

Analyse des phytates d'une farine de graines de cotonnier par chromatographie en phase liquide

C. Marqué, L. Ségueilha, G. Moulin, V. Vialettes, P. Galzy

C. Marqué, V. Vialettes : laboratoire de technologie cotonniere, CIRAD-CA, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France.

L. Ségueilha, G. Moulin, P. Galzy : chaire de microbiologie industrielle et de génétique des micro-organismes, ENSA, place Viala, 34060 Montpellier Cedex, France.

Résumé

Les auteurs proposent une méthode pour extraire, purifier et doser les inositols phosphates (IP_3 à IP_6). Ceux-ci sont purifiés par chromatographie échangeuse d'anions, puis dosés par chromatographie en phase liquide à haute performance, par appariement d'ions sur colonne RP C18.

Les phytates sont dosés par cette méthode dans deux farines à base de graines de cotonnier d'origines différentes et dans un échantillon de son.

L'analyse révèle systématiquement la présence d' IP_3 dans les échantillons de farine (de coton ou de son) et montre une grande différence de teneur en inositols phosphates entre les deux farines de coton étudiées. La technologie employée pour produire la farine de coton, ainsi que la variété des graines de cotonnier traitées doivent avoir une forte incidence sur la teneur en phytates des farines.

MOTS-CLES : coton, son, farines, dosages, phytates, inositols phosphates, chromatographie en phase liquide.

Introduction

L'acide phytique est un constituant de la plupart des graines de céréales et de quelques fruits et légumes (OBERLEAS, 1973). Dans les graines, il est souvent présent sous forme de phytine (un sel de calcium et de magnésium de l'acide phytique) et représente 60 à 90 % du phosphore total (LOLAS et MARKAKIS, 1975).

Bien qu'ils ne soient pas toxiques, les phytates possèdent des inconvénients nutritionnels largement démontrés.

Une quantité excessive d'acide phytique dans un régime alimentaire peut donner des effets négatifs sur la balance minérale. Il forme des complexes insolubles avec les ions cuivreux, zinc, ferrique et calcium au pH physiologique (GRAF, 1986 ; NOLAN *et al.*, 1987) et réduit de ce fait la biodisponibilité de ces minéraux.

Au pH 6, qui est approximativement le pH du duodénum où se réalise la plus importante absorption des ions divalents, on observe le maximum de précipitation de phytate de zinc ou de phytate mixte de zinc et de calcium (OBERLEAS, 1973).

De même, l'acide phytique donne, avec les protéines, des interactions de type ionique et entraîne une diminution de leur solubilité.

Selon WOZENSKI et WOODBURN (1975), les teneurs en acide phytique d'une farine de coton glanded, d'une farine glandless et d'une farine obtenue par classification à air sont respectivement 2,86 %, 4,29 % et 3,35 %.

Dans la perspective d'utiliser des farines de graines de cotonnier dans des aliments hyperprotéinés destinés à l'alimentation de jeunes enfants, nous nous sommes attachés à réduire la teneur en acide phytique des farines de coton par un procédé enzymatique.

En parallèle aux travaux portant sur la sélection d'une levure à haute activité phytasique (LAMBRECHTS, 1989) et sur l'étude du processus de fermentation réalisés par l'ENSA à Montpellier, nous avons développé une méthode de dosage des inositols phosphates par chromatographie en phase liquide à haute performance (C.L.H.P.) afin de pouvoir suivre toutes les étapes du procédé enzymatique.

Pour doser l'acide phytique, on distingue trois grands types de méthodes : les méthodes gravimétriques directes, volumétriques indirectes et la C.L.H.P. après une étape de purification sur colonne échangeuse d'anions.

Le principe de ces techniques est le suivant. Les phytates sont extraits soit par une solution acide (chlorhydrique ou

trichloracétique), soit par hydrolyse enzymatique (UPPSTROM et SVENSSON, 1980).

Les méthodes gravimétriques et volumétriques reposent sur la propriété des phytates à former un complexe stable et insoluble avec l'ion ferrique en solution à pH acide. On considère alors que la seule source de phosphore est l'acide phytique.

Dans la méthode gravimétrique directe, le précipité de phytate ferrique est recueilli afin d'en déterminer la teneur en phosphore ou en inositol, après séchage et hydrolyse (BAGHERI, 1982).

La méthode volumétrique indirecte est réalisée en ajoutant un excès connu de solution de chlorure ferrique à une solution contenant des phytates. La concentration en ions ferriques, non précipités par les phytates, est déterminée par dosage colorimétrique (LATTA et ESKIN, 1980 ; HOLT, 1955).

Pour convertir la teneur en fer ou en phosphore en acide phytique, on utilise le rapport de conversion suivant : Fe : P, 4 : 6. En effet, les 12 atomes d'hydrogène de l'acide phytique peuvent théoriquement être remplacés par 4 ions ferriques (OBERLEAS et HARLAND, 1986).

Les méthodes indirectes sont généralement plus reproductibles que la titration directe de l'acide phytique, mais sont sujettes à des erreurs quand la teneur en acide phytique est faible. Selon SAMOTUS et SCHWIMMER (1962), in OBERLEAS (1971), la présence de substances réductrices dans l'échantillon dosé, comme l'acide ascorbique et les acides chlorogéniques qui réduisent l'ion ferrique en ion ferreux, conduit à une surévaluation des résultats obtenus avec la méthode volumétrique indirecte. Cet inconvénient peut être supprimé en ajoutant une goutte d'eau oxygénée à 30 % dans le mélange réactionnel.

