

RÈGLEMENT (CEE) N° 2435/86 DE LA COMMISSION

du 29 juillet 1986

modifiant le règlement (CEE) n° 1470/68 relatif à la prise et réduction des échantillons ainsi qu'à la détermination de la teneur en huile, en impuretés et en humidité 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° 1454/86 ⁽²⁾, et notamment son article 24 *bis*,

considérant que, en raison des modifications successives du règlement (CEE) n° 1470/68 de la Commission ⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 3519/84 ⁽⁴⁾, le titre dudit règlement ne correspond que partiellement à son contenu; qu'il convient par conséquent d'en adapter l'intitulé;

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 une méthode appropriée;

considérant que, en application du règlement n° 282/67/CEE de la Commission, du 11 juillet 1967, relatif aux modalités d'intervention pour les graines oléagineuses ⁽⁵⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2436/86 ⁽⁶⁾, ainsi que du règlement (CEE) n° 2681/83 de la Commission, du 21 septembre 1983, portant modalités d'application du régime de l'aide pour les graines oléagineuses ⁽⁷⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2434/86 ⁽⁸⁾, il y a lieu de définir la méthode unique 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

Le règlement (CEE) n° 1470/68 est modifié comme suit.

1) Le titre est remplacé par le texte suivant :

« Relatif à la prise et à la réduction des échantillons ainsi qu'aux méthodes d'analyses des graines oléagineuses ».

2) L'article 2 *quater* est inséré :

« Article 2 *quater*

La détermination de la teneur en glucosinolates visée à l'article 4 du règlement n° 282/67/CEE et à l'article 32 du règlement (CEE) n° 2681/83 est effectuée selon la méthode définie à l'annexe VIII, sans préjudice des dispositions transitoires visées auxdits articles. »

3) L'annexe du présent règlement est ajoutée comme annexe VIII.

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 1^{er} juillet 1986.

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

Fait à Bruxelles, le 29 juillet 1986.

Par la Commission

Frans ANDRIESEN

Vice-président

⁽¹⁾ JO n° 172 du 30. 9. 1966, p. 3025/66.

⁽²⁾ JO n° L 133 du 21. 5. 1986, p. 8.

⁽³⁾ JO n° L 239 du 28. 9. 1968, p. 2.

⁽⁴⁾ JO n° L 328 du 15. 12. 1984, p. 12.

⁽⁵⁾ JO n° L 151 du 13. 7. 1967, p. 1.

⁽⁶⁾ Voir page 61 de ce présent Journal officiel.

⁽⁷⁾ JO n° L 266 du 28. 9. 1983, p. 1.

⁽⁸⁾ Voir page 51 de ce présent Journal officiel.

ANNEXE

« ANNEXE VIII

COLZA ET NAVETTE

Détermination de la teneur en glucosinolates

1. OBJET

La présente méthode est conçue pour la détermination de la composition et de la teneur en principaux glucosinolates du colza et de la navette.

2. PRINCIPE

- 2.1. Mesure des dérivés triméthylsilyl des glucosinolates désulfatés enzymatiquement, par chromatographie en phase gazeuse avec programmation des températures et usage de la sinigrine comme étalon interne.
- 2.2. La méthode permet de déterminer quantitativement, en micromoles par g de graine séchée à l'air, six glucosinolates importants contenus dans le colza et la navette et deux glucosinolates contenus dans les graines de moutarde, qui peuvent être des impuretés dans les graines oléagineuses.

3. PRINCIPAUX RÉACTIFS

- 3.1. DEAE Sephadex A-25
- 3.2. SP Sephadex C-25
- 3.3. Sulfatase type H-1
- 3.4. Allyl glucosinolate (Sinigrin)
- 3.5. Acétate de baryum
- 3.6. Acétate de plomb
- 3.7. Pyridine (grade silylation)
- 3.8. N-méthyle-N-triméthylsilyl heptafluorbutyramide (MSHFBA)
- 3.9. Triméthylchlorosilane (TMCS)
- 3.10. 1-Méthylimidazole

4. APPAREILLAGE PRINCIPAL

- 4.1. Tubes d'extraction suédois de 70 mm, en acier inoxydable, d'un diamètre intérieur de 18 mm, à roulement à billes à 17 mm, à bouchon en caoutchouc fluorosiliconé n° 3 et agitateur horizontal (Troeng 1955), ou agitateur équivalent à billes d'acier.
- 4.2. Moulin à café à rotation rapide.
- 4.3. Étuve à air pulsé.
- 4.4. Chromatographe en phase gazeuse à température programmable et détecteur à ionisation de flamme.
- 4.5. Colonne de verre pour chromatographie en phase gazeuse : longueur d'environ 2 mètres, diamètre interne de 2 mm, remplie avec 2 % de OV-07 sur diatomite d'une granulométrie de 80 à 100 mailles.

