VERORDNUNG (EWG) Nr. 2435/86 DER KOMMISSION

vom 29. Juli 1986

zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1470/68 über die Entnahme und Verkleinerung von Proben sowie über die Bestimmung des Gehalts der Ölsaaten an Ölfremdbestandteilen und Feuchtigkeit

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung Nr. 136/66/EWG des Rates vom 22. September 1966 über die Errichtung einer gemeinsamen Marktorganisation für Fette (1), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 1454/86 (2), insbesondere auf Artikel 24a,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Als Ergebnis der vielfältigen Änderungen der Verordnung (EWG) Nr. 1470/68 der Kommission (3), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 3519/84 (4), beschreibt der Titel jener Verordnung nur noch teilweise ihren Inhalt. Die Bezeichnung sollte deshalb ihrem Sinn gemäß berichtigt werden.

Der für Raps- und Rübsensamen verwendete Begriff „Doppelnull" hängt vom Glukosinolatgehalt der Samen ab. Daher sollte eine geeignete Methode für die Bestimmung dieses Gehaltes festgesetzt werden.

Gemäß der Verordnung Nr. 282/67/EWG der Kommission vom 11. Juli 1967 über Durchführungsbestimmungen betreffend die Interventionen bei Ölsaaten (5), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 2436/86 (6) und der Verordnung (EWG) Nr. 2681/83 der Kommission vom 21. September 1983 mit Durchführungsbestimmungen zur Beihilferegelung für Ölsaaten (7), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 2434/86 (8) ist ein einziges Verfahren für die Bestimmung des Glukosinolatgehalts festzusetzen.

Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Öle und Fette —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die Verordnung (EWG) Nr. 1470/68 wird wie folgt geändert:

1. Der Titel erhält folgende Fassung:

   „über die Entnahme und Verkleinerung von Proben und über die Analyseverfahren für Ölsaaten".

2. Folgender Artikel wird eingefügt:

   „Artikel 2c

   Die Bestimmung des Glukosinolatgehaltes im Sinne des Artikels 4 der Verordnung Nr. 282/67/EWG und des Artikels 32 der Verordnung (EWG) Nr. 2681/83 erfolgt nach dem in Anhang VIII dieser Verordnung dargestellten Verfahren unbeschadet der in den genannten Artikeln vorgesehenen Übergangsbestimmungen."

3. Der Anhang der vorliegenden Verordnung wird als Anhang VIII beigefügt.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am Tag ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Sie gilt mit Wirkung vom 1. Juli 1986.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 29. Juli 1986

Für die Kommission

Frans ANDRIESSEN

Vizepräsident

(1) ABl. Nr. 172 vom 30. 9. 1966, S. 3025/66.
(2) ABl. Nr. L 133 vom 21. 5. 1986, S. 8.
(3) ABl. Nr. L 239 vom 28. 9. 1968, S. 2.
(4) ABl. Nr. L 328 vom 15. 12. 1984, S. 12.
(5) ABl. Nr. 151 vom 13. 7. 1967, S. 1.
(6) Siehe Seite 61 dieses Amtsblatts.
(7) ABl. Nr. L 266 vom 28. 9. 1983, S. 1.
(8) Sieh Seite 51 dieses Amtsblatts.

ANHANG

„ANHANG VIII

RAPS- UND RÜBSENSAMEN

Bestimmung des Glukosinolategehalts

1. GEGENSTAND

Dieses Verfahren dient der Bestimmung der Zusammensetzung der wichtigsten Glukosinolate und ihres Gehaltes in Raps- und Rübsensamen.

2. PRINZIP

2.1. Bestimmung von Trimethylsilylabkömmlingen enzymatisch desulfatierter Glukosinolate durch temperaturgesteuerte Gaschromatografie unter Verwendung von Sinigrin als innerem Standard.

