REGLAMENTO (CEE) Nº 2435/86 DE LA COMISIÓN

de 29 de julio de 1986

por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 1470/68 relativo a la determinación del contenido en aceite, en impurezas y en humedad de las semillas oleaginosas

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento nº 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de materias grasas (1), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 1454/86 (2) y, en particular, su artículo 24 *bis*,

Considerando que, debido a las sucesivas modificaciones del Reglamento (CEE) nº 1470/68 de la Comisión (3), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 3519/84 (4), el título de dicho Reglamento sólo corresponde parcialmente a su contenido ; que es conveniente, en consecuecia, adaptar dicho título ;

Considerando que la denominación « doble cero », para las semillas de colza y de nabina, depende de su contenido en glucosinolatos ; que, para determinar dicho contenido, es conveniente prever un método adecuado ;

Considerando que, en virtud del Reglamento nº 282/67/CEE de la Comisión, de 11 de julio de 1967, relativo a las modalidades de intervención para las semillas oleaginosas (5), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 2436/86 (6), así como por el Reglamento (CEE) nº 2681/83 de la Comisión de 21 de septiembre de 1983, por el que se establecen las modalidades de aplicación del régimen de ayuda para las semillas oleaginosas (7), cuya última modificación la constituye el Reglamento nº 2434/86 (8), es conveniente definir el método único de determinación del contenido en glucosinolatos en la Comunidad ;

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de las materias grasas,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO :

Artículo 1

El Reglamento (CEE) nº 1470/68 queda modificado de la forma siguiente :

1. El título del Reglamento se sustituye por :

   « relativo a la toma y a la reducción de las muestras, así como a los métodos de análisis de las semillas oleaginosas ».

2. Se incluye artículo 2 *quater*:

   « Artículo 2 *quater*

   La determinación del contenido en glucosinolatos indicado en el artículo 7 del Reglamento nº 282/67/CEE y en el artículo 31 del Reglamento (CEE) nº 2681/83, se efectuará según el método definido en el Anexo VIII, sin perjuicio de las disposiciones transitorias contempladas en dichos artículos ».

3. El Anexo del presente Reglamento se añade como Anexo VIII.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el dia de su publicación en el *Diario Oficial de la Comunidades Europeas.*

Sera aplicable con efectos a partir del 1 de julio de 1986.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 29 de julio de 1986.

Por la Comisión

Frans ANDRIESSEN

Vicepresidente

(1) DO nº 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.
(2) DO nº L 133 de 21. 5. 1986, p. 8.
(3) DO nº L 239 de 28. 9. 1968, p. 2.
(4) DO nº L 328 de 15. 12. 1984, p. 12.
(5) DO nº L 151 de 13. 7. 1967, p. 1.
(6) Véase página 61 del presente Diario Oficial.
(7) DO nº L 266 de 28. 9. 1983, p. 1.
(8) Véase página 51 del presente Diario Oficial.

ANEXO

« ANEXO VIII

COLZA Y NABINA

Determinación del contenido de glucosinolatos

1. OBJETO

El presente método va destinado a la determinación de la composición y del contenido en principales glucosinolatos de la colza y la nabina.

2. PRINCIPIO

2.1. Medida de los trimetilsilil-derivados de los glucosinolatos desulfatados enzimáticamente, por cromatografía de gases con programación de la temperatura y utilización de la siniglina como patrón interno.

2.2. El método permite determinar cuantitativamente , en micromoles por g de semillas secadas al aire, seis glucosinolatos principales contenidos en la colza y la nabina y dos glucosinolatos contenidos en las semillas de mostaza, que pueden presentarse como contaminantes entre las semillas oleaginosas.

3. REACTIVOS PRINCIPALES

3.1. DEAE sephadex A-25.

3.2. SP Sephadex C-25.

3.3. Sulfatasa tipo H-1.

3.4. Glucosinolato de alilo (Sinigrina).

3.5. Acetato de bario.

3.6. Acetato de plomo.

3.7. Piridina (grado de sililación).

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

3.9. Trimetilclorosilano (TMCS).

3.10. 1-Metilimidazol.