Un autre inconvénient majeur de ces méthodes est que d'autres composés contenant du phosphore sont précipités en même temps que l'acide phytique. DE BOLAND *et al.* (1975) montrent que tous les inositols phosphates IP₁ à IP₆ forment un complexe ferrique insoluble, mais que les mono, di et tri phosphates ne précipitent pas de manière quantitative.

Pour déterminer la teneur en inositols phosphates intermédiaires (IP₂ à IP₅), on doit faire appel à des techniques

chromatographiques par échange d'anions ou en phase liquide à haute performance (C.L.H.P.).

Les premières applications de la C.L.H.P. pour doser l'acide phytique (TANGENDIAJA *et al.*, 1980 ; CAMIRE et CLYDESDALE, 1982 ; GRAF et DINTZIS, 1982 ; KNUCKLES *et al.*, 1982) sont pratiquées en phase inverse sur colonne RP C18. La détection est réalisée par réfractométrie. LEE et ABENDROTH (1983), SANDBERG et AHDERINNE (1986) et SANDBERG *et al.* (1987) dosent l'acide phytique IP₆ et les inositols phosphates IP₅, IP₄ et IP₃ par appariement d'ions en phase inverse. Les monophosphates myo-inositols sont déterminés par C.L.H.P. mais pas les inositols 2-5 phosphates. Ces composés sont habituellement séparés par chromatographie sur papier (SEQUI *et al.*, 1966) et par chromatographie échangeuse d'ions (BARTLETT, 1982).

La méthode que nous avons utilisée pour analyser les inositols phosphates est une adaptation de celle décrite par SANDBERG et AHDERINNE (1986). Elle consiste en une séparation des tri, tétra, penta et hexaphosphates appariés à des ions tetrabutylammonium par chromatographie en phase liquide, en phase inverse, sur colonne RPC18, après purification sur colonne échangeuse d'anions.

Les modifications apportées à la méthode décrite par SANDBERG et AHDERINNE (1986) sont les suivantes.

Nous avons supprimé l'étape de congélation de l'extrait de phytates (une nuit) que SANDBERG et AHDERINNE (1986) prévoient avant la centrifugation car nous avons constaté qu'une certaine proportion de phytates peut précipiter à froid.

La chromatographie échangeuse d'anions effectuée pour purifier les inositols phosphates est réalisée en éluant les phytates par 7 fois 4 ml d'acide chlorhydrique 2 N (extraction proche de 100 %) au lieu de 5 fois 4 ml d'acide chlorhydrique 2 N (extraction proche de 99 %).

Nous ne saturons pas la phase stationnaire de la colonne RP C18 par plusieurs injections d'une solution de phytate de sodium 5 µM/ml. Nous incluons directement le phytate de sodium dans la phase mobile pour atteindre une concentration de 10 µM.

Nous thermostatons la colonne à 40°C et appliquons un débit de phase mobile de 1 ml/min au lieu de 0,4 ml/min.

Matériels et méthodes

Matériels

Le phytate de sodium utilisé comme étalon provient de chez SIGMA (référence P 3168).

Les échantillons analysés sont les suivants :

- farine de graines de cotonnier glandless délipidée par extraction directe à l'hexane (GERDOC, Pessac) ;
- farine de graines de cotonnier sans gossypol obtenue par un procédé d'extrusion suivi d'une délipidation à l'hexane (usine TRITURAF, Côte-d'Ivoire) ;
- farine de son procurée par l'ENSA (Montpellier).

La purification des phytates est réalisée par chromatographie échangeuse d'anions sur résine Extra Sep, Sax, 500 mg/2,8 ml (Touzard et Matignon).

L'appareil de chromatographie en phase liquide à haute performance est composé d'une vanne d'injection Rhéodyne, d'une pompe Waters modèle 510, d'une colonne RP C18 Merck dont la taille des particules est égale à 5 μm (25 cm x 0,46 cm) thermostatée à 40°C et d'un réfractomètre Waters modèle R 401.

Méthodes

Extraction des phytates

Une prise d'essai de farine (0,5 g) est agitée en présence de 20 ml d'acide chlorhydrique 0,5 M durant 3 heures, à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 15 000 tours/min durant 15 min. Du liquide surnageant, 10 ml sont prélevés, placés dans un ballon rond de 250 ml et évaporés à sec, sous vide, à une température ne dépassant pas 40°C.

Purification sur résine échangeuse d'ions

L'extrait sec obtenu est repris par 15 ml, puis 10 ml, puis 5 ml d'acide chlorhydrique 0,025 N, et chargé au fur et à mesure sur la résine échangeuse d'anions. Le débit d'élution est maintenu à 15 gouttes/min au moyen d'une pompe péristaltique. L'éluat n'est pas conservé. Les phytates sont élués ensuite par 7 fois 4 ml d'acide chlorhydrique 2,0 N dans un ballon rond de 250 ml avec un débit de 15 gouttes/min. La résine est réalimentée en acide dès qu'il ne reste plus de liquide à sa surface. L'ensemble des fractions d'élution est évaporé à sec, sous vide, à une température ne dépassant pas 40°C.

Résultats et discussion

Étalonnage

Dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, le phytate de sodium sort au bout de 10,9 min (fig. 1).

La droite d'étalonnage qui donne la surface du pic correspondant au phytate de sodium en fonction de sa concentration dans la solution injectée passe par zéro. Son coefficient directeur est égal à 19 532,4 (fig. 3).

