386R2435

1.8.86 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* N:o L 210/55

KOMISSION ASETUS (ETY) N:o 2435/86,

annettu 29 päivänä heinäkuuta 1986,

öljysiementen näytteiden otosta ja esikäsittelystä sekä öljy-, epäpuhtaus- ja kosteuspitoisuuden määrittämisestä annetun asetuksen (ETY) N:o 1470/68 muuttamisesta

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon rasva-alan yhteisestä markkinajärjestelystä 22 päivänä syyskuuta 1966 annetun neuvoston asetuksen N:o 136/66/ETY [1], sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 1454/86 [2], ja erityisesti sen 24 a artiklan,

sekä katsoo, että

komission asetuksen (ETY) N:o 1470/68 [3], sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 3519/84 [4], peräkkäisten muutosten johdosta kyseisen asetuksen otsikko vastaa ainoastaan osittain sen sisältöä; sen vuoksi otsikkoa olisi muutettava,

rapsin ja rypsin nimitys "00-lajike" on riippuvainen niiden glukosinolaattipitoisuudesta; olisi säädettävä soveltuvasta menetelmästä tämän pitoisuuden määrittämiseksi,

öljysiementen interventiota koskevista yksityiskohtaisista säännöistä 11 päivänä heinäkuuta 1967 annetun komission asetuksen N:o 282/67/ETY [5], sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 2436/86 [6], sekä öljysiementen tukijärjestelmän soveltamista koskevista yksityiskohtaisista säännöistä 21 päivänä syyskuuta 1983 annetun komission asetuksen (ETY) N:o 2681/83 [7], sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 2434/86 [8], soveltamiseksi on syytä määritellä yhteisölle yhteinen menetelmä glukosinolaattipitoisuuden määrittämiseksi, ja

tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat rasvojen hallintokomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetus (ETY) N:o 1470/68 seuraavasti.

1) Korvataan otsikko seuraavasti:

"Öljysiementen näytteiden otosta ja esikäsittelystä sekä määritysmenetelmistä".

2) Lisätään 2 c artikla:

"*2 c artikla*

Asetuksen N:o 282/67/ETY 4 artiklassa ja asetuksen (ETY) N:o 2681/83 32 artiklassa tarkoitettu glukosinolaattipitoisuuden määritys on tehtävä liitteessä VIII määritellyn menetelmän mukaisesti, sanotun kuitenkaan rajoittamatta mainituissa artikloissa tarkoitettujen siirtymäsäännösten soveltamista."

3) Lisätään tämän asetuksen liite liitteeksi VIII.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan päivänä, jona se julkaistaan *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä.*

Sitä sovelletaan 1 päivästä heinäkuuta 1986.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 29 päivänä heinäkuuta 1986.

Komission puolesta

Frans ANDRIESSEN

Varapuheenjohtaja

---

(1) EYVL N:o 172, 30.9.1966, s. 3025/66
(2) EYVL N:o L 133, 21.5.1986, s. 8
(3) EYVL N:o L 239, 28.9.1968, s. 2
(4) EYVL N:o L 328, 15.12.1984, s. 12
(5) EYVL N:o L 151, 13.7.1967, s. 1
(6) EYVL N:o L 210, 1.8.1986, s. 61
(7) EYVL N:o L 266, 28.9.1983, s. 1
(8) EYVL N:o L 210, 1.8.1986, s. 51

LIITE

"LIITE VIII

RAPSI JA RYPSI

Glukosinolaattien pitoisuusmääritys

1. PÄÄMÄÄRÄ

Tämä menetelmä on suunniteltu rapsin ja rypsin pääasiallisten glukosinolaattien koostumuksen ja pitoisuuden määrittämiseksi.

2. PERIAATE

2.1 Glukosinolaattien, joista sulfaatit on entsymaattisesti poistettu, trimetyylisilyylijohdannaisten määritys kaasukromatografisesti lämpötilaohjelmoinnin avulla ja käyttäen sinigriiniä sisäisenä standardina.

