

DIN EN 17853



ICS 65.120

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von intakten Glucosinolaten in
Futtermittel-Ausgangserzeugnissen und Mischfuttermitteln mittels
LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 17853:2023**

Animal feeding stuff –
Methods of sampling and analysis –
Determination of intact glucosinolates in feed materials and compound feed by LC-MS/MS;
German version EN 17853:2023

Alimentation animale –
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Dosage des glucosinolates intacts dans les matières premières pour l'alimentation animale
et les aliments composés par CLHP MS/MS;
Version allemande EN 17853:2023

Gesamtumfang 54 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17853:2023) 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
ISO 9167	siehe	DIN EN ISO 9167

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 EN ISO 9167, *Rapssamen und Rapsschrot — Bestimmung des Glucosinolatgehaltes — Verfahren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie*

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

– Leerseite –

Deutsche Fassung

Futtermittel —
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von intakten Glucosinolaten in Futtermittel-
Ausgangserzeugnissen und Mischfuttermitteln mittels
LC-MS/MS

Animal feeding stuff —
Methods of sampling and analysis —
Determination of intact glucosinolates in feed materials
and compound feed by LC-MS/MS

Alimentation animale —
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse —
Dosage des glucosinolates intacts dans les matières
premières pour l'alimentation animale et les aliments
composés par CLHP MS/MS

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 3. März 2023 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	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	7
5.1 Analysestandards	7
5.2 Chemikalien	8
5.3 Standardlösungen	8
5.4 Reagenzien	11
5.5 Qualitätskontrollmaterial	12
6 Geräte	12
7 Durchführung	13
7.1 Probenvorbehandlung	13
7.2 Prüfmenge	13
7.2.1 Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnisse	13
7.2.2 Mischfuttermittel	13
7.3 Extraktion	13
7.3.1 Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnisse	13
7.3.2 Mischfuttermittel	14
7.3.3 Wiederfindungsprobe für Mischfuttermittel	14
7.3.4 Herstellung der Kalibrierstandards in einem Blindprobenextrakt	14
8 LC-MS/MS-Analyse	15
8.1 Allgemeines	15
8.2 Analysensequenz	16
8.2.1 Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnisse	16
8.2.2 Mischfuttermittel	16
9 Auswertung der Ergebnisse	17
9.1 Identifizierung	17
9.2 Quantifizierung	17
9.2.1 Allgemeines	17
9.2.2 Linearität der Kalibrierkurve	17
9.2.3 Berechnung der Glucosinolatkonzentration in der Ölsaat oder dem Ölsaatenerzeugnis	18
9.2.4 Berechnung der Glucosinolatkonzentration im Mischfuttermittel	18
9.3 Angabe der Ergebnisse	19
10 Präzision	19
10.1 Allgemeines	19
10.2 Wiederholpräzision	20
10.3 Vergleichpräzision	20
11 Untersuchungsbericht	20
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	21
Anhang B (informativ) Beispiel für LC-MS/MS-Bedingungen	43
B.1 Allgemeines	43
B.2 Chromatographische Bedingungen	43
B.3 MS-Bedingungen	44
Anhang C (informativ) Beispiele für Chromatogramme	46
Anhang D (informativ) Glucosinolat-Standards aus kommerziellen Quellen	48
Literaturhinweise	50

Bilder

Bild A.1 — Darstellung der relativen Vergleichstandardabweichung (RSD_R) in Abhängigkeit von der Konzentration (mmol/kg)	42
Bild C.1 — Extrahierte Ionenchromatogramme (Modus Multiple Reaction Monitoring) einer Glucosinolat-Standardmischung von 1 nmol/ml	46
Bild C.2 — Extrahierte Ionenchromatogramme (Modus Multiple Reaction Monitoring) der im Referenzmaterial ERM-BC366 vorhandenen Glucosinolate	47

