RÈGLEMENT (CEE) N° 1864/90 DE LA COMMISSION

du 29 juin 1990

modifiant le règlement (CEE) n° 1470/68 relatif à la prise et réduction des échantillons ainsi qu'aux méthodes d'analyses des graines oléagineuses

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu le règlement n° 136/66/CEE du Conseil, du 22 septembre 1966, portant établissement d'une organisation commune des marchés dans le secteur des matières grasses (1), modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2902/89 (2), et notamment son article 24 *bis*,

considérant que la dénomination « double zéro » pour les graines de colza et de navette dépend de leur teneur en glucosinolates ; que, pour déterminer cette teneur, il convient de prévoir la méthode la plus appropriée ;

considérant que le règlement (CEE) n° 1470/68 de la Commission (3), modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2435/86 (4), a défini la méthode commune pour la Communauté de détermination de la teneur en glucosinolates des graines de colza ; que, depuis, une meilleure méthode d'analyse a été mise au point et testée ; qu'il y a lieu de modifier la méthode commune pour la Communauté de détermination de la teneur en glucosinolates ;

considérant que les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion des matières grasses,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT :

Article premier

L'annexe VIII du règlement (CEE) n° 1470/68 est remplacée par l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le jour de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes.*

Il est applicable à partir du 1er juillet 1990.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 29 juin 1990.

Par la Commission

Ray MAC SHARRY

Membre de la Commission

(1) JO n° 172 du 30. 9. 1966, p. 3025/66.
(2) JO n° L 280 du 29. 9. 1989, p. 2.
(3) JO n° L 239 du 28. 9. 1968, p. 2.
(4) JO n° L 210 du 1. 8. 1986, p. 55.

ANNEXE

« *ANNEXE VIII*

GRAINES OLÉAGINEUSES — DÉTERMINATION DES GLUCOSINOLATES

Par chromatographie liquide haute performance

1. CHAMP D'APPLICATION

La présente annexe décrit une méthode de détermination des différents glucosinolates dans les graines oléagineuses du genre *Brassica*, particulièrement le colza, à l'aide de la chromatographie liquide haute performance. Cette méthode ne mesure pas les glucosinolates ayant des substituants sur la molécule de glucose, mais ces composés sont peu fréquents dans le colza du commerce.

2. RÉFÉRENCES

Les échantillons à analyser doivent être préparés conformément aux annexes correspondantes du présent règlement. En particulier, les annexes suivantes sont importantes :

annexe II : réduction des échantillons contractuels en échantillons à analyser,

annexe III : détermination de la teneur en humidité et en matières volatiles.

3. PRINCIPE

Extraction des glucosinolates dans une solution de méthanol, puis purification et désulfatation enzymatique sur des résines échangeuses d'ions. Détermination par chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec gradient d'élution et détection UV.

4. RÉACTIFS ET SUBSTANCES CHIMIQUES

Tous les réactifs doivent être des réactifs de qualité appropriée et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau d'un degré de pureté au moins équivalent.

4.1. Méthanol, en solution aqueuse à 70 % (V/V)

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

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

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

Dissoudre 204 g d'imidazole et 113 ml d'acide formique dans un ballon jaugé de 500 ml. Porter à 500 ml avec de l'eau.

4.5. **Étalon interne**

Utiliser de la sinigrine (allyl glucosinolate, sel de potassium monohydraté, PM = 415,49) dont la pureté doit être contrôlée conformément au point 4.5.3.

4.5.1. *Solution de sinigrine à 5 mmol/l*

Dissoudre 207,7 mg d'allyl glucosinolate, sel de potassium monohydraté, avec de l'eau dans un ballon jaugé de 100 ml et porter jusqu'au trait.

4.5.2. *Solution de sinigrine à 20 mmol/l*

Dissoudre 831,0 mg d'allyl glucosinolate, sel de potassium monohydraté, avec de l'eau dans un ballon jaugé de 100 ml et porter jusqu'au trait.

