ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 2435/86 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 29ης Ιουλίου 1986

για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 1470/68 περί λήψεως και αναγωγής δειγμάτων καθώς και περί προσδιορισμού περιεκτικότητας των ελαιούχων σπόρων σε έλαιο, σε ξένα σώματα και σε υγρασία

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

τον κανονισμό αριθ. 136/66/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 1966 περί δημιουργίας κοινής οργανώσεως αγοράς στον τομέα των λιπαρών ουσιών [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1454/85 [2], και ιδίως το άρθρο 24α,

Εκτιμώντας:
ότι, λόγω των διαδοχικών τροποποιήσεων του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 1470/68 της Επιτροπής [3], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3519/84 [4], ο τίτλος του εν λόγω κανονισμού δεν αντιστοιχεί παρά μόνο εν μέρει στο περιεχόμενό του· ότι πρέπει, συνεπώς, να γίνει προσαρμογή του τίτλου·

ότι ο χαρακτηρισμός «διπλό μηδέν» για τους κραμβόσπορους και τους γογγυλόσπορους εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε γλυκοζινιλικές ενώσεις· ότι, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας αυτής, πρέπει να προβλεφθεί κατάλληλη μέθοδος·

ότι, κατ' εφαρμογή του κανονισμού αριθ. 282/67/ΕΟΚ της Επιτροπής της 11ης Ιουλίου 1967 περί των λεπτομερειών παρεμβάσεως για τους ελαιούχους σπόρους [5], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2436/86 [6], καθώς και του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2681/83 της Επιτροπής της 21ης Σεπτεμβρίου 1983 για τις λεπτομέρειες εφαρμογής του καθεστώτος ενίσχυσης για τους ελαιούχους σπόρους [7], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2434/86 [8], πρέπει να οριστεί ενιαία μέθοδος στην Κοινότητα, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε γλυκοζινολικές ενώσεις·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Επιτροπής Διαχείρισης Λιπαρών Ουσιών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1470/68 τροποποιείται ως εξής:

1. Ο τίτλος του κανονισμού αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

   «σχετικά με τη λήψη και την αναγωγή δειγμάτων καθώς και με τις μεθόδους αναλύσεων των ελαιούχων σπόρων».

2. Παρεμβάλλεται το άρθρο 2γ:

   «*Άρθρο 2γ*

   Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε γλυκοζινολικές ενώσεις που αναφέρεται στο άρθρο 7 του κανονισμού αριθ. 282/67/ΕΟΚ και στο άρθρο 32 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2681/83 πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο που καθορίζεται στο παράρτημα VIII, με επιφύλαξη των μεταβατικών διατάξεων που αναφέρονται στα εν λόγω άρθρα.»

3. Το παράρτημα του παρόντος κανονισμού προστίθεται ως παράρτημα VIII.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την ημέρα της δημοσίευσής του στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων.*

Εφαρμόζεται από την 1η Ιουλίου 1986.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 29 Ιουλίου 1986.

Για την Επιτροπή

Frans ANDRIESSEN

Αντιπρόεδρος

---

(1) ΕΕ αριθ. 172 της 30. 9. 1966, σ. 3025/66.
(2) ΕΕ αριθ. L 133 της 21. 5. 1985, σ. 87.
(3) ΕΕ αριθ. L 239 της 28. 9. 1968, σ. 2.
(4) ΕΕ αριθ. L 328 της 15. 12. 1984, σ. 12.
(5) ΕΕ αριθ. 151 της 13. 7. 1967, σ. 1.
(6) Βλέπε σ. 61 της παρούσας Επίσημης Εφημερίδας.
(7) ΕΕ αριθ. L 266 της 28. 9. 1983, σ. 1.
(8) Βλέπε σ. 51 της παρούσας Επίσημης Εφημερίδας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII

ΚΡΑΜΒΟΣΠΟΡΟΙ ΚΑΙ ΓΟΓΓΥΛΟΣΠΟΡΟΙ

Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε γλυκοζινολικές ενώσεις

1. **Θέμα**

Η παρούσα μέθοδος έχει μελετηθεί για τον προσδιορισμό της σύστασης και της περιεκτικότητας σε κύριες γλυκοζινολικές ενώσεις των κραμβόσπορων και γογγυλόσπορων.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

2.1. Μέτρηση των τριμεθυλοσιλυλο-παραγώγων των γλυκοζινολικών ενώσεων μετά από ενζυματική αποθείωση με αέριο χρωματογραφία προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας κατά την οποία χρησιμοποιείται σινιγρίνη σαν εσωτερικό πρότυπο.

