VERORDENING (EEG) Nr. 2435/86 VAN DE COMMISSIE

van 29 juli 1986

houdende wijziging van Verordening (EEG) nr. 1470/68 betreffende het nemen en het omzetten van monsters alsmede betreffende het bepalen van het oliegehalte, het gehalte aan onzuiverheden en het vochtgehalte van oliehoudende zaden

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Verordening nr. 136/66/EEG van de Raad van 22 september 1966 houdende de totstandbrenging van een gemeenschappelijke ordening der markten in de sector oliën en vetten (1), laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 1454/86 (2), en met name op artikel 24 bis,

Overwegende dat als gevolg van de achtereenvolgende wijzigingen van Verordening (EEG) nr. 1470/68 van de Commissie (3), laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 3519/84 (4), de titel van die verordening nog slechts gedeeltelijk overeenkomt met de inhoud ervan; dat bijgevolg de titel ervan moet worden aangepast;

Overwegende dat de benaming „dubbel nul" voor koolzaad en raapzaad afhangt van het gehalte aan glucosinolaten ervan; dat om dit gehalte te bepalen een passende methode moet worden vastgesteld;

Overwegende dat op grond van Verordening nr. 282/67/EEG van de Commissie van 11 juli 1967 betreffende de interventieregeling voor oliehoudende zaden (5), laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 2436/86 (6), en van Verordening (EEG) nr. 2681/83 van de Commissie van 21 september 1983 houdende toepassingsbepalingen inzake de steunregeling voor oliehoudende zaden (7), laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 2434/86 (8), de uniforme methode voor de Gemeenschap voor de bepaling van het gehalte aan glucosinolaten moet worden vastgesteld;

Overwegende dat de in deze verordening vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Comité van beheer voor oliën en vetten,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

Verordening (EEG) nr. 1470/68 wordt als volgt gewijzigd:

1. De titel wordt gelezen:

   „betreffende het nemen en het omzetten van monsters alsmede betreffende de analysemethoden voor oliehoudende zaden".

2. Het volgende artikel wordt ingevoegd:

   „Artikel 2 quater

   De bepaling van het gehalte aan glucosinolaten als bedoeld in artikel 4 van Verordening nr. 282/67/EEG en artikel 32 van Verordening (EEG) nr. 2681/83 geschiedt volgens de in bijlage VIII omschreven methode, onverminderd de in voornoemde artikelen bedoelde overgangsbepalingen.".

3. De bijlage bij deze verordening wordt als bijlage VIII toegevoegd.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de dag van haar bekendmaking in het *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen.*

Zij is toepasselijk op 1 juli 1986.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke Lid-Staat.

Gedaan te Brussel, 29 juli 1986.

Voor de Commissie

Frans ANDRIESSEN

Vice-Voorzitter

(1) PB nr. 172 van 30. 9. 1966, blz. 3025/66.
(2) PB nr. L 133 van 21. 5. 1986, blz. 8.
(3) PB nr. L 239 van 28. 9. 1968, blz. 2.
(4) PB nr. L 328 van 15. 12. 1984, blz. 12.
(5) PB nr. 151 van 13. 7. 1967, blz. 1.
(6) Zie blz. 61 van dit Publikatieblad.
(7) PB nr. L 266 van 28. 9. 1983, blz. 1.
(8) Zie blz. 51 van dit Publikatieblad.

BIJLAGE

„BIJLAGE VIII

KOOLZAAD EN RAAPZAAD

Bepaling van het glucosinolaatgehalte

1. ONDERWERP

Deze methode is ontworpen voor de bepaling van de samenstelling en het gehalte van de belangrijkste glucosinolaten in koolzaad en raapzaad.

2. PRINCIPE

2.1. Bepaling van de trimethylsilyl-derivaten van enzymatisch gedesulfateerde glucosinolaten met behulp van gaschromatografie met temperatuurprogrammering met sinigrine als interne standaard.

2.2. De methode levert als resultaat de hoeveelheden, in micromolen per gram aan de lucht gedroogd zaad, van zes belangrijke glucosinolaten uit koolzaad en raapzaad en twee glucosinolaten uit mosterdzaad, dat als verontreiniging aanwezig kan zijn.