Stocker ces solutions dans un réfrigérateur à une température approximative de 4 °C si le stockage est de courte durée (par exemple une semaine) ou dans un congélateur à moins 18 °C pour des périodes plus longues.

4.5.3. *Contrôle de la pureté de la sinigrine*

Appliquer un ou plusieurs des trois tests suivants :

— l'analyse par CHLP selon la présente méthode ne devrait donner qu'un pic majeur,

— l'analyse de la sinigrine intacte par CLHP (technique « ion-pair ») ne devrait donner qu'un pic majeur,

— l'analyse de la sinigrine désulfatée et silylée par chromatographie en phase gazeuse ne devrait donner qu'un pic majeur.

Dans ces tests, le pic majeur doit correspondre à 98 % au moins de la surface totale des pics.

Confirmer par la détermination de la quantité de glucose libérée après hydrolyse à la myrosinase (thioglucoside glucohydrolase EC 3.2.3.1). Mesurer le glucose par des moyens enzymatiques en utilisant un kit du commerce. Il faut tenir compte de tout glucose libre présent qui sera mesuré sans addition de myrosinase. La concentration molaire de glucose mesuré devrait correspondre à 98 % au moins de la concentration molaire de la solution de sinigrine testée.

4.5.4. *Étalon interne de remplacement : glucotropaeoline*

Dans certaines graines de l'espèce *Brassica* ou dans des graines d'espèces similaires (cultivées ou adventices), la sinigrine peut être présente à l'état naturel. Lorsque de la sinigrine est présente à l'état naturel, un autre étalon interne, la glucotropaeoline (benzylglucosinolate, sel de potassium, PM = 447,52) devra être utilisé mais celui-ci est parfois difficile à séparer d'autres glucosinolates mineurs naturels.

Utiliser la glucotropaeoline de la même manière (solutions de 5 et 20 mol/l) que la sinigrine, après avoir contrôlé sa pureté conformément à la procédure décrite au point 4.5.3 et avoir vérifié que son facteur de réponse correspond, par comparaison avec la sinigrine, à celui indiqué au point 7.2.

4.6. **Phases mobiles**

4.6.1. Éluant A : eau (qualité CLHP).

4.6.2. Éluant B : acétonitrile (qualité CLHP), solution à 20 % (V/V) à base d'eau (qualité CLHP). La concentration peut être modifiée en fonction des colonnes utilisées.

4.7. **Résine échangeuse d'ions**

4.7.1. DEAE Sépharose CI-6B en suspension, vendu prêt à l'emploi

4.7.2. Une suspension de DEAE Séphadex A25 préparée comme suit :

Mélanger 10 g de résine dans un excès d'acide acétique à 2 mol/l. Laisser décanter. Ajouter de l'acide acétique à 2 mol/l jusqu'à ce que le volume de la suspension représente le double du volume du gel décanté.

4.8. Sulfatase, *Hélix pomatia* type H1 (EC 3.1.6.1) purifiée préalablement et contrôlée selon la procédure ci-dessus, puis diluée.

4.8.1. *Préparation des colonnes échangeuses d'ions*

Couper cinq pipettes Pasteur (5.9) à 7 cm au-dessus du col et introduire une mèche de laine de verre dans le col (5.8). Placer les pipettes verticalement sur un support et introduire dans chacune d'elles une suspension de résine échangeuse d'ions DEAE Sépharose C1-6B (4.7.1) de sorte que lorsque l'eau s'est écoulée, on obtienne un volume de 500 µl de résine.

Verser 1 ml d'une solution de formate d'imidazole à 6 mol/l (4.4) dans chaque pipette et rincer deux fois avec 1 ml d'eau.

4.8.2. *Purification de la sulfatase*

Peser à 0,1 mg près, 25 mg d'*Hélix pomatia* type H1, les dissoudre dans 2,5 ml d'eau et transférer 500 µl de la solution obtenue dans chacune des colonnes régénérées (4.8.1). Laver chaque colonne avec 1,5 ml d'eau en éliminant l'effluent. Ajouter ensuite 1,5 ml d'une solution d'acétate de sodium à 0,2 mol/l (4.3), récupérer et réunir les éluats des cinq colonnes dans un tube d'essai.