Tabellen

Tabelle 1 — Zusammenfassung der im Ringversuch geprüften Glucosinolat-Konzentrationsbereiche	6
Tabelle 2 — Vorbereitung der Standard-Stammlösungen	9
Tabelle 3 — Herstellung der Kalibrierstandards in wässriger Lösung	11
Tabelle 4 — Herstellung der Kalibrierstandards in einem Blindprobenextrakt	15
Tabelle A.1 — Präzisionsdaten zum Gesamtgehalt an Glucosinolaten	22
Tabelle A.2 — Präzisionsdaten zu Epiprogoitrin	22
Tabelle A.3 — Präzisionsdaten zu Glucoallysin	23
Tabelle A.4 — Präzisionsdaten zu Glucoarabin	24
Tabelle A.5 — Präzisionsdaten zu Glucobrassicinapin	25
Tabelle A.6 — Präzisionsdaten zu Glucobrassicin	26
Tabelle A.7 — Präzisionsdaten zu Glucocamelinin	27
Tabelle A.8 — Präzisionsdaten zu Glucoerucin	28
Tabelle A.9 — Präzisionsdaten zu Glucoiberin	29
Tabelle A.10 — Präzisionsdaten zu Gluconapin	29
Tabelle A.11 — Präzisionsdaten zu Gluconapoleiferin	30
Tabelle A.12 — Präzisionsdaten zu Gluconasturtiin	31
Tabelle A.13 — Präzisionsdaten zu Glucoraphanin	32
Tabelle A.14 — Präzisionsdaten zu Glucoraphenin	33
Tabelle A.15 — Präzisionsdaten zu Glucotropaeolin	34
Tabelle A.16 — Präzisionsdaten zu Homoglucocamelinin	35
Tabelle A.17 — Präzisionsdaten zu 4-Hydroxyglucobrassicin	36
Tabelle A.18 — Präzisionsdaten zu 4-Methoxyglucobrassicin	37
Tabelle A.19 — Präzisionsdaten zu Neoglucobrassicin	37
Tabelle A.20 — Präzisionsdaten zu Progoitrin	38
Tabelle A.21 — Präzisionsdaten zu Sinalbin	39
Tabelle A.22 — Präzisionsdaten zu Sinigrin	40
Tabelle B.1 — HPLC-Gradientenprogramm	43
Tabelle B.2 — MS-Geräteeinstellungen	44
Tabelle B.3 — Für die MS des Zielanalyten geeignete Ionenübergänge	44
Tabelle D.1 — Liste der Glucosinolat-Standards aus kommerziellen Quellen	48

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17853:2023) 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 Oktober 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2023 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

Glucosinolate sind eine Gruppe von pflanzlichen Sekundärmetaboliten, die hauptsächlich in der Familie der Kreuzblütler (Senf und Kohl) vorkommen ([1], [2], [3]). Viele Gemüsesorten, wie Brokkoli, Rosenkohl, Kohl und Blumenkohl, gehören zu dieser Pflanzenfamilie. Gleichzeitig sind Arten der Gattungen *Brassica*, *Camelina*, *Crambe*, *Rhaphanus* und *Sinapis* landwirtschaftliche Nutzpflanzen, die zur Herstellung von Pflanzenölen, wie z. B. Rapsöl, verwendet werden. Der Presskuchen wird als Einzelfuttermittel verwendet. Glucosinolate gelten als unerwünschte Stoffe in Futtermitteln [4]. Glucosinolate in Rapssamen und Rapserzeugnissen können auch nach enzymatischer Desulfatisierung durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) in Verbindung mit UV-Detektion gemessen werden. Dieses Verfahren ist in der Norm EN ISO 9167 [5] beschrieben.

WARNUNG — Diese Verfahrensvorschrift erhebt nicht den Anspruch, alle mit ihrer 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 der einzelnen intakten Glucosinolate in Futtermittel-Ausgangserzeugnissen einschließlich Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnissen sowie in Mischfuttermitteln durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) in Verbindung mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) fest.

Das in diesem Dokument festgelegte Verfahren wurde im Rahmen eines Ringversuchs mit den folgenden Matrices erfolgreich validiert: Rapssamen, Leindottersamen, *Brassica-oleracea*-Samen, gemischte Ölsaaten, Rapssamenflocken, Mischfuttermittel für Rinder, Schweine und Geflügel.