2.2. Mit Hilfe dieses Verfahrens können sechs wichtige in Raps- und Rübsensamen enthaltene Glukosinolate sowie zwei in Senfsaat enthaltene Glukosinolate, die als Verunreinigungen vorkommen können, quantitativ — in Mikromol pro Gramm lufttrockene Saat — bestimmt werden.

3. HAUPTREAGENZIEN

3.1. DEAE-Sephadex A-25

3.2. SP-Sephadex C-25

3.3. Sulfatase Typ H-1

3.4. Allyl-Glukosinolat (Sinigrin)

3.5. Bariumazetat

3.6. Bleiazetat

3.7. Pyridin (zur Silylierung)

3.8. N-Methyl-N-Trimethylsilyl-Heptafluorbutyramid (MSHFBA)

3.9. Trimethylchlorosilan (TMCS)

3.10. 1-Methylimidazol

4. HAUPTAUSRÜSTUNG

4.1. Schwedischer Extraktionszylinder, 70 ml, rostfreier Stahl, am Hals 18 mm innerer Durchmesser, 17 mm Kugellager-Kugeln, Nr. 3 Stopfen aus fluoriertem Silicongummi und horizontale Schüttelvorrichtung (Troeng 1955) oder gleichwertige Schüttelvorrichtung mit Stahlkugeln.

4.2. Hochtourige Kaffemühle.

4.3. Trockenschrank mit Luftumwälzung.

4.4. Gaschromatograph mit Temperaturprogrammierung und Flammen-Ionisations-Detektor.

4.5. Säule für den Gaschromatographen aus Glas, Länge etwa 2 m, innerer Durchmesser 2 mm, gefüllt mit 2 % OV-07 auf Diatomit CLQ 80-100 mesh.

5. VORBEREITUNG

5.1. **Herstellung von DEAE-Sephadex A-25 in Azetatform und „Pyridin-Azetat"-Form**

10 Gramm DEAE-Sephadex A-25 in ein 250-ml-Becherglas einwiegen, 150 ml Wasser hinzufügen, dann Sephadex über Nacht quellen lassen.

Sephadex in eine 20 × 400 mm-Säule einschlämmen.

500 ml 0,5-N-Natriumhydroxid (10 Gramm in Wasser auflösen und auf 500 ml auffüllen) durch die Säule laufen lassen.

Die Säule mit 250 ml Wasser waschen, um überschüssiges Natriumhydroxid zu entfernen, und auf neutralen pH-Wert prüfen.

Ein Zehntel des Sephadex zur Überführung in die Azetatform entnehmen. In Wasser aufschlämmen und in eine rund 15 × 200 mm-Säule gießen. 100 ml einer 0,5 Mol-Essigsäure (2,9 ml Eisessig auf 100 ml auffüllen) durch die Säule geben. Mit 250 ml Wasser waschen. Zur Aufbewahrung in einen 250-ml-Kolben mit Wasser einschlämmen.

Die verbleibenden 9/10 des Sephadex in der Säule mit Wasser zum Absetzen bringen. 400 ml 0,5 Mol Pyridinazetat (19,8 ml Pyridin plus 15 ml Eisessig mit Wasser auf 500 ml auffüllen) durch die Säule laufen lassen. Mit 250 ml Wasser waschen. Zur Aufbewahrung mit Wasser in einen 250-ml-Kolben einschlämmen.

5.2. **Herstellung der Natrium-Form des SP-Sephadex C-25**

1 Gramm SP-Sephadex C-25 in einen 100-ml-Becher einwiegen, 75 ml Wasser hinzufügen und das Sephadex über Nacht quellen lassen. Das Sephadex in eine 15 × 200 mm Säule einschlämmen und mit 250 ml Wasser waschen. Zur Aufbewahrung mit Wasser in einen 250-ml-Kolben einschlämmen.

5.3. **Reinigung der Sulfatase**

70 mg Sulfatase vom Typ H-1 in ein 16 × 150-mm-Reagenzglas einwiegen. 3 ml Wasser zur Auflösung der Sulfatase hinzufügen und mit dem gleichen Volumen Äthanol verdünnen.