Concentrer les éluats par filtration à l'aide d'un filtre millipore PTGC 11K25 jusqu'à obtention d'un résidu d'environ 100 µl (la sulfatase de masse molaire supérieure à 5 000 n'est pas éliminée). Ajouter 2,5 ml d'eau et concentrer de nouveau par filtration jusqu'à obtention d'un résidu d'environ 100 µl. Diluer jusqu'à 2,5 ml avec de l'eau et stocker la sulfatase ainsi purifiée au congélateur à — 18 °C (en petites quantités de manière à pouvoir décongeler la quantité nécessaire pour une utilisation immédiate).

4.8.3. *Contrôle de l'activité de la sulfatase*

4.8.3.1. Préparation d'une solution de sinigrine à 0,15 mmol/l, tamponnée à un pH de 5,8

Préparer successivement les solutions suivantes :

a) verser 1 ml d'acide acétique dans un ballon de 500 ml et ajuster au trait avec de l'eau,

b) verser 1 ml d'éthylène diamine dans un ballon de 500 ml et ajuster au trait avec de l'eau,

c) mélanger 73 ml de la solution (a) et 40 ml de la solution (b);

d) ajuster à pH 5,8 avec les solutions (a) ou (b).

Verser 3 ml de la solution de sinigrine à 5 mmol/l (4.5.1) dans un ballon de 100 ml et porter le contenu jusqu'au trait avec la solution (c).

4.8.3.2. Contrôle de l'activité

Une unité d'activité est exprimée comme représentant la production d'une micromole de sinigrine désulfatée par minute à 30 °C et à un pH de 5,8.

Pour le test, verser 2 ml de la solution de sinigrine tamponnée (4.8.3.1) dans les cellules de référence et de mesure au spectromètre (5.3) réglé à une longueur d'onde de 228 nm avec une température des celulles de 30 °C. Au temps t = 0, mettre 50 µl de sulfatase purifiée (4.8.2) dans la cellule de mesure et enclencher l'enregistreur. Arrêter l'enregistreur lorsque l'absorbance cesse de varier (Ae), calculer la tangente au point t = 0 et mesurer son gradient $\frac{\Delta A}{\Delta t}$

L'activité de la sulfatase, exprimée en unités d'activité par millimètre de solution de sulfatase, est égale à :

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V}{\Delta E} \times \frac{1000}{50} \times 10^6$$

formule dans laquelle :

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ est la pente de la tangente au point t = 0 en unité d'absorbance par minute

V est le volume, en litres, du milieu réactionnel (c'est-à-dire $2{,}0510 \times 10^{-3}$l).

ΔE est la différence entre les coefficients d'extinction molaire de la sinigrine et de la désulfosinigrine à 228 nm

$$\Delta E = \frac{\Delta Ae}{e \times c}$$

formule dans laquelle :

ΔAe est la différence entre l'absorbance au point d'équilibre de la sinigrine désulfatée et l'absorbance au moment t = 0

e est l'épaisseur des celulles en cm (ex. : 1 cm)

c est la concentration de la sinigrine désulfatée au point d'équilibre, en moles par litre (ex. :

$$c = \frac{0{,}15 \times 10^{-3} \times 0{,}95 \times 2}{2{,}05} = 1{,}39 \times 10^{-4} \text{ mol/l}).$$

Le rendement au point d'équilibre de la désulfatation de la sinigrine est de 0,95.

Calculer ΔE, qui doit être de l'ordre de 1 500 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$.

L'activité de la sulfatase peut aussi être calculée à l'aide de la formule simplifiée suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A \times 5{,}7}{\Delta t \times \Delta Ae}$$

L'activité trouvée doit être supérieure à 0,5 µmol/min.ml de solution de sulfatase purifiée (4.8.2).

