six laboratoires en CPL avec élution isocratique ou avec gradient et valeur théorique donnée par la norme NF EN ISO 9167-1.

Laboratoire	1	2	3	4	5	6
CPL élution isocratique	1,06	0,96	1,38	1,04	1,09	1,37
CPL élution avec gradient	1,04	0,92	1,44	1,05	1,10	1,35
NF EN ISO 9167-1	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95

$K_{GTL/SIN} = (C_{GTL} / C_{GTL}) \times (S_{SIN} / S_{GTL})$ avec C : concentration et S : surface du pic chromatographique.

Tableau 9. Répétabilité et reproductibilité des méthodes GradSIN, IsoGTL et GradGTL calculées par le logiciel AIL 5725.

Échantillon	A			B			C		
	GradSIN	IsoGTL	GradGTL	GradSIN	IsoGTL	GradGTL	GradSIN	IsoGTL	GradGTL
Nombre de laboratoires participants	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Nombre de laboratoires retenus*	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Nombre labos acceptés par AIL 5725	5	5	5	5	5	5	5	4**	4**
Moyenne	10,6	11,2	10,8	21,0	21,3	20,6	57,4	53,0	51,2
sr : écart-type répétabilité	0,26	0,32	0,33	0,72	0,41	0,40	1,5	1,4	1,0
Cv : CV répétabilité (%)	2,5	2,8	3,0	3,5	1,9	2,0	2,6	2,6	2,0
r : répétabilité 95 % (2,83 sr)	0,75	0,90	0,93	2,1	1,2	1,1	4,2	3,9	2,9
sR : écart-type reproductibilité	2,1	1,3	1,8	2,2	1,9	3,5	4,0	8,5	10
CVR : CV reproductibilité (%)	20	11	17	10	8,7	17	6,9	16	20
R : reproductibilité 95 % (2,83 sR)	6,1	3,6	5,1	6,1	5,2	9,8	11	24	28

* Le laboratoire n° 3 n'est pas retenu pour l'analyse statistique pour non-respect du mode opératoire de la norme.

** Le laboratoire n° 2 est éliminé par le logiciel AIL 5725 pour variance de répétabilité aberrante.

Tableau 10. Résultats d'un essai inter-laboratoires organisé par l'AFNOR (octobre 1988) pour l'évaluation du projet de norme ISO/DP 9167 (traitement statistique selon NF ISO 5725).

Échantillon	Colza A	Colza B	Colza C	Colza D
Nombre de laboratoires retenus	11	11	11	11
Moyenne (µmol/g graine sèche)	20,6	14,1	4,9	25,6
sr : écart-type répétabilité	1,7	0,6	0,3	0,8
Cv : CV répétabilité (%)	8,5	4,4	6,7	3,3
r : répétabilité 95 % (2,83 sr)	4,9	1,7	0,9	2,4
sR : écart-type reproductibilité	3,4	2,5	1,5	2,4
CVR : CV reproductibilité (%)	17	18	31	9,4
R : reproductibilité 95 % (2,83 sR)	9,6	7,1	1,4	6,8

la méthode GradSIN mesurée dans ce circuit satisfait la norme NF EN ISO 9167-1 et peut donc servir de référence pour la validation de la méthode IsoGTL.

Validation de la méthode IsoGTL

Les trois méthodes GradSIN, GradGTL et IsoGTL ont été comparées deux à deux sur le plan de la fidélité et de la justesse relative. La comparaison

entre GradSIN et IsoGTL (tableau 11) est la base de la validation de la méthode rapide par rapport à la méthode de référence.

La comparaison entre GradGTL et IsoGTL (tableau 12) montre l'influence du mode d'élution et la comparaison entre GradSIN et GradGTL montre l'influence de la nature de l'étalon interne (tableau 13). Les résultats de ces comparaisons indiquent que les trois méthodes sont équivalentes au risque de 5 % sur le plan de la justesse relative et de la fidélité pour les trois échantillons.