Optimisation de la purification des inositols phosphates par chromatographie échangeuse d'ions

A partir d'une solution de phytate de sodium 5 mM, 15 ml sont prélevés, passés sur une résine échangeuse d'anions Extra Sep, Sax, 500 mg/2,8 ml. Le débit de passage à travers la colonne est maintenu à 15 gouttes/min

Chromatographie en phase liquide à haute performance

La phase mobile est préparée de la manière suivante : 15 ml d'une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium à 40 % dans l'eau et 1 ml d'une solution de phytate de sodium 10 mM sont ajoutés à un litre d'une solution constituée de 56 % de méthanol et de 44 % d'acide formique 0,05 M. Le pH de la phase mobile est ajusté à 4,3 avec de l'acide sulfurique 9 N.

Le débit de la phase mobile est de 1 ml/min.

Pour être analysé, l'extrait sec issu de l'étape de purification sur résine échangeuse d'ions est repris par 2 ml de phase mobile sans phytate. Le liquide est ensuite filtré, sur membrane de 0,25 μm et injecté dans le système chromatographique.

Un étalonnage externe est réalisé en injectant des solutions de phytate de sodium de concentration croissante.

Expression des résultats

Nous avons utilisé les facteurs de correction qui tiennent compte de la réponse du détecteur pour les inositols phosphates donnés par SANDBERG et AHDERINNE (1986). Ces deux facteurs ont été calculés en déterminant la teneur en inositol et en phosphore des fractions de la phase mobile contenant les inositols phosphates : ces fractions sont recueillies en sortie de colonne RP C18 (CLHP).

Le facteur de correction est égal à 1,1 pour le pentaphosphoinositol (IP₅), à 1,5 pour le tétraphosphoinositol (IP₄) et à 2,4 pour le triphosphoinositol (IP₃).

au moyen d'une pompe péristaltique. Le dosage des phytates est réalisé sur le premier éluat, évacué durant la fixation des phytates sur la résine, et sur chaque fraction d'élution des phytates par l'acide chlorhydrique 2 N.

La totalité des phytates sont retenus sur la résine au cours de l'étape d'adsorption (tabl. 1). En effet, on ne détecte pas de phytate dans le premier éluat. Les phytates sont ensuite totalement élués par 7 fois 4 ml d'acide chlorhydrique 2 N à la suite de l'augmentation de la force ionique.

La même étude réalisée avec un débit d'élution de 30 gouttes/min montre que 10 fractions d'élution de 4 ml d'acide chlorhydrique 2 N sont nécessaires pour éluer la totalité des phytates.

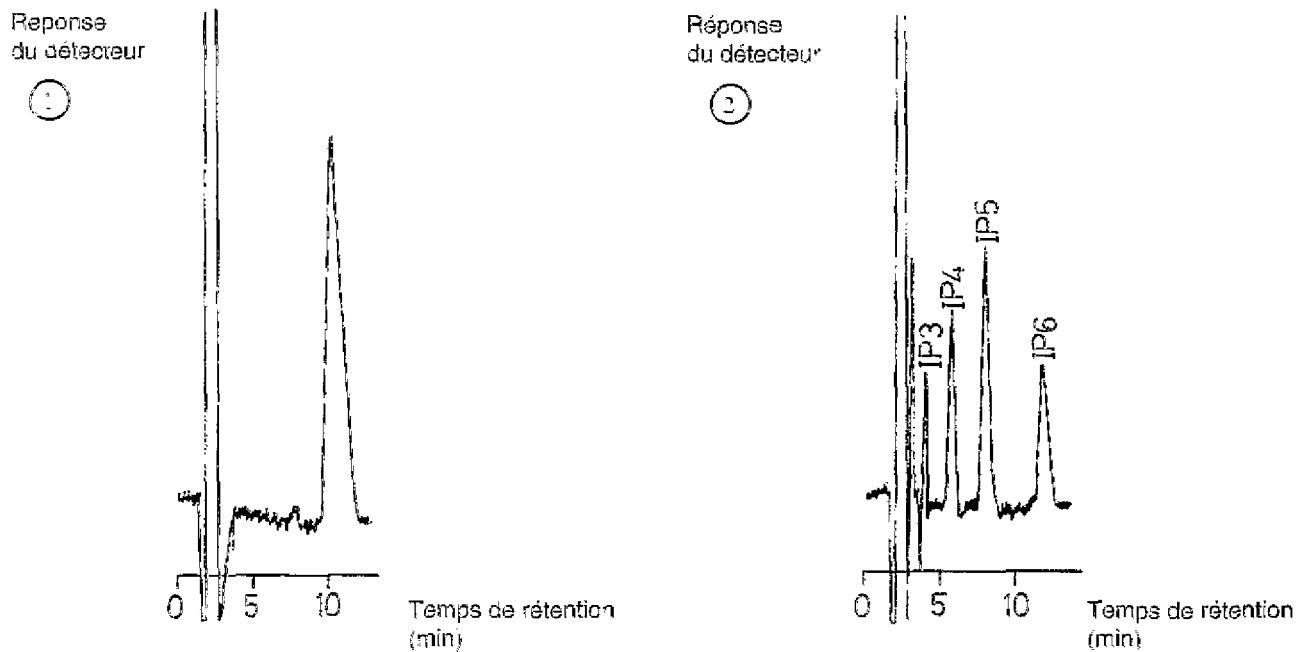


Figure 1
Dosage du phytate de sodium par C.L.H.P. (adaptation de la méthode de SANDBERG et AHDERINNE, 1986)
Sodium phytate quantitative analysis by H.P.L.C. (adaptation of the SANDBERG and AHDERINNE method, 1986).