3. BELANGRIJKSTE REAGENTIA

3.1. DEAE Sephadex A-25

3.2. SP Sephadex C-25

3.3. Sulfatase type H-1

3.4. Allylglucosinolaat (Sinigrin)

3.5. Bariumacetaat

3.6. Loodacetaat

3.7. Pyridine (Silylering-kwaliteit)

3.8. N-Methyl-N-trimethylsilylheptafluorbutyramide (MSHFBA)

3.9. Trimethylchloorsilaan (TMCS)

3.10. 1-Methylimidazool

4. BELANGRIJKSTE APPARATUUR

4.1. Zweedse extractiebuisjes, 70 ml, roestvrij staal, inwendige diameter van de hals 18 mm, kogellagers 17 mm, stoppen nr. 3 van fluorsilicoonrubber en een horizontale schudmachine (Troeng 1955) of een gelijkwaardige schudmachine.

4.2. Koffiemolen met een hoog toerental.

4.3. Oven met geforceerde luchtcirculatie.

4.4. Gaschromatograaf met de mogelijkheid tot temperatuurprogrammering en een vlamionisatie-detector.

4.5. Glazen kolom voor gaschromatografie, ongeveer 2 m lang, inwendige diameter 2 mm, gevuld met 2 % OV-7 op kiezelgoer, CLQ 80-100 mesh.

5. VOORBEREIDING

5.1. **Bereiding van DEAE Sephadex A-25 in de acetaatvorm en in de pyridine-acetaatvorm**

Weeg 10 gram DEAE Sephadex A-25 af in een 250 ml bekerglas, voeg 150 ml water toe en laat de Sephadex gedurende een nacht opzwellen.

Vul een kolom van 20 × 400 mm met de Sephadex.

Laat 500 ml 0,5 N natriumhydroxide (10 gram opgelost in water en aangevuld tot 500 ml) door de kolom lopen. Was de kolom met 250 ml water om de overmaat natriumhydroxide te verwijderen ; controleer of de pH gedaald is tot neutraal.

Verwijder 1/10 van de Sephadex om te worden omgezet in acetaatvorm. Suspendeer dit in water en schenk het in een kolom van 15 × 200 mm. Laat 100 ml 0,5 M azijnzuur (2,9 ml ijsazijn aangevuld tot 100 ml) door de kolom lopen. Was de kolom met 250 ml water. Breng de Sephadex over in een 250 ml erlenmeyer met wateren bewaar het hierin.

Laat de resterende 1/10 Sephadex in de kolom bezinken met water. Laat 400 ml 0,5 M pyridine-acetaat (19,8 ml pyridine en 15 ml ijsazijn aangevuld tot 500 ml met water) door de kolom lopen. Was de kolom met 250 ml water. Breng de Sephadex over in een 250 ml erlenmeyer met water en bewaar het hierin.

5.2. **Bereiding van SP Sephadex C-25 in de natriumvorm**

Weeg 1 gram SP Sephadex C-25 af in een 100 ml bekerglas, voeg 75 ml water toe en laat de Sephadex gedurende een nacht opzwellen. Vul een kolom van 15 × 200 mm met de Sephadex en was met 250 ml water. Breng het over in een 250 ml erlenmeyer met water en bewaar het daarin.

5.3. **Zuivering van sulfatase**

Weeg 70 mg sulfatase type H-1 af in een 16 × 150 mm reageerbuis. Voeg 3 ml water toe om de sulfatase op te lossen en verdun met een gelijk volume ethanol. Centrifugeer 10 minuten bij 2 000 × g.

Schenk het supernatans in een tweede reageerbuis af en gooi het neerslag weg. Voeg 9 ml ethanol toe aan het supernatans en centrifugeer weer 10 minuten bij 2 000 × g. Gooi het supernatans weg en los het neerslag op in 2 ml water.

Breng een klein plukje glaswol aan in de punt van twee pipetten. Voeg aan het ene puntje 100 microliter toe van de waterlaag boven de DEAE Sephadex A-25 in de acetaatvorm. Voeg vervolgens hieraan de DEAE Sephadex A-25 in de acetaatvorm toe zodat een kolom wordt gevormd van 15 mm hoog ; dit komt overeen met 20 mg droge Sephadex. Voeg in het andere puntje 100 microliter toe van de waterlaag boven de SP Sephadex C-25 in de natriumvorm. Vorm vervolgens een soortgelijke kolom door hieraan de vooraf klaargemaakte SP Sephadex C-25 in de natriumvorm toe te voegen.

