KOMMISSIONENS FORORDNING (EØF) Nr. 2435/86

af 29. juli 1986

om ændring af forordning (EØF) nr. 1470/68 om udtagelse og reduktion af prøver samt om bestemmelse af indholdet af olie, urenheder og fugtighed i olieholdige frø

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 136/66/EØF af 22. september 1966 om oprettelse af en fælles markedsordning for fedtstoffer (1), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 1454/86 (2), særlig artikel 24a, og

ud fra følgende betragtninger:

Som følge af de successive ændringer af Kommissionens forordning (EØF) nr. 1470/68 (3), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 3519/84 (4), dækker den nævnte forordnings titel kun delvis indholdet; titlen bør derfor tilpasses;

udtrykket »dobbeltlav« anvendt om raps- og rybsfrø afhænger af frøets indhold af glucosinolater; der bør fastsættes en passende metode til bestemmelse af dette indhold;

i henhold til Kommissionens forordning nr. 282/67/EØF af 11. juli 1967 om de nærmere regler for intervention ved olieholdige frø (5), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 2436/86 (6), og Kommissionens forordning (EØF) nr. 2681/83 af 21. september 1983 om gennemførelsesbestemmelser til støtteordningen for olieholdige frø (7), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 2434/86 (8), bør der fastsættes en fælles EF-metode til bestemmelse af glucosinolatindholdet;

de i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Forvaltningskomiteen for Fedstoffer —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

I forordning (EØF) nr. 1470/68 foretages følgende ændringer:

1. Titlen affattes således:

   »om udtagelse og reduktion af prøver samt om analysemetoder for så vidt angår olieholdige frø«.

2. Som artikel 2c indsættes:

   »*Artikel 2c*

   Den i artikel 4 i forordning nr. 282/67/EØF og artikel 32 i forordning (EØF) nr. 2681/83 omhandlede bestemmelse af glucosinolatindholdet foretages efter metoden i bilag VIII til nærværende forordning, uden at dette indskrænker anvendelsen af de i nævnte artikler omhandlede overgangsbestemmelser.«

3. Bilaget indsættes som bilag VIII.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på dagen for offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende.*

Den anvendes fra den 1. juli 1986.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 29. juli 1986.

På Kommissionens vegne

Frans ANDRIESSEN

Næstformand

(1) EFT nr. 172 af 30. 9. 1966, s. 3025/66.
(2) EFT nr. L 133 af 21. 5. 1986, s. 8.
(3) EFT nr. L 239 af 28. 9. 1968, s. 2.
(4) EFT nr. L 328 af 15. 12. 1984, s. 12.
(5) EFT nr. L 151 af 13. 7. 1967, s. 1.
(6) Se side 61 i denne Tidende.
(7) EFT nr. L 266 af 28. 9. 1983, s. 1.
(8) Se side 51 i denne Tidende.

BILAG

»BILAG VIII

RAPS- OG RYBSFRØ

Bestemmelse af indholdet af glucosinolater

1. EMNE

Denne metode er udarbejdet til bestemmelse af indholdet af de vigtigste glucosinolater i raps- og rybsfrø.

2. PRINCIP

2.1. Måling af trimethylsilylderivater af enzymatisk desulfonerede glucosinolater ved temperaturprogrammet gaschromatografi med anvendelse af sinigrin som intern standard.

2.2. Metoden giver mængden, i mikromol pr. gram lufttørret frø, af seks vigtige glucosinolater i raps- og rybsfrø og to glucosinolater i sennepsfrø, der kan være en urenhed.

3. DE VIGTIGSTE REAGENSER

3.1. DEAE Sephadex A-25.

3.2. SP Sephadex C-25.

3.3. Sulfatase type H-1.

3.4. Allylglucosinolat (sinigrin).

3.5. Bariumacetat.

3.6. Blyacetat.

3.7. Pyridin (siluleringskvalitet).

3.8. N-methyl-n-trimethylsilylheptafluorbutyramid (MSHFBA).

3.9. Trimethylchlorsilan (TMCS).

3.10. 1-methylimidazol.

