REGOLAMENTO (CEE) N. 2435/86 DELLA COMMISSIONE

del 29 luglio 1986

che modifica il regolamento (CEE) n. 1470/68 relativo al prelievo ed alla riduzione dei campioni, nonché alla determinazione del tenore in olio, impurità ed umidità dei semi oleosi

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

visto il regolamento n. 136/66/CEE del Consiglio, del 22 settembre 1966, relativo all'attuazione di un'organizzazione comune dei mercati nel settore dei grassi (1), modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 1454/86 (2), in particolare l'articolo 24 bis,

considerando che, a motivo delle successive modifiche del regolamento (CEE) n. 1470/68 della Commissione (3), modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 3519/84 (4), il titolo del suddetto regolamento corrisponde solamente in parte al suo contenuto; che è pertanto opportuno procedere ad un adeguamento del titolo stesso;

considerando che la denominazione « doppio zero » per i semi di colza e di ravizzone dipende dal loro tenore di glucosinolati; che, per determinare questo tenore, è opportuno prevedere un metodo appropriato;

considerando che, in applicazione del regolamento n. 282/67/CEE della Commissione, dell'11 luglio 1967, relativo alle modalità d'intervento per i semi oleosi (5), modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 2436/86 (6), nonché del regolamento (CEE) n. 2681/83 della Commissione, del 21 settembre 1983, che stabilisce le modalità d'applicazione del regime d'integrazione per i semi oleosi (7), modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 2434/86 (8), occorre definire un metodo unico per la Comunità di determinazione del tenore di glucosinolati;

considerando che le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per i grassi,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Il regolamento (CEE) n. 1470/68 è modificato come segue:

1) Il titolo è sostituito dal seguente testo:

« relativo al prelievo ed alla riduzione dei campioni, nonché ai metodi di analisi dei semi oleosi ».

2) È inserito l'articolo 2 quater seguente:

« *Articolo 2 quater*

La determinazione del tenore di glucosinolati di cui all'articolo 4 del regolamento n. 282/67/CEE e all'articolo 32 del regolamento (CEE) n. 2681/83 viene effettuata secondo il metodo definito nell'allegato VIII, fatte salve le disposizioni transitorie di cui ai suddetti articoli ».

3) L'allegato del presente regolamento è aggiunto come allegato VIII.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il giorno della pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee.*

Esso si applica a decorrere dal 1° luglio 1986.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 29 luglio 1986.

Per la Commissione
Frans ANDRIESSEN
Vicepresidente

(1) GU n. 172 del 30. 9. 1966, pag. 3025/66.
(2) GU n. L 133 del 21. 5. 1986, pag. 8.
(3) GU n. L 239 del 28. 9. 1968, pag. 2.
(4) GU n. L 328 del 15. 12. 1984, pag. 12.
(5) GU n. 151 del 13. 7. 1967, pag. 1.
(6) Vedi pagina 61 della presente Gazzetta ufficiale.
(7) GU n. L 266 del 28. 9. 1983, pag. 1.
(8) Vedi pagina 51 della presente Gazzetta ufficiale.

ALLEGATO

« ALLEGATO VIII

SEMI DI COLZA E DI RAVIZZONE

Determinazione del tenore di glucosinolati

1. OGGETTO

Il presente metodo è stato messo a punto per stabilire il tenore e la composizione dei principali glucosinolati dei semi di colza e di ravizzone.

2. PRINCIPIO

2.1. Misurazione dei derivati di trimetilsilano dei glucosinolati desolforati enzimaticamente mediante gascromatografia a temperatura programmata, impiegando sinigrina come campione interno.

2.2. Questo metodo consente di rilevare i quantitativi di 6 glucosinolati principali contenuti nei semi di colza e di ravizzone (in micromoli/g di granella essiccata all'aria) nonché di due glucosinolati contenuti nei semi di senape.