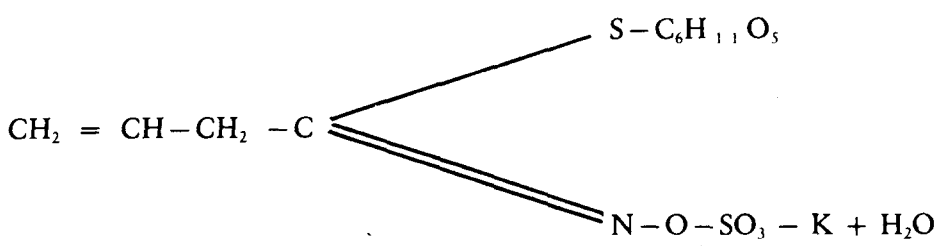
Laat de oplossing van enzym in water eerst door de kolom met SP Sephadex C-25 in de acetaatvorm lopen en vervolgens door de kolom met SP Sephadex C-25 in de natriumvorm.

De sulfatase-oplossing wordt onverdund op de kolommen in de pipetpuntjes opgebracht.

Bewaar het eluaat bij -20 °C en ontdooi het vlak voor het gebruik.

5.4. **Bereiding van de interne standaard**

Allylglucosinolaat (monohydraat, kaliumzout)



Molecuulgewicht :

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

Bereid een oplossing van 1 micromol/ml door 41,5 mg af te wegen en dit aan te vullen tot 100 ml.

5.5. **Bereiding van een OV-7-kolom voor gaschromatografie**

Was eerst de binnenzijde van een glazen kolom (4′ × 0,25″ uitwendige en 2 mm inwendige diameter) door deze aan één kant met een rubberslang aan te sluiten op een waterstraalpomp en deze in te stellen op een geringe zuigkracht. Zuig 100 ml chloroform, 100 ml aceton, en 100 ml petroleumether (30—60 °C) door de kolom. Droog door lucht door te zuigen en vervolgens in een oven, met geforceerde luchtcirculatie.

Stop één uiteinde dicht met glaswol. Sluit dit uiteinde van de kolom aan op een vacuümslang. Breng via een smalle trechter die met behulp van een klein stukje tygonslang wordt aangesloten op het andere uiteinde van de kolom de kolompakking aan, 2 % OV-7 op kiezelgoer CLQ 80-100 mesh. Tik zachtjes op de kolom om ervoor te zorgen dat het pakkingmateriaal door de windingen doorstroomt totdat de kolom volledig en gelijkmatig is gepakt.

Verwijder de trechter en de tygonslang. Blaas met een pasteurpipet met rubberen speen zoveel pakkingmateriaal weg dat het uiteinde kan worden dichtgestopt met glaswol.

Bevestig de kolom aan de injector van de gaschromatograaf met behulp van een roestvrij stalen moer, een grafietringetje en daarachter een extra ringetje. Laat als draaggas helium door de kolom lopen en programmeer de temperatuur met 1 °C per minuut van 100 °C tot 290 °C ; houd de kolom gedurende een nacht op deze temperatuur.

Laat de oven afkoelen en bevestig de kolom aan de detector met behulp van een roestvrij stalen moer, een grafietringetje en een extra ringetje erachter.

Stel de temperatuur van de injector in op 250 °C en van de detector op 300 °C, de temperatuur van de kolom op 200 °C, de stroomsnelheid van het draaggas helium op 40 ml/min., de stroomsnelheid van waterstof en lucht op respectievelijk 50 en 500 ml/min. voor een optimale respons van de detector, het bereik op 1 en de demping op 64.

6. PROCEDURE

6.1. **Monsterbereiding**

Het nemen van zaadmonsters en het reduceren van laboratoriummonsters tot te analyseren monsters dient te gebeuren overeenkomstig de respectievelijk in bijlage I en II bij Verordening (EEG) nr. 1470/68 beschreven procedures.

Ten minste éénmaal per reeks monsters dient er een standaard-zaadmonster te worden geanalyseerd. Gegevens van de analyse van standaardmonsters zijn nuttig voor een controle op nauwkeurigheid en juistheid van de methode.