4. DET VIGTIGSTE UDSTYR

4.1. Svenske ekstrationsrør, 70 ml, af rustfrit stål og med åbning 18 mm ID, 17 mm kuglelejer, propper af fluorsiliconegummi nr. 3 og horisontalt rysteapparat (Troeng 1955) eller et tilsvarende rysteapparat med stålkugler.

4.2. Hurtigtgående kaffemølle.

4.3. Ovn med luftcirkulation.

4.4. Gaschromatograf med temperaturprogrammering og flammeionisationsdetektor.

4.5. Gaschromatografisk kolonne af glas med en længde på ca. 2 m og en indre diameter 2 mm fyldt med 2 % OV-07 på diatomit CLQ 80-100 maskevidde.

5. KLARGØRING

5.1. **Klargøring af DEAE Sephadex A-25 på acetatform og »pyridinacetat«-form**

10 g DEAE Sephadex A-25 afvejes i et 250 ml bægerglas, der tilsættes 150 ml vand, og Sephadexen henstår til kvældning natten over. Sephadex-opslæmningen hældes i en kolonne på 20 × 400 mm.

500 ml 0,5 N natriumhydroxid (10 g opløst i vand og fortyndet til 500 ml) ledes gennem kolonnen. Kolonnen skylles med 250 ml vand for at fjerne overskuddet af natriumhydroxid, idet det kontrolleres, at pH er faldet til neutral.

$^1/_{10}$ af Sephadexen udtages til omdannelse til acetatform. Den opslæmmes i vand og hældes i en kolonne på 15 × 200 mm. 100 ml 0,5 M eddikesyre (2,9 ml isedikke fortyndet til 100 ml) ledes gennem kolonnen. Der skylles med 250 ml vand. Opbevares opslæmmet i vand i en 250 ml kolbe.

De resterende $^9/_{10}$ Sephadex sedimenteres i en kolonne med vand. Der ledes 400 ml 0,5 M pyridinacetat (19,8 ml pyridin plus 15 ml isedikke fortyndet til 500 ml med vand) gennem kolonnen. Der skylles med 250 ml vand. Opbevares som opslæmning i vand i en 250 ml kolbe.

5.2. Klargøring af SP Spehadex C-25 på natriumform

1 g SP Sephadex C-25 afvejes i et 100 ml bægerglas, der tilsættes 75 ml vand, og Sephadexen henstår til kvældning natten over. Sephadex-opslæmningen hældes i en kolonne på 15 × 200 mm, og der skylles med 250 ml vand. Opbevares som opslæmning i vand i en 250 ml kolbe.

5.3. Rensning af sulfatase

70 mg sulfatase type H-1 afvejes i et 16 × 150 mm reagensglas. Sulfatasen opløses i 3 ml vand og fortyndes med et lige så stort volumen ethanol. Der centrifugeres i 10 minutter ved 2 000 g. Centrifugatet dekanteres over i et andet glas, og bundfaldet bortkastes. Der sættes 9 ml ethanol til centrifugatet, og der centrifugeres atter i 10 minutter ved 2 000 g. Centrifugatet bortkastes, og bundfaldet opløses i 2 ml vand.

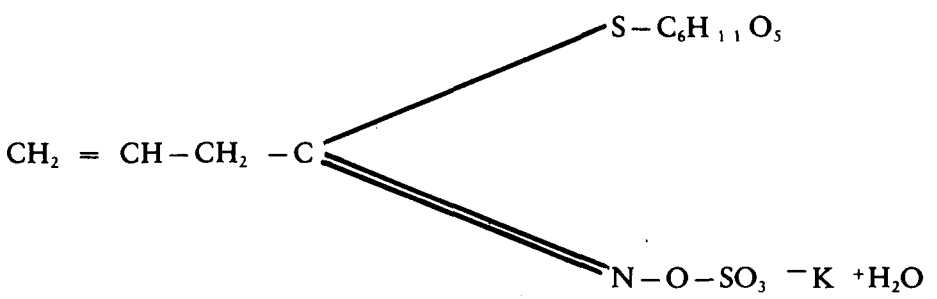
I to pipetter anbringes 100 µl af det vandige lag over DEAE Sephadex A-25 på acetatform. Dernæst anbringes der så meget DEAE Sephadex A-25 på acetatform, at der dannes en 15 mm høj kolonne, hvilket svarer til 20 mg tør Sephadex.

