# REGLAMENTO (CEE) Nº 1864/90 DE LA COMISIÓN

## de 29 de junio de 1990

## por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 1470/68 relativo a la toma y reducción de muestras, y a los métodos de análisis de las semillas oleaginosas

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento nº 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966, por el que se establece una organización común de mercados en el sector de las materias grasas (1), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 2902/89 (2), y, en particular, su artículo 24 *bis*,

Considerando que la denominación « doble cero » para las semillas de colza y de nabina depende de su contenido en glucosinolatos; que, para determinar este contenido, es conveniente establecer el método más apropiado;

Considerando que el Reglamento (CEE) nº 1470/68 de la Comisión (3), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 2435/86 (4) define el método común de determinación del contenido de glucosinolatos de las semillas de colza, para la Comunidad; que, desde entonces, se ha creado y experimentado un nuevo método de análisis; que es preciso modificar el método común para la Comunidad de determinación del contenido de glucosinolatos para la Comunidad;

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de las materias grasas,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

*Artículo 1*

Se sustituye el Anexo VIII del Reglamento (CEE) nº 1470/68 por el Anexo del presente Reglamento.

*Artículo 2*

El presente Reglamento entrará en vigor el día de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas.*

Será aplicable a partir del 1 de julio de 1990.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 29 de junio de 1990.

*Por la Comisión*

Ray MAC SHARRY

*Miembro de la Comisión*

(1) DO nº 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.
(2) DO nº L 280 de 29. 9. 1989, p. 2.
(3) DO nº L 239 de 28. 9. 1968, p. 2.
(4) DO nº L 210 de 1. 8. 1986, p. 55.

*ANEXO*

*« ANEXO VIII*

## SEMILLAS OLEAGINOSAS

### Determinación de su contenido en glucosinolatos mediante la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

1. CAMPO DE APLICACIÓN

En este Anexo aparece expuesto el método utilizado para determinar los distintos tipos de glucosinolatos contenidos en las semillas oleaginosas de algunas espoecies de BRASSICA, especialmente en la colza, mediante la cromatografía líquida de alta resolución. Este método no mide los glucosinolatos que se sustituyen en la molécula de glucosa, al ser compuestos que tienen poca importancia en la semilla de colza que se comercializa.

2. REFERENCIAS

La preparación de las muestras para los análisis deberá realizarse siguiendo los Anexos correspondientes de este Reglamento. Son de especial importancia los Anexos :

Anexo II — Reducción de las muestras para laboratorio a muestras para análisis.

Anexo III — Determinación del contenido en agua y materias volátiles.

3. PRINCIPIO

Extraer los glucosinolatos en una solución de metanol, y proceder seguidamente a su purificación y desulfatación enzimática en resinas de intercambio iónico. Determinar mediante la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa con eluyente y detección por UV.

4. REACTIVOS Y MATERIALES

Todos los reactivos serán de grado reactivo y el agua que se utilice será agua destilada o agua con un grado de pureza, como mínimo, equivalente.

4.1. Solución de metanol al 70 % (V/V) en agua.

4.2. Solución de acetato sódico, 0,02 mol/l, pH 4,0.

4.3. Solución de acetato sódico, 0,2 mol/l.

4.4. Solución de formiato de imidazol, 6 mol/l.

Disolver 204 g de imidazol en 113 ml de ácido fórmico en un matraz aforado de 500 ml. Enrasar a 500 ml con agua.

4.5. **Patrón interno**

Emplear sinigrina (monohidrato de alilglucosinolato potásico, PM = 415,49). Deberá comprobarse su pureza según se indica en el punto 4.5.3.

4.5.1. *Solución de sinigrina, 5 mmol/l.*

Disolver 207,7 mg de monohidrato de alilglucosinolato potásico con agua en un matraz aforado de 100 ml y completar hasta la señal.

4.5.2. *Solución de sinigrina, 20 mmol/l.*

Disolver 831,0 mg de monohidrato de alilglucosinolato potásico con agua en un matraz aforado de 100 ml, y completar hasta la señal.

Guardar estas soluciones en un frigorífico a 4 °C, aproximadamente, cuando se guarden durante un breve período de tiempo (una semana, por ejemplo), y a − 18 °C cuando se guarden durante períodos de tiempo más largos.