5. PRÉPARATION

5.1. Préparation de l'acétate de DEAE Sephadex A-25 et de pyridine Acétate

Peser 10 g de DEAE Séphadex A-25 dans un bécher de 250 ml, ajouter 150 ml d'eau et laisser le Séphadex gonfler pendant la nuit. Verser le Séphadex dans une colonne de 20 × 400 mm.

Passer 500 ml d'hydroxyde de sodium 0,5 N (10 g dissous dans de l'eau et portés à 500 ml) dans la colonne. Laver la colonne avec 250 ml d'eau afin d'éliminer l'excès d'hydroxyde de sodium en veillant à obtenir un pH neutre.

Prélever un dixième du Séphadex à transformer en acétate ; le délayer dans de l'eau et le verser dans une colonne de 15 × 200 mm. Passer 100 ml d'acide acétique à 0,5 M (2,9 ml d'acide acétique glacial portés à 100 ml) dans la colonne. Laver avec 250 ml d'eau. Verser le tout dans un flacon de 250 ml contenant de l'eau en vue du stockage.

Verser les neuf dixièmes restants du Séphadex dans une colonne avec de l'eau. Verser 400 ml d'acétate de pyridine à 0,5 M (19,8 ml de pyridine, plus 15 ml d'acide acétique glacial, le tout allongé à 500 ml avec de l'eau) dans la colonne. Laver avec 250 ml d'eau. Verser le tout dans un flacon de 250 ml contenant de l'eau en vue du stockage.

5.2. Préparation de la forme sodique du SP Sephadex C-25

Peser 1 g de SP Sephadex C-25 dans un bécher de 100 ml, ajouter 75 ml d'eau et laisser le Sephadex gonfler pendant la nuit. Verser le Sephadex dans une colonne de 15 × 200 mm et laver avec 250 ml d'eau. Verser le tout dans un flacon de 250 ml contenant de l'eau en vue du stockage.

5.3. Purification de la sulfatase

Peser 70 mg de sulfatase de type H-1 dans un tube à essai de 16 × 150 mm. Ajouter 3 ml d'eau en vue de dissoudre la sulfatase et diluer avec un volume égal d'éthanol. Centrifuger pendant 10 minutes à 2 000 x g. Décanter la phase surnageante dans un second tube et jeter le précipité. Ajouter 9 ml d'éthanol à la phase surnageante et centrifuger de nouveau pendant 10 minutes à 2 000 x g. Jeter la phase surnageante et dissoudre le précipité dans 2 ml d'eau.

Introduire un petit bouchon de laine de verre dans l'embout de chacune des deux pipettes.

Dans l'une des pipettes, ajouter 100 microlitres de la couche aqueuse surnageant sur l'acétate de DEAE Sephadex A-25. Y ajouter le même volume d'acétate de DEAE Sephadex A-25 pour obtenir une colonne de 15 mm de hauteur, équivalent à 20 mg de Sephadex sec.

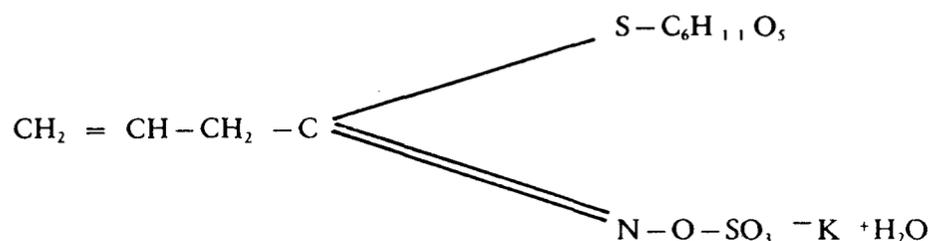
Dans l'autre pipette, ajouter 100 microlitres de la phase aqueuse surnageant sur la forme sodique de SP Sephadex C-25. Y ajouter ensuite le même volume de la forme sodique de SP Sephadex C-25 pour obtenir une colonne similaire.

