386R2435

1.8.86 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 210/55

# KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EEG) nr 2435/86

## av den 29 juli 1986

## om ändring av förordning (EEG) nr 1470/68 om provtagning och minskning av prover och bestämning av oljehalt, orenheter och vattenhalt i oljeväxtfrö

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning nr 136/66/EEG av den 22 september 1966 om den gemensamma organisationen av marknaden för oljor och fetter [1], senast ändrad genom förordning (EEG) nr 1454/86 [2], särskilt artikel 24a i denna, och

med beaktande av följande:

Som en följd av successiva ändringar av kommissionens förordning (EEG) nr 1470/68 [3], senast ändrad genom förordning (EEG) nr 3519/84 [4], anges i rubriken i nämnda förordning endast delvis dess innehåll. Dess benämning bör därför anpassas.

Uttrycket "dubbellågt", när den används som beteckning för frö av raps och rybs, beror på halten av glukosinolater i fröet. En lämplig metod för att bestämma denna halt bör fastställas.

I enlighet med kommissionens förordning nr 282/67/EEG av den 11 juli 1967 om närmare bestämmelser för intervention för oljeväxtfrö [5], senast ändrad genom förordning (EEG) nr 2436/86 [6] och kommissionens förordning (EEG) nr 2681/83 av den 21 september 1983 om tillämpningsföreskrifter för stödsystemet för oljeväxtfrö [7], senast ändrad genom förordning (EEG) nr 2434/86 [8], bör en enda gemenskapsmetod fastställas för att bestämma glukosinolathalterna.

De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från Förvaltningskommittén för oljor och fetter.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

*Artikel 1*

Förordning (EEG) nr 1470/68 ändras på följande sätt:

1. Rubriken skall ersättas med följande:

   "om provtagning och minskning av prover och om analysmetoder i fråga om oljeväxtfrö".

2. Följande artikel 2c skall införas:

   "*Artikel 2c*

   Bestämning av glukosinolathalten enligt artikel 4 i förordning nr 282/67/EEG och artikel 32 i förordning (EEG) nr 2681/83 skall utföras med användning av den metod som anges i bilaga 8 till denna, utan att det påverkar de övergångbestämmelser som föreskrivs i de nämnda artiklarna."

3. Bilagan till denna förordning skall läggas till som bilaga 8.

*Artikel 2*

Denna förordning träder i kraft samma dag som den offentliggörs i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

Den skall tillämpas från och med den 1 juli 1986.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 29 juli 1986.

*På kommissionens vägnar*
Frans ANDRIESSEN
*Vice ordförande*

---

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

*BILAGA*

*"BILAGA 8*

## RYBS- OCH RAPSFRÖ

### Bestämning av innehåll av glukosinolater

1. SYFTE

Denna metod används vid bestämning av innehåll och sammansättning av de viktigaste glukosinolaterna i rybs- och rapsfrö.

2. PRINCIP

2.1 Mätning av trimetylsilylderivat av enzymatiskt avsvavlade glukosinolater medelst temperaturreglerad gaskromatografi med användande av sinigrin som inre standard.

2.2 Metoden anger mängderna, i mikromol per gram av lufttorkat frö, av sex viktiga glukosinolater som återfinns i rybs- och rapsfrö och två glukosinolater som återfinns i senapsfrö som kan vara en orenhet.

3. HUVUDREAGENSER

3.1 DEAE Sephadex A-25

3.2 SP Sephadex C-25

3.3 Sulfatas typ H-1

3.4 Allylglukosinolat (Sinigrin)

3.5 Bariumacetat

3.6 Blyacetat

3.7 Pyridin (Silueringskvalitet)

3.8 N-metyl-N-trimetylsilylheptafluorbutyramid (MSHFBA)

3.9 Trimetylklorsilan (TMCS)

3.10 1-metylimidazol

4. HUVUDUTRUSTNING

4.1 70-ml svenskt extraktionsrör, av rostfritt stål, med hals med innerdiameter 18 mm, 17 mm kullager, nr 3 gummiproppar av fluorkisel och horisontalblandare (Troeng 1955) eller en likvärdig stålkuleskakare.

4.2 Snabbgående kaffekvarn.

4.3 Ugn med forcerat drag.

4.4 Gaskromatograf med temperaturreglering och flamjoniseringsdetektor.

4.5 Gaskromatografikolonn av glas, längd ca 2 meter, inre diameter 2 mm, fylld med 2 % OV-07 på en bädd av diatomit CLQ 80–100.