Tableau 11. Comparaison de la justesse et de la fidélité entre les méthodes de référence (GradSIN) et rapide (IsoGTL) réalisée par le logiciel AIL 5725.

Échantillon	A		B		C	
Méthode	GradSIN	IsoGTL	GradSIN	IsoGTL	GradSIN	IsoGTL
Écart-type de répétabilité	0,26	0,32	0,72	0,41	1,48	1,37
Écart-type de reproductibilité	2,14	1,27	2,15	1,85	3,97	8,47
Justesse	Égalité (1)		Égalité (1)		Égalité (1)	
Valeur calculée	0,57		0,27		0,99	
Valeur limite	2,00		2,00		2,00	
Fidélité	Égalité (1)		Égalité (1)		Égalité (1)	
Valeur calculée	1,46		3,12		1,17	
Valeur limite	3,72		3,72		3,53	

(1) : hypothèse d'égalité acceptée au risque de 5 %.

Tableau 12. Comparaison de la justesse et de la fidélité entre les méthodes GradGTL et IsoGTL réalisée par le logiciel AIL 5725.

Échantillon	A		B		C	
Méthode	GradGTL	IsoGTL	GradGTL	IsoGTL	GradGTL	IsoGTL
Écart-type de répétabilité	0,33	0,32	0,40	0,41	1,03	1,37
Écart-type de reproductibilité	1,81	1,27	3,47	1,85	10,0	8,47
Justesse	Égalité (1)		Égalité (1)		Égalité (1)	
Valeur calculée	0,46		0,39		0,27	
Valeur limite	2,00		2,00		2,00	
Fidélité	Égalité (1)		Égalité (1)		Égalité (1)	
Valeur calculée	1,07		1,02		1,78	
Valeur limite	3,72		3,72		3,47	

(1) : hypothèse d'égalité acceptée au risque de 5 %.

Tableau 13. Comparaison de la justesse et de la fidélité entre les méthodes GradSIN et GradGTL réalisée par le logiciel AIL 5725.

Échantillon	A		B		C	
Méthode	GradSIN	GradGTL	GradSIN	GradGTL	GradSIN	GradGTL
Ecart-type de répétabilité	0,26	0,33	0,72	0,40	1,48	1,03
Ecart-type de reproductibilité	2,14	1,81	2,15	3,47	3,97	10,0
Justesse	Égalité (1)		Égalité (1)		Égalité (1)	
Valeur calculée	0,15		0,19		1,19	
Valeur limite	2,00		2,00		2,00	
Fidélité	Égalité (1)		Égalité (1)		Égalité (1)	
Valeur calculée	1,56		3,20		2,09	
Valeur limite	3,72		3,72		3,53	

(1) : hypothèse d'égalité acceptée au risque de 5 %.

Cependant, pour les analyses des mélanges de SIN et de GTL, on peut remarquer que le coefficient de réponse relatif de GTL par rapport à SIN ($K_{GTL/SIN}$) varie considérablement en fonction du laboratoire et très peu en fonction du mode d'élution (tableau 8). Cela laisse penser que le mode d'élution a moins d'influence que l'étalon interne, sur les résultats. Par ailleurs, des écarts importants existent encore entre les laboratoires sur les

résultats GradGTL et IsoGTL malgré les corrections effectuées à l'aide de $K_{GTL/SIN}$. Ces différences sont aussi constatées au même titre avec la méthode GradSIN. Elles sont dues vraisemblablement à une mauvaise connaissance de la teneur réelle de la SIN utilisée, car par l'intermédiaire de $K_{GTL/SIN}$ la teneur de la GTL utilisée dans ce circuit est corrigée par rapport à la SIN.