4. EQUIPO PRINCIPAL

4.1. Tubos de extracción suecos de 70 ml, de acero inoxidable, un cuello de 18 mm de diámetro interior, cojinetes de bolas de 17 mm, tapones de goma con fluorosilicona del nº 3 y agitador horizontal (Troeng 1955), o bien un agitador de bolas de acero equivalente.

4.2. Molinillo de café de alta velocidad.

4.3. Estufa con circulación de aire.

4.4. Cromatógrafo de gases con temperatura programable y detector por ionización de llama.

4.5. Columna de vidrio para cromatografía de gases, de unos 2 metros de longitud, de 2 mm de diámetro interno, rellena con OV-07 al 2 % sobre diatomita de una granulometría de 80-100 mallas.

5. PREPARACIÓN

5.1. **Preparación del acetato de DEAE Sephadex A-25 y del acetato de piridina**

Poner 10 g de DEAE Sephadex A-25 en un vaso de 250 ml, añadir 150 ml de agua y dejar que se hinche el Sephadex hasta el día siguiente. Verter el Sephadex en una columna de 20 × 400 mm.

Pasar 500 ml de hidróxido sódico 0,5 N (10 g disueltos en agua y llevados a 500 ml) a través de la columna. Lavar ésta con 250 ml de agua para eliminar el exceso de hidróxido sódico y asegurarse de que el pH ha quedado neutro.

Tomar 1/10 del Sephadex que se va a convertir en acetato. Desleirlo en agua y pasarlo a una columna de 15 × 200 mm. Pasar por la columna 100 ml de ácido acético 0,5 M (2,9 ml de ácido acético glacial llevados a 100 ml). Lavar con 250 ml de agua. Poner en un matraz de 250 ml con agua para guardarlo.

Poner los restantes 9/10 de Sephadex en una columna con agua. Pasar por la columna 400 ml de acetato de piridina 0,5 M (19,8 ml de piridina con 15 ml de ácido acético glacial, llevados a 500 ml con agua). Lavar con 250 ml de agua. Poner en un matraz de 250 ml con agua para guardarlo.

5.2. **Preparación de la forma sódica del SP Sephadex C-25**

Poner 1 g de SP Sephadex C-25 en un vaso de 100 ml, añadir 75 ml de agua y dejar que se hinche el Sephadex hasta el día siguiente. Poner el Sephadex en una columna de 15 × 200 mm y lavar con 250 ml de agua. Pasar a un matraz de 250 ml con agua para guardarlo.

5.3. **Purificación de la sulfatasa**

Poner 70 mg de sulfatasa tipo H-1 en un tubo de ensayo de 16 × 150 mm. Añadir 3 ml de agua para disolver la sulfatasa y diluir con un volumen igual de etanol. Centrifugar durante 10 minutos a 2 000 xg. Decantar el sobrenadante en un segundo tubo y eliminar el precipitado. Añadir 9 ml de etanol al sobrenadante y volver a centrifugar durante 10 minutos a 2 000 xg. Eliminar el sobrenadante y disolver el precipitado en 2 ml de agua.

Poner un trocito de lana de vidrio en la punta de dos pipetas. En una de ellas, poner 100 microlitros de la capa acuosa sobrenadante sobre el acetato de DEAE Sephadex A-25. Añadir el mismo volumen de acetato de DEAE Sephadex A-25 para obtener una columna de 15 mm de altura, equivalente a 20 mg de Sephadex seco.