4.8.4. *Dilution*

À l'aide d'une pipette, verser 1 ml de sulfatase purifiée (4.8.2) dans un ballon jaugé de 10 ml, porter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger.

Diviser la solution en petites quantités et stocker à — 18°C.

5. APPAREILLAGE

Équipement normal de laboratoire et en particulier :

5.1. Un appareil de chromatographie liquide à haute performance, permettant d'obtenir un gradient d'élution et de régler la température de la colonne à 30 °C, relié à un détecteur UV permettant d'effectuer des mesures à 229 nm.

5.2. Une colonne chromatographique pour CLHP, type C18 ou C8, dont le calibre des particules est égal ou inférieur à 5 µm, soit par exemple :

Colonne lichrosorb RP 18	≤ 5 µm (150 mm × 4,6 mm)
Colonne sphérisorb ODS2	≤ 5 µm (250 mm × 4-5 mm)
Colonne Novapak C18	4 µm (150 mm × 4 mm)
Colonne Lichrospher RP8	≤ 5 µm (125 mm × 4 mm)
Colonne nucléosil C18	≤ 5 µm (200 mm × 4 mm)

La performance de la colonne retenue doit être contrôlée régulièrement, de préférence à l'aide d'un échantillon de colza de préférence (les désulfo-glucosinolates provenant de préférence d'échantillons du bureau de référence communautaire sont recommandés). En particulier, la colonne ne doit pas dégrader la 4-hydroxyglucobrassicine, glucosinolate important, mais relativement instable.

Les nouvelles colonnes doivent faire l'objet d'une utilisation préliminaire avant de pouvoir obtenir des résultats reproductibles.

5.3. Spectromètre à double faisceau, permettant de travailler en ultraviolet et, si possible, à une température réglée à 30 °C, équipé de cellule de quartz et, si possible, d'un système d'enregistrement

5.4. Petit broyeur, par exemple un moulin à café.

5.5. Centrifugeuse, conçue pour des tubes de 6 ml, permettant d'obtenir une accélération centrifuge de 5 000 g.

5.6. Bain-marie ou bloc chauffant, réglable à 75 °C.

5.7. Tubes de polypropylène, d'une capacité de 6 ml.

5.8. Laine de verre.

5.9. Pipettes Pasteur de 150 mm.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. Préparation de l'échantillon pour essai

Réduire l'échantillon de laboratoire conformément à l'annexe II et broyer à l'aide du microbroyeur (5.4) pendant 20 secondes. Mélanger la farine et broyer à nouveau pendant 5 secondes.

Si le taux d'humidité des graines dépasse 10 % (m/m), les sécher préalablement dans un courant d'air à 45 °C.

Note : Si l'analyse porte sur des graines traitées, les laver au dichlorométhane avant broyage.

6.2. Détermination de la teneur en humidité et en matières volatiles

Déterminer la teneur en humidité et en matière volatile de l'échantillon d'essai conformément à l'annexe III.

6.3. Prise d'essai

Préparer deux tubes (5.7) et y introduire 200 mg de l'échantillon de graines oléagineuses à tester, pesé à 0,1 mg près, dans chaque tube.

6.4. Extraction des glucosinolates

Placer les tubes dans un bain-marie ou un bloc chauffant (5.6) réglé à 75 °C pendant une minute. Ajouter 2 ml d'une solution bouillante de méthanol à 70 % (4.1) puis ajouter immédiatement :

— dans le premier tube A, 200 µl d'une solution de sinigrine à 5 mmol/l,

— dans le second tube B, 200 µl d'une solution de sinigrine à 20 mmol/l (4.5.2).

Maintenir à chaud au bain-marie réglé à 75 °C pendant 10 minutes en agitant régulièrement. Homogénéiser le contenu de chaque tube et centrifuger à une accélération de 5 000 g pendant trois minutes. Transférer chaque fraction surnageante dans un autre tube (5.7).

