

NORME
INTERNATIONALE

ISO
9167-1

Première édition
1992-07-01

**Graines de colza — Dosage des
glucosinolates —**

Partie 1:

Méthode par chromatographie liquide à haute
performance

ISO 9167-1:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cir/4/cir-151/0-00-4038-97-ef-e5e6aab12b67/iso-9167-1-1992>
Rapeseed — Determination of glucosinolates content —
Part 1: Method using high-performance liquid chromatography



Numéro de référence
ISO 9167-1:1992(F)

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 9167-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 2, *Graines et fruits oléagineux*.
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4e1c151a-0c00-4028-97af-e5e6aab12b67/iso-9167-1-1992>

L'ISO 9167 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Graines de colza — Dosage des glucosinolates*:

- *Partie 1: Méthode par chromatographie liquide à haute performance*
- *Partie 2: — Méthode par spectrométrie de fluorescence aux rayons X*

L'annexe A de la présente partie de l'ISO 9167 est donnée uniquement à titre d'information.

Graines de colza — Dosage des glucosinolates —

Partie 1:

Méthode par chromatographie liquide à haute performance

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 9167 prescrit une méthode de dosage par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) des différents glucosinolates dans les graines de colza.

NOTES

1 Cette méthode ne dose pas les glucosinolates ayant des substituants sur la partie glucose, mais ces composés sont peu importants dans les graines de colza commercialisées.

2 Une méthode rapide de dosage global des glucosinolates des graines de colza, par spectrométrie de fluorescence aux rayons X (XRF) fait l'objet de l'ISO 9167-2.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 9167. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 9167 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 664:1990, *Graines oléagineuses — Réduction de l'échantillon pour laboratoire en échantillon pour essai*.

ISO 665:1977, *Graines oléagineuses — Détermination de la teneur en eau et matières volatiles*.

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*.

3 Principe

Extraction des glucosinolates par le méthanol, puis purification et désulfatation enzymatique sur résines échangeuses d'ions. Détermination par chromatographie liquide à haute performance en phases inverses avec gradient d'éluion et détection aux ultraviolets.

4 Réactifs

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

4.1 **Méthanol**, qualité CLHP, solution à 70 % (V/V).

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

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

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

Dissoudre 204 g d'imidazole dans 113 ml d'acide formique dans une fiole jaugée de 500 ml. Ajuster au trait repère avec de l'eau.

4.5 **Étalon interne**, utiliser soit la **sinigrine monohydrate** (allylglucosinolate, sel de potassium monohydraté, $M_r = 415,49$) (voir 4.5.1) soit, pour le colza (cultivé ou adventice) dans lequel la sinigrine est présente naturellement, la **glucotropaéoline** (benzylglucosinolate, sel de potassium, $M_r = 447,52$) (voir 4.5.2).

Pour le colza à faible teneur en glucosinolates (< 20 µm/g), réduire la concentration de l'étalon interne (1 mmol/l à 3 mmol/l) en 4.5.1 et 4.5.2.1.

4.5.1 Sinigrine monohydratée.

4.5.1.1 Sinigrine monohydratée, solution à 5 mmol/l.

Dissoudre 207,7 mg d'allylglucosinolate de potassium monohydraté dans de l'eau, dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajuster au trait repère avec de l'eau.

La solution ainsi préparée peut être conservée au réfrigérateur à 4 °C pour une conservation d'une semaine ou au congélateur (-18 °C) pour une conservation plus longue.

4.5.1.2 Sinigrine monohydratée, solution à 20 mmol/l.

Dissoudre 831,0 mg d'allylglucosinolate de potassium monohydraté dans de l'eau, dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajuster au trait repère avec de l'eau.

La solution ainsi préparée peut être conservée au réfrigérateur à 4 °C environ pour une conservation d'une semaine ou au congélateur (-18 °C) pour une conservation plus longue.

4.5.1.3 Contrôle de pureté

Utiliser un ou plusieurs des trois tests suivants:

- l'analyse par CLHP réalisée par la méthode prescrite dans la présente partie de l'ISO 9167;
- l'analyse de la sinigrine intacte par CLHP (technique par appariement d'ions);
- l'analyse par chromatographie en phase gazeuse de la sinigrine désulfatée et silylée.