3. PRINCIPALI REAGENTI

3.1. DEAE Sephadex A-25

3.2. SP Sephadex C-25

3.3. Solfatasi tipo H-1

3.4. Glucosinolato di allile (Sinigrina)

3.5. Acetato di bario

3.6. Acetato di piombo

3.7. Piridina (purezza per sililazione)

3.8. N-metil-N-trimetilsilil eptafluorobutiriamide (MSHFBA)

3.9. Trimetilclorosilano (TMCS)

3.10. 1-Metilimidazolo

4. PRINCIPALI APPARECCHIATURE

4.1. Provette da estrazione svedesi, 70 ml, di acciaio inossidabile, aventi un collo con 18 mm di diametro interno, con sfere di metallo di 17 mm, con tappi di gomma al fluorosilicono n. 3 e agitatori orizzontali (Troeng 1955), o un agitatore a sfera d'acciaio equivalente.

4.2. Macinatore da caffè ad alta velocità.

4.3. Stufa a corrente d'aria.

4.4. Gascromatografo con la possibilità di programmare la temperatura e con un rivelatore a ionizzazione di fiamma.

4.5. Colonna di vetro per gascromatografia della lunghezza di circa 2 m e con un diametro interno di 2 mm, contenente da OV-7 al 2 % su diatomite CLQ 80-100 mesh.

5. PREPARAZIONE

5.1. **Preparazione del DEAE Sephadex A-25 nelle forme « acetato » e « acetato di piridina »**

Pesare 10 g di DEAE Sephadex A-25 in un bicchiere da 250 ml, aggiungere 150 ml d'acqua e lasciare rigonfiare il Sephadex per tutta la notte. Versare la poltiglia di Sephadex in una colonna di 20 × 400 mm.

Far passare 500 ml di idrossido di sodio 0,5 N (10 g sciolti in acqua e portati a 500 ml) attraverso la colonna. Lavare la colonna con 250 ml d'acqua in modo da eliminare l'eccesso di idrossido di sodio, controllando che il pH abbia raggiunto la neutralità.

Prelevare $^1/_{10}$ di Sephadex da trasformare nella forma acetato. Formare una politiglia con acqua e versare in una colonna di circa 15 × 200 mm. Far passare 100 ml di acido acetico 0,5 M (2,9 ml di acido acetico glaciale portati a 100 ml) attraverso la colonna.

Lavare con 250 ml d'acqua.

Farne una poltiglia in un pallone da 250 ml con acqua, ai fini della conservazione.

Lasciar depositare i rimanenti 9/10 di Sephadex in una colonna con acqua. Far passare 400 ml di acetato di piridina 0,5 M (19,8 ml di piridina più 15 ml di acido acetico glaciale portati a 500 ml con acqua) attraverso la colonna.

Lavare con 250 ml d'acqua.

Farne una poltiglia in un pallone da 250 ml, con acqua, ai fini della conservazione.

5.2. **Preparazione del Sephadex SP C-25 in forma sodica**

Pesare 1 g di SP Sephadex C-25 in un bicchiere da 100 ml, aggiungere 75 ml d'acqua e lasciar rigonfiare il Sephadex per tutta la notte.

Versare la poltiglia di Sephadex in una colonna di 15 × 200 mm e lavare con 250 ml d'acqua. Farne una poltiglia: un pallone da 250 ml, con acqua, ai fini della conservazione.

5.3. **Depurazione della solfatasi**

Pesare 70 mg di solfatasi tipo H-1 in una provetta di 16 × 150 mm. Aggiungere 3 ml d'acqua in modo da sciogliere la solfatasi e diluire con un volume eguale di etanolo.

Centrifugare per 10 minuti a 2 000 x *g*.

Travasare il surnatante in una seconda provetta ed eliminare il precipitato.

Aggiungere 9 ml di etanolo al surnatante e centrifugare nuovamente per 10 minuti a 2 000 x *g*.

Eliminare il surnatante e sciogliere il precipitato in 2 ml d'acqua.

Sistemare un batuffolo di lana di vetro all'estremità di due pipette. A una di esse aggiungere 100 microlitri dello strato acquoso che si trova al di sopra del DEAE Sephadex A-25 in forma di acetato. Successivamente aggiungere a questo un volume di DEAE Sephadex A-25 in forma di acetato tale da formare una colonna alta 15 mm, equivalente a 20 mg di Sephadex secco.