Ajouter 2 ml d'une solution bouillante de méthanol à 70 % (4.1) à chaque culot et chauffer de nouveau au bain-marie réglé à 75 °C pendant 10 minutes en agitant régulièrement. Centrifuger pendant trois minutes et ajouter la fraction surnageante au premier. Ajuster le volume à environ 5 ml à l'aide d'eau et mélanger.

L'extrait peut être stocké pendant deux semaines à l'obscurité, dans un congélateur réglé à — 18 °C.

6.5. Préparation des colonnes d'échange d'ions

Sectionner le nombre voulu de pipettes Pasteur (5.9), c'est-à-dire une pipette par échantillon, de manière à laisser un volume de 1,2 ml au-dessus du col et introduire une mèche de laine de verre (5.8) dans le col. Placer les pipettes verticalement sur un support.

Déposer 0,5 ml de la suspension bien homogénéisée de DEAE Séphadex A 25 (4.7.2) dans chaque colonne et laisser décanter et écouler.

Rincer les colonnes avec 2 ml de formiate d'imidazole à 6 mol/l (4.4), puis deux fois avec 1 ml d'eau.

6.6. **Purification et désulfatation**

Déposer 1 ml de l'extrait (6.4) dans la colonne préparée (6.5) sans altérer la surface de la résine et laisser s'écouler. Ajouter deux fois 1 ml du tampon d'acétate de sodium à 0,02 mol/l à pH 4,0 (4.2) et laisser s'écouler chaque fois.

Déposer 75 µl de la solution de sulfatase purifiée diluée (4.8.4). Laisser reposer pendant une nuit à température ambiante. Éluer des désulfoglucosinolates obtenus avec deux fois 1 ml d'eau (qualité CLHP) en laissant s'écouler entre chaque addition. Recueillir l'éluat dans un tube. Homogénéiser l'éluat et le stocker à l'obscurité dans un congélateur réglé à − 18 °C, s'il ne doit pas être chromatographié immédiatement.

6.7. **Essai de référence**

Si nécessaire (voir 7.3) effectuer un essai de référence dans les mêmes conditions sur une prise d'essai identique, mais en omettant la solution étalon interne de sinigrine de manière à détecter et quantifier toute présence de sinigrine dans la prise d'essai.

6.8. **Chromatographie**

6.8.1. *Réglage de l'appareil*

Débit de la phase mobile : il dépend de la nature de la colonne (voir le point 6.8.2)

Température de la colonne : 30 °C

Longueur d'onde de détection : 229 nm

6.8.2. *Essai et gradient d'élution*

Compte tenu du mode d'emploi de l'appareillage, injecter au maximum 50 µl de la solution de désulfoglucosinolate obtenue en 6.6.

Divers gradients peuvent convenir selon la colonne utilisée.

— Colonne Sphérisorb RP 18 5 µm (150 mm × 4,6 mm) :
  — 100 % de l'éluant A (4.6.1) + 0 % de l'éluant B (4.6.2) pendant une minute,
  — un gradient d'élution linéaire en 20 minutes jusqu'à 0 % d'éluant A et 100 % d'éluant B,
  — un gradient d'élution linéaire en 5 minutes jusqu'à 100 % d'éluant A et 0 % d'éluant B,
  — 100 % d'éluant A et 0 % d'éluant B pendant 5 minutes pour l'équilibrage.
— Colonne Lichrospher RP 8 5µm (125 mm × 4,0 mm) :
  — 100 % de l'éluant A pendant 2 minutes 30 secondes,
  — 100 % gradient d'élution linéaire en 18 minutes jusqu'à 0 % d'éluant A + 100 % d'éluant B,
  — 100 % d'éluant B pendant 5 minutes,
  — un gradient d'élution linéaire pendant deux minutes de 0 % d'éluant A + 100 % d'éluant B jusqu'à obtention de 100 % d'éluant A et 0 % d'éluant B.
  — équilibrer pendant 5 minutes.