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

Confirmer la pureté par une détermination de la quantité de glucose libéré après hydrolyse avec la myrosinase (thioglucoside glucohydrolase EC 3.2.3.1). Mesurer le glucose par voie enzymatique. L'utilisation d'un coffret du commerce facilite la détermination. Tenir compte du glucose libre éventuellement présent qui sera mesuré sans addition de myrosinase. La concentration molaire de glucose

mesurée devrait être égale au moins à 98 % de la concentration molaire de la solution de sinigrine testée.

4.5.2 Glucotropaéoline.

NOTE 3 La glucotropaéoline est quelquefois difficile à séparer d'autres glucosinolates naturels mineurs.

4.5.2.1 Glucotropaéoline, solution à 5 mmol/l. Dissoudre 233,8 mg de glucotropaéoline dans de l'eau, dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajuster au trait repère avec de l'eau.

4.5.2.2 Glucotropaéoline, solution à 20 mmol/l. Dissoudre 895,0 mg de glucotropaéoline dans de l'eau, dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajuster au trait repère avec de l'eau.

4.5.2.3 Contrôle de pureté

Contrôler la pureté conformément au mode opératoire indiqué en 4.5.1.3.

4.5.2.4 Coefficients de réponse

Vérifier que les coefficients de réponse de la glucotropaéoline, comparés à la sinigrine, correspondent à ceux indiqués en 9.2.

ISO 9167-1:1992 Phases mobiles

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4e1c151a-0c00-4028-97af-e5e6aab12b67/iso-9167-1-1992-1-1992>

4.6.1.1-Eluant A: eau, purifiée par passage sur cartouche de charbon actif (par exemple système Norganic Millipore¹⁾) ou eau de qualité équivalente.

4.6.2 Eluant B: acétonitrile, qualité CLHP, solution à 20 % (V/V) dans l'eau purifiée. La concentration peut être modifiée en fonction de la colonne utilisée.

4.7 Résine échangeuse d'ions, utiliser 4.7.1 ou 4.7.2.

4.7.1 Suspension DEAE Sepharose CL-6B²⁾, prête à l'emploi ou produit équivalent.

4.7.2 Suspension DEAE Sephadex A25²⁾, préparée comme suit.

Mélanger 10 g de résine DEAE Sephadex A25 (ou d'une résine équivalente) 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 du surnageant soit égal au volume du gel décanté.

1) Norganic Millipore est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 9167 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

2) DEA Sepharose et Sephadex sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 9167 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif de ces produits ainsi désignés.

4.8 Sulfatase, type H1 (EC 3.1.6.1) d'*Hélix pomatia* ayant une activité supérieure à 0,5 unité d'activité par millilitre de solution de sulfatase purifiée.

Purifier, tester et diluer la sulfatase conformément à la méthode décrite de 4.8.1 à 4.8.4.

4.8.1 Préparation des colonnes échangeuses d'ions

Couper cinq pipettes Pasteur (5.9) à 7 cm au-dessus de l'étranglement et placer une mèche de laine de verre (5.8) au niveau de l'étranglement. Installer les pipettes verticalement sur un support et déposer dans chacune d'elles une quantité suffisante de résine échangeuse d'ions (4.7) de manière à obtenir, après écoulement de l'eau, un volume de 500 µl de résine.

Verser dans chaque pipette 1 ml de la solution de formate d'imidazole (4.4) puis les rincer deux fois avec 1 ml d'eau.

4.8.2 Purification

Peser, à 0,1 mg près, 25 mg de sulfatase type H1 d'*Hélix pomatia* (4.8), les dissoudre dans 2,5 ml d'eau et faire passer 500 µl de cette solution dans chacune des colonnes préparées en 4.8.1. Laver chaque colonne avec 1,5 ml d'eau et éliminer l'effluent. Ajouter ensuite 1,5 ml de la solution d'acétate de sodium (4.3), puis récupérer et réunir les éluats des cinq colonnes dans un tube à essais.