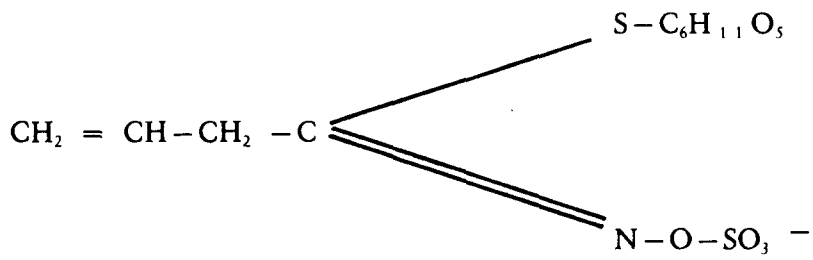
En la otra pipeta, poner 100 microlitros de la fase acuosa sobrenadante sobre la forma sódica de SP Sephadex C-25 y añadir a continuación el mismo volumen de la forma sódica de SP Sephadex C-25 para obtener una columna similar.

Pasar la solución enzimática acuosa en primer lugar por la columna que contiene el acetato de DEAE Sephadex A-25, y después por la columna que contiene la forma sódica de SP Sephadex C-25.

La solución de sulfatasa se utiliza sin diluir en columnas formadas por puntas de pipeta. Guardar el eluido a -20 °C y descongelar inmediatamente antes de usarlo.

5.4. **Preparación del patrón interno**

Glucosinolato de alilo (sal de potasio monohidratada)



Peso molecular :

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

Para preparar una solución de 1 micromol por ml, pesar 41,5 mg y llevar a 100 ml.

5.5. **Preparación de la columna de OV-7 para cromatografía de gases**

En primer lugar, lavar la superficie interior de una columna de vidrio (4' × 0,25" de diámetro exterior y 2 mm de diámetro interior) uniendo un extremo de la columna con un tubo de goma a una trompa de agua para obtener una succión suave. Aspirar a través de la columna 100 ml de cloroformo, 100 ml de acetona, y después 100 ml de éter de petróleo (punto de ebullición : de 30 a 60 °C). Aspirar aire a través de la columna para secarla y completar después el secado en la estufa con circulación de aire. Taponar un extremo con lana de vidrio. Ejercer una succión en este extremo de la columna por medio de una trompa de vacío. A través de un pequño embudo fijado al otro extremo de la columna por un tubo corto de tygon, añadir el relleno de la columna : 0V-7 al 2 % sobre diatomita CLQ de una granulometría de 80-100 mallas. Golpear suavamente la columna para facilitar el flujo del relleno por el serpentín hasta que su distribución sea completa y uniforme. Quitar el embudo y el tubo de tygon. Con ayuda de una pipeta Pasteur y de una pera de goma, extraer una cantidad de material suficiente para que se pueda taponar el extremo con lana de vidrio.

Acoplar la columna al inyector del cromatógrafo de gases por medio de una tuerca de acero inoxidable, un anillo de soporte montado atrás y un anillo de grafito. Hacer pasar el gas de arrastre (helio) a través de la columna y elevar la temperatura a partir de 100 °C (a razón de 1 °C por minuto) hasta 290 °C y mantenerla así hasta el día siguiente. Enfriar la estufa y fijar la columna al detector utilizando una tuerca de acero inoxidable, un anillo de soporte y un anillo delantero de grafito.

Ajustar la temperatura del inyector a 250 °C, la del detector a 300 °C y la de la columna a 200°C, el caudal del gas de arrastre (helio) a 40 ml por minuto, los caudales del hidrógeno y del aire respectivamente a 50 y 500 ml por minuto (condiciones óptimas de funcionamiento del detector), el rango a 1 y la atenuación a 64.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. **Preparación de las muestras**

La toma de muestras de semillas y la reducción de las muestras de laboratorio a muestras para el análisis se efectuarán con arreglo a los procedimientos descritos respectivamente en los Anexos I y II del Reglamento (CEE) nº 1470/68.

Al menos una vez por cada lote de muestras habrá que analizar una muestra de semillas tipo. Los datos de los análisis de la muestra tipo serán útiles para controlar la precisión y la exactitud del método.

Si la muestra de semillas está húmeda, secar 20 g en una estufa con circulación de aire a 45 °C hasta el día siguiente con el fin de conseguir una humedad del 7 %.