Das Verfahren ist anwendbar für die quantitative Bestimmung von Epiprogoitrin, Glucoalyssin, Glucoarabin, Glucobrassicinapin, Glucobrassicin, Glucocamelinin, Glucoerucin, Glucoiberin, Gluconapin, Gluconapoleiferin, Gluconasturtiin, Glucoraphanin, Glucoraphenin, Glucotropaeolin, Homoglucocamelinin, 4-Hydroxyglucobrassicin, 4-Methoxyglucobrassicin, Neoglucobrassicin, Progoitrin, Sinalbin und Sinigrin.

Die im Ringversuch geprüften Konzentrationsbereiche für jedes einzelne Glucosinolat und für den Gesamtgehalt an Glucosinolaten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 — Zusammenfassung der im Ringversuch geprüften Glucosinolat-Konzentrationsbereiche

Glucosinolat	Anzahl der Proben mit annehmbaren Ergebnissen	Geprüfter Konzentrationsbereich		
		mmol/kg		
		min.		max.
Epiprogoitrin	7	0,01		0,93
Glucoalyssin	6	0,02		2,10
Glucoarabin	3	0,31		6,15
Glucobrassicinapin	5	0,01		0,38
Glucobrassicin	5	0,02		0,31
Glucocamelinin	3	0,82		16,1
Glucoerucin	3	1,07		15,6
Glucoiberin	3	1,51		18,5
Gluconapin	6	0,23		1,68
Gluconapoleiferin	5	0,01		0,33
Gluconasturtiin	7	0,01		11,0
Glucoraphanin	5	0,01		3,11
Glucoraphenin	1		15,6	
Glucotropaeolin	2	0,03		18,3
Homoglucocamelinin	3	0,17		3,23
4-Hydroxyglucobrassicin	6	0,23		7,33
4-Methoxyglucobrassicin	1		0,16	
Neoglucobrassicin	5	0,01		0,13
Progoitrin	6	0,62		14,8
Sinalbin	4	0,01		41,1
Sinigrin	3	0,25		23,7
Gesamtgehalt	8	1,48		117,3

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 Zwecke — Anforderungen und Prüfungen (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:

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

4 Kurzbeschreibung

Die Glucosinolate werden aus der homogenisierten Probe mit Methanol : Wasser (70 : 30) (V : V) extrahiert. Nach dem Zentrifugieren werden die Extrakte verdünnt, gefiltert und mit Flüssigchromatographie in Verbindung mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) gemessen. In Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnissen werden einzelne Glucosinolate durch Mehrpunktkalibrierung unter Verwendung von Standards in wässriger Lösung quantifiziert. In Mischfuttermitteln werden einzelne Glucosinolate durch Mehrpunktkalibrierung unter Verwendung von Standards in einem Extrakt aus der Blindfuttermittelmatrix quantifiziert.

5 Reagenzien

5.1 Analysestandards

Die Analysestandards sollten eine nachgewiesene Reinheit von mindestens 90 %, vorzugsweise von 95 % oder höher, aufweisen.

ANMERKUNG In diesem Abschnitt werden Glucosinolatstandards aufgeführt, die derzeit von mindestens einem kommerziellen Anbieter erhältlich sind (siehe Anhang D). Je nach beabsichtigter Anwendung kann eine Auswahl der aufgeführten Glucosinolatstandards verwendet werden.

- 5.1.1 **Epiprogroitritin** (2-(S)-Hydroxy-3-butenylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 19237-18-4)
- 5.1.2 **Glucolyssin** (5-(Methylsulfinyl)pentylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 499-37-6)
- 5.1.3 **Glucorabin** (9-(Methylsulfinyl)nonylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 67920-64-3)
- 5.1.4 **Glucobrassicinapin** (4-Pentenylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 19041-10-2)
- 5.1.5 **Glucobrassicin** (3-Indolylmethylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 4356-52-9)
- 5.1.6 **Glucocamelinin** (10-(Methylsulfinyl)decylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 67884-10-0)
- 5.1.7 **Glucoerucin** (4-Methoxythiobutylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 21973-56-8)
- 5.1.8 **Glucioiberin** (3-Methylsulfinylpropylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 554-88-1)
- 5.1.9 **Glucunapin** (3-Butenylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 19041-09-9)

5.1.10 Gluconapoleiferin (2-(S)-Hydroxy-4-pentenylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 19764-03-5)

Gluconapoleiferin ist nur als 1 : 1-Gemisch aus 2-S- und 2-R-Isomeren erhältlich. Für 2S-Gluconapoleiferin wird eine Reinheit von 50 % angenommen.