Concentrer les éluats par filtration à l'aide d'un filtre immersible Millipore PTGC 11K25³⁾ jusqu'à obtention d'un résidu d'environ 100 µl (la sulfatase ayant une masse moléculaire supérieure à 5 000 n'est pas éliminée). Ajouter 2,5 ml d'eau et concentrer à nouveau par filtration jusqu'à obtention d'un résidu d'environ 100 µl. Diluer jusqu'à 2,5 ml avec de l'eau et conserver la sulfatase ainsi purifiée au congélateur à -18 °C en plusieurs fractions pour ne décongeler que le volume nécessaire à l'utilisation.

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 pH 5,8.

Préparer successivement les trois solutions suivantes:

- verser 1 ml d'acide acétique dans une fiole jaugée de 500 ml et ajuster au trait repère avec de l'eau;
- verser 1 ml d'éthylène diamine dans une fiole jaugée de 500 ml et ajuster au trait repère avec de l'eau;

- mélanger 73 ml de solution a) et 40 ml de solution b) et 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 une fiole jaugée de 100 ml et ajuster au trait repère avec la solution c).

4.8.3.2 Contrôle de l'activité

Verser, à la pipette, 2 ml de la solution de sinigrine tamponnée (4.8.3.1) dans les cuves de référence et de mesure du spectromètre (5.3) réglé à une longueur d'onde de 229 nm avec une température des cuves de 30 °C. Au temps $t = 0$, verser dans la cuve de mesure 50 µl de la sulfatase purifiée (4.8.2) et mettre en marche l'enregistreur. Arrêter l'enregistreur quand l'absorbance ne varie plus (A_e), tracer la tangente au point $t = 0$ et mesurer sa pente $\Delta A/\Delta t$.

L'activité de la sulfatase (c'est-à-dire la production de 1 micromole de sinigrine désulfatée par minute à 30 °C et pH 5,8), exprimée en unités d'activité par millilitre de solution de sulfatase, est égale à

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

où

$\Delta A/\Delta t$ est la pente de la tangente au point $t = 0$, en unités d'absorbance par minute;

V est le volume, en litres, du milieu réactionnel (soit $2,05 \times 10^{-3}$ l);

$\Delta \varepsilon$ est la différence (de l'ordre de $1\,500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) des coefficients d'extinction molaire de la sinigrine et de la désulfosinigrine à 228 nm, c'est-à-dire

$$\Delta \varepsilon = \frac{A_e}{lc}$$

où

A_e est la différence entre l'absorbance à l'équilibre de la sinigrine désulfatée et l'absorbance au temps $t = 0$;

l est le parcours optique de la cuve, en centimètres (soit 1 cm);

c est la concentration de la sinigrine désulfatée à l'équilibre, en moles par litre, soit

3) Millipore PTGC 11K25 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 9167 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

$$c = \frac{0,15 \times 10^{-3} \times 0,95 \times 2}{2,05}$$

$$= 1,39 \times 10 \text{ mol/l}$$

0,95 correspond au rendement à l'équilibre de la désulfatation de la sinigrine.

On peut également calculer l'activité de la sulfatase à l'aide de la formule simplifiée suivante:

$$\frac{\Delta A \times 5,7}{\Delta t A_e}$$

4.8.4 Dilution

Verser, à la pipette, 1 ml de sulfatase purifiée (4.8.2) dans une fiole jaugée de 10 ml, ajuster au trait repère avec de l'eau et mélanger.

Cette solution est divisée en petites quantités et stockée au congélateur à - 18 °C.

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

5.1 Chromatographe liquide à haute performance, permettant d'obtenir un gradient d'élution et un contrôle de la température de la colonne à 30 °C, relié à un détecteur ultraviolet permettant les mesures à une longueur d'onde de 229 nm.

5.2 Colonne de chromatographie pour CLHP, de type C₁₈, ou C₈ de granulométrie inférieure ou égale à 5 µm, soit par exemple⁴⁾

Colonne Lichrosorb RP18, ≤ 5 µm (150 mm × 4,6 mm)

Colonne Spherisorb ODS2, ≤ 5 µm (250 mm × 4 mm; 250 mm × 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)

Les performances de la colonne choisie doivent être régulièrement contrôlées à l'aide, de préférence, d'un échantillon de référence de colza désulfoglucosinolate⁵⁾. En particulier, la colonne ne doit pas dégrader l'hydroxy-4 glucobrassicine, un glucosinolate important, mais relativement instable.