Zehn Minuten mit rund 2 000 × g zentrifugieren. Die überstehende Lösung in ein zweites Reagenzglas dekantieren und den Niederschlag verwerfen. 9 ml Äthanol zu der abgegossenen Lösung geben und erneut 10 Minuten lang bei rund 2 000 × g zentrifugieren. Die überstehende Lösung verwerfen und den Niederschlag in 2 ml Wasser auflösen.

In die Spitzen von zwei Pipetten jeweils einen kleinen Stopfen aus Glaswolle stecken.

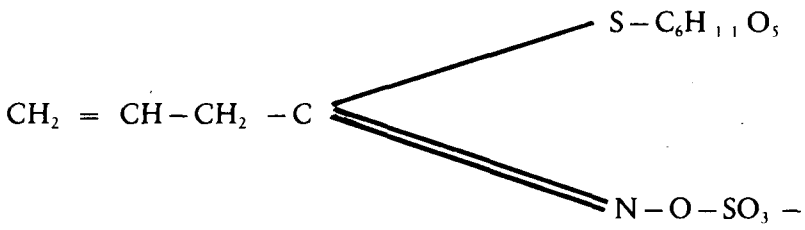
In die eine Pipette 100 Mikroliter der wäßrigen Lösung geben, die über dem DEAE-Sephadex A-25 in Azetatform stand. Dann so viel DEAE-Sephadex A-25 in Azetatform geben, daß eine 15 mm hohe Säule entsteht, die 20 mg trockenem Sephadex entspricht.

In die andere Pipette rund 100 Mikroliter der wäßrigen Lösung geben, die über dem SP-Sephadex C-25 in Natriumform stand. Dazu so viel SP-Sephadex C-25 in Natriumform zufügen, um eine ähnliche Säule zu bilden. Die wäßrige Enzymlösung zuerst über eine Säule, gefüllt mit DEAE-Sephadex A-25 in Azetatform, und dann über eine Säule, gefüllt mit der SP-Sephadex C-25 in Natriumform, laufen lassen.

Die Sulfatase-Lösung wird später unverdünnt auf die Säulen aus Pipettenspitzen gegeben. Das Eluat bei − 20 °C aufbewahren und unmittelbar vor Gebrauch auftauen.

5.4. **Herstellung des inneren Standards**

Allyl-Glukosinolat (Monohydrat, Kaliumsalz)



Molekulargewicht :

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	10	× 16,000	=	160,000
K	1	× 39,100	=	39,100
				415,494

Zur Herstellung einer Lösung von 1 Mikromol pro ml 41,5 mg einwiegen und auf 100 ml auffüllen.

5.5. **Herstellung einer OV-7 Säule für Gaschromatographie**

Zuerst die Innenfläche einer Glassäule mit 4′ × 0,25″ OD/2 mm ID waschen, indem ein Ende der Säule mit einem Gummirohr an einen Wassersauger angeschlossen und eine schwache Saugbewegung ausgeführt wird.

Durch die Säule rund 100 ml Chloroform und rund 100 ml Azeton, dann rund 100 ml Petrolähter (bp 30-60 °C) durchführen. Luft zum Trocknen durchführen und dann im Druckluftofen trocknen. Das eine Ende mit Glaswolle verstopfen. An diesem Ende der Säule einen Ansaugevorgang einleiten mit einer Vakuumleitung. Durch einen kleinen Trichter, der am anderen Ende der Säule mit Hilfe eines kurzen Stücks Tygonröhre befestigt ist, der Säulenfüllung hinzufügen : 2 % OV-7 auf Diatomit CLQ 80-100 Maschenweite oder ein gleichwertiges Reagenz. Die Säule vorsichtig antippen, um den Fluß des Füllmaterials um die Spulen in Bewegung zu bringen, bis die Säule vollständig und gleichmäßig gefüllt ist. Trichter und Tygonröhre entfernen. Eine ausreichende Menge Füllmaterial mit Pasteur-Pipette und Gummiküvette ausblasen, damit das Ende mit Glaswolle verstöpselt werden kann.