4.5.3. *Comprobación de la pureza de la sinigrina*

Esta comprobación se realizará mediante una o más de estas tres pruebas :

— los análisis realizados con CLAR siguiendo el presente método deberán proporcionar sólo un pico principal,

— el análisis de la sinigrina intacta mediante CLAR (técnica de pares iónicos) deberá generar sólo un pico principal,

— el análisis de la sinigrina desulfatada y sililatada mediante la cromatografía de gases deberá proporcionar sólo un pico principal.

En estas pruebas, el pico principal deberá representar un 98 % como mínimo de todas las áreas bajo los picos.

Confirmar determinando la cantidad de glucosa liberada después de la hidrólisis con mirosinasa (tioglucósido-glucohidrolasa EC 3.2.3.1). La glucosa deberá medirse con medios enzimáticos mediante un sistema de prueba comercializado. Será necesario tomar en consideración la glucosa libre presente, que deberá determinarse sin añadir mirosinasa. La concentración molar de glucosa medida deberá ser, como mínimo, un 98 % de la concentración molar de la solución de sinigrina examinada.

4.5.4. *Patrón interno alternativo : glucotropeolina*

En algunas semillas del género *Brassica* o en semillas de especies similares (cultivadas o de propagación autónoma) la sinigrina puede estar presente de forma natural.

En estos casos deberá emplearse un control interno alternativo : glucotropeolina (bencilglucosinolato, sal potásica, PM = 447,52) que a veces es difícil separar de otros glucosinolatos menores naturales. La glucotropeolina se empleará del mismo modo (soluciones de 5 y 20 mmol/l) que la sinigrina, una vez se haya comprobado su pureza según el procedimiento descrito en el punto 4.5.3, y se haya verificado que su factor de respuesta, en relación con la sinigrina, corresponde al indicado en el punto 7.2.

4.6. **Fases móviles.**

4.6.1. Eluyente A : agua (cualidad CLAR).

4.6.2. Eluyente B : acetonitrilo (de calidad CLAR), solución al 20 % (V/V) en agua (cualidad CLAR). La concentración puede modificarsen según las columnas utilizadas.

4.7. **Resina de intercambio iónico :**

4.7.1. DEAE Sepharose C1-6B en suspensión , que se vende ya preparado para su uso.

4.7.2. DEAE Sephadex A25 en suspensión, preparado del modo siguiente :

mezclar 10 g de resina con un exceso de ácido acético (2 mol/l). Dejar que sedimente. Añadir ácido acético (2 mol/l) hasta que el volumen de la suspensión sea igual al doble del volumen del material sedimentado.

4.8. Sulfatasa, del tipo Helix pomatia H1 (EC 3.1.6.1.) purificada previamente, examinada según se indica a continuación y diluida después.

4.8.1. *Preparación de las columnas de intercambio iónico :*

recortar 5 pipetas Pasteur (5.9) 7 cm por encima del cuello, y colocar un tapón de lana de vidrio (5.8). Poner las pipetas verticalmente sobre una base y colocar en cada una de ellas una suspensión de resina de intercambio iónico DEAE Sepharose C1-6B (4.7.1) de tal modo que, cuando se haya vaciado el agua, se obtenga un volumen de 500 µl de resina.

Verter un 1 ml de formato de imidazol 6 mol/l (4.4) en cada pipeta y enjuagar dos veces con agua (1 ml).

4.8.2. *Purificación de la sulfatasa*

Pesar 25 mg de *Helix pomatia* del tipo H1, con una precisión de 0,1 mg, disolver en 2,5 ml de agua y transferir 500 µl de esta solución a cada una de las columnas regeneradas (4.8.1). Lavar cada columna con agua (1,5 ml), eliminando el efluente. Seguidamente añadir 1,5 ml de acetato sódico 0,2 mol/l (4.3), recuperar y reunir los líquidos eluidos de las cinco columnas en un tubo de ensayo.

Concentrar los líquidos eluidos mediante un filtro Millipore PTGC 11K25 hasta que se obtenga un residuo de, aproximadamente, 100 µl (no se eliminará la sulfatasa con una masa molar superior a 5 000). Añadir agua (2,5 ml) y concentrar la solución una vez más con un filtro hasta que se obtenga un residuo de, aproximadamente, 100 µl. Diluir hasta 2,5 ml con agua y conservar la sulfatasa purificada en un congelador a la temperatura de − 18 °C (en cantidades pequeñas para poder descongelar la cantidad necesaria que vaya a utilizarse de forma inmediata).