5.1.11 Gluconasturtiin (2-Phenylethylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 499-30-9)

5.1.12 Glucoraphanin (4-Methylsulfinylbutylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 21414-41-5)

5.1.13 Glucoraphenin (4-Methylsulfinylbutenylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 28463-24-3)

5.1.14 Glucotropaeolin (Benzylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 499-26-3)

5.1.15 Homoglucocamelinin (11-(Methylsulfinylundecylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 186037-18-3)

5.1.16 4-Hydroxyglucobrassicin (4-Hydroxy-3-indolylmethylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 83327-20-2)

5.1.17 4-Methoxyglucobrassicin (4-Methoxy-3-indolylmethylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 83327-21-3)

5.1.18 Neoglucobrassicin (1-Methoxy-3-indolylmethylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 5187-84-8)

5.1.19 Progoitrin (2-(R)-Hydroxy-3-butenylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 585-95-5)

5.1.20 Sinalbin (4-Hydroxybenzylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 16411-05-5)

5.1.21 Sinigrin (2-Propenylglucosinolat), Monohydrat oder sein Kaliumsalz (CAS 3952-98-5)

5.2 Chemikalien

5.2.1 Methanol, LC-MS-Qualität

5.2.2 Essigsäure, 98 % bis 100 %, HPLC-Qualität

5.2.3 Wasser

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

5.3 Standardlösungen

5.3.1 Allgemeines

Von jedem Standard (5.1.1 bis 5.1.21) werden zwischen 5 mg und 10 mg präzise eingewogen (6.1) und in ein separates Braunglasfläschchen von 4 ml (6.8) gefüllt. Ein Volumen des Extraktionslösemittels (5.4.1) wird hinzugefügt, um eine Lösung mit einer Konzentration von 10 µmol/ml herzustellen. Das Gewicht, die Reinheit und das Aussehen des Standards werden berücksichtigt (siehe ANMERKUNGEN 1 bis 4). In Tabelle 2 sind Beispielrechnungen für die Vorbereitung von 1 ml Stammlösung angegeben.

ANMERKUNG 1 Glucosinolatstandards sind in der Regel als Kaliumsalze erhältlich. Einige Glucosinolatstandards enthalten zusätzlich ein Molekül Wasser.

ANMERKUNG 2 Die meisten Analysestandards für einzelne Glucosinolate werden in der Regel in Mengen von 5 mg und 10 mg gewonnen. Da es sich bei Glucosinolaten um stark hygroskopische Verbindungen handelt, wird der feste Standard nur einmal verwendet.

ANMERKUNG 3 Je nach beabsichtigter Anwendung kann eine Auswahl der nachfolgend aufgeführten Standardlösungen verwendet werden.

ANMERKUNG 4 Die Standard-Stammlösungen sind 24 Monate stabil, wenn sie bei $< -18^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Methanol : Wasser (70 : 30) (V : V) ist das bevorzugte Lösemittel, da es eine bessere Stabilität der Glucosinolate bietet als Wasser.