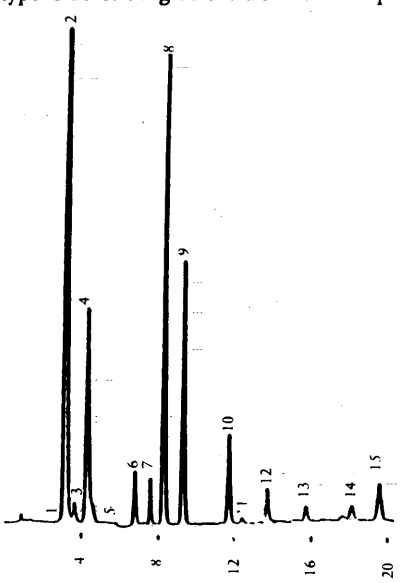
Note : Le profil des gradients peut être modifié pour obtenir des séparations optimales en fonction des colonnes utilisées.

6.8.3. *Examen des chromatogrammes*

Ne prendre en compte que les pics de glucosinolates d'une surface supérieure à 1 % de la surface totale des pics.

L'ordre d'élution des pics à l'aide d'une colonne de type C 18 et un gradient d'élution indiqué au point 6.8.2. est généralement le suivant :

1. Désulfoglucoïbérine
2. Désulfoprogoïtrine
3. Désulfoépi-Progoïtrine
4. Désulfosinigrine
5. Désulfoglucoraphanine
6. Désulfogluconapoléiférine
7. Désulfoglucoalyssine
8. Désulfogluconapine
9. Désulfo-4-OH-glucobrassicine
10. Désulfoglucobrassicanapine
11. Désulfoglucotropaéoline
12. Désulfoglucobrassicine
13. Désulfogluconasturtiine
14. Désulfo-4-méthoxyglucobrassicine
15. Désulfonéoglucobrassicine



7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

7.1. Calcul de la teneur en chaque glucosinolate

La teneur de chaque glucosinolate, exprimée en micromoles par gramme de graines entières séchées, est égale à :

$$\frac{\text{aire de pic du désulfoglucosinolate}}{\text{aire de pic de la désulfosinigrine}} \times \frac{\text{quantité d'étalon interne ajouté dans le tube en 6.4 (en µmoles)}}{\text{poids de l'échantillon de graines extrait}}$$

$$\times \text{ facteur de réponse du désulfoglucosinolate (7.2)} \times \frac{100}{100 - H}$$

formule dans laquelle :

H est la teneur en eau et en matières volatiles exprimée en pourcentage (masse) de l'échantillon d'essai (6.2).

Dans certains cas, l'expression des résultats est demandée à un taux d'humidité déterminé (actuellement 9 %). Dans ces cas, multiplier le résultat obtenu sur la matière sèche par

$$\frac{(100 - \text{humidité})}{100}$$

7.2. Facteurs de réponse

La valeur des facteurs de réponse a été déterminée expérimentalement ; cette valeur a été fixée d'un commun accord entre les divers laboratoires ayant participé à l'élaboration de la méthode et il peut être nécessaire de procéder officiellement à leur révision en temps opportun.

Désulfoglucoibérine	1,07
Désulfoglucobrassicanapine	1,15
Désulfoglucoraphanine	1,07
Désulfo-4-OH-glucobrassicine	0,28
Désulfoglucoalyssine	1,07
Désulfoglucobrassicine	0,29
Désulfoprogoitrine	1,09
Désulfonéoglucobrassicine	0,20
Désulfoépi-Progoitrine	1,09
Désulfoglucotropaeoline	0,95
Désulfosinigrine	1,00
Désulfogluconasturtiine	0,95
Désulfogluconapine	1,11
Désulfogluconapoléiférine	1,00
Désulfo-4-méthoxyglucobrassicine	0,25
Autres désulfoglucosinolates	1,00

7.3. Teneur totale en glucosinolates

La teneur totale en glucosinolates, exprimée en micromoles par gramme de matière sèche de l'échantillon, est égale à la somme de chaque glucosinolate, dont la surface de pic est supérieure à 1 % de la somme des surfaces de pic.