4.8.3. *Prueba de la actividad de la sulfatasa*

4.8.3.1. Preparación de una solución de sinigrina 0,15 mmol/l, amortiguada con un pH de 5,8.

Preparar las soluciones siguientes sucesivamente :

a) Transferir 1 ml de ácido acético a un matraz de 500 ml y enrasar con agua.

b) Transferir 1 ml de etilenodiamina a un matraz de 500 ml y enrasar con agua.

c) Mezclar 73 ml de la solución a) con 40 ml de la solución b).

d) Ajustar el pH a 5,8 mediante las soluciones a) o b).

Verter 3 ml de sinigrina 5 mmol/l (4.5.1.) en un matraz de 100 ml y enrasar con la solución c).

4.8.3.2. Prueba de actividad

La unidad de actividad se define como la producción de un micromol de sinigrina desulfatada por minuto a una temperatura de 30 °C y un pH de 5,8.

Para la prueba, transferir 2 ml de sinigrina amortiguada (4.8.3.1.) a las células de referencia y de medición del espectrómetro (5.3), ajustado a una longitud de onda de 228 nm y a una temperatura de 30 °C. En el punto t = 0, introducir 50 µl de sulfatasa purificada (4.8.2.) en la célula de medición y encender el registrador. Apagar el registrador cuando deje de variar la absorbancia (Ae), representar la tangente en el punto t = 0 y mediar la pendiente $\frac{\Delta A}{\Delta t}$.

La actividad de la sulfatasa, expresada en unidades de actividad por mililitro de sulfatasa, será igual a

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

donde :

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ es la pendiente de la tangente en el punto t = 0, en unidades de absorbancia por minuto

V es el volumen, en litros, del medio reactivo (es decir, $2{,}0510 \times 10^{-3}$ l)

$\Delta E$ es la diferencia entre los coeficientes de extinción molar de la sinigrina y de la desulfosinigrina a 228 nm.

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

donde :

$\Delta Ae$ es la diferencia entre la absorbancia en equilibrio de la sinigrina desulfatada y la absorbancia en el punto t = 0

e es la longitud de la célula en centímetros (es decir, 1 cm).

c es la concentración de sinigrina desulfatada en equilibrio, en moles por litro (es decir,

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

El rendimiento en equilibrio de la desulfatación de la sinigrina es 0,95.

Calcular $\Delta E$, que será del orden de 1 500 $l.mol^{-1}. cm^{-1}$.

La actividad de la sulfatasa también puede calcularse mediante el empleo de la fórmula simplificada :

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

La actividad hallada deberá ser superior a 0,5 µmol/min.ml de sulfatasa purificada (4.8.2.).

4.8.4. *Disolución*

Con una pipeta, transferir 1 ml de sulfatasa purificada (4.8.2.) a un matraz aforado de 10 ml ; enrasar con agua y homogeneizar.

Dividir la solución en cantidades pequeñas y almacenarlas a una temperatura de − 18 °C.

5. APARATOS

Equipo normal de laboratorio y, en especial :

5.1. Un cromatógrafo líquido de alta resolución con el que se obtenga un gradiente de los eluyentes y se controle la temperatura de la columna a 30 °C, conectado a un detector de UV que permita hacer mediciones a 229 nm.

5.2. Columna cromatográfica para CLAR, del tipo C18 o C8, cuyo tamaño de partículas sea ≤ 5 µm, o, por ejemplo :

| | |
|---|---|
| Columna de Lichrosorb RP 18 | ≤ 5 µm (150 mm x 4,6 mm) |
| Columna de Spherisorb ODS2 | ≤ 5 µm (250 mm x 4-5,mm) |
| Columna de Novapak C18 | 4 µm (150 mm x 4 mm) |
| Lichrospher RP8 | ≤ 5 µm (200 mm x 4 mm) |
| Columna de Nucleosil C18 | ≤ 5 µm (200 mm × 4 mm) |

El rendimiento de la columna elegida deberá comprobarse de forma regular, utilizando preferentemente una muestra de semilla de colza de referencia (se recomienda el empleo de desulfoglucosinolato, obtenido preferentemente de muestras de la Oficina Comunitaria de Referencias). Concretamente, la columna no debe descomponer la 4— hidroxiglucobrasicina, glucosinolato importante pero relativamente inestable.