5. BEREDNING

5.1 **Beredning av DEAE Sephadex A-25 i acetat- och pyridinacetatform**

Väg upp 10 g DEAE Sephadex A-25 i en 250 ml bägare, tillsätt 150 ml vatten och låt Sephadexblandningen svälla över natten. Slamma Sephadexblandningen i en kolonn (20 x 400 mm).

Häll 500 ml 0,5 N natriumhydroxid (10 g löst i vatten och spätt till 500 ml) genom kolonnen. Tvätta kolonnen med 250 ml vatten för att ta bort överskottet av natriumhydroxid och kontrollera att pH-värdet gått ner till neutralt värde.

Ta bort en tiondel av den Sephadexlösning som skall omvandlas till acetatform. Häll i vatten och häll i en kolonn som är 15 x 200 mm. Häll 100 ml 0,5 M ättikssyra (2,9 ml isättika spätt till 100 ml) genom kolonnen. Tvätta med 250 ml vatten. Häll slammet i en 250 ml mätkolv med vatten och förvara.

Låt de återstående nio tiondelarna Sephadex klarna i en kolonn med vatten. Häll 400 ml 0,5 M pyridinacetat (19,8 ml pyridin plus 15 ml isättika spätt till 500 ml med vatten) genom kolonnen. Tvätta med 250 ml vatten. Häll slammet i en 250 ml mätkolv med vatten och förvara.

5.2 **Beredning av SP Sephadex C-25 i natriumform**

Väg upp 1 g SP Sephadex C-25 i en 100 ml bägare, tillsätt 75 ml vatten och låt lösningen svälla under natten. Slamma Sephadexen i en 15 × 200 mm kolonn och tvätta med 250 ml vatten. Häll slammet i en 250 ml mätkolv med vatten och förvara.

5.3 **Rening av sulfatas**

Väg upp 70 mg sulfatas typ H-1 i ett 16 × 150 mm provrör. Häll i 3 ml vatten för att lösa sulfatasmassan och späd ut med samma mängd etanol. Centrifugera under 10 minuter vid 2 000 × g. Häll över supernatanten i ett andra provrör och kasta fällningen. Häll 9 ml etanol i samma provrör och certrifugera åter i 10 minuter vid 2 000 × g. Kasta supernatanten och lös upp fällningen i 2 ml vatten.

Sätt en liten kork av glasull i toppen på två pipetter.

Tillsätt i den ena pipetten 100 mikroliter av vattenskiktet ovanpå SP Sephadex A-25 i acetatform. Tillsätt sedan en mängd av den beredda SP Sephadex A-25 i acetatform för att bilda en 15 mm hög kolonn, vilket motsvarar 20 mg torr Sephadex.

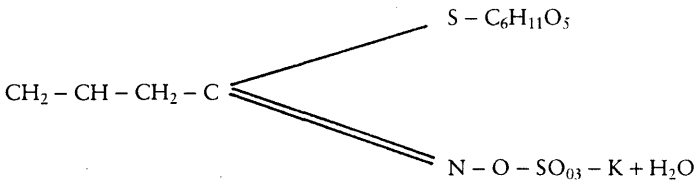
Tillsätt i den andra pipetten 100 mikroliter av vattenskiktet ovanpå SP Sephadex C-25 i natriumform. Tillsätt sedan en mängd av den beredda SP Sephadex C-25 i natriumform för att bilda en likadan kolonn.

Låt först den vattenhaltiga enzymlösningen passera genom kolonnen med DEAE Sephadex A-25 i acetatform och sedan genom kolonnen med SP Sephadex C-25 i natriumform.

Sulfatlösningen skall användas outspädd på pipettoppkolonner. Förvara eluaten vid – 20 °C och tina strax före användning.

5.4 **Beredning av inre standard**

Allylglukosinolat (monohydrat av kaliumsalt)




Molekylvikt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 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 |

För att bereda 1 mikromol per ml lösning väg upp 41,5 mg och späd till 100 ml.

5.5 **Beredning av OV-7 gaskromatografikolonn**

Tvätta först den inre ytan av en 4" × 0,25" OD" 2 mm ID glaskolonn genom att medelst en gummislang och med lågt vakuum fästa kolonnens ena ända på en vattensugapparat. Pumpa 100 ml kloroform, 100 ml aceton och sedan 100 ml petroleumeter (bp 30–60 °C) genom kolonnen. Pumpa igenom luft för att torka och torka sedan i en ugn med forcerad ventilation. Täpp igen ena ändan med glasull. Använd sugkraft i denna ända av kolonnen med hjälp av en vakuumledning. För in kolonnfyllning bestående av 2 % OV-7 på Diatomite CLQ 80-100 nät genom en smal tratt som är fastsatt vid kolonnens andra ände med ett kort tygonrör. Knacka lätt på kolonnen för att fyllnadsmaterialet lättare skall flyta runt rullarna tills det är helt och jämt packat. Ta bort tratten och tygonröret. Blås ut tillräckligt fyllnadsmaterial med en pasteurpipett och gummiboll så att glasullsproppen inte täcks.