Moler 20 g de semillas secas en un molino de café. Extraer la grasa de 3 g de semillas molidas, utilizando 40 ml de *éter de petróleo* (punto de ebullición : 30 a 60 °C) o de *n-hexano* en un tubo sueco con tres bolas de acero y cerrado con un tapón con fluorosilicona. Agitar horizontalmente en un agitador mecánico durante 45 minutos. Filtrar por aspiración a través de papel Whatman nº 1 en embudo cónico y lavar dos veces con disolvente nuevo. Secar la muestra de harina al aire en una campana de gases hasta el día siguiente. Reducir eventualmente los grumos del producto secado pasándolo por muestra. de 280 micrómetros. Debe pasar el tamiz más del 90 % de la muestra.

6.2. **Inactivación de la microsinasa y extracción de los glucosinolatos**

Poner 100 mg de harina en un tubo de ensayo. Calentar el tubo y la muestra al baño María (más de 95 °C). Después de dos minutos añadir agua hirviendo (1 ml). Después de otros dos minutos añadir el patrón interno (glucosinolato de alilo). La concentración del patrón interno depende del contenido estimado de glucosinolatos en la muestra, según las indicaciones del cuadro siguiente. Continuar calentando a más de 95 °C durante 15 minutos.

Se realiza un segundo ensayo sin añadir patrón interno, para poder determinar el contenido de glucosinolato de alilo en la muestra original.

Enfriar la solución y añadir 100 microlitros de una solución que contenga 0,5 moles de acetato de bario y 0,5 moles de acetato de plomo por litro de agua. Mezclar y centrifugar a 2 000 xg. Conservar el sobrenadante.

Contenido en glucosinolatos (micromoles/g semillas)	Concentración del patrón interno (micromoles/ml)	Cantidad del extracto para aplicar al Sephadex (ml)
< 15	1	1,0
15 — 40	2	0,5
> 40	3	0,2

6.3. **Preparación de las minicolumnas de DEAE Sephadex A-25**

Se pueden preparar columnas adecuadas bien con puntas de pipeta de plástico de 1 ml o bien con pipetas Pasteur recortadas. Poner un trocito de lana de vidrio en el fondo de la « minicolumna » y lavar con agua (1 ml). Añadir una suspensión de DEAE Sephadex A-25 (en forma de acetato de piridina) equivalente a 20 mg de Sephadex en peso seco. El medio más fácil de conseguirlo es añadir un volumen predeterminado de una suspensión (bien mezclada).

Dejar que sedimente el gel y lavar con agua.

Poner en la columna la fase sobrenadante resultante del tratamiento con bario/plomo. Dejar que escurra y lavar la columna con 1 ml de agua, seguido de 1 ml de acetato de piridina (0,02 M). Dejar que escurra y añadir después a la columna 50 microlitros de una solución de sulfatasa purificada, y dejar reposar a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Eluir los desulfoglucosinolatos con agua (3 × 0,5 ml).

6.4. **Obtención de los derivados de los desulfoglucosinolatos**

Perparar el reactivo de sililación mezclando 100 microlitros de MSHFBA, 10 microlitros de TMCS y 50 microlitros de 1-metilimidazol diluido. El 1-metilimidazol diluido se prepara a partir de 50 microlitros de 1-metilimidazol y 950 microlitros de acetona.

Secar una muestra del diluido de desulfoglucosinolato en un pequeño vial que se pueda cerrar eficazamente. Pueden secarse pequeñas cantidades (de 5 a 10 microlitros) calentando a 120 °C durante 10 minutos. También se puede secar en un desecador de vacío con ayuda de P_2O_5. Añadir a la muestra secada un volumen igual del reactivo de sililación y cerrar el vial. Calentar éste a 120 °C durante 5 minutos para completar la obtención de derivados.

6.5. **Separación por cromatografía de gases de los derivados de los desulfoglucosinolatos**

Inyectar 2 microlitros en la columna de OV-7 y mantener la temperatura a 200 °C durante 5 minutos y llevarla después hasta 280 °C programando una elevación de temperatura de 5 °C por minuto. Mantener esta temperatura final durante 15 minutos.