2.2 Menetelmällä on mahdollista määrittää kvantitatiivisesti, mikromooleina grammaa ilmassa kuivattuja siemeniä kohden, kuusi merkittävää rapsin ja rypsin sisältämää glukosinolaattia ja kaksi sinapin siementen sisältämää glukosinolaattia, jotka voivat olla epäpuhtauksina öljysiemenissä.

3. PÄÄASIALLISET REAGENSSIT

3.1 DEAE Sephadex A-25.

3.2 SP Sephadex C-25.

3.3 Sulfataasi tyyppiä H-1.

3.4 Allyyliglukosinolaatti (Sinigrin).

3.5 Bariumasetaatti.

3.6 Lyijyasetaatti.

3.7 Pyridiini (silylointilaatua).

3.8 N-metyyli-N-trimetyylisilyyliheptafluoributyramidi (MSHFBA).

3.9 Trimetyylikloorisilaani (TMCS).

3.10 1-Metyyli-imidatsoli.

4. PÄÄASIALLINEN VÄLINEISTÖ

4.1 Ruotsalaisia uuttoputkia, 70 ml, ruostumatonta terästä, sisähalkaisija 18 mm, 17 mm kuulalaakeri, fluorisilikonikuminen tulppa n:o 3 ja vaakatasossa ravistelija (Troeng 1955) tai vastaava teräskuularavistelija.

4.2 Suurinopeuksinen kahvimylly.

4.3 Paineilmauuni.

4.4 Kaasukromatografi ohjelmoitavalla lämpötilasäädöllä ja liekki-ionisaatiodetektori.

4.5 Lasikolonni kaasukromatografiaa varten: pituus noin 2 metriä, sisähalkaisija 2 mm, täytettynä hiukkaskooltaan 80–100 meshin piimaalla olevalla 2 % OV07:llä.

5. ESIKÄSITTELY

5.1 **DEAE Sephadex A-25-asetaatin ja pyridiiniasetaatin valmistus**

Punnitaan 10 g DEAE Sephadex A-25 250 ml:n dekantterilasiin, lisätään 150 ml vettä ja annetaan Sephadexin turvota yön yli. Kaadetaan Sephadex kooltaan 20 × 400 mm kolonniin.

Kaadetaan *500* ml 0,5 N natriumhydroksidia (10 g liuotettuna veteen ja täytettynä *500* ml:ksi) kolonniin. Pestään kolonni 250 ml:lla vettä natriumhydroksidin ylimäärän poistamiseksi valvoen, että pH saadaan neutraaliksi.

Otetaan kymmenesosa asetaatiksi muutettavaa Sephadexia; lietetään veteen ja kaadetaan kooltaan 15 × 200 mm kolonniin. Kaadetaan 100 ml 0,5 M etikkahappoa (2,9 ml jäätikkaa täytettynä 100 ml:ksi) kolonniin. Pestään 250 ml:lla vettä. Kaadetaan tämä kaikki vettä sisältävään 250 ml:n pulloon varastointia varten.

Kaadetaan jäljellä olevat yhdeksän kymmenesosaa Sephadexia kolonniin veden kanssa. Kaadetaan 400 ml 0,5 M pyridiiniasetaattia (19,8 ml pyridiiniä plus 15 ml jäätikkaa täytettynä vedellä 500 ml:ksi) kolonniin. pestään 250 ml:lla vettä. Kaadetaan tämä kaikki vettä sisältävään 250 ml:n pulloon varastointia varten.

5.2 **Natrium-muotoisen SP Sephadex C-25 valmistus**

Punnitaan 1 g SP Sephadex C-25 100 ml:n dekantterilasiin, lisätään 75 ml vettä ja annetaan Sephadexin turvota yön yli. Kaadetaan Sephadex kooltaan 15 × 200 mm kolonniin ja pestään 250 ml:lla vettä. Kaadetaan tämä kaikki 250 ml:n pulloon, joka sisältää vettä, varastointia varten.