Figure 2
Chromatogramme d'un mélange d'inositols phosphates dosés par C.L.H.P. (adaptation de la méthode de SANDBERG et AHDERINNE, 1986).
Chromatogram of an inositol phosphate mixture after quantitative analysis by H.P.L.C. (adaptation of the SANDBERG and AHDERINNE method, 1986).

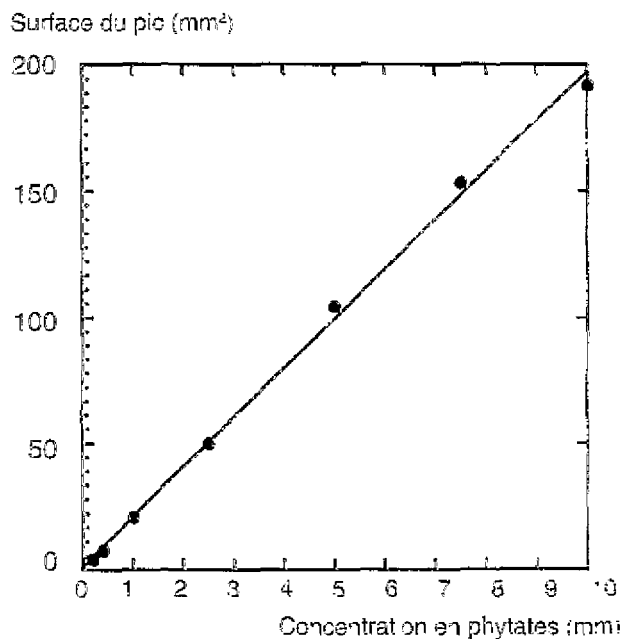


Figure 3
Droite d'étalonnage pour le dosage du phytate de sodium par C.L.H.P. (adaptation de la méthode de SANDBERG et AHDERINNE, 1986).
Calibration curve for sodium phytate analysis by H.P.L.C. (adaptation of the SANDBERG and AHDERINNE method, 1986).

TABLEAU 1
Optimisation de la chromatographie échangeuse d'ions pour la purification des phytates.
Optimization of ion exchange chromatography for phytate purification.

Fraction d'éluion	Surface du pic	Phytate élué (%)
Eluat précurseur (adsorption des phytates)	Non détecté	0
Première (4 ml)	485 064	62,77
Deuxième (4 ml)	171 507	22,19
Troisième (4 ml)	71 789	9,30
Quatrième (4 ml)	35 000	4,53
Cinquième (4 ml)	7 675	0,99
Sixième (4 ml)	1 732	0,22
Septième (4 ml)	traces	
Huitième (4 ml)	traces	

Evaluation de la séparation des inositols phosphates par le calcul des facteurs de capacité

Un mélange d'inositols phosphates est préparé, à partir de phytate de sodium, par hydrolyse chimique de la manière suivante. Cent millilitres d'une solution de phytate de sodium 5 mM dans de l'acide chlorhydrique 0,5 M sont chauffés à reflux. Des prélèvements de 10 ml sont effectués au bout de 4h 30 et de 7h 00 ; ils sont évaporés à sec, puis repris par 10 ml d'eau, avant d'être analysés par C.L.H.P. La figure 2 montre un chromatogramme obtenu après avoir injecté le mélange prélevé au bout de 4h 30 d'incubation.

La sélectivité de la colonne et les facteurs de capacité pour les inositols phosphates (IP_3 , IP_4 , IP_5 et IP_6) sont les suivants.

Temps de rétention :

IP_3 , 4,26 min	$k' = 1,13$
IP_4 , 5,84 min	$k' = 1,92$
IP_5 , 7,79 min	$k' = 2,89$
IP_6 , 10,96 min	$k' = 4,48$

La sélectivité, en moyenne égale à 1,58, montre une bonne séparation de ces composés.

Dosage des phytates dans une farine de coton

Le tableau 2 rassemble les résultats obtenus pour une farine de coton délipidée par extraction directe à l'hexane (GERDOC, Pessac).

L'analyse de la farine de coton révèle systématiquement la présence d' IP_5 à un taux avoisinant les 12 % de la totalité des inositols phosphates.

Ces résultats montrent un taux de phytates supérieur à celui auquel on pouvait s'attendre d'après la littérature. En effet les pourcentages en phytates annoncés par plusieurs auteurs, pour les dérivés des graines de cotonnier, sont plus proches de 5 % que de 8 % (WOZENSKI et WOODBURN, 1975). Par ailleurs, nous avons analysé une farine de coton produite par l'extrusion d'amandes de graines sans gossypol suivie d'une délipidation avec de l'hexane (usine TRITURAF, Côte-d'Ivoire). Nous avons déterminé que la teneur en acide phytique (IP_6) de cette farine, prise à 0 % d'humidité, est égale à 4,81 % et que celle en inositols pentaphosphates (IP_5) représente 1,42 %. Cette valeur est plus en accord avec celle annoncée par WOZENSKI et WOODBURN (1975) pour une farine sans gossypol (4,29 %). La technologie employée pour produire la farine de coton, ainsi que la variété de cotonnier dont sont issues les graines pourraient avoir une grande importance sur la teneur en phytates des farines.