Droog 20 gram van het zaadmonster, als dat vochtig is, gedurende een nacht bij 45 °C in een oven met geforceerde luchtcirculatie, zodat het vochtgehalte 7 % of minder is. Maal 20 gram gedroogd zaad in een koffiemolen fijn.

Extraheer olie uit 3 gram gemalen zaad met 40 ml petroleumether (30-60 °C) of *n*-hexaan in een Zweedse buis die 3 stalen kogels bevat, afgesloten met een fluorsilicoonstop.

Schud gedurende 45 minuten horizontaal in een schudmachine. Filtreer onder vacuüm door Whatman-papier nr. 1 in een konische trechter en was tweemaal met oplosmiddel. Laat het gemalen monster in een zuurkast gedurende een nacht aan de lucht drogen. Maak, wanneer dit droog is, klonten fijn door te zeven, door een zeef van 280 micrometer. Meer dan 90 % van het monster moet de zeef passeren.

6.2. **Inactivering van myrosinase en extractie van de glucosinolaten**

Weeg maalsel (100 mg) af in een reageerbuis. Verwarm de buis en het monster in een kokend (95 °C) waterbad. Voeg na twee minuten kokend water toe (1 ml). Voeg na nog eens twee minuten 1 ml interne standaard toe (allylglucosinolaat). De concentratie van de interne standaard is afhankelijk van het geschatte glucosinolaatgehalte van het monster, zoals in de tabel hieronder is aangegeven.

Verwarm verder bij 95 °C gedurende 15 minuten. Bij een tweede bepaling wordt geen interne standaard toegevoegd om het allylglucosinolaatgehalte van het oorspronkelijke monster te bepalen. Laat de oplossing afkoelen en voeg 100 microliter toe van een oplossing die 0,5 mol bariumacetaat en 0,5 mol loodacetaat per liter water bevat en meng dit. Centrifugeer bij 2 000 × g. Bewaar het supernatans.

Glucosinolaatgehalte (micromol/gram zaad)	Concentratie van de interne standaard (micromol/ml)	Volume op de Sephadex op te brengen extract (ml)
< 15	1	1,0
15-40	2	0,5
> 40	3	0,2

6.3. **Bereiding van de minikolommen met DEAE Sephadex A-25**

Voor de bereiding van de kolommen kan gebruik worden gemaakt van plastic pipetpuntjes van 1 ml of anders van verkorte pasteurpipetten. Breng een klein plukje glaswol aan op de bodem van de „minikolom" en was met water (1 ml). Voeg een hoeveelheid suspensie van DEAE Sephadex A-25 (pyridine-acetaatvorm) toe, die overeenkomt met 20 mg droog gewicht Sephadex. Dit wordt het eenvoudigst gedaan door een van tevoren bepaald volume van een (goed gemengde) suspensie toe te voegen. Laat de gel bezinken en was met water.

Breng op de kolom het supernatans dat is verkregen na de behandeling met bariumlood. Laat dit wegzakken en was de kolom met 1 ml water en vervolgens met 1 ml pyridine-acetaat (0,02 M). Laat dit wegzakken, breng vervolgens op de kolom 50 µl gezuiverde sulfatase-oplossing en laat dit gedurende een nacht bij kamertemperatuur staan. Elueer de desulfoglucosinolaten met water (3 × 0,5 ml).

6.4. **Vorming van de derivaten van de desulfoglucosinolaten**

Bereid het silylerend reagens door MSHFBA (100 µl), TMCS (10 µl) en verdund 1-methylimidazool (50 µl) te mengen. Deze laatste oplossing wordt bereid door 1-methylimidazool (50 µl) te verdunnen met aceton (950 µl).