Tabelle 2 — Vorbereitung der Standard-Stammlösungen

Glucosinolat	Molekülmasse Kaliumform g/mol	Gewichtsstandard für 1 ml Standardlösung von 10 $\mu\text{mol/ml}$ mg
Epiprogoitrin	427,48	4,274 8
Glucoalyssin	489,63	4,896 3
Glucoarabin	545,73	5,457 3
Glucobrassicinapin	425,51	4,255 1
Glucobrassicin	486,26	4,862 6
Glucocamelinin	559,76	5,597 6
Glucoerucin	459,61	4,596 1
Glucoiberin	461,56	4,615 6
Gluconapin	411,49	4,114 9
Gluconapoleiferin	441,51	4,415 1
Gluconasturtiin	461,16	4,611 6
Glucoraphanin	475,66	4,756 6
Glucoraphenin	473,58	4,735 8
Glucotropaeolin	447,52	4,475 2
Homoglucocamelinin	573,79	5,737 9
4-Hydroxyglucobrassicin	502,56	5,025 6
4-Methoxyglucobrassicin	516,59	5,165 9
Neoglucobrassicin	516,59	5,165 9
Progoitrin	427,49	4,274 9
Sinalbin	463,52	4,635 2
Sinigrin	397,47	3,974 7

5.3.2 Epiprogoitrin (10 $\mu\text{mol/ml}$)

5.3.3 Glucoalyssin (10 $\mu\text{mol/ml}$)

5.3.4 Glucoarabin (10 $\mu\text{mol/ml}$)

5.3.5 Glucobrassicinapin (10 $\mu\text{mol/ml}$)

5.3.6 Glucobrassicin (10 $\mu\text{mol/ml}$)

- 5.3.7 **Glucocamelinin** (10 µmol/ml)
- 5.3.8 **Glucoerucin** (10 µmol/ml)
- 5.3.9 **Glucoiberin** (10 µmol/ml)
- 5.3.10 **Gluconapin** (10 µmol/ml)
- 5.3.11 **Gluconapoleiferin** (10 µmol/ml)
- 5.3.12 **Gluconasturtiin** (10 µmol/ml)
- 5.3.13 **Glucoraphanin** (10 µmol/ml)
- 5.3.14 **Glucoraphenin** (10 µmol/ml)
- 5.3.15 **Glucotropaeolin** (10 µmol/ml)
- 5.3.16 **Homoglucocamelinin** (10 µmol/ml)
- 5.3.17 **4-Hydroxyglucobrassicin** (10 µmol/ml)
- 5.3.18 **4-Methoxyglucobrassicin** (10 µmol/ml)
- 5.3.19 **Neoglucobrassicin** (10 µmol/ml)
- 5.3.20 **Progoitrin** (10 µmol/ml)
- 5.3.21 **Sinalbin** (10 µmol/ml)
- 5.3.22 **Sinigrin** (10 µmol/ml)
- 5.3.23 **Mischstandardlösung** (100 nmol/ml)

In einen 10-ml-Messkolben (6.11) werden 100 µl jeder Stammlösung 5.3.2 bis 5.3.22 (10 µmol/ml) pipetiert (6.12) und mit Extraktionslösemittel (5.4.1) bis zur Markierung aufgefüllt.

ANMERKUNG 1 Je nach beabsichtigter Anwendung kann eine Auswahl der Standardlösungen verwendet werden.

ANMERKUNG 2 Bei Lagerung < -18 °C ist die Lösung 1 Jahr stabil. Das Extraktionslösemittel [Methanol : Wasser (70 : 30) (V : V)] ist das bevorzugte Lösemittel, da es eine bessere Stabilität der Glucosinolate bietet als Wasser.

5.3.24 **Mischstandardlösung** (10 nmol/ml)

2 ml der Mischstandardlösung 100 nmol/ml (5.3.23) werden in einen 20-ml-Messkolben (6.11) pipetiert (6.12) und mit Extraktionslösemittel (5.4.1) bis zur Marke aufgefüllt.

ANMERKUNG Bei Lagerung < -18 °C ist die Lösung 1 Jahr stabil. Das Extraktionslösemittel [Methanol : Wasser (70 : 30) (V : V)] ist das bevorzugte Lösemittel, da es eine bessere Stabilität der Glucosinolate bietet als Wasser.

5.3.25 **Mischstandardlösung** (1 nmol/ml)

500 µl der Mischstandardlösung 100 nmol/ml (5.3.23) werden in einen 50-ml-Messkolben (6.11) pipetiert (6.12) und mit Extraktionslösemittel (5.4.1) bis zur Marke aufgefüllt.