Sätt fast kolonnen vid insprutningsdelen av gaskromatografen med en rostfri skruv, ett bakre beslag fastsatt bakvänt och ett grafitbeslag. Släpp bärargas (helium) genom kolonnen och öka temperaturen programenligt från 100 °C med 1 °C per minut till 290 °C. Låt stå vid denna temperatur över natten. Låt ugnen svalna och fäst kolonnen vid detektorn med rostfri skruv, bakre beslag samt frambeslag av grafit.

Ställ insprutningstemperaturen på 250 °C, detektortemperaturen på 300 °C och kolonntemperaturen på 200 °C, strömningshastigheten för bärargasen på 40 ml per minut och för kväve och luft på 50 respektive 500 ml per minut för att få den högsta detektorreaktionen, vanationsvidd vid 1 och dämpning vid 64.

## 6. UTFÖRANDE

### 6.1 Beredning av prover

Uttagning av fröprover och minskning av laboratorieprover till analysprover skall utföras enligt de förfaranden som beskrivs i bilaga 1 respektive 2 till förordning (EEG) nr 1470/68.

Ett standardfröprov bör analyseras minst en gång för varje provparti. Analysresultaten är användbart för att kontrollera metodens precision och riktighet.

Om fröprovet är fuktigt torkas 20 g i en ugn med luftventilation över natten vid 45 °C för att erhålla 7 % vattenhalt.

Mal 20 g torkat frö i en kaffekvarn. Extrahera olja från 3 g malt frö med 40 ml petroleumeter (bp 30–60 °C) eller n-hexan i ett svenskt rör som innehåller tre stålkulor och som är tillsluten med en propp av fluorsilikon. Skaka röret horisontalt i en mekanisk skakapparat i 45 minuter. Filtrera under vakuum genom Whatman nr 1-papper i en konisk tratt och tvätta två gånger med färskt lösningsmedel. Lufttorka fröprovet i ett dragskåp över natten. Bryt upp eventuella klumpar när det är torrt genom att sikta genom ett 280 mikrometer sikt. Mer än 90 % av provet skall passera igenom sikten.

### 6.2 Inaktivering av myrosin och extraktion av glukosinolater

Väg upp mjöl (100 mg) i ett provrör. Värm röret och provet i ett kokande vattenbad (95 °C). Tillsätt kokande vatten (1 ml) efter två minuter. Tillsätt 1 ml inre standard (allylglukosinolat) efter ytterligare två minuter. Koncentrationen av den interna standarden beror på provets uppskattade halt av glukosinolater enligt vad som anges i tabellen nedan. Fortsätt värma vid 95 °C under 15 minuter.

I en andra provanalys tillsätts inte den interna standarden för att bestämma glukosinolathalten i ursprungsprovet.

Kyl lösningen och tillsätt 100 mikroliter av en lösning som innehåller 0,5 ml bariumsalt och blysalt per liter vatten och blanda. Centrifugera vid 2 000 × g. Spara fällningen.

| Innehåll av glukosinolater (mikromol/g av frö) | Koncentration av inre standard (mikromol/ml) | Mängd av extrakt att tillsättas Sephadex (ml) |
|---|---|---|
| < 15 | 1 | 1,0 |
| 15–40 | 2 | 0,5 |
| > 40 | 3 | 0,2 |

### 6.3 Beredning av DEAE – Sephadex A-25 minikolonner

Lämpliga kolonner kan förberedas av 1 ml pipettoppar av plast eller alternativt avkortade pasteurpipetter. Placera en liten propp av glasull i botten på "minikolonnen" och tvätta med vatten (1 ml). Tillsätt en suspension av DEAE Sephadex A-25 (pyridinacetat form) lika med 20 mg torrsubstans av Sephadex. Detta uppnås enklast genom tillsats av en förutbestämd mängd av en suspension (välblandad). Låt gelen sätta sig och tvätta med vatten.

Tillsätt supernanten från behandlingen med barium och bly till kolonnen. Låt den torka opch tvätta kolonnen med 1 ml vatten följt av 1 ml pyridinacetat (0,02 M). Låt den rinna av och tillsätt sedan 50 mikroliter renad sulfatlösning till kolonnen och låt den stå i rumstemperatur över natten. Eludera desulfoglukosinolaterna med vatten (3 × 0,5 ml).