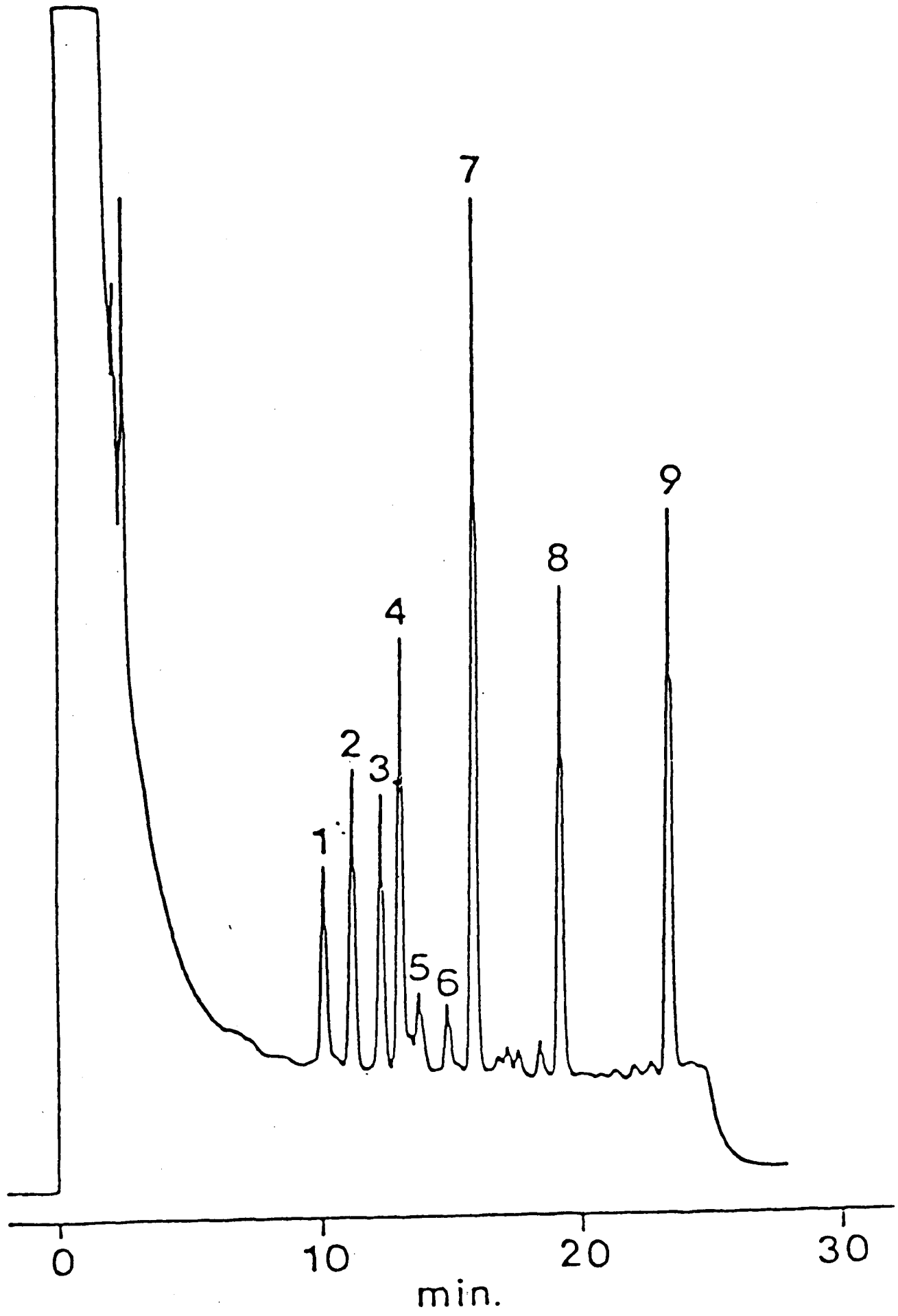
Droog een monster van het desulfoglucosinolaat-eluaat in een klein flesje dat goed kan worden afgesloten. Kleine hoeveelheden (5-10 microliter) kunnen worden gedroogd door gedurende 10 minuten op 120 °C te verhitten. Het kan ook worden gedroogd in een vacuüm-exsiccator boven P_2O_5. Voeg aan het gedroogde monster een gelijk volume silylerend reagens toe en sluit het flesje af. Verhit het flesje gedurende 5 minuten op 120 °C om de derivaatvorming volledig te maken.

6.5. **Scheiding van de derivaten van de desulfoglucosinolaten door gaschromatografie**

Injecteer 2 µl op de OV-7-kolom en houdt de temperatuur gedurende 5 minuten op 200 °C; programmeer vervolgens de temperatuur met 5 °C per minuut tot 280 °C. Houd de kolom gedurende 15 minuten op deze eindtemperatuur.