L'utilisation des étalons internes à deux concentrations (4.5.1 et 4.5.2) permet de tenir compte de la sinigrine initialement contenue dans l'échantillon ou de la présence d'un composé inconnu s'éluant en même temps que la sinigrine.

— si la différence entre les résultats relatifs à la teneur totale en glucosinolates de deux répétitions est compatible avec les conditions de répétabilité (8.2) il n'y a pas contamination de l'étalon interne. Le résultat est la moyenne arithmétique des deux déterminations,

— si la différence entre les résultats ne remplit pas les conditions de répétabilité (8.2), répéter la détermination sur deux autres échantillons d'essai et effectuer un essai de référence (6.7) en excluant la solution d'étalon interne. L'aire du contaminant est déduite de l'aire de l'étalon interne, ce qui donne l'aire réelle de l'étalon interne utilisé dans la formule indiquée au point 7.1. Le résultat est la moyenne arithmétique des résultats des deux nouvelles déterminations.

8. PRÉCISION ET EXACTITUDE

8.1. Précision (répétabilité et reproductibilité)

Une étude interlaboratoire internationale, organisée en 1988, avec la participation de douze laboratoires, chacun d'eux ayant effectué deux déterminations sur les quatre échantillons de colza, donne les valeurs de répétabilité et de reproductibilité indiqués dans le tableau 1. Les résultats furent évalués selon la norme ISO 5725. (Application statistique — exactitude des méthodes d'essai — détermination d'une méthode d'essai normalisé par essais interlaboratoires).

Tableau 1 : Valeurs de répétabilité et de reproductibilité obtenus à partir de l'étude interlaboratoire

Échantillons	Colza A	Colza B	Colza C	Colza D
Nombre de laboratoires après élimination des cas aberrants	11	11	11	11
Moyenne	20,6	14,1	4,9	25,6
Écart-type de répétabilité typiques	1,7	0,6	0,3	0,8
Coefficient de variation de répétabilité	8,5 %	4,4 %	6,7 %	3,3 %
Répétabilité	4,9	1,7	0,9	2,4
Écart-type de reproductibilité typiques	3,4	2,5	1,5	2,4
Coefficient de variation de reproductibilité	17 %	18 %	31 %	9,4 %
Reproductibilité	9,6	7,1	1,4	6,8

8.1.1. *Répétabilité*

Suivant les résultats repris ci-dessus (8.1), la différence entre les valeurs de deux déterminations effectuées rapidement l'une après l'autre par le même analyste utilisant le même appareillage sur le même échantillon pour essai, ne doit pas dépasser 2 micromoles/g pour les teneurs inférieures à 20 micromoles/g et 4 micromoles/g pour les teneurs situées entre 20 et 35 micromoles/g.

8.1.2. *Reproductibilité*

Suivant les résultats ci-dessus (8.1), la différence entre les valeurs du résultat final obtenues par deux laboratoires employant la méthode actuelle pour analyser le même échantillon de laboratoire, ne doit pas dépasser 4 micromoles/g pour les teneurs inférieures à 20 micromoles/g et 8 micromoles/g pour les valeurs situées entre 20 et 35 micromoles/g.

8.2. **Exactitude**

L'utilisation correcte de la méthode sera vérifiée en effectuant des mesures répétitives sur des matériaux de référence à teneur certifiée en glucosinolates totaux et couvrant la gamme de concentration concernée.

Des matériaux appropriés de référence à teneur certifiée peuvent être obtenus auprès du bureau communautaire de référence (BCR) de la Commission des Communautés européennes.

Le protocole pour comparer les résultats de laboratoire obtenu avec des matériaux de référence à teneur certifiée est décrit dans le paragraphe « instruction for use » du rapport accompagnant les matériaux de référence.

9. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode employée et le résultat obtenu. Il doit mentionner aussi toute modalité opératoire non spécifiée dans la norme internationale ou considérée comme facultative, ainsi que toute donnée susceptible d'avoir influencé le résultat.

Le procès-verbal d'essai donne toutes les informations nécessaires pour une complète identification de l'échantillon. »