2.2. Με τη μέθοδο προσδιορίζονται οι ποσότητες, σε μικρογραμμομόρια ανά γραμμάριο ξηρανθέντων στον αέρα σπόρων, έξι βασικών γλυκοζινολικών ενώσεων που περιέχονται στους κραμβόσπορους και γογγυλόσπορους καθώς και δύο γλυκοζινολικών ενώσεων που περιέχονται στους σπόρους του σιναπιού που είναι δυνατό να υπάρχουν σαν ξένες προσμείξεις

3. **Βασικά αντιδραστήρια**

3.1. DEAE Sephadex A-25

3.2. SP Sephadex C-25

3.3. Σουλφατάση, τύπου H-1

3.4. Αλλυλογλυκοζινολικό κάλιο (Σινιγρίνη)

3.5. Οξικό βάριο

3.6. Οξικός μόλυβος

3.7. Πυριδίνη (με βαθμό καθαρότητας για σιλυλίωση)

3.8. N-μεξυλο-N-τριμεθυλοσιλυλοεπ/αφθοροβουτυραμίδιο (MSHFBA)

3.9. Τριμεθυλοχωροσιλάνιο (TMCS)

3.10. 1-Μεθυλιμιδαζίλιο

4. ΒΑΣΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

4.1. Σουηδικοί σωλήνες εκχύλισης των 70 ml, από ανοξείδωτο χάλυβα με στόμιο εσωτερικής διαμέτρου 18 mm, σφαιροτριβείς των 17 mm, ελαστικά πώματα από φθοροσιλικόνη αριθ. 3 και οριζόντιος δονητής (Troeng 1955) ή ισοδύναμος αναδευτήρας με χαλύβδινα σφαιρίδια.

4.2. Μύλος του καφέ υψηλής ταχύτητας.

4.3. Κλίβανος εξαναγκασμένης κυκλοφορίας του αέρα.

4.4. Αέριος χρωματογράφος με δυνατότητα προγραμματισμού της θερμοκρασίς και με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.

4.5. Γυάλινη στήλη αερίου χρωματογραφίας, μήκους 2 m περίπου, εσωτερικής διαμέτρου 2 mm, πληρωμένη με 2 % OV-7 επί γης διατόμων CLQ mesh 80-100.

5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

5.1. **Παρασκευή της οξικής και της πυριδινοξικής μορφής του DEAE Sephadex A-25**

Ζυγίζονται 10 g του DEAE Sephadex A-25 μέσα σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml, προστίθενται 150 ml νερού και αφήνεται το Sephadex όλη τη νύχτα για να διογκωθεί. Ο πολτός του Sephadex φέρεται σε στήλη διαστάσεων 20 × 400 mm.

Διοχετεύεται μέσω της στήλης 500 ml υδροξειδίου του νατρίου 0,5 N (διαλύονται 10 g σε νερό και συμπληρώνονται ο όγκος μέχρι 500 ml). Η στήλη εκπλύνεται με 250 ml νερού, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του υδροξειδίου του νατρίου, και ελέγχεται το pH αν είναι ουδέτερο.

Παραλαμβάνεται το $^1/_{10}$ του Sephadex για να μετατραπεί στην οξική μορφή. Σχηματίζεται πολτός με νερό και χύνεται σε στήλη διαστάσεων 15 × 200 mm. Διοχετεύονται μέσω της στήλης 100 ml οξικού οξέος 0,5 M (2,9 ml παγόμορφου οξικού οξέος, αραιώνονται με νερό μέχρι το 100 ml). Η στήλη εκπλύνεται με 250 ml νερού. Το περιεχόμενο της στήλης μεταφέρεται σε φιάλη των 250 ml, σχηματίζεται πολτός με την προσθήκη νερού και η φιάλη αποθηκεύεται.