Die Säule auf den Injektionsschlitz des Gaschromatographen unter Verwendung einer Schraubenmutter aus rostfreiem Stahl, einer rückwärts montierten Heftzwinge und eine Graphitzwinge aufsetzen. Heliumträgergas durch die Säule geben und die Temperaturregelung von 100 °C ausgehend von 1 °C je Minute erhöhen, bis 290 °C erreicht sind ; über Nacht stehen lassen. Den Ofen abkühlen lassen und die Säule mit einer Schraubenmutter aus rostfreiem Stahl, einer Gegenheftzwinge und einer Graphitstirnzwinge an dem Detektor befestigen.

Die Injektortemperatur auf 250 °C und die Detektortemperatur auf rund 300 °C, die Säulentemperatur auf 200 °C, die Fließgeschwindigkeit des Heliumträgergases auf 40 ml je Minute, die Fließgeschwindigkeiten für Wasserstoff und Luft auf rund 50 bzw. rund 500 ml einstellen, um eine optimale Detektorreaktion zu erreichen, die Skale auf 1 und die Schwächung auf 64 einstellen.

6. VERFAHREN

6.1. **Vorbereitung der Proben**

Die Entnahme der Ölsaatenproben und die Verkleinerung der Laborproben zu Analyseproben ist gemäß den jeweils in den Anhängen I und II der Verordnung (EWG) Nr. 1470/68 beschriebenen Verfahren durchzuführen.

Zur Kontrolle der Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Verfahrens sollte mindestens einmal je Probenpartie eine Standardsaatgutprobe analysiert werden.

Ist die Probe feucht, so sind 20 Gramm in einem Druckluftofen über Nacht bei 45 °C zu trocknen, um 7 % Feuchtigkeit zu erreichen. 20 Gramm getrockneten Saatguts in einer Kaffeemühle mahlen.

Aus rund 3 Gramm Basissaatgut mit Hilfe von 40 ml Petroläther (bp 40-60 C) oder n-Hexan in einer Schweden-Röhre mit drei Stahlkugeln und mit einem Fluorosilikonstöpsel das Öl extrahieren.

Horizontal in einem mechanischen Schüttler 45 Minuten lang schütteln. Unter Absaugen durch Whatman Nr. 1-Papier in konischem Trichter filtern und zweimal mit frischem Lösungsmittel waschen. Die Mahlgutprobe über Nacht in einem Abzug an der Luft trocknen. Klumpen in der trokkenen Probe durch Sieben durch ein 280 um-Sieb auflösen. Mehr als 90 % der Probe müssen den Filter passieren.

6.2. **Inaktivierung von Myrosinase und Extraktion der Glukosinolate**

Das Mahlgut (100 mg) in eine Versuchsröhre abwiegen. Die Röhre erhitzen und die Probe in kochendes (über 95 °C) Wasserbad geben. Nach 2 Minuten kochendes Wasser zufügen (1 ml). Nach weiteren 2 Minuten den inneren Standard (1 ml) (Allyl-Glukosinolat) zusetzen. Die Konzentration des inneren Standards hängt von dem geschätzten Glukosinolatgehalt der Probe ab, wie in der Tabelle angegeben. Weitere 15 Minuten lang bei mehr als 95 °C erhitzen.

In einem zweiten Versuch wird der innere Standard nicht zugesetzt, daher ist der Allyl-Glukosinolatgehalt der Originalprobe zu bestimmen.

Die Lösung abkühlen und 100 µl einer Lösung mit jeweils 0,5 mol Bariumazetat und Bleiazetat je Liter Wasser hinzufügen und vermischen. Bei 2 000 x g zentrifugieren. Den Überstand zurückbehalten.