Las columnas nuevas se someterán a una operación previa de modo que puedan obtenerse resultados reproducibles.

5.3. Espectrómetro de doble haz, capaz de funcionar con ultravioleta, y, cuando sea posible, termostatizado a 30 °C, provisto de células de cuarzo y de un sistema de registro, cuando sea posible.

5.4. Micromolinillo, por ejemplo, un molinillo de café.

5.5. Centrífuga, para tubos de 6 ml, capaz de obtener una aceleración centrífuga de 5 000 g.

5.6. Baño de agua caliente o aparato de calentamiento, que pueda regularse a 75 °C.

5.7. Tubos de poliprolieno, de 6 ml de capacidad.

5.8. Lana de vidrio.

5.9. Pipetas Pasteur, de 150 ml de longitud.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. **Preparación de las muestras problema**

Reducir la muestra de laboratorio según el Anexo II y triturarla en el micromolinillo (5.4) durante 20 segundos. Mezclar el polvo y triturarlo todo durante otros 5 segundos.

Si las semillas contienen más del 10 % (m/m) de agua, secarlas primero en una corriente de aire de 45 °C, aproximadamente.

Nota : cuando se analicen semillas tratadas, lavarlas con diclorometano antes de triturarlas.

6.2. **Determinación de la humedad y del contenido de materia volátil**

Determinar la humedad y el contenido de materia volátil de la muestra problema según el Anexo III.

6.3. **Porción de prueba**

Preparar dos tubos (5,7) y transferir a cada uno 200 mg de la muestra problema de las semillas oleaginosas, pesadas con 0,1 mg de precisión.

6.4. **Extracción de glucosinolatos**

Colocar los tubos en un baño de agua caliente o en un aparato de calentamiento (5.6) a una temperatura de 75 °C y dejarlos durante un minuto. Añadir 2 ml de una solución al 70 % de metanol hirviendo (4.1) e, inmediatamente, añadir :

— en el primer tubo A, 200 µl de sinigrina 5 mmol/l (4.5.1)

— en el segundo tubo B, 200 µl de sinigrina 20 mmol/l (4.5.2).

Proseguir el calentamiento en el baño a 75 °C durante 10 minutos, agitando regularmente. Homogeneizar el contenido de cada tubo y centrifugar con una aceleración de 5 000 g durante 3 minutos. Transferir cada sobrenadante a otro tubo (5.7).

Añadir 2 ml. de una solución al 70 % de metanol hirviendo (4.1) a cada sedimento y volver a calentar en el baño a 75 ° durante 10 minutos, agitando regularmente. Centrifugar durante 3 minutos y añadir el sobrenadante al original. Completar el volumen hasta unos 5 ml con agua y homogeneizar.

Este extracto podrá almacenarse durante 2 semanas, en la oscuridad, en un congelador a —18 °C.

6.5. **Preparación de las columnas de intercambio iónico**

Recortar el número de pipetas Pasteur (5.9) necesarias, es decir, una pipeta por muestra, de forma que quede un volumen de 1,2 ml por encima del cuello y colocar un tapón de lana de vidrio (5.8) en el cuello. Colocar las pipetas de forma vertical encima de una base.

Depositar 0,5 ml de la suspensión bien homogenelzada de DEAE Sephadex A 25 (4.7.2) en cada columna y dejar que sedimente.

Enjuagar las columnas con 2 ml de formiato de imidazol 6 mol/l (4.4) y volver a enjuagar dos veces con un 1 ml de agua.

6.6. **Purificación y desulfatación**

Depositar un 1 ml del extracto (6.4.) en la columna preparada (6.5.) sin alterar la superficie de resina y dejar desaguar. Añadir dos veces 1 ml de solución amortiguadora de acetato sódico 0,02 mol/l de pH 4,0 (4.2.) dejando que la columna desagüe cada vez.