Στοιβάζονται τα υπόλοιπα $^9/_{10}$ του Sephadex σε στήλη με τη βοήθεια νερού. Διοχετεύονται μέσω της στήλης 400 ml οξικής πυριδίνης 0,5 M (19,8 ml πυριδίνης και 15 ml παγόμορφου οξικού οξέος αραιώνονται με νερό μέχρι τα 500 ml). Η στήλη εκπλύνεται με 250 ml νερού. Το περιεχόμενο της στήλης μεταφέρεται σε φιάλη 250 ml, προστίθεται νερό και η φιάλη αποθηκεύεται.

5.2. **Παρασκευή της μετά νατρίου μορφής του SP Sephadex C-25**

Ζυγίζεται 1 g του SP Sephadex C-25 μέσα σε ποτήρι ζέσεως 100 ml, προστίθενται 75 ml νερό και αφήνεται το Sephadex όλη τη νύχτα για να διογκωθεί. Ο πολτός του Sephadex φέρεται σε στήλη διαστάσεων 15 × 200 ml. Η στήλη εκπλύνεται με 250 ml νερού. Το περιεχόμενο της στήλης μεταφέρεται σε φιάλη των 250 ml, προστίθεται νερό και η φιάλη αποθηκεύεται.

5.3. **Καθαρισμός της σουλφατάσης**

Ζυγίζεται 70 mg σουλφατάσης τύπου H-1 μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα διαστάσεων 16 × 150 mm. Προστίθενται 3 ml νερού για να διαλυθεί η σουλφατάση και το διάλυμα αραιώνεται με ίσο όγκο αιθανόλης. Φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 2 000 x g. Το υπερκείμενο αποχύνεται σε ένα δεύτερο σωλήνα ενώ το ίζημα απορρίπτεται. Προστίθενται στο υπερκείμενο 9 ml αιθανόλης και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 2 000 x g. Το υπερκείμενο χύνεται και το ίζημα διαλύεται σε 2 ml νερού.

Ένα μικρό βύσμα από υαλοβάμβακα τοποθετείται σε καθένα από δύο ρύγχη σιφωνίου Eppendorz.

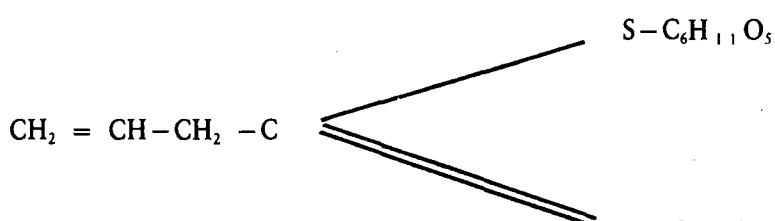
Στο πρώτο προστίθενται 100 μικρόλιτρα από την υδατική στοιβάδα που έχει σχηματιστεί πάνω από την οξική μορφή της DEAE Sephadex A-25. Στη συνέχεια προστίθεται ποσοτικά η οξική μορφή της DEAE Sephadex A-25 μέχρι να σχηματιστεί στήλη ύψους 15 mm, που ισοδυναμεί με 20 mg ξηρού Sephadex.

Στο δεύτερο ρύγχος προστίθενται 100 μικρόλιτρα από την υδατική στοιβάδα που έχει σχηματιστεί πάνω από τη μετά νατρίου μορφή του SP Sephadex C-25 ώστε να σχηματισθεί μία παρόμοια με την παραπάνω στήλη. Το υδατικό διάλυμα του ενζύμου διοχετεύεται πρώτα μέσω της στήλης με την οξική μορφή του SP Sephadex C-25.

Το διάλυμα σουλφατάσης χρησιμοποιείται αναραίωτο σε στήλες από ρύγχη σιφωνίων. Το έκλουσμα αποθηκεύεται στους —20 °C και τήκεται αμέσως πριν από τη χρήση.