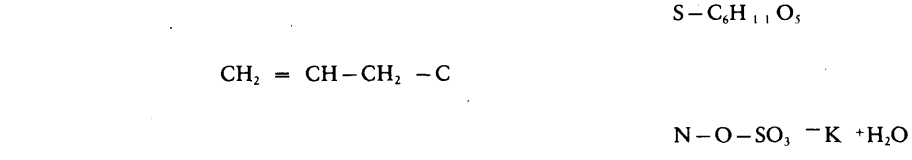
Nell'altra pipetta aggiungere 100 microlitri dello strato acquoso al di sopra dell'SP Sephadex C-25 in forma sodica. Aggiungere quindi un volume dello SP Sephadex C-25 in forma sodica che è stato preparato, in modo da formare una colonna simile. Far passare la soluzione acquosa dell'enzima dapprima attraverso la colonna di DEAE Sephadex A-25 in forma di acetato, quindi attraverso la colonna di SP Sephadex C-25 in forma sodica.

Nelle colonne a punta di pipetta, la soluzione di solfatasi dev'essere impiegata allo stato non diluito.

Conservare l'eluato a − 20 °C e scongelare immediatamente prima dell'uso.

5.4. **Preparazione dello standard interno**

Glucosinolato di allile (sale potassico monoidrato)



$S-C_6H_{11}O_5$

$CH_2 = CH-CH_2-C$

$N-O-SO_3^{-}K^{+}H_2O$

Peso molecolare:

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

Per ogni micromoli/g per ml di soluzione pesare 41,5 mg e portare a 100 ml.

5.5. **Preparazione della colonna gascromatografica OV-7**

Innanzi tutto lavare la superficie interna di una colonna di vetro avente una lunghezza di 4′ x un diametro esterno di 0,25″, nonché 2 mm di diametro interno collegando un'estremità della colonna con un manicotto di gomma ad una pompa a caduta d'acqua e applicando un'aspirazione leggera. Far passare attraverso una colonna 100 ml di cloroformio, 100 ml di acetone, poi 100 ml di etere di petrolio (punto d'ebollizione 30-60 °C). Far essiccare in corrente d'aria e successivamente in una stufa a corrente d'aria.

Attraverso un piccolo imbuto applicato all'altra estremità della colonna per mezzo di un breve tratto di tubo di tygon, aggiungere il riempimento della colonna costituito da OV-7 al 2 % su diatomite CLQ 80-100 mesh. Dare leggeri colpetti alla colonna in modo da facilitare il flusso del materiale di riempimento nel serpentino finché tutto il materiale non è disceso disponendosi in modo uniforme. Togliere l'imbuto e il tubo di tygon. Mediante una pipetta di Pasteur e una pera di gomma, soffiare il materiale di riempitura in quantità tale che l'estrimità risulti chiusa dal tampone in lana di vetro.

Applicare la colonna al foro di iniezione del gascromatografo mediante un dato in acciaio inossidabile, una ghiera montata nella parte posteriore e una ghiera in grafite. Far passare il gas vettore (elio) attraverso la colonna e programmare l'aumento di temperatura da 100 °C a 290 °C (incremento: 1 °C/minuto), mantenerlo tutta la notte a tale temperatura. Raffreddare la stufa e collegare la colonna con il rivelatore facendo uso del dado di acciaio inossidabile nonché della ghiera posteriore e della ghiera anteriore in grafite.

Regolare la temperatura dell'iniettore a 250 °C e la temperatura del rivelatore a 300 °C, la temperatura della colonna a 200 °C, il flusso del gas vettore (elio) a 40 ml per minuto, il flusso dell'idrogeno e dell'aria rispettivamente a 50 ml e a 500 ml al minuto in modo che la risposta del rivelatore sia quella ottimale, la gamma a 1 e l'attenuazione a 64.

6. MODO DI OPERARE

6.1. **Preparazione dei campioni**

Il prelievo dei campioni di sementi e la trasformazione dei campioni da laboratorio in campioni per l'analisi vanno effettuati conformemente alle procedure descritte negli allegati I e II del regolamento (CEE) n. 1470/68.