Depositar 75 µl de sulfatasa purificada diluida (4.8.4.). Dejar que actúe toda la noche a temperatura ambiente. Eluir con agua (1 ml dos veces (cualidad CLAR) los desulfoglucosinolatos obtenidos, dejando que desagüe entre cada adición. Recoger el eluido en un tubo. Homogeneizar bien el eluido y, si no se va a utilizar inmediatamente en la cromatrografía, guardarlo en la oscuridad congelado a —18 °C.

6.7. **Prueba de referencia**

Cuando sea preciso (véase 7.3.), realizar una prueba de referencia en las mismas condiciones en una porción de prueba idéntica, aunque suprimiendo la solución de patrón interno de sinigrina, con el fin de detectar y cuantificar la sinigrina presente en la porción de prueba.

6.8. **Cromatografía**

6.8.1. *Ajuste del aparato*

Flujo de la fase móvil : depende de la naturaleza de la columna (véase 6.8.2.)

Temperatura de la columna : 30 °C

Longitud de onda para la detección : 229 nm

6.8.2. *Prueba y gradiente de la elución*

Siguiendo las instrucciones de funcionamiento del aparato, inyectar 50 µl como máximo de la solución de desulfoglucosinolatos obtenido en 6.6.

De acuerdo con la columna empleada, convendrá un determinado número de gradientes.

— Columna Spherisorb RP 18,5 µm (150 mm x 4,6 mm)
  — 100 % de eluyente A (4.6.1.) + 0 % de eluyente B (4.6.2.) durante 1 minuto,
  — gradiente de elución lineal durante 20 minutos hasta que se obtenga el 0 % de eluyente A y el 100 % de eluyente B,
  — un gradiente de elución lineal durante 5 minutos hasta que se obtenga 100 % de eluyente A y 0 % de eluyente B,
  — 100 % de eluyente A y 0 % de eluyente B durante 5 minutos para equilibrar.
— Columna Lichrospher RP8 5 um (125 mm x 4,0 mm)
  — 100 % de eluyente A durante 2 minutos y 30 segundos,
  — un gradiente de elución lineal durante 18 minutos hasta que se obtenga 0 % de eluyente A + 100 % de eluyente B,
  — 100 % de eluyente B durante 5 minutos,
  — un gradiente de elución lineal durante 2 minutos de 0 % de eluyente A + 100 % de eluyente B hasta que se obtenga 100 % de eluyente A y 0 % de eluyente B,
  — equilibrar durante 5 minutos.

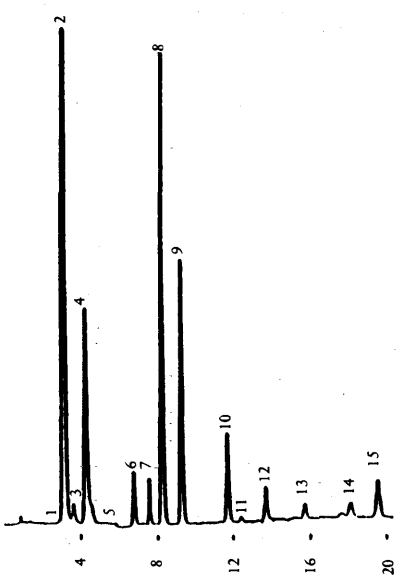
Nota : Podrán modificarse los perfiles del gradiente con el fin de conseguir separaciones óptimas de acuerdo con las columnas empleadas.

6.8.3. *Examen de los cromatogramas*

Tomar en consideración sólo los picos de gluconinolatos con áreas superiores a 1 % de la suma total de las áreas bajo los picos.

El orden de elución de los picos con una columna del tipo C 18 y el gradiente de elución de 6.8.2. será generalmente :

1. Desulfoglucolberina
2. Desulfoprogoltrina
3. Desulfoepi-progoitrina
4. Desulfosinigrina
5. Desulfoglucorrafanina
6. Desulfogluconapoleiferina
7. Desulfoglucoalisina
8. Desulfogluconapina
9. Desulfo-4-hidroxiglucobrasicina
10. Desulfoglucobrasicanapina
11. Desulfoglucotropeolina
12. Desulfoglucobrasicina
13. Desulfogluconasturtiina
14. Desulfo-4-metoxiglucobrasicina
15. Desulfoneoglucobrasicina