5.4. **Παρασκευή του εσωτερικού προτύπου**

Αλλυλογλυκοζινολική ένωση (το μετά καλίου άλας με ένα μόριο νερού)



Μοριακό βάρος

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

Για να παρασκευασθεί διάλυμα 1 μικρογραμμομορίου ανά ml ζυγίζονται με ακρίβεια 41,5 mg και συμπληρώνονται μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

5.5. **Προετοιμασία της στήλης OV-7 για την αέριο χρωματογραφία**

Πρώτα πλένεται η εσωτερική επιφάνεια μιας γυάλινης στήλης εξωτερικών διαστάσεων 4″ × 0,25″ και εσωτερικής διαμέτρου 2 mm με σύνδεση του ενός άκρου της στήλης με αναρροφητήρα νερού μέσω ελαστικού σωλήνα και εφαρμογή χαμηλού κενού. Διοχετεύονται μέσω της στήλης 100 ml χλωροφορμίου, 100 ml ακετόνης και μετά 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα (σ.ζ. 30-60° C). Η στήλη ξηραίνεται με ρεύμα αέρα και στη συνέχεια σε κλίβανο εξαναγκασμένης κυκλοφορίας αέρα. Πωματίζεται το ένα άκρο της στήλης με υαλοβάμβακα. Στο άκρο αυτό εφαρμόζεται κενό με τη βοήθεια μιας αντλίας. Ταυτόχρονα προστίθεται το υλικό πληρώσεως της στήλης, 2 % OV-7 σε γη διατόμων CLQ mesh 80-100, από το άλλο άκρο όπου είναι προσαρμοσμένο ένα μικρό χωνί μέσω ενός κοντού σωλήνα από Tygon. Η στήλη κτυπιέται ελαφρά για να διευκολυνθεί η ροή του υλικού πληρώσεως γύρω από τις σπείρες της ώστε να στοιβαστει εντελώς και ομοιόμορφα. Το χωνί και ο σωλήνας από Tygon απομακρύνονται. Εμφυσάται αρκετή ποσότητα υλικού πληρώσεως με τη βοήθεια σιφωνίου Pasteur και ενός ελαστικού «πουάρ» ώστε το άκρο της στήλης να μπορεί να πωματιστεί με τον υαλοβάμβακα.

Η στήλη στερεώνεται στη θυρίδα εγχύσεως του αέριου χρωματογράφου με τη βοήθεια ενός περικοχλίου από ανοξείδωτο χάλυβα, ενός οπισθίου δακτυλίου στερεωμένου στην πίσω πλευρά καθώς και ενός δακτυλίου από γραφίτη. Διοχετεύεται φέρον αέριο ήλιο μέσω της στήλης, προγραμματίζεται η θερμοκρασία ώστε να ανεβεί από τους 100 °C στους 290 °C με ταχύτητα 1 °C ανά λεπτό και το σύστημα αφήνεται έτσι όλη νύχτα. Ο κλίβανος ψύχεται και η στήλη προσαρμόζεται στον ανιχνευτή με τη βοήθεια ενός περικοχλίου από ανοξείδωτο χάλυβα, ενός οπισθίου δακτυλίου και ενός εμπροσθίου δακτυλιου από γραφίτη.

Ρυθμίζονται: η θερμοκρασία εγχύσεως στους 250 °C, του ανιχνευτή στους 300 °C και της στήλης στους 200 °C, η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου ηλίου σε 40 ml ανά λεπτό, οι ταχύτητες ροής του υδρογόνου και του αέρα σε 30 και 500 ml ανά λεπτό αντίστοιχα ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη απόκριση του ανιχνευτή, η κλίμακα στο 1 και η εξασθένηση στο 64.

6. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

6.1. **Προετοιμασία των δειγμάτων**

Η συλλογή των δειγμάτων από σπόρους και η παρασκευή δειγμάτων για την ανάλυση από τα εργαστηριακά δείγματα πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στα παραρτήματα I και II αντίστοιχα του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 1470/68.

Θα πρέπει να αναλύεται ένα πρότυπο δείγμα σπόρων τουλάχιστον μία φορά ανά παρτίδα δειγμάτων. Τα δεδομένα απο τις αναλύσεις του προτύπου δείγματος χρησιμεύουν στον έλεγχο της ακρίβειας και της ευαισθησίας της μεθόδου.