Passer la solution enzymatique aqueuse d'abord dans la colonne contenant l'acétate de DEAE Sephadex A-25, puis dans la colonne contenant la forme sodique de SP Sephadex C-25.

La solution de sulfatase est utilisée non diluée dans des colonnes formées par des embouts de pipettes. Entreposer l'éluat à 20° et décongeler immédiatement avant usage.

5.4. Préparation de l'étalon interne

Glucosinolate d'allyle (sel de potassium monohydraté)



Poids moléculaire :

C	10 × 12,011	= 120,110
H	18 × 1,008	= 18,144
N	1 × 14,008	= 14,008
S	2 × 32,006	= 64,132
O	1 × 16,000	= 16,000
K	1 × 39,100	= 39,100
		<u>415,494</u>

Pour préparer 1 micromole par ml de solution, prélever une quantité de 41,5 mg et porter à 100 ml.

5.5. Préparation de la colonne OV-7 pour chromatographie en phase gazeuse

Commencer par laver la surface intérieure d'une colonne de verre (4' × 0,25" de diamètre extérieur et 2 mm de diamètre intérieur) en reliant par un tuyau de caoutchouc une extrémité de la colonne à un aspirateur à eau pour obtenir une faible succion. Aspirer à travers la colonne 100 ml de chloroforme, 100 ml d'acétone, puis 100 ml d'éther de pétrole (point d'ébullition : 30 à 60° C). Aspirer de l'air à travers la colonne pour la sécher, puis la sécher dans une étuve à air pulsé. Boucher une extrémité avec de la laine de verre. Exercer une succion à cette extrémité de la colonne au moyen d'une trompe à vide. À travers un petit entonnoir fixé à l'autre extrémité de la colonne par un court tuyau en tygon, ajouter le garnissage de la colonne : 2 % OV-7 sur diatomite CLQ d'une granulométrie de 80 à 100 mailles. Tapoter la colonne pour faciliter l'écoulement du garnissage autour des serpentins jusqu'à ce que sa répartition soit complète et uniforme. Enlever l'entonnoir et le tuyau en tygon. Expulser à l'aide d'une pipette Pasteur et d'un bulbe en caoutchouc une quantité de matériel suffisante pour qu'il soit possible de boucher l'extrémité avec de la laine de verre.

Adapter la colonne à la vanne d'injection du chromatographe gazeux au moyen d'un écrou en acier inoxydable, une bague arrière montée à l'arrière et une bague en graphite. Faire passer le gaz porteur (hélium) à travers la colonne et faire monter la température à partir de 100 °C à raison de 1 °C par minute jusqu'à 290 °C et l'y maintenir toute la nuit. Refroidir le four et fixer la colonne au détecteur en utilisant l'écrou en acier inoxydable, la bague arrière et la bague avant en graphite.

Régler la température de l'injecteur à 250 °C et celle du détecteur à 300 °C, la température de la colonne à 200 °C, le débit du gaz d'hélium porteur à 40 ml par minute, les débits de l'hydrogène et de l'air respectivement à 50 et à 500 ml par minute (conditions optimales de fonctionnement du détecteur) l'intervalle à 1 et l'atténuation à 64.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. Préparation des échantillons

Le prélèvement des échantillons de graines et la réduction des échantillons de laboratoire en échantillons d'analyse s'effectuent conformément aux procédures décrites respectivement aux annexes I et II du règlement (CEE) n° 1470/68.

Un échantillon de graines types doit être analysé au moins une fois par lot d'échantillons. Les données des analyses d'échantillon type sont utiles pour contrôler la précision et la fiabilité de la méthode.

Si l'échantillon de graines est humide, en sécher 20 grammes dans une étuve à air pulsé pendant la nuit à une température de 45 °C afin d'obtenir 7 % d'humidité.

Moudre 20 grammes de graines séchées dans un moulin à café. Extraire l'huile de 3 grammes de graines broyées avec 40 ml d'éther de pétrole (point d'ébullition : 30 à 60 degrés C) ou n-hexane dans un tube suédois contenant trois billes d'acier, et fermé à l'aide d'un bouchon fluorosiliconé. Agiter horizontalement dans un agitateur mécanique pendant 45 minutes. Filtrer par aspiration à travers un papier Whatman n° 1 dans un entonnoir conique et laver par deux fois avec du solvant frais. Sécher l'échantillon de farine à l'air dans une cheminée pendant la nuit. Réduire éventuellement tout grumeau du produit séché par passage dans un tamis de 280 micromètres. Plus de 90 % de l'échantillon doit passer dans le tamis.