Pour tester la méthode de dosage nous avons, dans un premier temps, analysé la même farine de coton (produite par extraction directe à l'hexane) après y avoir ajouté une quantité connue de phytate de sodium. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

Ces résultats montrent que la totalité des phytates rajoutés est dosée correctement.

Dans un second temps, nous avons analysé un échantillon de son dont la teneur en phytate est estimée à 4,55 % plus ou moins 1,03 %. Pour cela, en raison de sa teneur importante en amidon, nous avons été contraints de centrifuger l'échantillon avant de le passer sur la résine échangeuse d'ions. L'analyse par CLHP révèle 3,42 % d' IP_6 et 0,90 % d' IP_5 dans l'échantillon de son analysé. Ces résultats sont donc du même ordre que ceux escomptés.

TABLEAU 2

Teneur en inositols phosphates d'une farine de cotonnier sans gossypol produite par extraction directe à l'hexane. Les résultats se rapportent à la matière fraîche.
Inositol phosphate content of a gossypol-free cottonseed flour produced by direct extraction with hexane. The results are expressed in relation to fresh matter.

Référence de l'analyse	IP ₃ (%) (facteur = 1,1)	IP ₅ (%)
Août 1991	1,18	8,11
Septembre 1991 : n° 1	0,91	7,46
Septembre 1991 : n° 2	0,92	7,92
Septembre 1991 : n° 3	0,86	7,80
Moyenne	0,97	7,82

TABLEAU 3

Dosage des phytates dans une farine de coton après y avoir ajouté une quantité connue de phytate de sodium.
Quantitative analysis of phytates in a cottonseed flour after adding a known quantity of sodium phytate.

	Farine de coton	Farine + 1,4 % de phytate de sodium (résultat théorique)	Farine + 1,4 % de phytate de sodium (résultat expérimental)
IP ₃ (%)	3,54	9,94	9,91

Conclusion

Le dosage des inositols tri, tetra, penta et hexaphosphates est réalisable avec la méthode de SANDBERG et AHDERINNE (1986) telle que nous la modifions. La séparation de ces composés est bien réalisée avec une durée d'analyse qui ne dépasse pas 12 min.

Toutefois, la forte teneur en phytates détectée dans la farine de coton délipidée par extraction directe à l'hexane reste préoccupante. À en juger par les résultats obtenus

pour le son, pour la farine de coton produite par TRITURAF et pour l'échantillon de farine à laquelle nous avons ajouté une quantité connue de phytate, il ne semble pas que la méthode de dosage soit à mettre en cause. Par conséquent, cette méthode peut être utilisée pour suivre tout le processus de dégradation des phytates de la farine de coton par une levure. Cependant, il est indispensable de rechercher l'origine de la teneur élevée en phytates de la farine de coton produite par extraction directe à l'hexane.

Références bibliographiques

- BAGHERI S., 1982. - Dosage colorimétrique du phosphore phytique. Communication personnelle, station de nutrition INRA, Jouy-en-Josas, France.
- BARTLETT G. R., 1982. - Isolation and assay of red-cell, inositol polyphosphates. *Anal. Biochem.*, 124, 425 - 431.
- CAMIRE A. L., CLYDESDALE F. M., 1982. - Analysis of phytic acid in foods by H.P.L.C. *J. Food Sci.*, 47, 575 - 578.
- DE BOLAND A. R., GARNER G.B., O'DELL B. L., 1975. - Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. *J. Agric. Food Chem.*, 23, 1186-1189.
- GRAF E., 1986. - Phytic acid. Chemistry and application. *E. Graf Pilatus press*, Minneapolis, 344-360.
- GRAF E., DINTZIS F. R., 1982 a. - Determination of phytic acid in foods by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1094-1097.
- HOLTR., 1955. - Studies of dried peas. The determination of phytates phosphorous. *J. Sci. Food Agric.*, 6, 136-142.
- KNUCKLES B. E., KUZMICKY D. D., BETSCHART A.A., 1982. - HPLC analysis of phytic acid in selected food and biological samples. *J. Food Sci.*, 47, 4, 1257-1258.

- LAMBRECHTS C., 1989. - Etudes préliminaires de l'activité phytasique de quelques levures. Mémoire de DEA sciences des aliments, USTL, Montpellier, France, 45 p.
- LATTA M., ESKIN, M.J., 1980. - A Simple and rapid colorimetric method for Phytat determination. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1313 - 1315.
- LEE K., ABENDROTH J. A., 1983. - High performance liquid chromatographic determination of phytic acid in foods. *J. Food Sci.*, 48, 1344 - 1345.
- LOLAS G. M., MARKAKIS P., 1975. - Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 23, 13-15.
- NOLAN K. B., DUFFIN P. A., Mc WEENEY D. J., 1987. - Effect of phytate on mineral bioavailability. *In vitro* studies on Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Cu⁺⁺, and Zn⁺⁺ (also Cd⁺⁺) solubilities in the presence of phytate. *J. Sci. Food Agric.*, 40, 79 - 85.
- OBERLEAS D., 1973. - Phytates. In: Toxicants occurring naturally in foods. 2nd ed. *F. M. Stong, National Academy of Sciences*, Washington, DC, 369-371.
- OBERLEAS D., 1971. - The determination of the phytate and inositol phosphates. *Methods of biochemical analysis*, 20, 87-101.
- OBERLEAS D., HARLAND B.F., 1986. - Analytical methods for phytate - In: Phytic acid chemistry and applications. *E. Graf, pilatus press*, Minneapolis, 77-100.
- SANDBERG A.S., ANDERSSON H., CARLSSON N. G., SANDSTROM B., 1987. - Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine. Effect of extrusion cooking on digestibility. *J. Nutr.*, 117, 2061 - 2065.
- SANDBERG A. S., AHDERINNE R., 1986. - HPLC method for determination of inositol tri, tetra, penta and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food Sci.*, 51, 547 - 550.
- SEQUI P., MARCHESINI A., GALANTE E., 1966. - Chromatografia su Carta degli inositol fosfati. *Ric. Sci.*, 36, 183-190.
- TANGENDJAJA B., BUCKLE K. A., WOOTON M., 1980. - Analysis of phytic acid by high performance liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 197, 274-277.
- UPPSTROM B., SVENSSON R., 1980. - Determination of phytic acid in rapeseed meal. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 651-656.
- WOZENSKI J., WOODBURN M., 1975. - Phytic acid (myoinositol hexaphosphate) and phytase activity in flour cottonseed protein products. *Cereal Chem.*, 52, 665-669.

