

DIN EN ISO 9167

ICS 67.200.20

Ersatz für
DIN EN ISO 9167:2019-09**Rapssamen und Rapsschrot –
Bestimmung des Glucosinolatgehaltes –
Verfahren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (ISO 9167:2019);
Deutsche Fassung EN ISO 9167:2019**

Rapeseed and rapeseed meals –
Determination of glucosinolates content –
Method using high-performance liquid chromatography (ISO 9167:2019);
German version EN ISO 9167:2019

Graines et tourteaux de colza –
Dosage des glucosinolates –
Méthode par chromatographie liquide à haute performance (ISO 9167:2019);
Version allemande EN ISO 9167:2019

Gesamtumfang 39 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 9167:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsaaten, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-05-05 AA „Gemeinschaftsausschuss von DIN und DGF für die Analytik von Fetten, Ölen, Fettprodukten, verwandten Stoffen und Rohstoffen (GA Fett)“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

ISO 664	siehe	DIN EN ISO 664
ISO 665	siehe	DIN EN ISO 665
ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5725:1986	siehe	DIN ISO 5725:1988-04
ISO 5725 (all parts)	siehe	DIN ISO 5725 (alle Teile)
ISO 21294	siehe	DIN EN ISO 21294

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 9167-1:2013-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aufnahme von Rapsschrot in den Anwendungsbereich mit Hinzufügung eines neuen Ringversuchs;
- b) normative Verweisungen aktualisiert bzw. ergänzt;
- c) Aufnahme des Abschnittes 3 „Begriffe“;
- d) Aktualisierung des Abschnittes 5 „Reagenzien“ (z. B. bei „Interner Standard“ und „Mobile Phasen“);
- e) in Abschnitt 9.2 70%iges Methanol wegen der geringeren Toxizität durch 50%iges Methanol ersetzt [6];
- f) in Abschnitt 9.2 wird anstelle von zwei nur eine Extraktion durchgeführt;
- g) ausführliche Aktualisierung des Abschnitts 9.6.2 „Geräteeinstellung“ (ehemals 8.6.1);
- h) in Abschnitt 10.2 und Abschnitt E.5.1 den Begriff „relativer Proportionalitätsfaktor“ anstelle von „Kalibrierfaktor“ verwendet;
- i) Anhang A (informativ) „Ergebnisse von Ringversuchen — HPLC-Verfahren mit Gradientenelution“ neu aufgenommen;
- j) Anhang B (normativ) „Überprüfung des Titors der vorbereiteten internen Standardlösung“ neu aufgenommen;
- k) Anhang C (normativ) „Herstellung und Prüfung einer gereinigten Sulfatase-Lösung und Überprüfung des Desulfatierungsschritts auf Ionenaustauschssäulen“ neu aufgenommen;

- l) Anhang D (informativ) „Qualifizierung der Leistungskriterien von HPLC-System und -Säule“ neu aufgenommen;
- m) in Anhang E isokratischen Modus aufgenommen;
- n) Norm redaktionell überarbeitet und an die derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Gegenüber DIN EN ISO 9167:2019-09 wurden folgende Korrekturen vorgenommen:

- a) Korrektur der Formel zur Berechnung des Gehalts C_g eines jeden Glucosinolats, angegeben in Mikromol je Gramm Trockenmasse des Produkts (E.1);
- b) die Übersetzung in D.2.3 wurde angepasst.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 9167-1: 1995-09, 2013-12

DIN EN ISO 9167: 2019-09

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 664, Ölsamen — *Verkleinerung der Laboratoriumsprobe auf die Untersuchungsprobe*

DIN EN ISO 665, Ölsamen — *Bestimmung des Gehaltes an Feuchtigkeit und flüchtigen Bestandteilen*

DIN EN ISO 21294, Ölsamen — *Manuelle oder automatische diskontinuierliche Probenahme*

DIN ISO 3696, Wasser für analytische Zwecke — *Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 5725:1988-04, *Präzision von Messverfahren — Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision von festgelegten Messverfahren durch Ringversuche; Identisch mit ISO 5725, Ausgabe 1986*

DIN ISO 5725 (alle Teile), *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen*

Deutsche Fassung

Rapssamen und Rapsschrot —
Bestimmung des Glucosinolatgehaltes —
Verfahren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie
(ISO 9167:2019)

Rapeseed and rapeseed meals —
Determination of glucosinolates content —
Method using high-performance liquid chromatography
(ISO 9167:2019)