## 7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

### 7.1. Cálculo del contenido de cada glucosinolato

El contenido de cada glucosinolato, expresado en micromoles por gramo de semillas secas completas, es igual a :

$$\frac{\text{áreas bajo el pico del desulfoglucosinolato}}{\text{área bajo el pico de la desulfosinigrina}} \times \frac{\text{cantidad de patrón interno añadido al tubo en 6.4. ( µmoles)}}{\text{peso de la muestra de la semilla extraída}}$$

$$\times \text{ factor de respuesta del desulfoglucosinolato (7.2)} \times \frac{100}{100 - H}$$

donde :

H el el contenido de humedad y de materia volátil, expresado como porcentaje en masa, de la muestra problema (6.2.).

En algunos casos, la expresión de los resultados debe hacerse con un nivel de humedad específico, (ahora, 9 %). En estos casos, el resultado obtenido de la materia seca se multiplicará por

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

### 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. PRECISIÓN Y EXACTITUD

### 8.1. Precisión (respetabilidad y reproducibilidad)

En una prueba realizada entre 12 laboratorios, organizada en 1988 a nivel internacional, con la participación de 11 laboratorios, cada uno de los cuales llevó a cabo dos determinaciones de cada muestra, se obtuvieron los resultados estadísticos (determinados según la norma ISO 5725 « Aplicaciones Estadísticas — Precisión de los Métodos de Ensayo — Determinación de un Método de Ensayo Normalizado por los ensayos entre laboratorios ») que se indican en el cuadro 1.

Cuadro 1 : Resultados estadísticos del ensayo inter-laboratorios

| Muestras | Semilla de colza A | Semilla de colza B | Semilla de colza C | Semilla de colza D |
|---|---|---|---|---|
| Número de laboratorios una vez excluidos los laboratorios no aptos | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Media | 20,6 | 14,1 | 4,9 | 25,6 |
| Desviación típicas de repetibilidad | 1,7 | 0,6 | 0,3 | 0,8 |
| Coeficiente de la variación de repetibilidad | 8,5 % | 4,4 % | 6,7 % | 3,3 % |
| Repetibilidad | 4,9 | 1,7 | 0,9 | 2,4 |
| Desviación típicas de reproducibilidad | 3,4 | 2,5 | 1,5 | 2,4 |
| Coeficiente de la variación de reproducibilidad | 17 % | 18 % | 31 % | 9,4 % |
| Reproducibilidad | 9,6 | 7,1 | 1,4 | 6,8 |

8.1.1. *Repetibilidad*

Al obtener los resultados arriba expuestos (8.1.), la diferencia entre el valor de las dos determinaciones, realizadas rápidamente una después de la otra por el mismo analista con el mismo equipo y con la misma muestra problema, no debe superar los 2 µmoles/g cuando el contenido era inferior a 20 µmoles/g ni los 4 µmoles/g cuando el contenido se situaba entre 20 y 35 µmoles.

8.1.2. *Reproducibilidad*

Al obtener los resultados arriba expuestos (8.1.), la diferencia entre los valores del resultado final obtenidos por dos laboratorios mediante este método para analizar la misma muestra de laboratorio, no debe superar los 4µmoles/g cuando el contenido era inferior a 20 µmoles/g ni los 8 µmoles/g cuando el contenido se situaba entre 20 y 35 µmoles/g.

8.2. **Exactitud**

Se verificará el uso correcto del método mediante mediciones repetitivas de materiales de referencia con contenidos en glucosinolatos totales certificados y que cubran la referida gama de concentraciones. La Oficina Comunitaria de Referencia (OCR) de la Comisión de las Comunidades Europeas puede suministrar adecuados materiales de referencia con contenidos en glucosinolatos totales certificados.

La descripción del protocolo de comparación de los resultados obtenidos en el laboratorio con los materiales de referencia, se encuentra en el párrafo « instruction for use » del informe que acompaña dichos materiales de referencia.

9. INFORME DE LA PRUEBA

En el informe de la prueba se recogerá el método empleado y los resultados obtenidos. También se hará referencia a cualquier detalle del procedimiento que no aparezca especificado en la Norma Internacional o, se considere opcional, así como cualquier hecho que pueda incidir en el resultado.

El informe de la prueba dará todos los datos necesarios que permitan obtener una identificación completa de la muestra. »