5.3 **Sulfataasin puhdistus**

Punnitaan 70 mg sulfataasin tyyppiä H-1 kooltaan 16 × 150 mm koeputkeen. Lisätään 3 ml vettä sulfataasin liuottamiseksi ja laimennetaan yhtä suurella tilavuusmäärällä etanolia. Sentrifugoidaan 10 minuuttia kiihtyvyydellä 2 000 × g. Dekantoidaan kelluva faasi toiseen putkeen ja heitetään sakka pois. Kelluvaan faasiin lisätään 9 ml etanolia ja sentrifugoidaan uudelleen 10 minuutin ajan kiihtyvyydellä 2 000 × g. Heitetään kelluva faasi pois ja liuotetaan sakka 2 ml:aan vettä.

Laitetaan pieni tulppa lasivillaa kummankin pipetin kärkeen.

Toiseen pipettiin lisätään 100 mikrolitraa DEAE Sephadex A-25-asetaatin kelluvaa vesikerrosta. Tähän lisätään yhtä suuri tilavuusmäärä DEAE Sephadex A-25asetaattia, jotta saadaan korkeudeltaan 15 mm kolonni, joka vastaa 20 mg kuivaa Sephadexia.

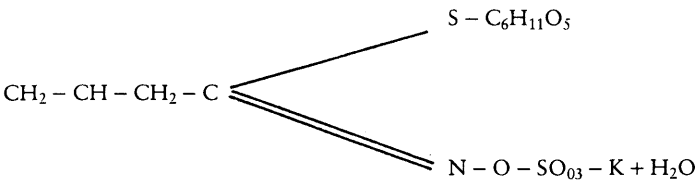
Toiseen pipettiin lisätään 100 mikrolitraa SP Sephadex C-25:n natrium-muotoista kelluvaa vesifaasia. Tähän lisätään sitten yhtä suuri tilavuusmäärä SP Sephadex C-25:n natrium-muotoa, jotta saadaan samanlainen kolonni.

Kaadetaan ensin entsymaattinen vesiliuos kolonniin, joka sisältää DEAE Sephadex A-25 -asetaattia, sitten kolonniin, joka sisältää SP Sephadex C-25:n natriummuotoa.

Sulfataasiliuosta käytetään laimentamattomana pipetinkärkikolonneissa. Varastoidaan eluaatti −20 °C:ssa ja sulatetaan välittömästi ennen käyttöä.

5.4 **Sisäisen standardin valmistus**

Allyyliglukosinolaatti (kaliumsuolan monohydraatti)



Poids moléculaire = Moolimassat:

C	10	x 12,011	=	120,110
H	18	x 1,008	=	18,144
N	1	x 14,008	=	14,008
S	2	x 32,006	=	64,132
O	10	x 16,000	=	160,000
K	1	x 39,100	=	39,100
				415,494

Punnitaan 41,5 mg ja täytetään 100 ml:ksi 1 mikromoolin valmistamiseksi liuosmillilitraa kohden.

5.5 **OV-7 -kolonnin valmistelu kaasukromatografiaa varten**

Ensin pestään lasikolonnin (ulkohalkaisijaltaan 4" × 0,25" ja sisähalkaisijaltaan 2 mm) sisäpinta kiinnittämällä kolonnin toiseen päähän kumiletku yhdistettynä vesiimulaitteeseen, jotta saadaan heikko imu päälle. Imetään kolonnin läpi 100 ml kloroformia, 100 ml asetonia ja sitten 100 ml petrolieetteriä (kiehumispiste: 30–60 °C). Imetään ilmaa kolonnin läpi sen kuivaamiseksi, sen jälkeen kuivataan paineilmauunissa. Suljetaan toinen pää lasivillalla. Kohdistetaan imu tähän päähän kolonnia tyhjöpumpun avulla. Lisätään kolonnin toiseen päähän lyhyen tygonletkun avulla kiinnitetyn pienen suppilon läpi kolonnin täyte, hiukkaskooltaan 80–100 meshin piimaa-CLQ:lla olevalla 2 % OV-7:llä. Taputellaan kolonnia kevyesti täytteen valumisen helpottamiseksi kierukoiden ympäri, kunnes täyte on jakautunut täydellisesti ja tasaisesti. Irrotetaan suppilo ja tygonletku. Poistetaan Pasteurpipetillä ja kumipumpetilla ainetta riittävästi, jotta pää saadaan suljettua lasivillalla.