Les nouvelles colonnes doivent faire l'objet d'une mise en condition préliminaire, selon les instructions du fabricant, avant de pouvoir obtenir des résultats reproductibles.

5.3 Spectromètre à double faisceau, permettant d'opérer dans l'ultraviolet et à température contrôlée de 30 °C, muni de cuves en quartz de 1 cm de parcours optique et d'un système enregistreur.

5.4 Microbroyeur, par exemple moulin à café.

5.5 Centrifugeuse, convenant pour l'utilisation avec les tubes (5.6), permettant d'obtenir une accélération centrifuge de 5 000g.

5.6 Tubes en polypropylène, de 6 ml de capacité.

5.7 Bain d'eau ou bloc de chauffage, réglable à 75 °C.

5.8 Laine de verre.

5.9 Pipettes Pasteur, de 150 mm de long. et support approprié, ou tout autre dispositif adéquat.

6 Échantillonnage

Il convient que l'échantillonnage ait été effectué conformément à l'ISO 542.

Si, avant la réduction de l'échantillon pour laboratoire, on a séparé les gros corps étrangers non oléagineux, il en sera tenu compte dans les calculs.

4) Les exemples donnés sont des produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 9167 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

5) Des échantillons de référence de désulfoglucosinolate de colza peuvent être obtenus auprès du Bureau Communautaire de Référence.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Réduire l'échantillon pour laboratoire selon l'ISO 664.

Si les graines ont une teneur en eau et en matières volatiles supérieure à 10 % (*m/m*), les sécher au préalable à l'aide d'un courant d'air à environ 45 °C.

Le taux d'impureté est en général de 2 % (*m/m*). Si l'on trouve de la sinigrine dans l'échantillon, effectuer une analyse séparée pour les impuretés.

Déterminer la teneur en eau et en matières volatiles de l'échantillon pour essai selon l'ISO 665.

Si les graines ont été traitées, les laver au dichlorométhane.

Broyer les graines dans le microbroyeur (5.4) pendant 20 s. Mélanger, puis broyer pendant encore 5 s.

Centrifuger pendant 3 min et ajouter le liquide surnageant des deux tubes aux liquides surnageants respectifs retenus en 8.2.2.

8.2.4 Ajuster le volume des extraits combinés à environ 5 ml avec de l'eau et mélanger.

Ces extraits peuvent être conservés 2 semaines à l'abri de la lumière, au congélateur à - 18 °C.

8.3 Préparation des colonnes échangeuses d'ions

Couper le nombre de pipettes Pasteur (5.9) approprié, soit une pipette par échantillon, de manière à laisser un volume de 1,2 ml au-dessus de l'étranglement et placer une mèche de laine de verre (5.8) au niveau de l'étranglement. Placer les pipettes verticalement sur un support.

Déposer 0,5 ml de la suspension, préalablement bien mélangée de résine échangeuse d'ions (4.7) dans chaque pipette, laisser décanter et écouler.

Rincer les pipettes avec 2 ml de formate d'imidazole (4.4) puis avec deux fois 1 ml d'eau.

8.4 Purification et désulfatation

8.4.1 Effectuer les opérations indiquées en 8.4.2 à 8.4.5 pour chaque extrait combiné.

8.4.2 Déposer 1 ml d'extrait (8.2.4) sur la colonne préparée (8.3) sans en modifier la surface et le laisser s'écouler. Ajouter deux fois 1 ml de tampon d'acétate de sodium (4.2) en le laissant s'écouler à chaque fois.

8.4.3 Ajouter dans la colonne 75 µl de la solution de sulfatase purifiée diluée (4.8.4). Laisser agir pendant une nuit à température ambiante.

8.4.4 Placer un tube (5.7) sous la colonne pour recueillir l'éluat.

Éluer le désulfoglucosinolate obtenu avec deux fois 1 ml d'eau, en laissant l'eau s'écouler après chaque addition.

8.4.5 Bien homogénéiser l'éluat. S'il n'est pas utilisé immédiatement pour la chromatographie, il peut être conservé à l'abri de la lumière, au congélateur à - 18 °C, pendant une semaine.