I den anden anbringes 100 µl af det vandige lag over SP Sephadex C-25 på natriumform. Dernæst anbringes der så meget klargjort SP Sephadex C-25 på natriumform, at der dannes en tilsvarende kolonne. Den vandige enzymopløsning ledes først gennem kolonnen med DEAE Sephadex A-25 på acetatform og dernæst gennem kolonnen med SP Sephadex C-25 på natriumform.

Sulfataseopløsningen anvendes ufortyndet på kolonnerne i pipettespidserne. Eluatet opbevares ved − 20° C og optøs først umiddelbart før brug.

5.4. Fremstilling af intern standard

Allylglucosinolat (monohydrat, kaliumsalt)



Molekylvægt :

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

Til fremstilling af en opløsning med 1 µmol/ml afvejes 41,5 mg, der fortyndes til 100 ml.

5.5. Fremstilling af gaschromatografikkolonne med OV-7

Først skylles indersiden af en 4′ × 0,25″ glaskolonne med ID 2 mm ved at forbinde dens ene ende til en vandluftpumpe med en gummislange for at frembringe svagt vakuum. 100 ml chloroform, dernæst 100 ml acetone og til sidst 100 ml petroleumether (kp 30-60° C) suges gennem kolonnen. Der suges luft igennem kolonnen for at tørre den, hvorefter den tørres i ovn med luftcirkulation.

Den ene ende tilproppes med glasuld. Denne ende af kolonnen forbindes med vakuum. Der tilsættes kolonnepakning, 2 % OV-7 på diatomit CLQ 80-100 maskevidde, gennem en lille tragt, der med et lille stykke Tygonslange er forbunder med kolonnens anden ende. For at pakningen lettere skal kunne løbe gennem bøjningerne, bankes der let på kolonnen, indtil den er fuld og regelmæssigt pakket. Tragt og Tygonslange fjernes. Ved hjælp af en Pasteur-pipette med gummibold blæses så meget pakning ud ad enden af kolonnen, at den kan tilproppes med glasuld.

Kolonnen monteres på gaschromatografens injektionsblok ved hjælp af en møtrik af rustfrit stål, en omvendt monteret bagferrul og en grafitferrul. Der ledes heliumbæregas gennem kolonnen ; temperaturprogrammeringen startes ved 100° C og indstilles til 1° C pr. minut indtil 290° C, som fastholdes natten over. Ovnen afkøles, og kolonnen skrues fast på detektoren med en møtrik af rustfrit stål, bagferrul og forferrul af grafit.

Injektionsblokkens temperatur indstilles til 250° C, detektortemperaturen til 300° C, kolonnetemperaturen til 200° C, heliumbæregassens hastighed til 40 ml pr. minut, hydrogen- og luftstrømmen til henholdsvis 50 og 500 ml pr. minut, så detektoren får størst mulig følsomhed, måleområdet (range) til 1 og dæmpningen (attenuation) til 64.

6. FREMGANGSMÅDE

6.1. Prøveforberedelse

Udtagning af frøprøver og reduktion af laboratorieprøver til analyseprøver foretages i overensstemmelse med de fremgangsmåder, der er beskrevet i henholdsvis bilag I og II til forordning (EØF) nr. 1470/68.

For hver batch af prøver bør der mindst én gang analyseres en standardfrøprøve. Data fra analyser af standardprøver er nyttige til kontrol af metodens præcision og nøjagtighed.

Hvis frøprøven er fugtig, tørres 20 g heraf ved 45° C natten over i en ovn med luftcirkulation for at opnå en fugtighed på 7 %. 20 g tørrede frø males i en kaffemølle.