6.2. Inactivation de la myrosinase et extraction des glucosinolates

Peser la farine (100 mg) dans un tube à essai. Chauffer le tube et l'échantillon dans un bain d'eau bouillante (plus de 95 °C). Deux minutes plus tard, ajouter de l'eau bouillante (1 ml). Encore deux minutes plus tard, ajouter l'étalon interne (glucosinolate d'allyle). La concentration de l'étalon interne est fonction de la teneur estimative de l'échantillon en glucosinolates, selon les indications du tableau ci-après. Continuer de chauffer à plus de 95 °C pendant 15 minutes.

Au cours d'un second essai, l'étalon interne n'est pas ajouté pour pouvoir déterminer la teneur an allyl-glucosinolate de l'échantillon original.

Refroidir la solution et ajouter 100 microlitres d'une solution contenant 0,5 mol. respectivement d'acétate de baryum et d'acétate de plomb par litre d'eau et mélanger. Centrifuger à 2 000 x g. Conserver la phase surnageante.

Teneur en glucosinolates (micromole/g graine)	Concentration de l'étalon interne (micromole/ml)	Quantité d'extrait à appliquer au Sephadex (ml)
moins de 15	1	1,0
15 — 40	2	0,5
plus de 40	3	0,2

6.3. Préparation des minicolonnes DEAE — Sephadex A-25

Pour préparer des colonnes convenables, il est possible d'utiliser soit des embouts de pipettes de 1 ml en plastique, soit des pipettes Pasteur raccourcies. Placer un petit bouchon de laine de verre dans le fond de la "minicolonne" et laver avec de l'eau (1 ml). Ajouter une suspension de DEAE Sephadex A-25 (sous forme pyridine-acétate) équivalant à 20 mg (poids sec) de Sephadex. Le moyen le plus facile d'y parvenir est d'ajouter un volume prédéterminé d'une suspension (bien mélangée). Laisser le gel décanter et laver avec de l'eau.

Verser dans la colonne la phase surnageante résultant du traitement au baryum/plomb. Laisser s'écouler et laver la colonne avec 1 ml d'eau, puis avec 1 ml de pyridine-acétate (0,02M). Laisser s'écouler puis ajouter dans la colonne 50 microlitres d'une solution de sulfatase purifiée, puis laisser reposer à température ambiante pendant une nuit. Eluer les désulfoglucosinolates avec de l'eau (3 x 0,5 ml).

6.4. Dérivatisation des désulfoglucosinolates

Préparer le réactif silylant en mélangeant le MSHFBA (100 microlitres), le TMCS (10 microlitres) et le 1-méthylimidazole dilué (50 microlitres). Le 1-méthylimidazole dilué est préparé à partir de 1-méthylimidazole (50 microlitres) et d'acétone (950 microlitres).

Sécher un échantillon d'éluat de désulfoglucosinolate dans une petite fiole pouvant être correctement bouchée. De petites quantités (5 à 10 microlitres) peuvent être séchées par chauffage à 120 °C pendant 10 minutes. Il est également possible de procéder au séchage dans un dessiccateur sous vide à l'aide de P₂O₅. A l'échantillon séché ajouter un volume égal de réactif silylant et boucher la fiole. Chauffer celle-ci à 120 °C (pendant 5 minutes) pour achever le processus de dérivatisation.