Liitetään kolonni kaasukromatografin injektioventtiiliin käyttäen ruostumattomasta teräksestä valmistettua mutteria, takarengasta taakse asennettuna ja grafiittirengasta. Annetaan kantajakaasun (helium) kulkea kolonnin läpi ja nostetaan lämpötilaa 100 °C:sta 290 °C:seen nopeudella 1 °C minuutissa ja pidetään tässä lämpötilassa yön yli. Jäähdytetään uuni ja kiinnitetään kolonni detektoriin käyttäen ruostumattomasta teräksestä valmistettua mutteria, takarengasta ja grafiittista eturengasta.

Säädetään injektorin lämpötilaksi 250 °C ja detektorin lämpötilaksi 300°C, kolonnin lämpötilaksi 200 °C, helium-kantajakaasun virtausnopeudeksi 40 ml/min, vedyn virtausnopeudeksi 50 ml/min ja ilman virtausnopeudeksi 500 ml/min (detektorin optimaaliset toimintaolosuhteet), asteikoksi 1 ja vaimennukseksi 64.

6. MENETTELY

6.1 **Näytteiden esikäsittely**

Siementen näytteenotto ja laboratorionäytteiden esikäsittely määritettäviksi näytteiksi suoritetaan asetuksen (ETY) N:o 1470/68 liitteissä I ja II kuvattujen menettelyjen mukaisesti, tässä järjestyksessä.

Siementen standardinäyte on määritettävä vähintään kerran näytteiden erää kohden. Tiedot standardinäytteen määrityksistä ovat hyödyllisiä menetelmän tarkkuuden ja luotettavuuden valvomiseksi.

Jos siemennäyte on kostea, kuivataan sitä 20 g paineilmauunissa yön yli lämpötilassa 45 °C, jotta saadaan kosteudeksi 7 %.

Jauhetaan 20 g kuivattuja siemeniä kahvimyllyssä. Uutetaan 3 grammasta jauhettuja siemeniä saatu öljy 40 ml:lla petrolieetteriä (kiehumispiste 30–60 °C) tai n-heksaania ruotsalaisessa putkessa, joka sisältää kolme teräskuulaa, ja suljettuna fluorisilikonitulpalla. Ravistellaan vaakatasossa mekaanisessa ravistelijassa 45 minuuttia. Suodatetaan imulla Whatman n:o 1 suodatinpaperin läpi kartiomaiseen suppiloon ja pestään kaksi kertaa tuoreella liuottimella. Kuivataan jauhonäyte ilmassa vetokaapissa yön yli. Kuivatusta tuotteesta rikotaan kaikki mahdolliset paakut käyttämällä 280 mikrometrin seulan läpi. Yli 90 % näytteestä on läpäistävä seula.

6.2 **Myrosinaasin inaktivointi ja glukosinolaattien uutto**

Punnitaan jauhoa (100 mg) koeputkeen. Kuumennetaan putkea näytteineen kiehuvassa vesihauteessa (yli 95 °C). Kaksi minuuttia myöhemmin lisätään kiehuvaa vettä (1 ml). Edelleen kaksi minuuttia myöhemmin lisätään sisäinen standardi (1 ml) (allyyliglukosinolaatti). Sisäisen standardin pitoisuus riippuu näytteen arvioidusta glukosinolaattien pitoisuudesta jäljempänä olevan taulukon mukaisesti. Jatketaan kuumennusta yli 95 °C:ssa 15 minuuttia.

Toisen kokeen aikana sisäistä standardia ei lisätä alkuperäisen näytteen allyyliglukosinolaattipitoisuuden määrittämiseksi.

Jäähdytetään liuos ja lisätään 100 mikrolitraa liuosta, joka sisältää 0,5 mol sekä bariumasetaattia että lyijyasetaattia vesilitraa kohden ja sekoitetaan. Sentrifugoidaan kiihtyvyydellä 2 000 × g. Säilytetään kelluva faasi.