Εάν το δείγμα σπόρων είναι υγρό, ξηραίνονται 20 g από αυτό σε κλίβανο εξαναγκασμένης κυκλοφορίας αέρα στους 45 °C όλη τη νύχτα ώστε να μειωθεί η υγρασία σε 7 %. Αλέθονται 20 g ξηρών σπόρων σε μύλο του καφέ. Εκχυλίζεται το έλαιο από 3 g αλεσμένων σπόρων σε 40 ml πετρελαϊκού αιθέρα (σ.ζ. 30-60 °C) ή n-εξανίου μέσα σε σουηδικό σωλήνα που περιέχει 3 χαλύβδινα σφαιρίδια και είναι κλεισμένος με πώμα από φθοροσιλικόνη. Ο σωλήνας ανακινείται οριζόντια σε μηχανικό δονητή επί 45 λεπτά. Το εκχύλισμα διηθείται υπό κενό σε κωνικό χωνί μέσω διηθητικού χάρτη Whatman αριθ. 1 που πλένεται δύο φορές με καθαρό διαλύτη. Το αλευρόμορφο δείγμα ξηραίνεται με ρεύμα αέρα, με απαγωγό, όλη τη νύχτα. Μετά την ξήρανση, οι τυχόν σβώλοι θραύονται με κοσκίνισμα σε κόσκινο των 280 μm. Από το κόσκινο πρέπει να περάσει περισσότερο από το 90 % του δείγματος.

6.2. **Αδρανοποίηση της μυροζινάσης και εκχύλιση των γλυκοζινολικών ενώσεων**

Ζυγίζεται αλεύρι (100 mg) μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ο σωλήνας με το δείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο που βράζει (95 °C). Μετά από 2 λεπτά προστίθεται βραστό νερό (1 ml). Μετά από 2 ακόμα λεπτά προστίθεται εσωτερικό πρότυπο (αλλυλογλυκοζινολική ένωση 1 ml). Η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου εξαρτάται από την αναμενόμενη περιεκτικότητα του δείγματος σε γλυκοζινολικές ενώσεις όπως φαίνεται στον παρακάτων πίνακα. Η θέρμανση συνεχίζεται για 15 λεπτά στους 95 °C.

Σε μια δεύτερη δοκιμή, δεν προστίθεται το εσωτερικό πρότυπο ώστε να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα αλλυλογλυκοζινολικών ενώσεων στο αρχικό δείγμα. Το διάλυμα ψύχεται, προστίθενται 100 μικρόλιτρα ενός διαλύματος που περιέχει οξικό βάριο και οξικό μόλυβδο, το καθένα σε συγκέντρωση 0,5 mol ανά λίτρο νερού και αναδεύεται. Φυγοκεντρείται στο 2 000 x g. Το υπερκείμενο φυλάσσεται.

Περιεκτικότητα σε γλυκοζινολικές ενώσεις (μικρογραμμομόριο/g σπόρου)	Συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου (μικρογραμμομόριο/ml)	Ποσότητα εκχυλίσματος που πρέπει να προστεθεί στο Sephadex (ml)
< 15	1	1,0
15-40	2	0,5
> 40	3	0,2

6.3. **Παρασκευή μικροστηλών από DEAE Sephadex A-25**

Είναι δυνατό να παρασκευασθούν κατάλληλες στήλες με τη χρησιμοποίηση πλαστικών ρυγχών του 1 ml για σιφώνια ή, εναλλακτικά, σιφωνίων Pasteur που έχουν κοντύνει. Ένα μικρό βύσμα από υαλοβάμβακα τοποθετείται στον πυθμένα της «μικροστήλης» και η στήλη πλένεται με νερό (1 ml). Προστίθεται εναιώρημα DEAE Sephadex A-25 (πυριδινοξικη μορφή) ισοδύναμο με 20 mg ξηρού βάρους Sephadex. Ο πιο ένκολος τρόπος γι' αυτό είναι η προσθήκη προκαθορισμένου όγκου από το εναιώρημα (καλά αναμειγμένο). Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί και εκπλύνεται με νερό.