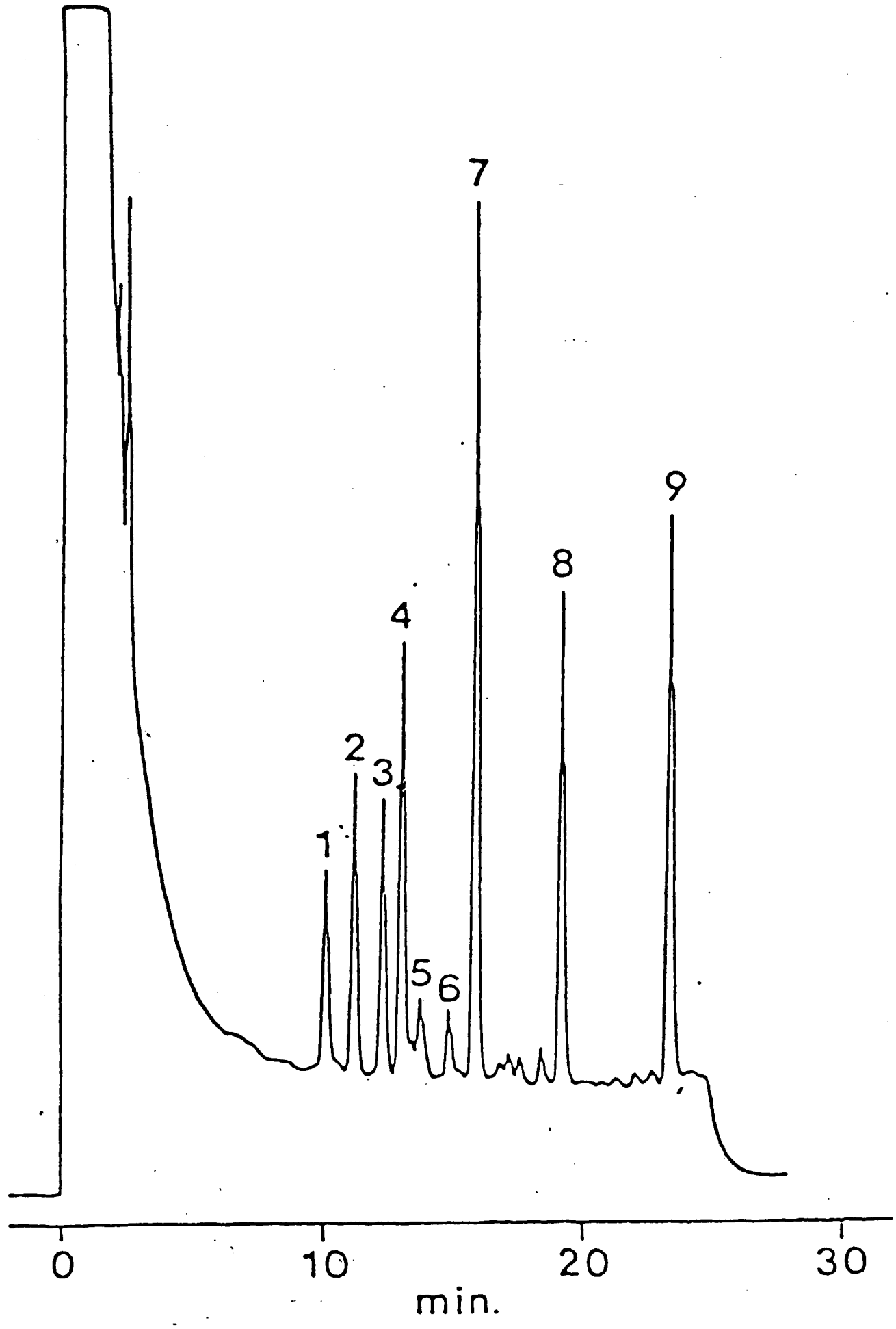
Tomar las áreas de los picos de :

glucosinolato de 3-butenilo, glucosinolato de 4-pentenilo, glucosinolato de 2-hidroxi-3-butenilo, glucosinolato de 2-hidroxi-4-pentenilo, glucosinolato de indol-3-il-metilo, glucosinolato de 4-hidroxi-indol-3-il-metilo,

y, en su caso :

glucosinolato de alilo, glucosinolato de 4-hidroxi-bencilo.