Phytate analysis of a cottonseed flour by liquid chromatography

C. Marquié, L. Segueilha, G. Moulin, V. Vialettes, P. Galzy

Abstract

The authors propose a method for the extraction, anion exchange chromatography purification and quantitative analysis of inositol phosphates (IP₃ to IP₆) using high performance liquid chromatography (H.P.L.C.), through ion pairing on a RP C18 column.

This method was used for quantitative analysis of phytates in two cottonseed flours of different origins and in a bran sample.

The analysis systematically revealed the existence of IP₅ in flour samples (cotton or bran) and showed a substantial difference in inositol phosphate contents between the two cottonseed flours studied.

The technology used to produce the cottonseed flour, and the variety of cottonseeds used must greatly effect the phytate content of the flours.

KEYWORDS: cotton, bran, flours, phytates content determination, inositol phosphates, high performance liquid chromatography.

Introduction

Phytic acid occurs in most cereal seeds and some fruits and vegetables (OBERLEAS, 1973). In seeds, it often occurs in phytin form (a salt of calcium and magnesium in phytic acid) and represents 60% to 90% of total phosphorus (LOLAS and MARKAKIS, 1975).

Although they are not toxic, phytates have been widely shown to have nutritional drawbacks.

An excessive amount of phytic acid in the diet can have adverse effects on mineral balance, since it forms insoluble complexes with copper, zinc, iron and calcium ions at a physiological pH level (GRAF, 1986; NOLAN *et al.*, 1987), thereby reducing the bioavailability of these minerals.

Maximum zinc phytate or mixed zinc and calcium phytate precipitation is observed at pH 6, which is approximately the pH in the duodenum, where most divalent ion absorption takes place. (OBERLEAS, 1973).

Likewise, phytic acid, along with proteins, leads to ionic type interactions and a reduction in their solubility.

According to WOZENSKI and WOODBURN (1975), the phytic acid content of a glanded cottonseed flour, a glandless cottonseed flour and a flour obtained by air classification was 2.86%, 4.29% and 3.35% respectively.

With a view to using cottonseed flour in hyperprotein products for young children, we attempted to reduce the phytic acid content of cottonseed flours using an enzymatic process.

In parallel with work on producing a yeast with high phytase activity (LAMBRECHTS, 1989) and a study of the fermentation process undertaken by ENSA in Montpellier, we developed a quantitative analysis method for inositol phosphates using H.P.L.C., so as to be able to monitor all stages of the enzymatic process.

A distinction can be made between three major types of methods for quantitative analysis of phytic acid: direct gravimetric, indirect volumetric and H.P.L.C. after a purification stage on an anion exchange column.

The principle of these techniques is as follows.

Phytates are extracted either by an acid solution (hydrochloric or trichloroacetic), or by enzymatic hydrolysis (UPPSTROM and SVENSSON, 1980).

The gravimetric and volumetric methods are based on the property of phytates to form a stable, insoluble complex with the ferric ion in a solution with acid pH. It is then considered that the only source of phosphorus is phytic acid.

In the direct gravimetric method, the ferric phytate precipitate is collected, to determine its phosphorus or inositol content after drying and hydrolysis (BAGHERI, 1982).

The indirect volumetric method is carried out by adding a known quantity of excess iron chloride solution to a solution containing phytates. The concentration of ferric ions not precipitated by the phytates is determined by colorimetric quantitative analysis (LATTA and ESKIN, 1980; HOLT, 1955).

To convert the iron or phosphorus content into phytic acid, the following conversion ratio is used: Fe:P, 4:6. In fact, the 12 hydrogen atoms of the phytic acid can theoretically be replaced by 4 ferric ions (OBERLEAS and HARLAND, 1986).

The indirect methods are usually more reproducible than direct quantitative analysis of phytic acid, but they are liable to error when the phytic acid content is low. According to SAMOTUS and SCHWIMMER (1962, in OBERLEAS, 1971), the presence of reducing substances in the quantified sample, such as ascorbic acid and chlorogenic acids, which reduce ferric ions into ferrous ions, leads to overestimation of the results obtained with the indirect volumetric method. This drawback can be removed by adding a drop of 30% peroxide to the reaction mixture.