Glukosinolaattien pitoisuus (mikromoolia/g siemeniä)	Sisäisen standardin pitoisuus (mikromoolia/ml)	Sephadexiin käytettävän uutteen määrä (ml)
pienempi kuin 15	1	1,0
15–40	2	0,5
suurempi kuin 40	3	0,2

6.3 **DEAE – Sephadex A-25 -pienoiskolonnien valmistus**

Sopivien kolonnien valmistamiseksi on mahdollista käyttää joko 1 ml muovipipettien kärkiä tai vaihtoehtoisesti lyhennettyjä pasteurpipettejä. Asetetaan pieni lasivillatuppo "pienoiskolonnin" pohjaan ja pestään vedellä (1 ml). Lisätään DEAE Sephadex A-25 -suspensiota (pyridiiniasetaatin muodossa) määrä, joka vastaa 20 mg Sephadexia (kuivapaino). Helpoin keino tämän saavuttamiseksi on lisätä ennalta määrätty tilavuusmäärä suspensiota (hyvin sekoitettuna). Annetaan geelin laskeutua ja pestään vedellä.

Kaadetaan kolonniin barium/lyijy -käsittelystä saatu kelluva faasi. Annetaan valua ja pestään kolonni 1 ml:lla vettä, sitten 1 ml:lla pyridiiniasetaattia (0,02 M). Annetaan valua ja lisätään sitten kolonniin 50 mikrolitraa puhdistettua sulfataasiliuosta, sen jälkeen annetaan seistä huoneenlämmössä yön yli. Eluoidaan desulfoglukosinolaatit vedellä (3 × 0,5 ml).

6.4 **Desulfoglukosinolaattien johdannaisten tekeminen**

Valmistetaan silyloiva reagenssi sekoittamalla MSHFBA (100 mikrolitraa), TMCS (10 mikrolitraa) ja laimennettu 1-metyyli-imidatsoli (50 mikrolitraa). Laimennettu 1-metyyli-imidatsoli valmistetaan 1-metyyli-imidatsolista (50 mikrolitraa) ja asetonista (950 mikrolitraa).

Kuivataan desulfoglukosinolaattieluuatista näyte pienessä pullossa, joka voidaan sulkea tiiviisti. Pieniä määriä (5–10 mikrolitraa) voidaan kuivata kuumentamalla 120 °C:ssa 10 minuuttia. On myös mahdollista kuivata tyhjöeksikaattorissa P_2O_5:n avulla. Kuivattuun näytteeseen lisätään yhtä suuri tilavuusmäärä silyloivaa reagenssia ja suljetaan pullo tiiviisti. Kuumennetaan tätä 120 °C:ssa (5 minuuttia), jotta johdannaisprosessi saadaan loppuun.