Sarebbe opportuno esaminare un campione standard di sementi per ogni partita di campioni poiché i dati concernenti l'analisi di un campione standard possano essere utili per controllare la precisione e l'esattezza del metodo seguito.

Se il campione di semente è umido, essiccarne 20 g in una stufa a circolazione d'aria per tutta una notte a 45 °C, fino al raggiungimento di un'umidità del 7 %. Macinare 20 g di semente essiccata in macinino da caffè.

Estrarre l'olio da 3 g di semi macinati con 40 ml di etere di petrolio (punto di ebollizione 30-60 °C) oppure con n-esano, in una provetta svedese contenente 3 sfere di acciaio e chiusa con un tappo di fluorosilicone. Agitare orizzontalmente in un agitatore meccanico per 45 minuti. Filtrare per aspirazione attraverso carta Whatman n. 1 in un imbuto conico e lavare due volte con solvente fresco. Lasciar asciugare all'aria il campione di farina mantenendolo sotto cappa per tutta la notte. Sbriciolare eventuali grumi a secco mediante vagliatura oltre 280 micrometri. Oltre il 90 % dei campioni deve superare la vagliatura.

6.2. **Inattivazione della mirosinasi e estrazione dei glucosinolati**

Pesare farina (100 mg) in una provetta. Scaldare la provetta ed il campione in un bagnomaria bollente (95 °C). Dopo due minuti aggiungere acqua bollente (1 ml). Dopo altri due minuti aggiungere lo standard interno (1 ml) (glucosinato di allile). La concentrazione dello standard interno dipende dal tenore presente di glucosinolato del campione, come indicato nella tabella in appresso. Continuare a scaldare a 95 °C per 15 minuti.

Lo standard interno non viene aggiunto in una successiva prova per determinare il tenore di glucosinolato di allile del campione originale.

Raffreddare la soluzione ed aggiungere 100 microlitri di una soluzione contenente 0,5 mol di acetato di bario e di acetato di piombo per litro d'acqua e agitare. Centrifugare a 2 000 × g. Conservare il surnatante.

Tenore in glucosinolati (micromoli/g di sementi)	Concentrazione dello standard interno (micromoli ml)	Quantità di estratto da applicare al Sephadex (ml)
< 15	1	1,0
15 — 40	2	0,5
> 40	3	0,2

6.3. **Preparazione di minicolonne di DEAE — Sephadex A-25**

Opportune colonne potranno essere preparate facendo uso di pipette di plastica da 1 ml, oppure impiegando pipette di Pasteur accorciate. Inserire un piccolo batuffolo di lana di vetro all'estremità inferiore della « minicolonna » e lavare con acqua (1 ml). Aggiungere una sospensione di DEAE Sephadex A-25 sotto forma di acetato di piridina equivalente a 20 mg di Sephadex secco. Questo risultato lo si ottiene semplicemente aggiungendo un volume predeterminato di una sospensione (ben mescolata). Lasciare che il gel si depositi e lavare con acqua.

Applicare alla colonna il surnatante proveniente dal trattamento bario/piombo. Lasciar scolare e lavare la colonna con 1 ml d'acqua seguita da 1 ml di acetato di piridina (0,02 mol). Lasciar scolare e aggiungere quindi alla colonna 50 microlitri di soluzione di solfatasi depurata e lasciare a temperatura ambiente per tutta la notte. Eluire i desulfoglucosinolati con acqua (3 x 0,5 ml).

6.4. **Derivatizzazione dei desulfoglucosinolati**

Preparare il reagente di sililazione mescolando MSHFBA (100 microlitri), TMCS (10 microlitri) e diluire 50 microlitri di 1-metilimidazole. Mescolare 1-metilimidazole diluito con 50 microlitri di 1-metilimidazole e 950 microlitri di acetone.