ANMERKUNG Bei Lagerung < -18 °C ist die Lösung 1 Jahr stabil. Das Extraktionslösemittel [Methanol : Wasser (70 : 30) (V : V)] ist das bevorzugte Lösemittel, da es eine bessere Stabilität der Glucosinolate bietet als Wasser.

5.3.26 Kalibrierlösungen in wässriger Lösung

Die Kalibrierlösungen werden nach Tabelle 3 hergestellt. Es wird direkt in HPLC-Fläschchen (siehe ANMERKUNG) pipettiert (6.12).

Tabelle 3 — Herstellung der Kalibrierstandards in wässriger Lösung

Code	Konzentration nmol/ml	Mischstandard- lösung 1 nmol/ml (5.3.25) µl	Mischstandard- lösung 10 nmol/ml (5.3.24) µl	Mischstandard- lösung 100 nmol/ml (5.3.23) µl	Wasser (5.2.3) µl
Kal 1	0	0	0	0	1 000
Kal 2	0,01	10	0	0	990
Kal 3	0,02	20	0	0	980
Kal 4	0,05	50	0	0	950
Kal 5	0,10	0	10	0	990
Kal 6	0,25	0	25	0	975
Kal 7	0,50	0	50	0	950
Kal 8	1,0	0	0	10	990
Kal 9	2,5	0	0	25	975
Kal 10	5,0	0	0	50	950

Die Kalibrierstandards sollten an jedem neuen Analysentag erstellt werden. Es wird empfohlen, alle Kalibrierstandards zu verwenden, jedoch mindestens die Kalibrierstandards Kal 1, 3 bis 8.

ANMERKUNG Die erforderlichen Kalibrierpunkte sind von den in den Proben (siehe 7.3) erwarteten Konzentrationen, dem verwendeten Verdünnungsfaktor (siehe 7.3) und dem Dynamikbereich des Massenspektrometers (siehe Abschnitt 8) abhängig.

5.4 Reagenzien

5.4.1 Extraktionslösemittel: Methanol : Wasser (70 : 30) (V : V)

700 ml Methanol (5.2.1) werden mit 300 ml Wasser (5.2.3) gemischt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und kann einen Monat verwendet werden.

5.4.2 Mobile Phase A: 0,1%ige Essigsäure in Wasser

1 ml Essigsäure (5.2.2) wird in 1 000 ml Wasser (5.2.3) pipettiert (6.12). Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und kann einen Monat verwendet werden.

ANMERKUNG Die Essigsäurekonzentration kann in dem Bereich von 0,01 % bis 0,1 % eingestellt werden, um die Aufbewahrung der Analyten auf der analytischen Säule zu optimieren.

5.4.3 Mobile Phase B: Methanol (5.2.1)

5.5 Qualitätskontrollmaterial

Ein geeignetes Material wird in jede Serie aufgenommen und für Qualitätszwecke verwendet. Dieses Material kann ein Referenzmaterial¹ bzw. ein Material mit bekannter natürlicher Kontamination oder eine mit bekannten Mengen der Glucosinolate angereicherte Blindprobe sein.

6 Geräte

Übliche Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte.

6.1 Analysenwaage mit einer Massenauflösung von 0,1 mg oder besser

6.2 Analysenwaage mit einer Massenauflösung von 1 mg oder besser

6.3 (Mikro-)Mühle

6.4 Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen, 50 ml, mit Schraubverschluss

6.5 Wasserbad

Geeignet, eine Temperatur von $75\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ aufrechtzuerhalten.

6.6 Vortex-Mischer oder Minishaker

6.7 Vertikal- oder Horizontalschüttler, einstellbar

6.8 Flasche aus Braunglas von 4 ml mit Schraubverschluss

6.9 HPLC-Autosampler-Fläschchen, Glas oder Polypropylen, 1,5 ml

6.10 Zentrifuge, für die Verwendung mit 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.4) geeignet

6.11 Messkolben, kalibriert auf 10 ml, 20 ml, 50 ml

6.12 Kalibrierte mikrometrische Pipette(n)

6.13 HPLC-System, bestehend aus:

6.13.1 Autosampler, thermostatisiert

Geeignet, eine Temperatur von $10\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ aufrechtzuerhalten.