Another major drawback with these methods is that other compounds containing phosphorus are precipitated at the same time as the phytic acid. DE BOLAND *et al.* (1975) showed that all IP₁ to IP₆ inositol phosphates form an insoluble ferric complex, but that the mono- di- and tri-phosphates do not precipitate quantitatively.

Anion exchange chromatographic techniques or high performance liquid chromatography (H.P.L.C.) are required for determining intermediate inositol phosphate contents (IP₂ to IP₅).

The first applications of H.P.L.C. for quantitative analysis of phytic acid (TANGENDJAJA *et al.*, 1980; CAMIRE and CLYDESDALE, 1982; GRAF and DINTZIS, 1982; KNUCKLES *et al.*, 1982) were carried out in reverse phase on a RP C18 column. Detection was carried out by refractometry. LEE and ABENDROTH (1983), SANDBERG and AHDERINNE (1986) and SANDBERG *et al.* (1987) quantitatively analyzed IP₆ phytic acid and inositol phosphates IP₅, IP₄ and IP₃ by reverse phase ion-pairing. The monophosphate myo-inositols were determined by H.P.L.C., but not the 2-5 inositol phosphates. These compounds are usually separated by paper chromatography (SEQUI *et al.*, 1986) and by ion-exchange chromatography (BARTLETT, 1982).

The method we used to analyze inositol phosphates was an adaptation of that described by SANDBERG and AHDERINNE (1986). It consisted in separating tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates paired with tetrabutylammonium ions by reverse phase liquid chromatography on a RP C18 column after purification on an ion exchange column.

The modifications made to the method described by SANDBERG and AHDERINNE (1986) were as follows:

We eliminated the phytate extract freezing stage (one night) that SANDBERG and AHDERINNE (1986) allowed for prior to centrifugation, since we found that a certain proportion of the phytates could precipitate cold.

Materials and method

Materials

The sodium phytate used as the standard was obtained from SIGMA (ref: P3168).

The samples analyzed were as follows:

- glandless cottonseed flour delipidated by direct extraction with hexane (GERDOC, Pessac),

- gossypol-free cottonseed flour obtained by an extrusion process followed by delipidation with hexane (TRITURAF factory, Côte-d'Ivoire),

- bran flour obtained through ENSA (Montpellier).

The phytates were purified by anion exchange chromatography on Extra Sep. Sax resin, 500 mg/2.8 ml (Touzard and Matignon).

The H.P.L.C. apparatus consisted of a Rheodyne injection valve, a Waters model 510 pump, a Merck RP C18 column with a particle size of 5 μm (25 cm \times 0.46 cm) thermostatically controlled at 40°C and a Waters model R401 refractometer.

Method

Phytate extraction

A test portion of flour (0.5 g) was agitated in the presence of 20 ml of 0.5 M hydrochloric acid for 3 hours at ambient temperature. The mixture was centrifuged at 15,000 rpm for 15 min. 10 ml of the supernatant liquid were taken off, placed in a 250 ml round-bottomed flask and evaporated to dryness in a vacuum at a temperature not exceeding 40°C.

Purification on ion exchange resin

The dry extract obtained was diluted in 15 ml, then 10 ml, then 5 ml of 0.025 N hydrochloric acid and loaded step by step onto the ion exchange resin. The elution flow

Anion exchange chromatography carried out to purify the inositol phosphates was carried out by eluting the phytates with 7 times 4 ml of 2N hydrochloric acid (almost 100% extraction) rather than 5 times 4 ml of 2N hydrochloric acid (almost 99% extraction).

We did not saturate the stationary phase on the RP C18 column with several injections of a 5 μM /ml sodium phytate solution. We added the sodium phytate directly to the mobile phase, to reach a concentration of 10 μM .

The column was thermostatically controlled at 40°C and we applied a mobile phase flow rate of 1 ml/min rather than 0.4 ml/min.

rate was maintained at 15 drops/min using a peristaltic pump. The eluate was not kept. The phytates were then eluted with 7 times 4 ml of 2.0 N hydrochloric acid in a 250 ml round-bottomed flask at a flow rate of 15 drops/min. More acid was added to the resin as soon as there was no liquid on the surface. All the elution fractions were evaporated to dryness, in a vacuum, at a temperature not exceeding 40°C.

High Performance Liquid Chromatography

The mobile phase was prepared as follows: 15 ml of a 40% tetrabutylammonium hydroxide solution in water and 1 ml of a 10 mM sodium phytate solution were added to a litre of solution consisting of 56% methanol and 44% 0.05M formic acid. The pH of the mobile phase was adjusted to 4.3 with 9N sulphuric acid.

The flow rate of the mobile phase was 1 ml/min.

For analysis, the dry extract, obtained from the purification phase on ion exchange resin, was diluted in 2 ml of the mobile phase without phytates. The liquid was then filtered through 0.25 μm membrane and injected into the chromatographic system.

External calibration was carried out by injecting increasing concentrations of sodium phytate solutions.

Expression of results

We used correction factors that took into account the detector's response for inositol phosphates given by SANDBERG and AHDERINNE (1986). These were calculated by determining the inositol and phosphorus content of the mobile phase fractions containing the inositol phosphates, collected from the output of the RP C18 column (H.P.L.C.).

The correction factor was equal to 1.1 for pentaphosphoinositol (IP₅), to 1.5 for tetraphosphoinositol (IP₄) and 2.4 for triphosphoinositol (IP₃).

Results and discussion

Calibration

Under the experimental conditions described above, sodium phytate comes out after 10.9 min (figure 1).