Προστίθεται στη στήλη το υπερκείμενο από την κατεργασία με βάριο/μόλυβδο. Αφήνεται να στραγγίσει και κατόπιν η στήλη εκπλύνεται με 1 ml νερού και στη συνέχεια με 1 ml οξικής πυριδίνης (0,02 m). Αφήνεται να στραγγίσει, κατόπιν προστίθεται στη στήλη 50 μικρόλιτρα διαλύματος καθαρής σουλφατάσης και το σύστημα παραμένει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όλη τη νύχτα. Οι αποθειωμένες γλυκοζινολικές ενώσεις εκλούονται με νερό (3 × 0,5 ml).

6.4. **Παρασκευή παραγώγων των αποθειωμένων γλυκοζινολικών ενώσεων**

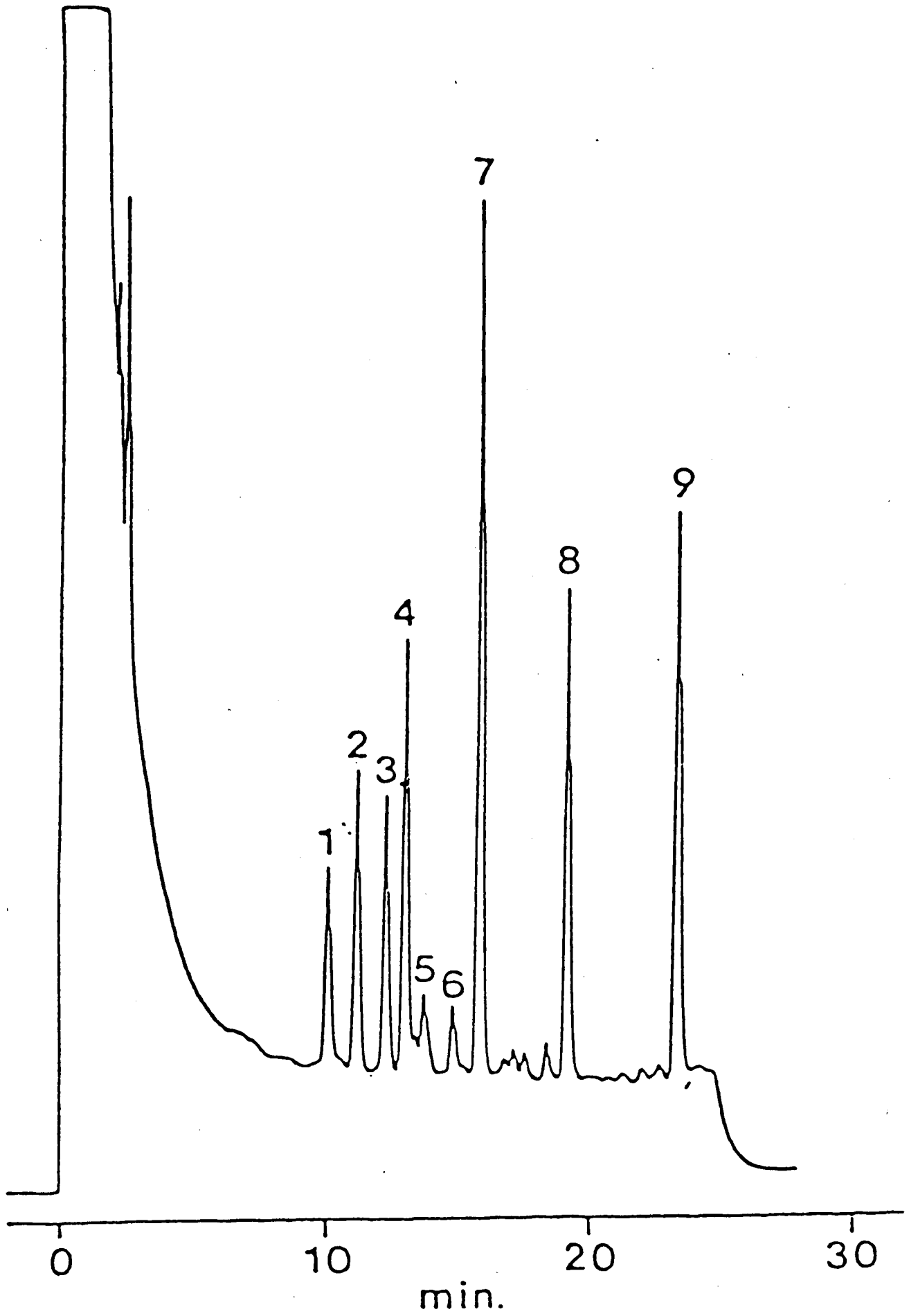
Παρασκευάζεται το αντιδραστήριο σιλυλίωσης με ανάμειξη MSHFBA (100 μικρόλιτρα), TMCS (10 μικρόλιτρα) και αραιωμένου 1-μεθυλιμιδαζόλιου (50 μικρόλιτρα). Το αραιωμένο 1-μεθυλιμιδαζόλιο παρασκευάζεται με 1-μεθυλιμιδαζόλιο (50 μικρόλιτρα) και ακετόνη (950 μικρόλιτρα).