Glukosinolatgehalt in µmol je 1 g Ölsaaten (µmol/g Saatgut)	Konzentration der inneren Standardlösung (µmol/ml)	Extramenge, die mit Sephadex behandelt wird (ml)
< 15	1	1,0
15 — 40	2	0,5
> 40	3	0,2

6.3. **Vorbereitung der DEAE — Sephadex A-25-Minisäulen**

Geeignete Säulen können unter Verwendung der 1 ml Plastik-Pipettenspitzen oder aber durch Verwendung gekürzter Pasteur-Pipetten hergestellt werden. Einen kleinen Stöpsel Glaswolle auf den Boden der „Minisäule" geben und mit 1 ml Wasser waschen. Eine Suspension von DEAE-Sephadex A-25 (Pyridin-Azetatform) entsprechend 20 mg Trockengewicht von Sephadex hinzufügen. Dies wird auf einfachste Weise durch Zusatz eines vorher festgelegten Volumens einer Suspension (gut gemischt) erreicht. Das Gel soll sich absetzen, dann mit Wasser waschen.

Die Säule dem Überstand (0,2 ; 0,5 oder 1,0 ml) der Barium-Bleibehandlung hinzufügen. Abtropfen lassen und die Säule mit 1 ml Wasser, anschließend mit 1 ml Pyridinazetat (0,02 mol) waschen. Abtropfen lassen und dann der Säule 50 µl gereinigte Sulfataselösung zufügen und bei Raumtemperatur über Nacht stehen lassen. Die Desulphoglukosinolate mit Wasser elutieren (3 × 0,5 ml).

6.4. **Bildung von Abkömmlingen der Desulphoglukosinolate**

Das Silylatreagenz durch Vermischen einer Verdünnung von 1-Methylimidazol (50 µl) und TMCS (10 µl) herstellen. Das verdünnte 1-Methylimidazol wird mit 1-Methylimidazol (50 µl) und Azeton (950µl) zubereitet.

Eine Probe des Desulphoglukosinolat-Eluats (siehe oben) in einem kleinen Glasfläschchen mit einwandfreiem Verschluß trocknen. Kleine Mengen (5-10 µl) können durch Erhitzen bei 120 °C 10 Minuten lang getrocknet werden.