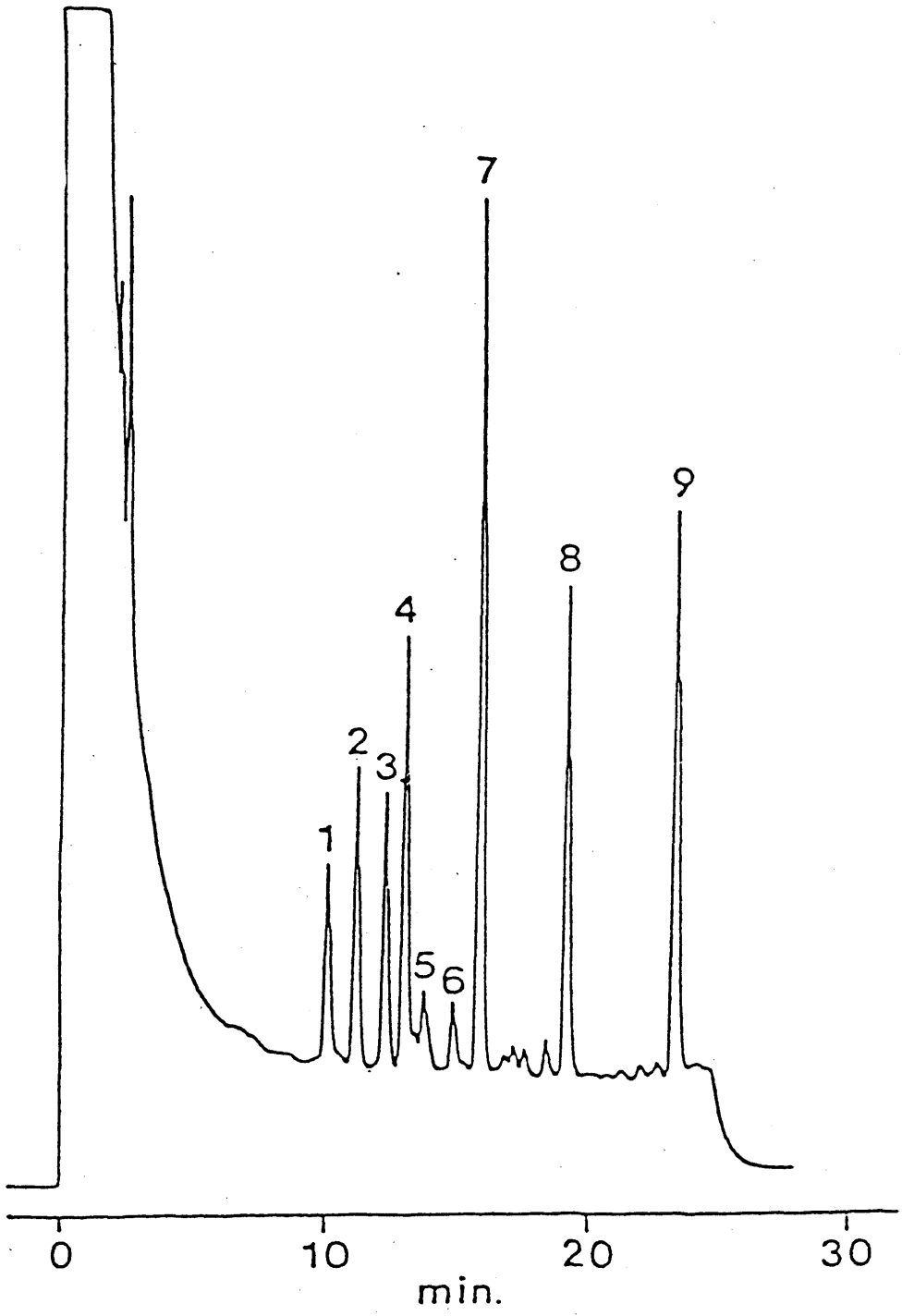
6.5 **Johdettujen desulfoglukosinolaattien erottaminen kaasukromatografisesti**

Injektoidaan 2 mikrolitraa OV-7-kolonniin ja ylläpidetään lämpötila 200 °C:ssa 5 minuutin ajan, nostetaan se sitten 280 °C:seen ohjelmoiden lämpötilan nousuksi 5 °C minuutissa. Ylläpidetään tätä loppulämpötilaa 15 minuutin ajan.

Kerätään seuraavien glukosinolaattipiikkien pinta-alat:

3-butenyyliglukosinolaatti, 4-pentenyyliglukosinolaatti, 2-hydroksi-3-butenyyliglukosinolaatti, 2-hydroksi-4-pentenyyliglukosinolaatti, indolyyli-3-metyyliglukosinolaatti, 4-OH-indolyyli-3-metyyliglukosinolaatti ja tarvittaessa: allyyliglukosinolaatti, 4-hydroksibentsyyliglukosinolaatti.

Kun määritetään näytteitä, jotka sisältävät laajan valikoiman glukosinolaatteja tai kun määritys aloitetaan useamman tunnin kestäneen tauon jälkeen, voi olla tarpeen toistaa näytteen injektointeja, kunnes saadaan vakiona pysyviä tuloksia.



Desulfoglukosinolaattijohdannaisten erottaminen kaasukromatografisesti ohjelmoidulla lämpötilasäädöllä.

(1) allyyli-,
(2) 3-butenyyli-,
(3) 4-pentenyyli-,
(4) 2-hydroksi-3-butenyyli-,
(5) 2-hydroksi-4-pentenyyli-,
(6) sakkaroosi,
(7) bentsyyli-,
(8) 4-hydroksi-bentsyyli-,
(9) 4-hydroksi-indolyyli-3-metyyli-.