8.5 Essai à blanc

Si besoin est (voir 9.3), effectuer un essai à blanc en suivant le même mode opératoire, sur une prise d'essai provenant du même échantillon pour essai, mais en omettant la solution d'étalon interne de

8 Mode opératoire

8.1 Prise d'essai

Étiqueter deux tubes (5.6) A et B, y introduire 200 mg, pesés à 0,1 mg près, d'échantillon pour essai préparé (article 7).

8.2 Extraction des glucosinolates

8.2.1 Plonger les tubes dans le bain d'eau ou le bloc de chauffage (5.7) réglé à 75 °C et les y laisser 1 min. Ajouter ensuite 2 ml d'une solution bouillante de méthanol (4.1) et immédiatement après

- dans le tube A, 200 µl de solution d'étalon interne à 5 mmol/l (4.5.1.1) et
- dans le tube B, 200 µl de solution d'étalon interne à 20 mmol/l (4.5.1.2).

8.2.2 Poursuivre le chauffage à 75 °C pendant 10 min, en agitant régulièrement. Mélanger le contenu de chaque tube et centrifuger avec une accélération de 5 000g pendant 3 min. Verser le liquide surnageant de chaque tube, dans deux autres tubes étiquetés (5.6) A' et B'.

8.2.3 Ajouter dans les deux tubes contenant le sédiment, 2 ml d'une solution bouillante de méthanol (4.1) et chauffer à nouveau pendant 10 min, dans le bain d'eau ou dans le bloc de chauffage (5.7) réglé à 75 °C, en agitant les tubes régulièrement.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9167-1:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4e1c151a-0c00-4028-97af->

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4e1c151a-0c00-4028-97af->

sinigrine afin de détecter et de quantifier une éventuelle présence de sinigrine dans la prise d'essai.

8.6 Chromatographie

8.6.1 Réglage de l'appareil

Ajuster le chromatographe pour obtenir

un débit de la phase mobile (4.6), dépendant de la nature de la colonne (voir 8.6.2), en général de l'ordre de 1 ml/min

une température de la colonne (5.2) de 30 °C, et

une longueur d'onde de détection de 229 nm.

8.6.2 Analyse

En fonction de l'appareillage, injecter dans le chromatographe un volume inférieur à 50 µl de la solution de désulfoglucosinolate obtenue en 8.4.4.

Utiliser un gradient d'élution approprié correspondant à la colonne utilisée.

NOTES

4 Les gradients d'élution suivants sont indiqués comme exemples.

a) Colonne Lichrosorb RP18, ≤ 5 µm (150 mm × 4,6 mm)

- passer 100 % de l'éluant A (4.6.1) pendant 1 min
- appliquer un gradient d'élution linéaire pendant 20 min jusqu'à ce que 0 % d'éluant A et 100 % d'éluant B (4.6.2) soient obtenus
- appliquer un gradient d'élution linéaire pendant 5 min jusqu'à ce que 100 % de l'éluant A et 0 % de l'éluant B soient obtenus
- passer 100 % de l'éluant A pendant 5 min pour équilibrer.

b) Colonne Lichrospher RP8, ≤ 5 µm (125 mm × 4 mm)

- passer 100 % d'éluant A pendant 2 min 30 s
- appliquer un gradient d'élution linéaire pendant 18 min jusqu'à ce que 0 % de l'éluant A et 100 % de l'éluant B soient obtenus
- passer 100 % de l'éluant B pendant 5 min
- appliquer un gradient d'élution linéaire pendant 2 min jusqu'à ce que 100 % d'éluant A et 0 % d'éluant B soient obtenus.

- passer 100 % de l'éluant A pendant 5 min pour équilibrer.

5 les profils des gradients peuvent être modifiés pour donner les séparations optimales en fonction des colonnes utilisées.

8.6.3 Examen des chromatogrammes

Prendre uniquement en compte les pics dont l'aire est supérieure à 1 % de la somme totale des aires des pics.

L'ordre d'élution des pics avec une colonne du type C₁₈ et un gradient d'élution approprié (voir les exemples donnés en 8.6.2) est, en général, tel que représenté à la figure 1.