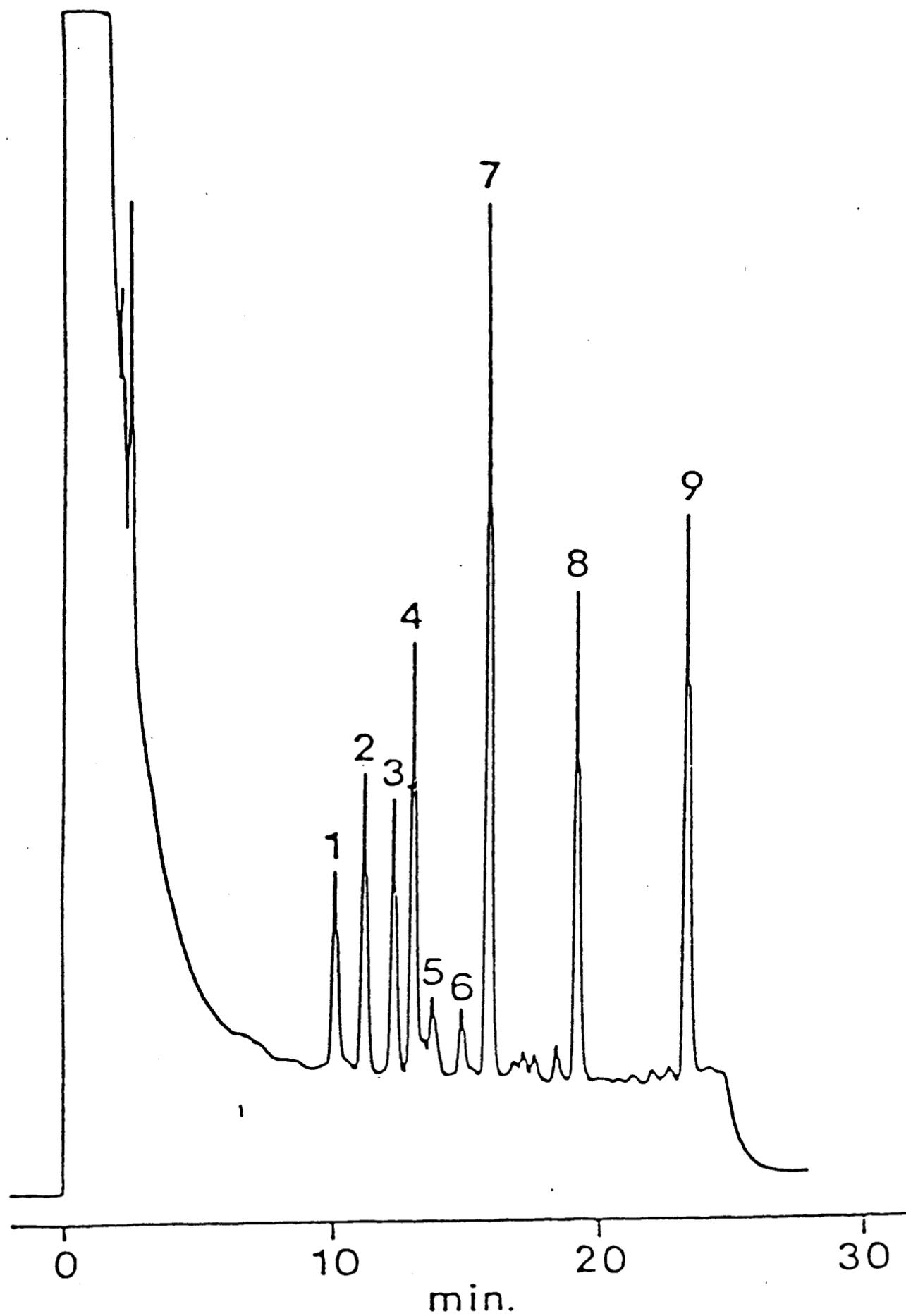
6.5. Séparation par chromatographie en phase gazeuse des désulfoglucosinolates dérivés

Injecter 2 microlitres dans la colonne OV-7 et maintenir la température à 200 °C pendant 5 minutes, puis la porter à 280 °C en programmant une élévation de température de 5 °C par minute. Maintenir cette température finale pendant 15 minutes.

Noter les surfaces de pic pour les glucosinolates suivants :

3-butényle glucosinolate, 4-pentényle glucosinolate, 2-hydroxy-3-butényle glucosinolate, 2-hydroxy-4-pentényle glucosinolate, indolyle-3-méthyle glucosinolate, 4-OH-indolyle-3-méthyle glucosinolate, et le cas échéant : allyle glucosinolate, 4-hydroxy benzyle glucosinolate.

Lorsqu'on analyse des échantillons contenant une large gamme de glucosinolates ou lorsqu'on commence l'analyse après une période de plusieurs heures de repos, il peut être nécessaire de répéter des injections d'un échantillon jusqu'à obtention de résultats constants.



Séparation des désulphoglucosinolates dérivés par gaz chromatographie avec températures programmées.