6.13.2 Binäres Pumpensystem

Geeignet, einen binären Gradienten bei für die verwendete analytische Säule geeigneten Fließgeschwindigkeiten mit ausreichender Genauigkeit zu etablieren.

6.13.3 Säulenofen, thermostatisiert

Geeignet, eine Temperatur von $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ aufrechtzuerhalten.

6.13.4 Analytische Säule

1 ERM®-BC366R Rapssamen, ERM®-BC190R Rapssamen und ERM®-BC367R Rapssamen sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Empfehlung des CEN für diese Produkte dar.

Enthält C18-Umkehrphasen-Packungsmaterial, das zur Basislinientrennung der Analyten mit identischer Molekülmasse geeignet ist. Eine stationäre C18-Phase mit chemisch geladener Oberfläche hat sich als gut geeignet erwiesen.

6.13.5 Vorsäule, optional

Sie enthält das gleiche Material für die stationäre Phase wie die analytische Säule und mit geeigneten Abmessungen.

6.14 Tandem-Massenspektrometer

Geeignet, im negativen Modus ein Multiple/Selected Reaction Monitoring bei ausreichend großem Dynamikbereich und ausreichender Abtastgeschwindigkeit durchzuführen, und zur Trennung von Masseneinheiten geeignet sowie mit einem rechnergestützten Datenverarbeitungssystem ausgestattet. Es darf jede Ionenquelle eingesetzt werden, die zu einer ausreichenden Ionisierung führt.

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

Laborproben sollten, falls möglich, in Übereinstimmung mit Europäischen Rechtsvorschriften [6] oder in jedem anderen Fall nach EN ISO 6498 genommen und vorbereitet werden.

Die Proben werden in einer Mühle (6.3) auf < 1 mm homogenisiert.

7.2 Prüfmenge

7.2.1 Ölsaaten und Ölsaatenenerzeugnisse

Die Menge der untersuchten homogenisierten Ölsaaten- oder Ölsaatenenerzeugnisprobe (7.1) beträgt $1,00 \text{ g} \pm 0,02 \text{ g}$.

Die Menge der homogenisierten Ölsaaten- oder Ölsaatenenerzeugnisprobe darf auf $0,50 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ reduziert werden. In diesem Fall muss die Menge des Extraktionslösemittels entsprechend reduziert werden (7.3.1).

7.2.2 Mischfuttermittel

Die Menge der homogenisierten Mischfuttermittelprobe (7.1), die untersucht wird, beträgt $1,00 \text{ g} \pm 0,02 \text{ g}$.

7.3 Extraktion

7.3.1 Ölsaaten und Ölsaatenenerzeugnisse

Eine Prüfmenge von $1,00 \text{ g} \pm 0,02 \text{ g}$ der homogenisierten Probe (7.2.1) wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.4) eingewogen (6.2). 25 ml Extraktionslösemittel (5.4.1) werden zugegeben, 10 s geschüttelt (6.6) und das Röhrchen in ein Wasserbad bei 75°C (6.5) gestellt (siehe ANMERKUNG 1). Die Probe wird 15 min erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Röhrchen wird 60 min in einen Schüttler gestellt, der mit mäßiger Geschwindigkeit rotiert (6.7).

Das Zentrifugieren des Röhrchens erfolgt 5 min bei $2\,000 \text{ g}$ und Raumtemperatur (6.10). 5 μl des Überstandes werden in ein HPLC-Fläschchen (6.9) überführt, es werden 995 μl Wasser zugegeben, und das Fläschchen wird geschlossen (siehe ANMERKUNG 2).

ANMERKUNG 1 Ein Extraktionslösemittel, das 70 % (Volumenanteil) Methanol enthält, bietet den besten Kompromiss zwischen Analytenstabilität und Extraktionseffizienz. Ein Extraktionslösemittel mit einem höheren organischen Anteil (z. B. 80 % Methanol) erhöht die Stabilität der Analyten (langsamer Abbau durch Myrosinase), führt aber auch zu einer geringeren Extraktionsleistung. Ein Extraktionslösemittel mit einem geringeren organischen Anteil (z. B. 60 % Methanol