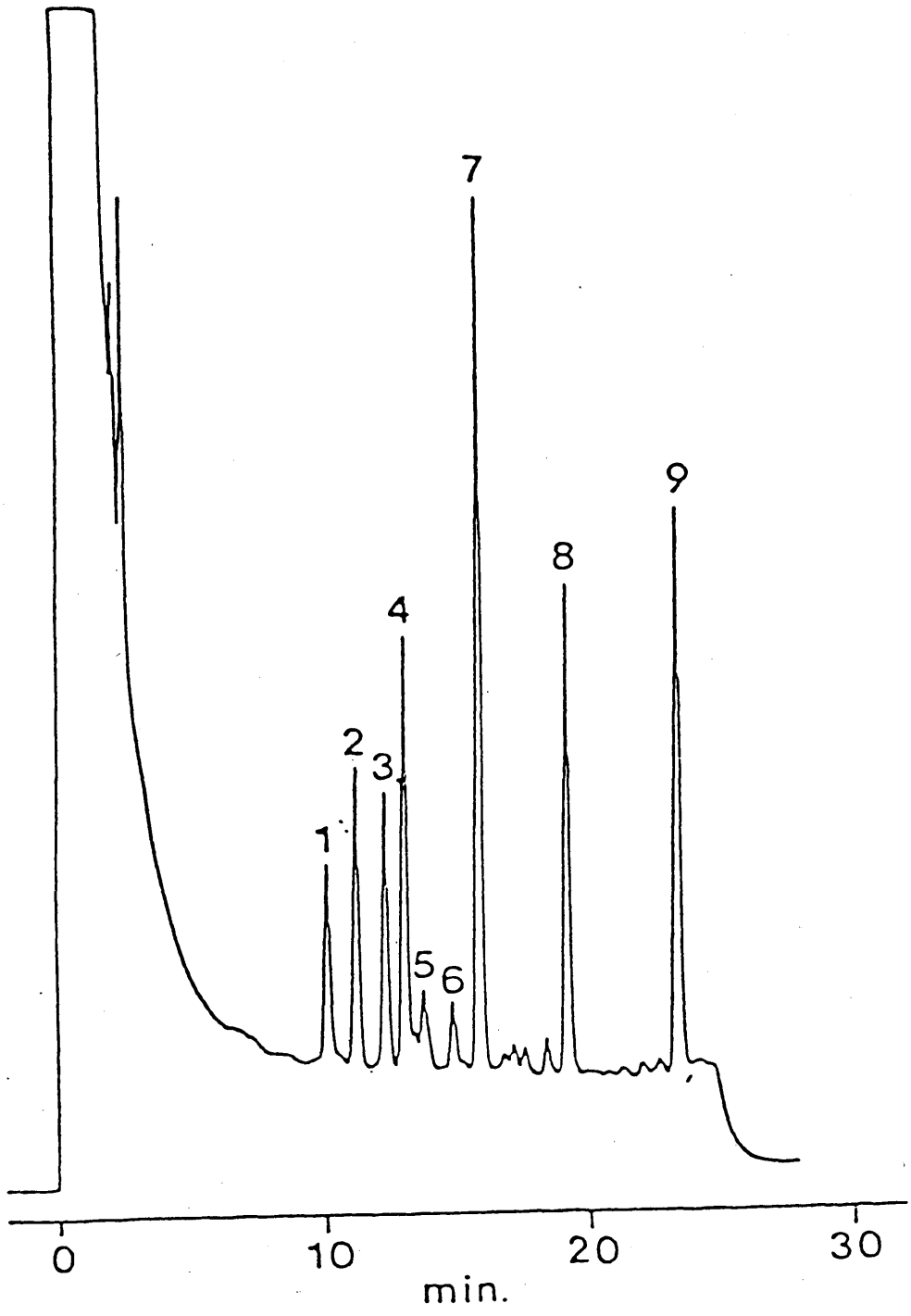
Essiccare un campione di eluato di desulfoglucosinolato in una piccola fiala atta ad essere perfettamente chiusa. Piccoli quantitativi (5 — 10 microlitri) possono essere essiccati per riscaldamento a 120 °C per minuti. Come alternativa essiccare in un essiccatore a vuoto su P_2O_5. Al campione essiccato aggiungere un volume eguale di reattivo sililante e chiudere la fiala. Scaldare la fiala a 120 °C (5 minuti) per completare la derivatizzazione.