Verzamel de piekoppervlaktes voor: 3-butenylglucosinolaat, 4-pentenylglucosinolaat, 2-hydroxy-3-butenylglucosinolaat, 2-hydroxy-4-pentenylglucosinolaat, indolyl-3-methylglucosinolaat, 4-hydroxy-indolyl-3-methylglucosinolaat, en indien aanwezig: allylglucosinolaat en 4-hydroxy-benzylglucosinolaat.

Wanneer monsters worden geanalyseerd die een breed scala glucosinolaten bevatten of bij de eerste analyse nadat er een tijd niet is gewerkt, moet een monster herhaaldelijk worden geïnjecteerd tot de resultaten constant zijn.



Scheiding van desulfoglucosinolaten door gaschromatografie met temperatuurprogrammering.

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

6.6. **Kwantificering van de resultaten**

Allereerst moet het oppervlakte van allylglucosinolaat worden bepaald, dat is toe te schrijven aan eventuele verontreiniging. Het uit de analyse zonder toegevoegde interne standaard voor allylglucosinolaat verkregen oppervlakte wordt genormaliseerd met behulp van de oppervlakten voor 2-hydroxy-3-butenylglucosinolaat afkomstig van beide analyses, met en zonder toegevoegde interne standaard :

$$\text{oppervlakte allylglucosinolaat-TMS (zonder interne standaard)} \times \frac{\text{oppervlakte 2-HO-3-butenylglucosinolaat-TMS (met interne standaard)}}{\text{oppervlakte 2-HO-3-butenylglucosinolaat-TMS (zonder interne standaard)}} = \text{allylglucosinolaat-TMS uit verontreiniging}$$

Om het oppervlakte van de als interne standaard toegevoegde allyl te verkrijgen wordt dit oppervlakte vervolgens afgetrokken van het uit de analyse met toegevoegde interne standaard voor allylglucosinolaat verkregen totaaloppervlakte :

$$\text{oppervlakte allylglucosinolaat-TMS (met interne standaard)} - \text{oppervlakte allylglucosinolaat-TMS uit verontreiniging} = \text{oppervlakte allylglucosinolaat-TMS uit toegevoegde interne standaard}$$

De uit de analyse met toegevoegde interne standaard verkregen oppervlakten voor de individuele glucosinolaat-TMS-derivaten worden elk gedeeld door het oppervlakte dat is toe te schrijven aan het als interne standaard toegevoegde allylglucosinolaat en vervolgens vermenigvuldigd met het aantal micromolen allylglucosinolaat, dat is toegevoegd per gram aan de lucht gedroogd maalsel, waaruit de olie is geëxtraheerd ; het resultaat is dan het aantal micromolen glucosinolaat per gram aan de lucht gedroogd maalsel, waaruit de olie is geëxtraheerd :

$$\frac{\text{oppervlakte glucosinolaat-TMS}}{\text{oppervlakte van allylglucosinolaat-TMS van toegevoegde interne standaard}} \times \frac{\text{micromolen toegevoegd allylglucosinolaat}}{\text{gewicht (gram) aan de lucht gedroogd maalsel zonder olie}} = \frac{\text{micromolen glucosinolaat}}{\text{aan de lucht gedroogd maalsel zonder olie}}$$

Uitgedrukt per gewichtseenheid aan de lucht gedroogd zaad :

$$\frac{\text{micromolen glucosinolaat}}{\text{gram aan de lucht gedroogd maalsel zonder olie}} \times \frac{100 - \%\text{ olie}}{100} = \frac{\text{micromolen glucosinolaat}}{\text{gram aan de lucht gedroogd zaad}}$$

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

De hoeveelheden 3-butenyl-, 4-pentenyl-, 2-hydroxy-3-butenyl, 2-hydroxy-4-pentenyl, indolyl-3-methyl-, 4-hydroxyindolyl-3-methylglucosinolaat worden opgeteld en als één geheel weergegeven. Allyl- en 4-hydroxybenzylglucosinolaat worden, indien zij aanwezig zijn, afzonderlijk weergegeven als indicatie voor de verontreiniging met mosterdzaad of andere zaden van kruisbloemigen.

De resultaten worden weergegeven in micromol per gram aan de lucht gedroogd zaad, waarbij het gemiddelde van twee bepalingen en de spreiding R wordt vermeld (R = hoogste waarde van de twee bepalingen min de laagste van de twee)."