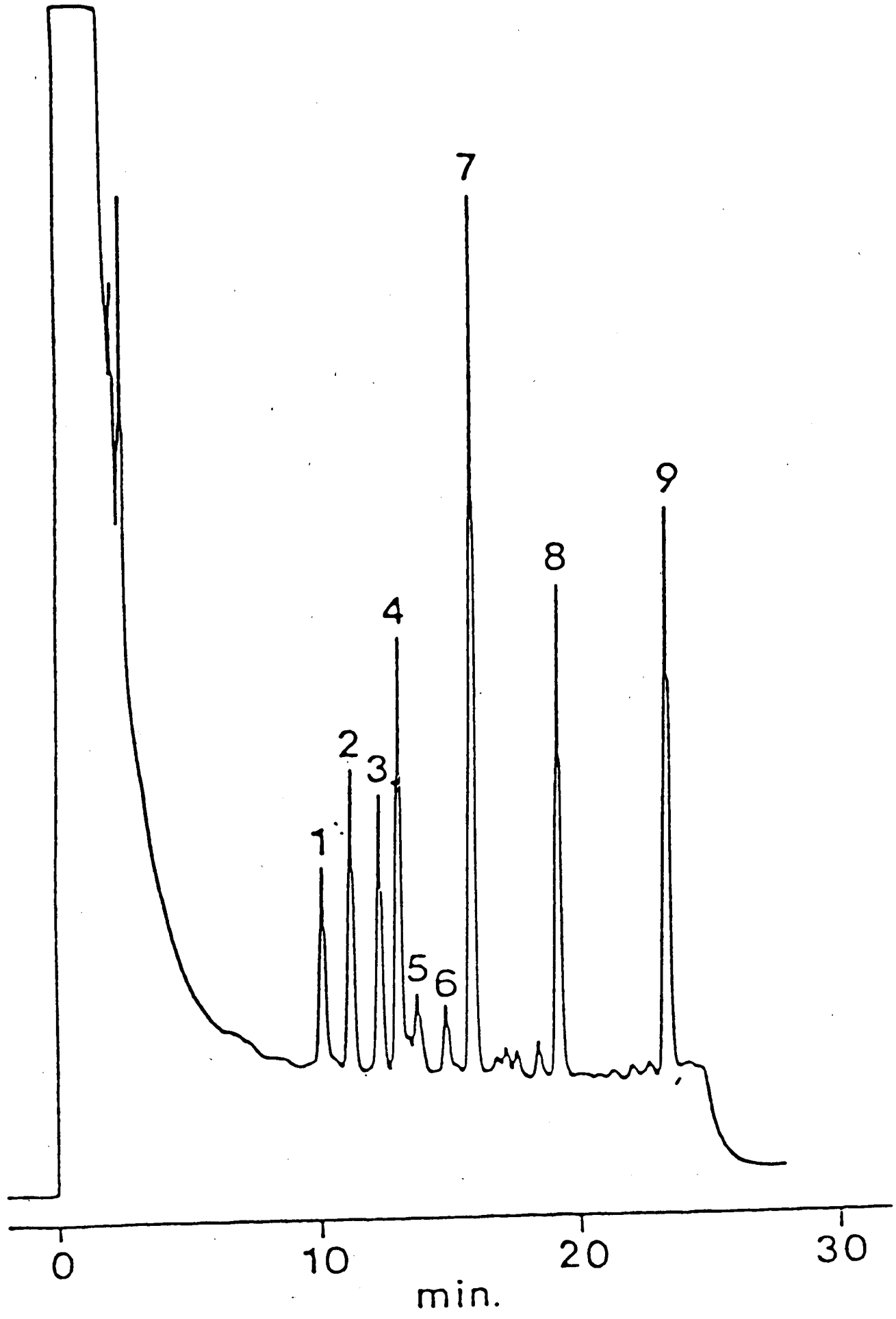
Anderenfalls kann im Vakuumtrockengerät über P_2O_5 getrocknet werden. Der getrockneten Probe eine gleiche Volumenmenge des Silylatreagenz hinzufügen und das Glasfläschchen versiegeln. Das Glasfläschchen bei 120 °C (5 Minuten lang) bis zur vollen Bildung der Abkömmlinge erhitzen.

6.5. **Abtrennung der gebildeten Desulphoglukosinolate durch Gaschromatographie**

2 µl auf die OV-7 Säule aufspritzen und bei 200 °C 5 Minuten lang ruhen lassen, dann Temperaturprogramm auf 5 °C je Minute bis 280 °C einstellen. Diese Endtemperatur 15 Minuten lang beibehalten.

Die Spitzenflächen für 3-Butenyl-, 4-Pentenyl-, 2-Hydroxy-3-Butenyl-, 2-Hydroxy-4-Pentenyl-, Indolyl-3-Methyl-, 4-Hydroxyindolyl-3-Methyl-Glukosinolate sowie Allyl- und 4-Hydroxybenzyl-Glukosinolate, falls vorhanden (Schaubild 1), zusammenstellen.

Bei Analyse von Proben mit einem breiten Band von Glukosinolatgehalten oder Wiederbeginn nach mehrstündiger Unterbrechung sind wiederholte Einspritzungen einer Probe erforderlich, bis konstante Ergebnisse erreicht werden.



Abtrennung von gebildeten Desulphoglukosinolaten durch temperaturprogrammierte Gaschromatographie

(1) Allyl-,
(2) 3-Butenyl-,
(3) 4-Pentenyl-,
(4) 2-Hydroxy-Butenyl-,
(5) 2-Hydroxy-4-Pentenyl-,
(6) Sucrose,
(7) Benzyl-,
(8) 4-Hydroxy-Benzyl,
(9) 4-Hydroxyindolyl-3-Methyl-.