Cuando se analizan muestras con una amplia gama de glucosinolatos o cuando se comienza el análisis después de un período de varias horas de inactividad, es necesario repetir las inyecciones de muestra hasta obtener resultados constantes.



Separación de los derivados de los desulfoglucosinolatos por cromatografía de gases con temperaturas programadas.

(1) de alilo,
(2) de 3-butenilo,
(3) de 4-pentelilo,
(4) de 2-hidroxi-3-butenilo,
(5) de 2-hidroxi-4-pentenilo,
(6) de sacarosa,
(7) de bencilo,
(8) de 4-hidroxi-bencilo,
(9) de 4-hidroci-indol-3-il-metilo.

6.6. **Cálculo de los resultados**

Lo primero que hay que hacer es determinar, en su caso, el área del glucosinolato de alilo que se puede atribuir a una eventual contaminación.

El área del glucosinolato de alilo, obtenida en el análisis sin patrón interno, se normaliza utilizando las áreas del glucosinolato de 2-hidroxi-3-butenilo de los dos análisis, con y sin patrón interno :

$$\text{Área del glucosinolato de alilo TMS (sin patrón interno)} = \frac{\text{Área del glucosinolato de 2-hidroxi-3-butenilo TMS (con patrón inteno)}}{\text{Área del glucosinolato de 2-hidroxi-3-butenilo TMS (sin patrón interno)}} = \text{Área del glucosinolato de alilo TMS resultante de una contaminación}$$

El segundo punto consiste en calcular el área del glucosinolato de alilo correspondiente al patrón interno. El resultado anterior se resta del área total de glucosinolato de alilo obtenida en el análisis con patrón interno :

$$\text{Área del glucosinolato de alilo TMS (con patrón interno)} - \text{Área del glucosinolato de alilo TMS resultante de una contaminación} = \text{Área del glucosinolato de alilo TMS correspondiente al patrón interno}$$

Las áreas de los diversos derivados de glucosinolato TMS, obtenidas en el análisis con patrón interno, se dividen sucesivamente por el área correspondiente al glucosinolato de alilo añadido como patrón interno y después se multiplican por los micromoles de glucosinolato de alilo añadidos por gramo de harina desengrasada y secada al aire, lo que da como resultado los micromoles de glucosinolato por gramo de harina desengrasada y secada al aire :

$$\frac{\text{Área del glucosinolato TMS}}{\text{Área del glucosinolato de alilo TMS correspondiente al patrón interno}} \times \frac{\text{Micromoles de glucosinolato de alilo}}{\text{g de harina desengrasada y secada al aire}} = \frac{\text{Micromoles de glucosinolato}}{\text{g de harina desengrasada}}$$

g de harina desengrasa y secada al aire

Para expresar los resultados respecto a las semillas secadas al aire :

$$\frac{\text{Micromoles de glucosinolato}}{\text{g de harina desengrasada y secada al aire}} \times \frac{100 - \%\ \text{grasa}}{100} = \frac{\text{Micromoles de glucosinolato}}{\text{g de semillas secadas al aire}}$$

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Las cantidades de los glucosinolatos de 3-butenilo, de 4-pentenilo, de 2-hidroxi-3-butenilo, de 2-hidroxi-4-pentenilo, de indol-3-il-metilo, y de 4-hidroxi-indol-3-il-metilo se suman y se expresan conjuntamente. Los glucosinolatos de alilo y de 4-hidroxi-benciclo, presenten eventualmente, se expresan aparte como indicación de una contaminación por semillas de mostaza o de otras plantas crucíferas.

Los resultados se expresan en micromoles por g de semillas secadas al aire, como valor medio de dos determinaciones, indicando la diferencia entre el valor más alto y el más bajo de las dos determinaciones. »