Ένα δείγμα από το έκλουσμα των αποθειωμένων γλυκοζινολικών ενώσεων ξηραίνεται μέσα σε μικρό φιαλίδιο που κλείνει ερμητικά. Μικρές ποσότητες (5-10 μικρόλιτρα) μπορούν να ξηρανθούν με θέρμανση στους 120 °C για 10 λεπτά. Εναλλακτικός τρόπος είναι η ξήρανση σε ξηραντήρα κενού πάνω από P_2O_5. Μετά την ξήρανση προστίθεται στο δείγμα ίσος όγκος αντιδραστηρίου σιλυλίωσης και το φιαλίδιο σφραγίζεται και θερμαίνεται στους 120 °C (5 λεπτά) για να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός των παραγώγων.

6.5. **Διαχωρισμός των παραγώγων των αποθειωμένων γλυκοζινολικών ενώσεων με αέριο χρωματογραφία**

Εκχύνονται 2 μικρόλιτρα στη στήλη OV-7 και η θερμοκρασία διατηρείται στους 100 °C για 5 λεπτά. Κατόπιν προγραμματίζεται η θερμοκρασία να ανεβαίνει 5 °C ανά λεπτό μέχρι τους 280 °C. Η τελική αυτή θερμοκρασία διατηρείται σταθερή για 15 λεπτά. Καταγράφονται τα εμβαδά των κορυφών για τις 3-βουτενυλο-, 4-πεντενυλο-, 2-υδροξυ-3-μεθυλο 2-υδροξυ-4-πεντενυλο-, ινδονυλο-3-μεθυλο-, 4-υδροξυ-ινδολυλο-3-μεθυλο γλυκοζινολικές ενώσεις αν υπάρχουν.

Όταν αναλύονται δείγματα που περιέχουν ευρύ φάσμα γλυκοζινολικών ενώσεων ή όταν αρχίζει η ανάλυση μετά από αρκετές ώρες αδράνειας, ενδέχεται να απαιτηθούν επανειλημμένες εγχύσεις ενός δείγματος μέχρι να υπάρξουν σταθερά αποτελέσματα.



Διαχωρισμός των σχηματισθέντων αποθειωμένων γλυκοσινολικών παραγώγων με αέριο χρωματογραφία προγραμματισμένης θερμοκρασίας.

(1) αλλυλο-,
(2) 3-βουτενυλο-,
(3) 4-πεντενυλο-,
(4) 2-υδροξυ-3-βουτενυλο-,
(5) 2-υδροξυ-4-πεντενυλο-,
(6) σακχαρόλη,
(7) βενζυλο-,
(8) 4-υδροξυ-βενζυλο-,
(9) 4-υδροξυνδολυλο-3-μεθυλο-.

6.6. **Ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων**

Κατ' αρχή πρέπει να προσδιοριστεί το εμβαδόν που αντιστοιχεί στις αλλυλογλυκοζινολικές ενώσεις που προέρχονται από προσμείξεις, αν υπάρχουν.