The calibration line giving the surface of the peak corresponding to sodium phytate according to its concentration in the injected solution passes through the origin. Its directing coefficient is equal to 19532.4 (figure 3).

Optimization of inositol phosphate purification by ion exchange chromatography

15 ml of 5 mM sodium phytate solution were passed through an Extra Sep. Sax anion exchange resin, 500 mg/2.8 ml. The flow rate through the column was maintained at 15 drops/min using a peristaltic pump. Phytate quantitative analysis was carried out on the first eluate, drawn off during phytate fixation on the resin, and on each fraction of phytate elution, using 2N hydrochloric acid.

Table 1 indicates that all the phytates were retained on the resin during the adsorption stage. In fact, no phytate was detected in the first eluate. The phytates were then totally eluted with 7 times 4 ml of 2N hydrochloric acid after increasing ionic strength.

The same study carried out with an elution flow rate of 30 drops/min showed that 10 elution fractions of 4 ml of 2N hydrochloric acid are necessary to elute the phytates in their entirety.

Assessment of inositol phosphate separation by determination of capacity factors

An inositol phosphate mixture was prepared from sodium phytate by chemical hydrolysis, as follows.

100 ml of a 5mM sodium phytate solution were reflux heated in 0.5M hydrochloric acid. 10-ml samples were taken after 4 1/2 and 7 hours, evaporated to dryness and diluted in 10 ml of water prior to H.P.L.C. analysis. Figure 2 shows a chromatogram obtained after injecting the mixture sampled after 4 1/2 hours' incubation.

The capacity factors for inositol phosphates (IP₃, IP₄, IP₅ and IP₆), and column selectivity were as follows:

Retention time: IP₃, 4.26 min $k' = 1.13$
Retention time: IP₄, 5.84 min $k' = 1.92$
Retention time: IP₅, 7.79 min $k' = 2.89$
Retention time: IP₆, 10.96 min $k' = 4.48$

The selectivity, equal to 1.58 on average, reveals the good separation of these compounds.

Quantitative analysis of phytates in cottonseed flour

Table 2 summarizes the results obtained for a cottonseed flour delipidated by direct extraction with hexane (GERDOC, Pessac).

Analysis of the cottonseed flour systematically revealed the presence of IP₅, at a rate approaching 12% of total inositol phosphates.

These results reveal a phytate rate higher than might have been expected according to existing literature. In fact, the phytate percentages, for cottonseed derivatives, mentioned by several authors, are nearer 5% than 8% (WOZENSKI and WOODBURN, 1975). We also analyzed a cottonseed flour produced by gossypol-free cottonseed kernel extrusion followed by delipidation with hexane (TRITURAF factory, Côte-d'Ivoire). We determined that this flour's phytic acid content (IP₆), taken at 0% humidity, was 4.81% and the inositol pentaphosphate content (IP₅) was 1.42%. This value tallies better with that reported by WOZENSKI and WOODBURN (1975) for a gossypol-free cottonseed flour (4.29%). The technology used to produce the cottonseed flour, and the cotton variety from which the seeds were obtained, could have a substantial effect on the phytate content of cottonseed flours.

To test the quantitative analysis method, we initially analyzed the same flour (produced by direct extraction with hexane), after adding a known quantity of sodium phytate. The results are given in table 3.

These results show that the quantitative analysis of all the phytates added was correct.

We then analyzed a bran sample, with an estimated phytate content of 4.55% plus or minus 1.03%. Given its high starch content, we had to centrifuge the sample prior to passage through the ion exchange resin. H.P.L.C. analysis revealed 3.42% IP₆ and 0.90% IP₅ in the bran sample analyzed. The results were therefore as expected.

Conclusion

Quantitative analysis of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates is possible with the SANBERG and AHDERINNE method (1986), such as we modified it.

Separation of these compounds is successfully achieved with an analysis time not exceeding 12 min.

However, the high phytate content detected in cottonseed flour delipidated by direct extraction with hexane remains worrying. Judging from results obtained for bran, the cotton seed flour produced by TRITURAF and the flour sample to which we added a known quantity of phytates, the quantitative analysis method does not appear to be in

doubt. Consequently, this method can be used to monitor the entire process of phytate degradation by a yeast in cottonseed flour. Nevertheless, it is essential to try and determine the origin of the high phytate content of cottonseed flour produced by direct extraction with hexane.

Análisis de fitatos de una harina de granos de algodónero por cromatografía en fase líquida

C. Marquié, L. Séguilha, G. Moulin, V. Vialettes, P. Galzy

Resumen

Los autores proponen un método para extraer, purificar y dosificar los inositoles fosfatos (IP3 a IP6). La purificación se realiza por cromatografía intercambiadora de aniones y la dosificación por cromatografía en fase líquida de elevada eficacia, por apareamiento de iones en columna RP C18.

Los fitatos son dosificados en dos harinas a base de granos de algodón de orígenes diferentes y en una muestra de salvado. El

análisis revela sistemáticamente la presencia de IP5 en las muestras de harina (de algodón o de salvado) y pone de relieve una gran diferencia del contenido de inositoles fosfatos entre las dos harinas de algodón estudiadas. La tecnología empleada para producir la harina de algodón, así como la variedad de las semillas de algodón tratadas, deben tener una fuerza de incidencia en el contenido de fitatos de las harinas.

PALABRAS CLAVE : algodón, salvado, harinas, dosificaciones, fitatos, inositoles fosfatos, cromatografía en fase líquida.