I et svensk rør med tre stålkugler lukket med en prop af fluorsiliconegummi ekstraheres olien fra 3 g formalede frø med 40 ml petrolumether (kp 40-60° C) eller n-hexan. Der rystes vandret i et rysteapparat i 45 minutter. Der filtreres under vakuum på papirfilter (Whatman nr. 1) i en konisk tragt og skylles to gange med frisk opløsningsmiddel. Melet lufttørres natten over i stinkskab. Efter tørringen fjernes eventuelle klumper, om nødvendigt med en 280 µm sigte. Mere end 90 % af prøven skal passere gennem sigten.

6.2. Deaktivering af myrosinase og ekstraktion af glucosinolater

En mængde mel (100 mg) afvejes i et reagensglas, som opvarmes på kogende vandbad (95° C). Efter to minutter tilsættes kogende vand (1 ml), og efter yderligere to minutter tilsættes intern standard (1 ml) (allylglucosinolat). Koncentrationen af den interne standard er som anført i tabellen afhængig af prøvens skønnede glucosinolatindhold. Glasset holdes opvarmet til 95° C i 15 minutter.

For at bestemme den originale prøves indhold af allyglucosinolat, benyttes en anden prøve, til hvilken der ikke tilsættes intern standard.

Blandingen afkøles, hvorefter der tilsættes 100 µl af en opløsning indeholdende 0,5 mol bariumacetat og 0,5 mol blyacetat pr. liter vand og blandes. Der centrifugeres ved 2 000 g, og centrifugatet gemmes.

Glucosinolatindhold (µmol/g frø)	Koncentration af intern standard opløsning (µmol/ml)	Ekstraktmængde, der skal behandles med Sephadex (ml)
< 15	1	1,0
15-40	2	0,5
> 40	3	0,2

6.3. Fremstilling af minikolonner med DEAE — Sephadex A-25

Passende kolonner kan fremstilles ved anvendelse af 1 ml plasticpipettespidser eller ved hjælp af afkortede Pasteur-pipetter. En lille glasuldsprop anbringes i bunden af »minikolonnen«, og der vaskes med vand (1 ml). Der tilsættes en mængde opslæmning af DEAE Sephadex A-25 (pyridinacetatform) svarende til 20 mg tør Sephadex. Dette gøres enklest ved at tilsætte et i forvejen bestemt volumen af en (omhyggeligt blandet) opslæmning. Når gelen har sat sig, skylles der med vand.

Centrifugatet fra barium/bly-behandlingen sættes på kolonnen. Når det er løbet igennem, skylles kolonnen først med 1 ml vand og dernæst med 1 ml pyridinacetat (0,02 M). Når kolonnen er løbet tør, sættes der 50 µl renset sulfataseopløsning på, og den henstår natten over ved stuetemperatur. Desulfoglucosinolaterne elueres med vand (3 × 0,5 ml).

6.4. Derivatisering af desulfoglucosinolaterne

Silyleringsreagenset fremstilles ved at blande MSHFBA (100 µl) og fortyndet 1-methylimidazol (50 µl) og acetone (950 µl).

En prøve af desulfoglucosinolateluatet tørres i et lille glas, der kan lukkes tæt til. Små mængder (5-10 µl) kan tørres ved opvarmning til 120° C i ti minutter.

