

DIN EN 17504



ICS 65.120

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Gossypol in Baumwollsamensamen und Futtermitteln mittels
LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 17504:2022**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of gossypol in cotton seed and feeding stuff by LC-MS/MS;
German version EN 17504:2022

Aliments des animaux –
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Dosage du gossypol dans les graines de coton et les aliments pour animaux par CL SM/SM;
Version allemande EN 17504:2022

Gesamtumfang 24 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17504:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-5 siehe DIN ISO 5725-5

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-5, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 5: Alternative Methoden für die Ermittlung der Präzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Deutsche Fassung

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von Gossypol in Baumwollsamensamen und
Futtermitteln mittels LC-MS/MS**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling
and analysis —
Determination of gossypol in cotton seed and feeding
stuff by LC-MS/MS

Aliments des animaux —
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse —
Dosage du gossypol dans les graines de coton et les
aliments pour animaux par CL-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 10. Januar 2022 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	5
6 Geräte	7
7 Verfahren	8
7.1 Allgemeines	8
7.2 Probenvorbehandlung	9
7.3 Prüfmenge	9
7.4 Extraktion	9
8 LC-MS/MS-Analyse	11
8.1 Allgemeines	11
8.2 Analysensequenz	11
9 Ergebnisse	12
9.1 Identifizierung	12
9.2 Quantifizierung	12
10 Präzision	14
10.1 Allgemeines	14
10.2 Wiederholpräzision	15
10.3 Vergleichpräzision	15
11 Prüfbericht	16
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	17
Anhang B (informativ) Beispiel für LC-MS/MS-Bedingungen	19
B.1 Allgemeines	19
B.2 HPLC-Bedingungen	19
B.3 MS-Bedingungen	20
Anhang C (informativ) Beispielchromatogramm von Gossypol in einem Mischfuttermittel	21
Literaturhinweise	22

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17504:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis September 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 2022 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Gossypol ist ein polyphenolisches Pflanzengift, das von Arten der Gattung *Gossypium* (Baumwollpflanze) produziert wird. Die Pflanzen werden in erster Linie für die Faser- und Ölproduktion angebaut. Die Samen und die Produkte aus verarbeiteten Samen werden auch als Futtermittel verwendet. Gossypol kommt in den Samen in zwei Formen vor: als freies Gossypol und als (meist an Proteine) gebundenes Gossypol. Der Gehalt an freiem Gossypol, der gemessen wird, hängt vom Extraktionsverfahren und von der Spezifität des anschließend verwendeten Untersuchungsverfahrens ab [1] [2]. Folglich ist dieses Verfahren möglicherweise nicht direkt vergleichbar mit vorhandenen Normen, die auf spektralphotometrischen Messungen basieren (z. B. [3], [4]).

WARNUNG — Diese Verfahrensvorschrift erhebt nicht den Anspruch, alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Verfahrensvorschrift, geeignete Sicherheits- und Gesundheitsschutzmaßnahmen festzulegen und sicherzustellen, dass behördliche und gesetzliche Anforderungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von freiem Gossypol, das mittels angesäuertem Acetonitril/Wasser extrahierbar ist, in Baumwollsamensamen, in aus Baumwollsamensamen hergestellten Produkten und in Mischfuttermitteln durch Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS, engl. liquid chromatography with tandem mass spectrometry) fest.

Durch einen Ringversuch mit den nachfolgend angegebenen Matrices ist das in diesem Dokument beschriebene Verfahren für den Bereich von 69 mg/kg bis 5 950 mg/kg erfolgreich validiert worden: Baumwollsamensamen, Baumwollsamensamenprodukte (Kuchen/Mehl, Schalen) und Mischfuttermittel für Rinder, Schweine und Geflügel.

ANMERKUNG Es ist möglich, Bestimmungsgrenzen von etwa 5 mg/kg bei Mischfuttermitteln zu erreichen. Das Verfahren ist möglicherweise anwendbar bei niedrigeren und höheren Konzentrationen als dem im Ringversuch validierten Konzentrationsbereich. Dies muss jedoch durch eine interne Validierung bewertet werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696)*