6.6. **Mengenmäßige Bestimmung der Ergebnisse**

Erste Aufgabe ist die Bestimmung der Allyl-Glukosinolat-Fläche, die auf Verschmutzung zurückzuführen ist, falls eine solche besteht.

Die Allyl-Glukosinolat-Fläche, die ohne Zusatz des inneren Standards bei der Analyse gewonnen wird, wird unter Verwendung der Flächen für 2-Hydroxy-3-Butenyl-Glukosinolat aus beiden Analysen, mit und ohne Zusatz des inneren Standards, normalisiert.

$$\text{Fläche Allyl-Glukosinolat-TMS (ohne inneren Standard) (—)} \times \frac{\text{Fläche 2-HO-3-Butenyl-TMS (+) (mit innerem Standard)}}{\text{Fläche 2-HO-3-Butenyl-TMS (ohne inneren Standard)}} = \text{Allyl-Glukosinolat-TMS aus der Verschmutzung}$$

Zweite Aufgabe ist die Gewinnung der Fläche des auf den inneren Standard zurückzuführenden Allyl-Glukosinolats. Diese Fläche wird dann von der Gesamtfläche für Allyl-Glukosinolat, wie sie in der Analyse mit Zusatz des inneren Standards gewonnen wurde, abgezogen :

$$\text{Fläche Allyl-TMS (mit innerem Standard)} - \text{Fläche Allyl-Glukosinolat-TMS aus der Verschmutzung} = \text{Fläche Allyl-Glukosinolat-TMS aus Zusatz des inneren Standards}$$

Die Flächen für die einzelnen Glukosinolat-TMS-Abkömmlinge, die in der Analyse mit Zusatz des inneren Standards gewonnen werden, werden jeweils durch die dem Zusatz von Allyl-Glukosinolat als innerem Standard zuzuschreibende Fläche dividiert, dann mit dem Mikromolen des zugesetzten Allyl je Gramm des nach der Ölextraktion luftgetrockneten Mahlguts multipliziert, um die Mikromole des Glukosinolats je Gramm des nach Ölextraktion luftgetrockneten Mahlguts zu gewinnen :

$$\frac{\text{Fläche des Glukosinolats TMS}}{\text{Fläche des Allyl-Glukosinolat-TMS aus zugesetztem innerem Standard}} \times \frac{\text{µmol Allyl-Glukosinolats}}{\text{g des nach Ölextraktion luftgetrocknetem Mahlguts}} = \frac{\text{µmol Glukosinolat}}{\text{g des nach Ölextraktion luftgetrockneten Mahlguts}}$$

Werden die Ergebnisse auf Grundlage der luftgetrockneten Ölsaaten ausgedrückt, so lauten sie

$$\frac{\text{µmol Glukosinolat}}{\text{g des nach Ölextraktion luftgetrockneten Mahlguts}} \times \frac{\text{100-Ölgehalt (\%)}}{100} = \frac{\text{µmol Glukosinolate}}{\text{g luftgetrockneter Ölsaat}}$$

7. WIEDERGABE DER ERGEBNISSE

Die Mengen an 3-Butenyl-, 4-Pentenyl-, 2-Hydroxy-3-Butenyl-, 2-Hydroxy-4-Pentenyl-, Indolyl-3-Methyl-, 4-Hydroxyindolyl-3-Methyl-Glukosinolate werden zusammengezählt und zusammen eingetragen. Allyl- und 4-Hydroxybenzyl-Glukosinolat werden, falls vorhanden, getrennt als Angabe der Verschmutzung mit Senf oder anderen Kreuzblütlerunkrautsamen getrennt aufgeführt.

Die Ergebnisse werden als Mikromole je Gramm luftgetrockneter Saaten als Mittelwert von 2 Bestimmungen und unter Angabe des Bereichs R (R = höherer Wert minus niedrigerer Wert der Doppelbestimmung) wiedergegeben."