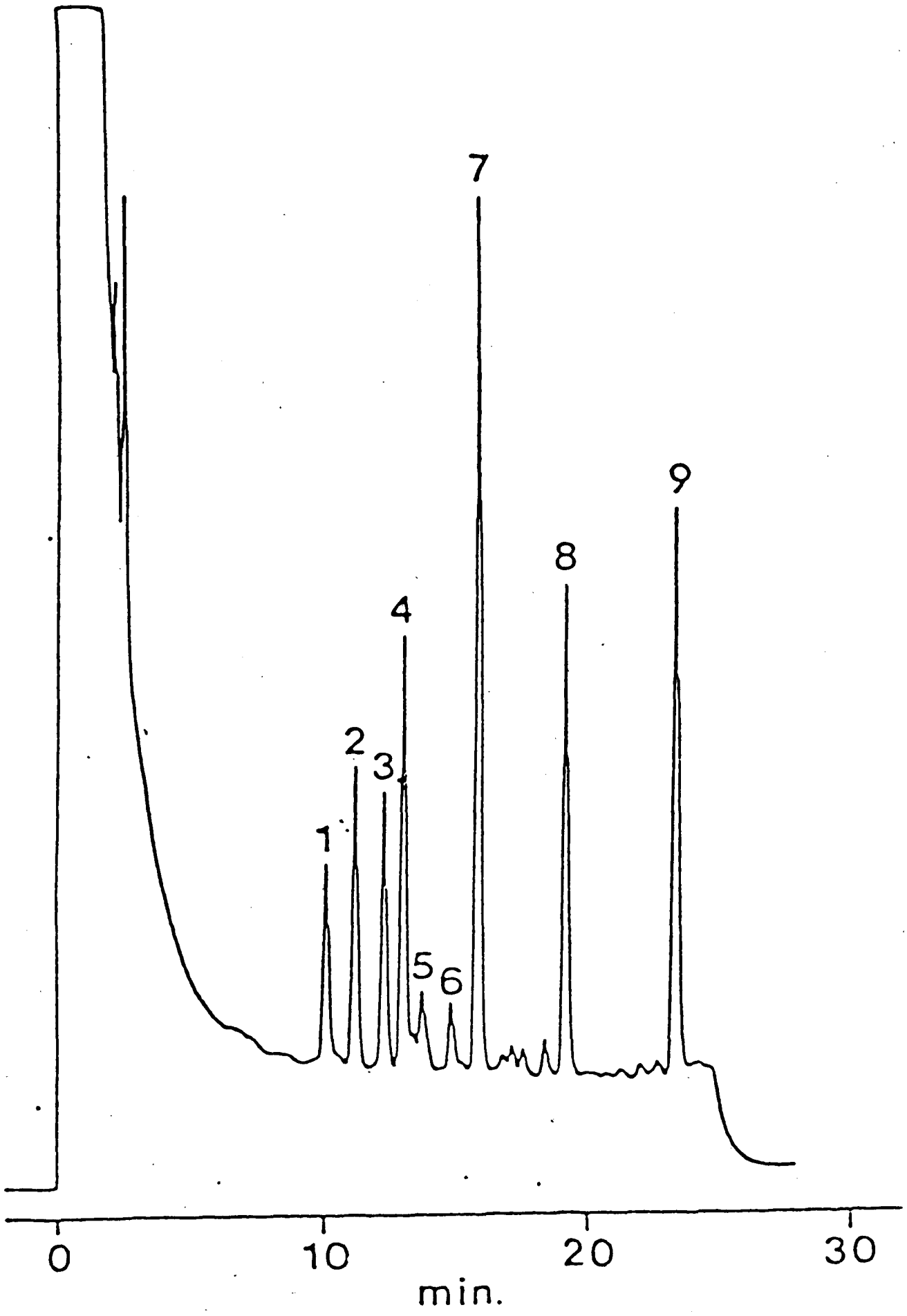
Eller der tørres over p_2O_5 i en vakuum ekssikkator. Til den tørrede prøve tilsættes et lige så stort volumen silyleringsreagens, og glasset lukkes tæt til. Derivatiseringen finder sted ved opvarmning af glasset til 120° C (fem minutter).

6.5. Adskillelse af desulfoglucosinolatderivaterne ved gaschromatografi

Der indsprøjtes 2 µl i OV-7-kolonnen, som holdes ved 200° C i fem minutter, hvorefter temperaturprogrammeringen indstilles på 5° C pr. minut op til 280° C. Denne temperatur fastholdes i 15 minutter.