6.6 **Tulosten laskeminen**

Ensimmäisenä tehtävänä on määrittää tarvittaessa allyyliglukosinolaatti-alueen pinta-ala, joka liittyy mahdolliseen kontaminaatioon.

Määrityksestä, johon ei ole lisätty sisäistä standardia, saadun allyyliglukosinolaatteja vastaavan alueen pinta-ala normalisoidaan käyttäen molemmista määrityksistä, sisäinen standardi lisättynä ja ilman sitä, saatua 2-hydroksi-3-butenyyliglukosinolaattia vastaavien alueiden pinta-alaa:

$$\text{allyyliglukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala (ilman sisäistä standardia)} \times \frac{\text{2-OH-3-butenyyliglukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala (sisäinen standardi lisättynä)}}{\text{2-OH-3-butenyyliglukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala (ilman sisäistä standardia)}} = \text{Kontaminaatiosta johtuvan allyyliglukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala}$$

Toisena tehtävänä on laskea sisäiseen standardiin liittyvän allyyliglukosinolaattia vastaavan alueen pinta-ala. Edellinen tulos vähennetään määrityksestä, johon on lisätty sisäistä standardia, saadun allyyliglukosinolaattialueen kokonaispinta-alasta:

$$\text{Allyyliglukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala (sisäinen standardi lisätty)} - \text{Kontaminaatiosta johtuvan allyyliglukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala} = \text{Sisäisen standardin lisäämiseen liittyvän allyyliglukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala}$$

Eri glukosinolaatti-TMS-johdannaisalueiden pinta-alat, jotka on saatu määrityksestä sisäinen standardi lisättynä, jaetaan kukin peräkkäin sisäisenä standardina lisättyyn allyyliglukosinolaattiin liittyvän alueen pinta-alalla, kerrottuna sitten mikromooleina lisättyä allyyliglukosinolaattia grammaa jauhoa kohden, joka on kuivattu ilmassa ja josta öljy on poistettu, tällöin saadaan mikromoolia glukosinolaattia grammaa kohden jauhoa, joka on kuivattu ilmassa ja josta on poistettu öljy:

$$\frac{\text{Glukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala}}{\text{Sisäisen standardin lisäyksestä johtuvan allyyliglukosinolaatti-TMS-alueen pinta-ala}} \times \frac{\text{Mikromoolia allyyliglukosinolaattia}}{\text{grammaa jauhoa, joka onkuivattu ilmassa ja josta on poistettu öljy}} = \frac{\text{Mikromoolia glukosinolaattia}}{\text{grammaa jauhoa, joka on kuivattu ilmassa ja josta on poistettu öljy}}$$

Suhteessa ilmassa kuivattujen siementen tuloksiin:

$$\frac{\text{Mikromoolia glukosinolaattia}}{\text{grammaa jauhoa, joka on kuivattu ilmassa ja josta on poistettu öljy}} \times \frac{100 - \%\ \text{öljyä}}{100} = \frac{\text{Mikromoolia glukosinolaattia}}{\text{grammaa ilmassa kuivattuja siemeniä}}$$

7. TULOSTEN ILMAISEMINEN

3-butenyyli-, 4-pentenyyli-, 2-hydroksi-3-butenyyli-, 2-hydroksi-4-pentenyyli-, Indolyyli-3-metyyli-, 4-OH-indolyyli-3-metyyli- glukosinolaattien määrät lasketaan yhteen ja ilmoitetaan yhdessä. Allyyli- ja 4-hydroksibentsyyliglukosinolaatit ilmoitetaan esiintyessään erikseen osoituksena sinapin tai muiden ristikukkaisten siementen kontaminaatiosta.

Tulokset ilmoitetaan mikromooleina grammaa ilmassa kuivattuja siemeniä kohden, kahden määrityksen keskiarvona ja ilmoittamalla kahden määrityksen suurimman ja pienimmän arvon välinen ero."