### 6.4 Derivatisering av desulfoglukosinolater

Bered silyleringsreagenserna genom att blanda MSHFBA (100 mikroliter), TMCS (10 mikroliter) och utspädd 1-metylimidazol (50 mikroliter). Den utspädda 1-metylimidazolvätskan behandlas med 1metylimidazol (50 mikroliter) och aceton (950 mikroliter).

Torka ett prov av eluerat desulfoglukosinolat i en liten mätkolv som kan tillslutas ordentligt. Mindre mängder (5–10 mikroliter) kan torkas genom värmning vid 120 °C under 10 minuter. En annan möjlighet är att torka i en vakuumtork över $P_2O_5$. Tillsätt en likvärdig mängd av silyleringsreagens till det torkade provet och tillslut mätkolven. Värm mätkolven vid 120 °C (5 minuter) för att avsluta derivatiseringen.

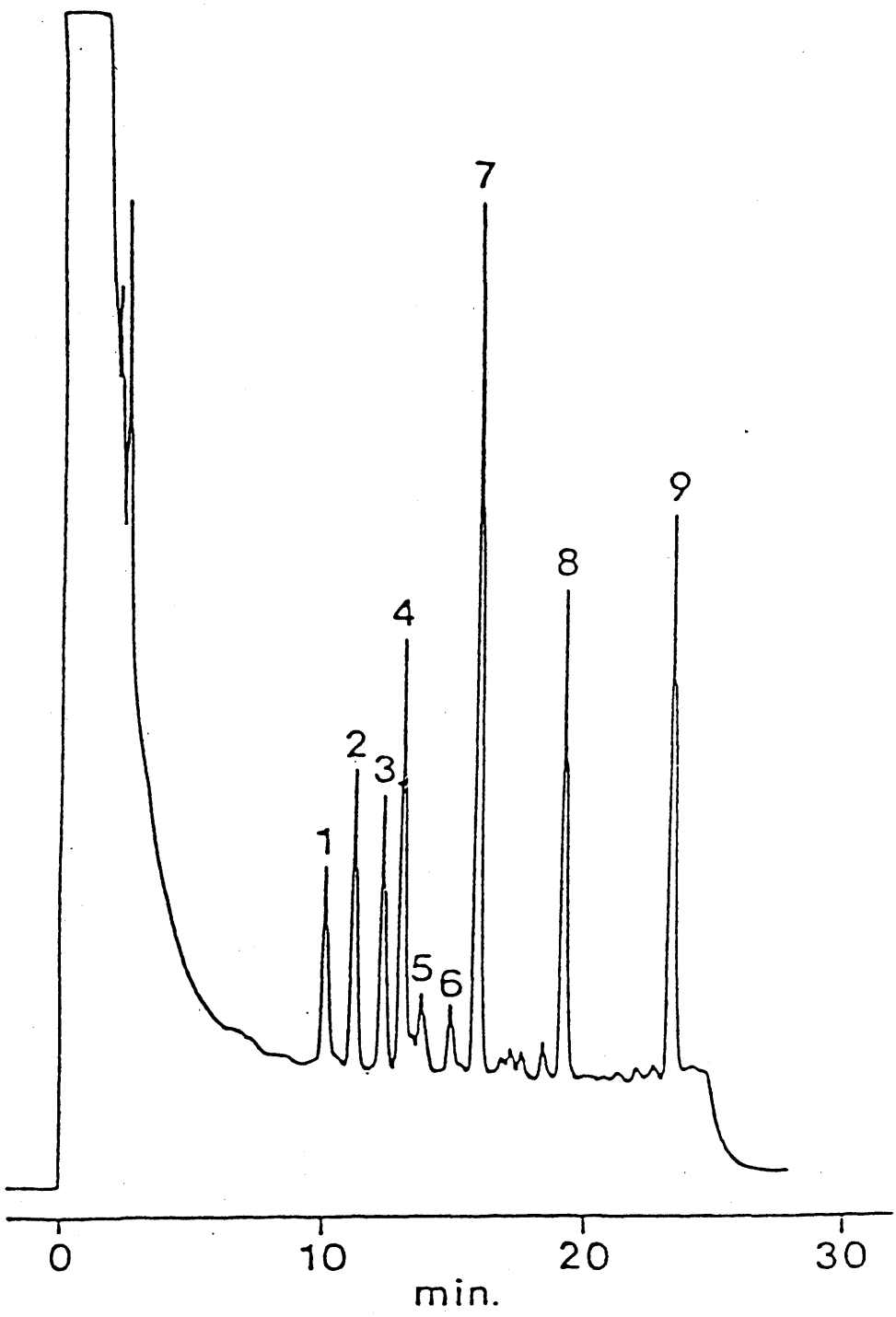
### 6.5 Separering av de derivatiserade desulfoglukosinolaterna genom gaskromatografi

Spruta in 2 mikroliter i OV-7 kolonnen och håll kvar vid 200 °C i 5 minuter och temperaturreglera sedan med 5 °C per minut till 280 °C. Håll kvar vid den slutliga temperaturen under 15 minuter.