6.5. **Separazione dei desulfoglucosinolati derivatizzati mediante gascromatografia**

Iniettare 2 microlitri nella colonna riempita con OV-7 e mantenere a 200 °C per 5 minuti, poi programmare l'aumento di temperatura a 5 °C per minuto fino a 280 °C. Mantenere questa temperatura finale per 15 minuti.

Raccogliere l'area dei picchi per i seguenti composti : glucosinolati di 3-butenile, 4-pentenile, 2-idrossi-3-butenile, 2-idrossi-4-pentenile, indolil-3-metile, 4-OH-indolil-3-metile, ed eventualmente allile e 4-idrossibenzile, se presenti.

Quando si analizzano campioni nei quali le concentrazioni di glucosinolato variano entro ampi limiti, o quando l'analisi viene effettuata dopo alcune ore di inattività, può essere necessario iniettare ripetutamente un determinato campione fino a costanza dei risultati.



Separazione dei desulfoglucosinolati mediante gascromatografia a temperatura programmata.

(1) allile-,
(2) 3-butenile-,
(3) 4-pentenile-,
(4) 2-idrossi-3-butenile-
(5) 2-idrossi-4-pentenile-
(6) saccarosio
(7) benzile-
(8) 4-idrossi-benzile
(9) 4-idrossinidolil-3-metile-.

6.6. **Quantificazione dei risultati**

Il primo compito è quello di determinare l'area dell'allile attribuibile alla contaminazione, se presente.

Per ottenere l'area relativa all'allile attribuibile a contaminazione, l'area relativa all'allile ottenuto nell'analisi senza aggiunta di standard interno viene normalizzata usando le aree relative al 2-idrossi-3-butenile proveniente da entrambe le analisi :

$$\text{area allile glucosinolato TMS (senza standard interno)} \times \frac{\text{area 2-HO-3-butenile glucosinolato TMS}}{\text{area 2-HO-3-butenile glucosinolato TMS (senza standard interno)}} = \text{allile glucosinolato TMS da contaminazione}$$

Per ottenere l'area dell'allile aggiunto come standard interno, questa area viene successivamente sottratta dall'area totale relativa all'allile ottenuto nell'analisi con aggiunta di standard interno :

$$\text{area allile glucosinolato TMS (con standard interno)} - \text{Area allile glucosinolato TMS preveniente da contaminazione} = \text{area allile glucosinolato TMS da aggiunta di standard interno}$$

Le aree relative ai singoli derivati TMS del glucosinolato ottenuti nell'analisi mediante aggiunta di standard interno vengono a loro volta divise per l'area attribuibile al glucosinolato di allile aggiunto come standard interno, moltiplicato successivamente per le micromoli dell'allile aggiunto per g di farina essiccata all'aria e disoleata, in modo da ottenere le micromoli di glucosinolato per g di farina essiccata all'aria e disoleata :

$$\frac{\text{area del glucosinolato TMS}}{\text{area dell'allile glucosinolato TMS proveniente dall'aggiunta di standard interno}} \times \frac{\text{micromoli di glucosinolato d'allile aggiunto}}{\text{peso (in g) della farina essiccata all'aria e disoleata}} = \text{micromoli/g di farina essiccata all'aria e disoleata}$$

Per riferire i risultati alla quantità di granella essiccata all'aria, come raccomandato :

$$\text{micromoli/g di farina essiccata all'aria disoleata} \times \frac{100 - \%\text{ di olio}}{100} = \text{micromoli/g di granella essiccata all'aria}$$

7. INDICAZIONE DEI RISULTATI

I quantitativi di glucosinolato di 3-butenile, 4-pentenile, 2-idrossi-3-butenile, 2-idrossi-4-pentenile, indolil-3-metile, 4-OH-indolil-3-metile vengono sommati e indicati globalmente. I glucosinolati di allile e di 4-idrossi benzile, se presenti, vengono indicati separatamente come indizio di contaminazione da mostarda di senape o di altri semi di crucifere.

I risultati vengono espressi in micromoli per g di semente essiccata all'aria per ottenere la doppia determinazione e l'indicazione della serie R (R = Valore superiore meno valore inferiore della doppia determinazione) ».