9 Expression des résultats

9.1 Calcul de la teneur en chaque glucosinolate

La teneur de chaque glucosinolate, exprimée en micromoles par gramme de matière sèche du produit est égale à

$$\frac{A_g}{A_s} \times \frac{n}{m} \times K_g \times \frac{100}{100 - w}$$

A_g est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant au désulfoglucosinolate;

A_s est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant à la désulfosinigrine;

K_g est le coefficient de réponse du désulfoglucosinolate (9.2);

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai;

n est la quantité, en micromoles, de l'étalon interne ajoutée dans le tube en 8.2;

w est la teneur en eau et en matières volatiles, exprimée en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai.

Si l'on désire exprimer le résultat par rapport à une teneur en eau et en matières volatiles spécifiée, w_s , [par exemple, $w_s = 9 \%$ (m/m)], multiplier le résultat obtenu sur matière sèche (comme ci-dessus) par

$$\frac{100 - w_s}{100}$$

9.2 Coefficients de réponse

Les coefficients de réponse suivants doivent être adoptés.

NOTE 6 Ces coefficients de réponse ont été déterminés expérimentalement et ont été fixés par consensus des différents laboratoires ayant participé aux mesures; ils sont susceptibles d'être complétés ou modifiés.

1 Désulfoglucoïbérine	1,07
2 Désulfoprogoïtrine	1,09
3 Désulfoépi-progoïtrine	1,09
4 Désulfosinigrine	1,00
5 Désulfoglucoraphanine	1,07
6 Désulfogluconapoléïférine	1,00
7 Désulfoglucoalyssine	1,07
8 Désulfogluconapine	1,11
9 Hydroxy-4-désulfoglucobrassicine	0,28
10 Désulfoglucobrassicinapine	1,15
11 Désulfoglucotropaéoline	0,95
12 Désulfoglucobrassicine	0,29
13 Désulfogluconasturtine	0,95
14 Méthoxy-4-désulfoglucobrassicine	0,25
15 Désulfoglucobrassicine	0,20
16 Autres désulfoglucosinolates	1,00

Tableau 1 — Résultats statistiques des essais interlaboratoires

Échantillon	Colza A	Colza B	Colza C	Colza D
Nombre de laboratoires retenus après élimination des aberrants	11	11	11	11
Moyenne de la teneur en glucosinolates ($\mu\text{mol/g}$ de matière sèche)	20,6	14,1	4,9	25,6
Écart-type de répétabilité, s_r	1,7	0,6	0,3	0,8
Coefficient de variation de répétabilité	8,5 %	4,4 %	6,7 %	3,3 %
Répétabilité, $2,83s_r$	4,9	1,7	0,9	2,4
Écart-type de reproductibilité, s_R	3,4	2,5	1,5	2,4
Coefficient de variation de reproductibilité	17 %	18 %	31 %	9,4 %
Reproductibilité, $2,83s_R$	9,6	7,1	1,4	6,8

9.3 Calcul de la 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 des teneurs de chaque glucosinolate dont l'aire du pic correspondant est supérieure à 1 % de la somme totale des aires des pics.

Si la différence entre les résultats de la teneur en glucosinolates totaux utilisés pour les deux concentrations satisfait aux exigences de répétabilité (voir 10.2), il n'y a pas contamination de l'étalon interne. Dans ce cas, prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations.

10 Fidélité

10.1 Résultat des essais interlaboratoires

Un essai interlaboratoire, organisé en 1988 sur le plan international avec la participation de 11 laboratoires, chacun d'eux ayant effectué deux déterminations sur chaque échantillon, a donné les résultats statistiques (déterminés selon l'ISO 5725), indiqués dans le tableau 1.

10.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire et par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne doit pas être supérieure à $2 \mu\text{mol/g}$ pour les teneurs inférieures à $20 \mu\text{mol/g}$ et $4 \mu\text{mol/g}$ pour les teneurs comprises entre $20 \mu\text{mol}$ et $35 \mu\text{mol/g}$.

10.3 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, ne doit pas être supérieure à $4 \mu\text{mol/g}$ pour les teneurs inférieures à $20 \mu\text{mol/g}$ et à $8 \mu\text{mol/g}$ pour les teneurs comprises entre $20 \mu\text{mol/g}$ et $35 \mu\text{mol/g}$.