Samla in eluaterna för:

3-butenylglukosinolat, 4-pentenylglukosinolat, 2 hydroxy-3-butenylglukosinolat, 2-hydroxy-4-pentenylglukosinolat, indolyl-3-metylglukosinolat, 4-OH-indolyl-3metylglukosindat och om befintligt: allylglukosinolat, 4-hydroxybenzylglokosinolat.

Vid analys av prover som innehåller en stor variation av glukosinolathalt eller när en analys startas efter några timmars uppehåll är det nödvändigt att göra upprepade injektioner av ett prov till dess att likvärdiga resultat erhålls.




Separering av avsvavlade desulfoglukosinolater genom temperaturreglerad gaskromatografi.

1) allyl-,
2) 3-butenyl-,
3) 4-pentenyl-,
4) 2-hydroxy-3-butenyl-,
5) 2-hydroxy-4-pentenyl-,
6) sukros,
7) benzyl-,
8) 4-hydroxy-benzyl-,
9) 4-hydroxyindolyl-3-metyl-.

6.6 **Kvantifiering av resultat**

Den första upgiften är att bestämma den area av allylglukosinolat som kan anses bero på förorening, om sådan förekommer.

Arean med allylglukosinolat som erhålls i analysen utan tillsats av inre standard normaliseras genom användningen av areorna med 2-hydroxy-3-butenylglukosinolat från bägge analyserna, med eller utan tillsats av inre standard:

$$\text{allylglykosinolat TMS (utan inre standard)} \times \frac{\text{area 2-OH-3-butenylglukosinolat TMS (med inre standard)}}{\text{area 2-OH-3-butenylglukosinolat TMS (utan inre standard)}} = \text{allyl glukosinolat TMS från förorening}$$

Den andra uppgiften är att erhålla arean av allylglukosinolat som kan anses bero på inre standard. Det föregående resultatet dras av från den totala arean av glukosinolater som erhållits i analysen med tillsats av inre standard:

$$\text{area allylglukosinolat TMS (med inre standard)} - \text{area allylglukosinolat TMS från förorening} = \text{area allylglukosinolat TMS från tillsatts av inre standard}$$

Areorna för de enskilda derivaten av glukosinolat TMS som erhållit i analysen med tillsats av inre standard är var och en i tur och ordning delad med arean som beror på tillsats av inre standard av allylglukosinolat och sedan multiplicerade med det antal mikromol av allylglykosinolat som tillsatts per gram av fettfri lufttorkat mjöl för att erhålla antalet mikromol glukosinolat per gram fettfri lufttorkat mjöl:

$$\frac{\text{area glukosinolat TMS}}{\text{area allylglukosinolat TMS från tillsats av inre standard}} \times \frac{\text{mikromol allylglukosinolat}}{\text{g fettfritt lufttorkat mjöl}} = \frac{\text{mikromol glukosinolat}}{\text{g fettfritt lufttorkat mjöl}}$$

För att uttrycka resultat på basis av lufttorkade frön:

$$\frac{\text{mikromol glukosinolat}}{\text{fettfritt lufttorkat mjöl}} \times \frac{100 - \%\ \text{olja}}{100} = \frac{\text{mikromol glukosinolat}}{\text{g lufttorkat frö}}$$

7. RESULTATANGIVELSE

Innehållet av 3-butenylglukosinolat, 4-pentenylglukosinolat, 2-hydroxy-3-butenyl glukosinolat, 2-hydroxy-4pentenylglukosinolat, Indolyl-3-metylglukosinolat, 4-OH-indolyl-3-metyl glukosinolat adderas och rapporteras tillsammans. Om allylglukosinolat och 4-hydroxybenzylglukosinolat förekommer rapporteras dessa var för sig som ett tecken på förorening med senapsfrö eller andra korsblommiga ogräsfrön.

Resultaten anges i mikromol per gram lufttorkat frö som medelvärde av dubbelanalys och angivande omfattningen av R. (R = det högre värdet minus det lägre värdet i dubbelanalysen)."