Toppene optegnes for:
3-butenylglucosinolat, 4-pentenylglucosinolat, 2-hydroxy-3-butenylglucosinolat, 2-hydroxy-4-pentenylglucosinolat, indolyl-3-methylglucosinolat, 4-OH-indolyl-3-methylglucosinolat samt allylglucosinolat, og 4-hydroxy benzylglucosinolat.

Ved analysering af prøver med stærkt varierende glucosinolatindhold eller ved gentagelse af chromatograferingen efter nogle timers pause er det nødvendigt at indsprøjte samme prøve flere gange, indtil resultaterne er konstante.



Adskillelse af desulfoglucosinolatderivater ved temperaturprogrammeret gaschromatografi

(1) allyl-,
(2) 3-butenyl-,
(3) 4-penthenyl-,
(4) 2-hydroxy-3-butenyl-,
(5) 2-hydroxy-4-pentenyl-,
(6) saccharose,
(7) benzyl-,
(8) 4-hydroxy-benzyl,
(9) 4-hydroxyindolyl-3-methyl-.

6.6. Beregning af resultater

Først bestemmes arealet af allylglucosinolat, som skyldes eventuel forurening.

Det allyglucosinolat-areal, der frekommer ved analysen uden tilsætning af intern standard, korrigeres ved hjælp af arealerne for 2-hydroxy-3-butenylglucosinolat fra begge analyser, med og uden tilsætning af intern standard :

$$\text{areal for allyl-glucosinolat TMS (uden tilsætning af intern standard)} \times \frac{\text{areal for 2-HO-3-butenylglucosinolat TMS (med tilsætning af intern standard)}}{\text{areal for 2-HO-3-butenylglucosinolat TMS (uden tilsætning af intern standard)}} = \text{allyllucosinolat TMS fra forurening}$$

Dernæst bestemmes arealet af allylglucosinolat, som svarer til den tilsatte interne standard. Det første areal trækkes fra det samlede allylglucosinolat-areal fremkommet ved analysen med tilsætning af intern standard :

$$\text{areal for allylglucosinolat TMS (med intern standard)} - \text{areal for allylglucosinolat TMS fra forurening} = \text{areal for allylglucosinolat TMS fra tilsat intern standard}$$

Glucosinolatindholdet i mikromol pr. gram oliefrit lufttørret mel fremkommer ved for hvert glucosinolat-TMS-derivat at dividere arealet fra analysen med tilsætning af intern standard med det areal, der svarer til den mængde allylglucosinolat, der er tilsat som intern standard, og dernæst at gange med den mængde allylglucosinolat, der er tilsat pr. gram oliefrit lufttørret mel, udtrykt i mikromol :

$$\frac{\text{areal for glucosinolat-TMS}}{\text{areal for allylglucosinolat TMS fra tilsat intern standard}} \times \frac{\mu\text{mol allylglucosinolat}}{\text{g oliefrit lufttørret mel}} = \frac{\mu\text{mol glucosinolat}}{\text{g oliefrit lufttørret mel}}$$

Resultaterne udtrykkes i forhold til frømængde :

$$\frac{\mu\text{mol glucosinolat}}{\text{g oliefrit lufttørret mel}} \times \frac{100 - \text{olieindholdet (\%)}}{100} = \frac{\mu\text{mol glucosinolat}}{\text{g lufttørret frø}}$$

7. RAPPORTERING AF RESULTATER

Mængderne af 3-butenyl-, 4-pentenyl-, 2-hydroxy-3-butenyl-, 2-hydroxy-4-pentenyl-, indolyl-3-methyl- og 4-OH-indolyl-3-methylglucosinolat adderes og anføres samlet. Et eventuelt indhold af allyl- og 4-hydroxybenzylglucosinolat angives særskilt som tegn på forurening med sennep eller andet frø af korsblomstret ukrudt.

Resultaterne anføres i mikromol pr. gram lufttørret frø som gennemsnitsværdi af to bestemmelser og med angivelse af forskellen R (R = højeste værdi — laveste værdi af de to bestemmelser).