- (1) allyl-,
- (2) 3-butenyl-,
- (3) 4-pentenyl-,
- (4) 2-hydroxy-3-butenyl-,
- (5) 2-hydroxy-4-pentenyl-,
- (6) sucrose,
- (7) benzyl-,
- (8) 4-hydroxy-benzyl,
- (9) 4-hydroxyindolyl-3-methyl.

6.6. Calcul des résultats

La première chose à faire est de déterminer quelle est, le cas échéant, la surface de la zone du glucosinolate d'allyle imputable à une contamination éventuelle.

La surface normalisée de la zone correspondant aux glucosinolates d'allyle, obtenue par analyse sans addition d'étalon interne se calcule à partir de la surface des zones correspondant au glucosinolate 2-hydroxy-3-butényle résultant de deux analyses, avec et sans addition d'étalon interne :

$$\begin{array}{ccc} \text{Surface de la zone} & & \text{Surface de la zone} \\ \text{de glucosinolate} & & \text{de glucosinolate} \\ \text{d'allyle TMS} & \times & \text{2-HO-3-butényle TMS} \\ \text{(sans étalon interne)} & & \text{(avec étalon interne)} \\ & & \text{Surface de la zone} \\ & & \text{du glucosinolate} \\ & & \text{2-HO-3-butényle TMS} \\ & & \text{(sans étalon interne)} \\ & & \text{Surface de la zone} \\ & & \text{de glucosinolate} \\ & & \text{d'allyle TMS} \\ & & \text{résultant d'une} \\ & & \text{contamination} \end{array}$$

Le second travail consiste à calculer la surface de la zone correspondant au glucosinolate d'allyle imputable à un étalon interne. Le résultat précédent est soustrait de la surface totale de la zone de glucosinolate d'allyle obtenu par analyse avec addition d'étalon interne :

$$\begin{array}{ccc} \text{Surface de la zone} & & \text{Surface de la zone} \\ \text{de glucosinolate} & & \text{du glucosinolate} \\ \text{d'allyle TMS} & - & \text{d'allyle TMS résultant} \\ \text{(avec étalon interne)} & & \text{d'une contamination} \\ & & \text{Surface de la zone} \\ & & \text{de glucosinolate d'allyle TMS} \\ & & \text{imputable à l'addition} \\ & & \text{d'un étalon interne} \end{array}$$

Les surfaces des zones des divers dérivés de glucosinolate TMS, obtenues dans l'analyse avec addition d'étalon interne, sont chacune successivement divisées par la surface de la zone imputable au glucosinolate d'allyle ajouté en tant qu'étalon interne, puis multipliées par les micromoles de glucosinolate d'allyle ajouté par gramme de farine déshuilée séchée à l'air, ce qui donne les micromoles de glucosinolate par gramme de farine déshuilée séchée à l'air :

$$\begin{array}{ccc} \text{Surface de la zone} & & \text{Micromoles de} \\ \text{de glucosinolate TMS} & & \text{glucosinolate d'allyle} \\ & \times & \\ \text{Surface de la zone} & & \text{gramme de farine déshuilée} \\ \text{de glucosinolate} & & \text{séchée à l'air} \\ \text{d'allyle TMS} & & \\ \text{résultant de l'addition} & & \\ \text{d'étalon interne} & & \text{Micromoles de} \\ & & \text{glucosinolate} \\ & & \text{gramme de farine déshuilée} \\ & & \text{séchée à l'air} \end{array}$$

Pour rapporter les résultats aux graines séchées à l'air :

$$\begin{array}{ccc} \text{Micromoles de glucosinolate} & & \text{100 — \% d'huile} \\ \text{g de farine déshuilée} & \times & \text{100} \\ \text{séchée à l'air} & & \\ & & \text{Micromoles de glucosinolate} \\ & & \text{g de graines séchées à l'air} \end{array}$$

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les quantités de glucosinolates de 3-butényle, 4-pentényle, 2-hydroxy-3-butényle, 2-hydroxy-4-pentényle, Indolyl-3-méthyle, 4-OH-indolyl-3-méthyle sont additionnées et consignées globalement. Les glucosinolates d'allyle et de 4-hydroxybenzyle, éventuellement présents, sont consignés séparément, à titre d'indication d'une contamination par la moutarde ou d'autres graines de crucifères.

Les résultats sont rapportés en micromoles par gramme de graines séchées à l'air, en tant que moyennes de doubles déterminations et indication de l'écart entre la plus grande et la plus petite valeur de la double détermination ».