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

4 Kurzbeschreibung

Freies Gossypol wird durch Mischen einer homogenisierten Probe von 0,4 g Baumwollsamensamen oder 1,0 g Baumwollsamensamenprodukt oder Mischfuttermittel mit 40 ml 0,1%iger Phosphorsäure in Acetonitril : Wasser (80 : 20) (V : V) extrahiert. Das Gemisch wird 1 h geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wird ein Teil des Überstandes mit Extraktionslösemittel in einem Fläschchen verdünnt. Der Endextrakt wird mittels Umkehrphasen-Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Die Quantifizierung von Gossypol in Baumwollsamensamen und Baumwollsamensamenprodukten basiert auf einer Mehrpunktkalibrierung unter Verwendung von Standards in Extraktionslösemittel. Die Quantifizierung von Gossypol in Mischfuttermitteln basiert auf einer Mehrpunktkalibrierung unter Verwendung von Standards in Extraktionslösemittel und einer Korrektur um die scheinbare Wiederfindung.

5 Reagenzien

WARNUNG — Gossypol kann gesundheitsgefährdend sein. Es hat eine starke toxische Wirkung auf die Fortpflanzungsorgane. Je nach Expositionsgrad sind sowohl akute als auch chronische Wirkungen möglich.

5.1 Gossypol, ≥ 95 %, als Gossypol-Basis

Gossypol ist ein racemisches Gemisch aus (+)- und (–)-Gossypol. Bei diesem Verfahren erfolgt keine Trennung der Enantiomeren des Gossypols. Es darf ein Standard verwendet werden, der eine Mischung aus beiden Enantiomeren enthält.

Gossypol steht auch in Form eines 1 : 1-Komplexes mit Essigsäure zur Verfügung. Bei diesem Verfahren darf entweder ein Standard von Gossypol oder von Gossypol-Essigsäure verwendet werden.

ANMERKUNG Gossypol ist lichtempfindlich.

5.2 Acetonitril, LC-MS- oder HPLC-Qualität

5.3 Phosphorsäure 85 % w/w, $d = 1,71 \text{ g/cm}^3$, p.a.-Qualität

5.4 Ameisensäure, ≥ 98 %, p.a.-Qualität

5.5 Wasser

Wasser mit LC-MS-Reinheitsgrad, doppelt destilliertes Wasser oder Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696.

5.6 Extraktionslösemittel: 0,1%ige Phosphorsäure in Acetonitril : Wasser (80 : 20).

800 ml Acetonitril (5.2) und 200 ml Wasser (5.5) werden in einer 1 000-ml-Flasche gemischt. Es wird 1,0 ml Phosphorsäure (5.3) zugegeben und es wird gemischt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und darf 1 Monat verwendet werden.

5.7 Mobile Phase A: 0,5%ige Ameisensäure in Acetonitril : Wasser (5 : 95).

50 ml Acetonitril (5.2) und 950 ml Wasser (5.5) werden in einer 1 000-ml-Flasche gemischt. Es werden 5 ml Ameisensäure (5.4) zugegeben und es wird gemischt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und darf 1 Monat verwendet werden.

5.8 Mobile Phase B: 0,5%ige Ameisensäure in Acetonitril : Wasser (95 : 5).

950 ml Acetonitril (5.2) und 50 ml Wasser (5.5) werden in einer 1 000-ml-Flasche gemischt. Es werden 5 ml Ameisensäure (5.4) zugegeben und es wird gemischt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und darf 1 Monat verwendet werden.

5.9 Gossypol-Stammlösung, 1 mg/ml

20 mg Gossypol (5.1) werden eingewogen (6.1) und in einen 20-ml-Messkolben aus Braunglas überführt. Die Masse, die Reinheit und die chemische Form des Standards sind zu berücksichtigen. Es wird Extraktionslösemittel (5.6) zugegeben, durch Mischen gelöst und mit Extraktionslösemittel (5.6) bis zur Marke aufgefüllt. Die Stammlösung wird in eine Flasche aus Braunglas (6.7) überführt und bei $< -18^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen darf die Lösung 6 Monate verwendet werden.

5.10 Gossypol-Standardlösung, 10 $\mu\text{g/ml}$

Mit einer Pipette werden 100 μl Gossypol-Stammlösung (5.9) in einen 10-ml-Messkolben aus Braunglas (6.7) überführt. Es wird mit Extraktionslösemittel (5.6) bis zur Marke aufgefüllt und gemischt. Das Gemisch wird in eine Flasche aus Braunglas (6.7) überführt. Die Standardlösung wird bei $< -18^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung 2 Monate verwendet werden. Diese Standardlösung wird zur Erstellung von Kalibrierkurven verwendet.