Bien que la stabilité de la SIN mise à la disposition des laboratoires par les fournisseurs de produits de laboratoire soit en général satisfaisante, il paraît utile de vérifier de manière rigoureuse les concentrations des solutions utilisées pour l'étalonnage des analyses. Cette précaution devient la règle avec la GTL car la pureté des lots disponibles dans le commerce est beaucoup moins élevée et constante que pour la SIN.

Conclusion

Ce circuit d'analyse inter-laboratoires démontre que la méthode d'analyse des GSL totaux par CPL isocratique (AFNOR T 60 D - Doc 22) est équivalente à la méthode de référence (CPL avec gradient d'élution, NF EN ISO 9167-1) dans le domaine de l'analyse des graines de colza. Les performances de répétabilité de la méthode de référence ont été jugées meilleures qu'à l'origine de la méthode, vraisemblablement à cause de l'expérience acquise par les laboratoires participants. Le mode d'élution n'a que peu d'influence sur le résultat. En revanche, il apparaît que l'influence de l'étalon interne sur la reproductibilité inter-laboratoires est d'une importance plus grande et peut entraîner une différence de sensibilité entre les deux méthodes si sa pureté n'est pas connue avec précision. La glucotropaéoline et la sinigrine utilisées dans ce circuit et disponibles dans le commerce ne sont pas des étalons certifiés et la vérification du titre de l'une par rapport à l'autre sans utiliser de méthode indépendante ne permet pas de connaître précisément leurs titres réels.

Ces résultats rappellent que pour disposer d'une meilleure reproductibilité entre laboratoires, il est nécessaire de respecter scrupuleusement les modes opératoires normalisés dans les étapes critiques et de s'assurer de l'étalonnage correct de l'analyse en utilisant des étalons internes et des matériaux de référence certifiés ou de qualité reconnue. Ces précautions

font partie des exigences de la norme NF EN 45001 [11] pour l'accréditation des laboratoires.

RÉFÉRENCES

1. J.O.C.E. - L 67 du 12 mars 1992, règlement n° 615/92, annexe IV.
2. PERNY A, KROUTI M, QUINSAC A, RIBAILLIER D (1991). Crucifères adventices du colza, plantes à inconvénients multiples. *Phytoma. La défense des végétaux*, 426 : 43-5.
3. QUINSAC A, CAHOUS X, KROUTI M, PERNY A, RIBAILLIER D (1995). Analyse par chromatographie en phase liquide des glucosinolates dans les crucifères adventices du colza en France. Proc on 9th International Rapeseed Congress, GCIRC, Cambridge 4-7 July, 3 : 919-21.
4. J.O.C.E. - L 67 du 12 mars 1992, règlement n° 615/92, annexe V.
5. J.O.C.E. - L 170 du 29 juin 1990, règlement n° 1864/90, annexe VIII.
6. NF EN ISO 9167-1. Graines de colza. Dosage des glucosinolates. Partie 1 : Méthode par chromatographie liquide à haute performance.
7. WATHELET J-P, RIBAILLIER D, SEVERIN M, QUINSAC A (1994). L'analyse des glucosinolates, travaux réalisés par l'Organisation internationale de standardisation et la CEE. *Bull GCIRC*, 10 : 167-77.
8. QUINSAC A, RIBAILLIER D, ELFAKIR C, LAFOSSE M, DREUX M (1991). A new approach to the study of glucosinolates by isocratic liquid chromatography. Part 1. Rapid determination of desulfated derivatives of rapeseed glucosinolates. *J Assoc Off Chem*, 74 : 932-9.
9. QUINSAC A, RIBAILLIER D (1994). Analyse quantitative rapide des glucosinolates du colza par chromatographie en phase liquide isocratique. *Bull GCIRC*, 10 : 147-54.
10. AFNOR - T 60 Doc 22. Graines de colza. Dosage des glucosinolates. Méthode rapide par chromatographie liquide à haute performance.
11. NF EN 45001. Critères généraux concernant le fonctionnement de laboratoires d'essais.