Το εμβαδό που αντιστοιχεί στην αλλυλογλυκοζινολική ένωση και έχει ληφθεί από την ανάλυση χωρίς την προσθήκη εσωτερικού προτύπου, συνδυάζεται γραμμικά με τα εμβαδά που αντιστοιχούν στην 2-υδροξυ-3-βουτενυλογλυκοζινολική ένωση και έχουν ληφθεί από τις δύο αναλύσεις, με και χωρίς προσθήκη εσωτερικού προτύπου:

$$\text{εμβαδό αλλυλογλυκοζινολικού TMS (χωρίς εσωτερικό πρότυπο)} \times \frac{\text{εμβαδό 2-υδροξυ-3-βουτενυλογλυκοζινολικού TMS (με εσωτερικό πρότυπο)}}{\text{εμβαδό 2-υδροξυ-3-βουτενυλογλυκοζινολικού TMS (χωρίς εσωτερικό πρότυπο)}} = \text{αλλυλογλυκοζινολικού TMS από προσμείξεις}$$

Στη συνέχεια πρέπει να υπολογιστεί το εμβαδό που αντιστοιχεί στην αλλυλογλυκοζινολική ένωση που προστέθηκε σαν εσωτερικό πρότυπο. Το προηγούμενο αποτέλεσμα αφαιρείται από το συνολικό εμβαδό για την αλλυλογλυκοζινολική ένωση που έχει ληφθεί από την ανάλυση για προσθήκη εσωτερικού προτύπου:

$$\text{εμβαδό αλλυλογλυκοζινικού TMS (με εσωτερικό πρότυπο)} - \text{εμβαδό αλλυλογλυκοζινικού TMS από προσμείξεις} = \text{εμβαδό αλλυλογλυκοζινολικού TMS από το πρόσθετο εσωτερικό πρότυπο.}$$

Τα εμβαδά που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τα παράγωγα των γλυκοζινολικών ενώσεων με TMS και έχουν ληφθεί από την ανάλυση με προσθήκη εσωτερικού προτύπου, πρώτα διαιρούνται με το εμβαδό που αντιστοιχεί στην αλλυλογλυκοζινική ένωση που προστέθηκε σαν εσωτερικό πρότυπο και κατόπιν πολλαπλασιάζονται με τα μικρογραμμομόρια της ίδιας ένωσης που προστέθηκαν ανά g ξηραθέντος στον αέρα αλεύρου μετά την εκχύλιση του ελαίου.

$$\frac{\text{εμβαδό γλυκοζινολικού TMS}}{\text{εμβαδό αλλυλογλυκοζινολικού TMS από το πρόσθετο εσωτερικό πρότυπο}} \times \frac{\text{μικρογραμμομόρια αλλυλογλυκοζινολικής ένωσης}}{\text{g ξηραθέντος στον αέρα αλεύρου μετά την εκχύλιση του ελαίου}} = \frac{\text{μικρογραμμομόρια γλυκοζινολικής ένωσης}}{\text{g ξηραθέντος στον αέρα αλεύρου μετά την εκχύλιση του ελαίου.}}$$

Για να εκφρασθούν τα αποτελέσματα ως προς τους ξηρανθέντες στον αέρα σπόρους:

$$\frac{\text{μικρογραμμομόρια γλυκοζινολικής ένωσης}}{\text{g ξηρανθέντος στον αέρα αλεύρου μετά την εκχύλιση του ελαίου}} \times \frac{100 - \%\ \text{ελαίου}}{100} = \frac{\text{μικρογραμμομόρια γλυκοζινολικής ένωσης}}{\text{g ξηρανθέντων στον αέρα σπόρων.}}$$

7. ΕΚΘΕΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι ποσότητες των 3-βουτενυλο-, 4-πεντενυλο-, 2-υδροξυ-3-βουτενυλο-, 3-βουτενυλο, 2-υδροξυ-4-πεντενυλο-, ινδονυλ-3-μεθυλο, 4-υδροξυ-ιδολυλ-3- μεθυλο-, γλυκοζινολικών ενώσεων προστίθενται και αναφέρονται σαν σύνολο. Οι ποσότητες αλλυλο- και 4-υδροξυβενζυλο- γλυκοζινολικών ενώσεων, αν υπάρχουν, αναφέρονται χωριστά σαν ένδειξη για την παρουσία σινάπεως ή άλλων σπόρων Cruciferous.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μικρογραμμομόρια ανά g ξηρανθέντων στον αέρα σπόρων και αναφέρονται ως η μέση τιμή δύο προσδιορισμών και με ένδειξη του εύρους R (R = διαφορά ανάμεσα στη μέγιστη και στην ελάχιστη τιμή των δύο προσδιορισμών).»