Graines et tourteaux de colza —
Dosage des glucosinolates —
Méthode par chromatographie liquide à haute
performance (ISO 9167:2019)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 4. Mai 2019 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
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
5 Reagenzien	8
6 Geräte	10
7 Probenahme	12
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	12
9 Durchführung	12
9.1 Einwaage	12
9.2 Extraktion der Glucosinolate	12
9.3 Blindversuch	13
9.4 Herstellung der Ionenaustauschersäulen	13
9.5 Reinigung und Desulfatierung	13
9.6 Chromatographie mit Gradientenelution	14
10 Angabe der Ergebnisse	15
10.1 Berechnung des Gehalts der einzelnen Glucosinolate	15
10.2 Relative Proportionalitätsfaktoren	16
10.3 Berechnung des Gesamtgehalts an Glucosinolaten	17
11 Präzision	17
11.1 Ringversuch	17
11.2 Wiederholpräzision	17
11.3 Vergleichpräzision	17
12 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Ergebnisse von Ringversuchen — HPLC-Verfahren mit Gradientenelution	18
Anhang B (normativ) Überprüfung des Titers der hergestellten internen Standardlösung	20
B.1 Bestimmung der Reinheit	20
B.2 Bestimmung des Titers	20
B.3 Relative Proportionalitätsfaktoren	20
Anhang C (normativ) Herstellung und Prüfung einer gereinigten Sulfatase-Lösung und Überprüfung des Desulfatierungsschritts an Ionenaustauschersäulen	21
C.1 Allgemeines	21
C.2 Kurzbeschreibung	21
C.3 Reagenzien und Geräte	21
C.4 Durchführung	22

Anhang D (informativ) Qualifizierung der Leistungskriterien von HPLC-System und -Säule	26
D.1 Allgemeines	26
D.2 Durchführung	26
D.3 Eignung des Systems	26
Anhang E (informativ) Elution im isokratischen Modus.....	28
E.1 Interner Standard.....	28
E.2 Mobile Phasen für die isokratische Elution	28
E.3 Säule für die isokratische Elution.....	28
E.4 Chromatographie mit isokratischer Elution (vereinfachtes Verfahren)	29
E.5 Angabe der Ergebnisse	31
E.6 Berechnung des Gesamtgehalts an Glucosinolaten	32
E.7 Präzision	32
E.8 Untersuchungsbericht	33
E.9 Ergebnisse des Ringversuchs für das HPLC-Verfahren mit isokratischer Elution	33
Literaturhinweise.....	35

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 9167:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 307 „Ölsaaten, tierische und pflanzliche Fette und Öle und deren Nebenprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2019, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2019 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 ersetzt EN ISO 9167-1:1995.

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.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 9167:2019 wurde von CEN als EN ISO 9167:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 2, *Oleaginous seeds and fruits and oilseed meals* erarbeitet.

Diese erste Ausgabe ersetzt ISO 9167-1:1992, die technisch überarbeitet wurde. Sie enthält auch die Änderung ISO 9167-1:1992/Amd.1:2013. Die wesentlichen Änderungen sind folgende:

- Rapsschrot wurde in den Anwendungsbereich mit der Hinzufügung eines neuen Ringversuchs aufgenommen;
- in 9.2 wurde 70%iges Methanol wegen der geringeren Toxizität durch 50%iges Methanol ersetzt [6];
- in 9.2 wird nur eine Extraktion durchgeführt anstelle von zwei;
- in 10.2 und E.5.1 wurde die Benennung „relativer Proportionalitätsfaktor“ anstelle von „Kalibrierfaktor“ verwendet;
- der isokratische Modus wurde in Anhang E aufgenommen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Die Glucosinolate in Rapssamen können durch chromatographische, enzymatische oder spektroskopische Verfahren analysiert werden. Dieses Dokument beschreibt ein chromatographisches Verfahren mit zwei Elutionsbedingungen (Gradienten- und isokratische Elution) zur qualitativen und quantitativen Analyse von einzelnen Glucosinolaten in Rapssamen und Rapsschrot. Das Verfahren mit Gradientenelution wird als Referenzverfahren angesehen, während das Verfahren mit isokratischer Elution als vereinfachtes Verfahren betrachtet wird und in Anhang E zur Information aufgeführt ist.

Dieses Dokument legt ein Verfahren unter Anwendung von Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, en: high-performance liquid chromatography) mit Gradientenelution als Referenzverfahren fest. Bei dem isokratischen Modus unterscheiden sich die Wahl des internen Standards, die chromatographischen Bedingungen und die Ergebnisse der Trennung vom Referenzverfahren. Diese Aspekte werden in Anhang E behandelt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung der einzelnen Glucosinolate in Rapssamen und Rapsschrot mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Gradientenelution fest.

Dieses Verfahren wurde an Rapssamen und Rapsschrot (*Brassica rapa*, *Brassica napus* und *Brassica juncea*) geprüft, ist jedoch auf andere Pflanzenmaterialien unter der Bedingung anwendbar, dass die vorkommenden Glucosinolate zuvor identifiziert wurden und in diesem Dokument beschrieben sind. Die quantitative Bestimmung des (der) betreffenden Glucosinolats (Glucosinolate) wird nicht durchgeführt.

ANMERKUNG Glucosinolate, die am Glucosemolekül substituiert sind, werden mit diesem Verfahren nicht erfasst, sind für handelsübliche Rapssamen und Rapsschrot jedoch auch von untergeordneter Bedeutung.

Anhang A enthält die Ergebnisse der Ringversuche für das HPLC-Verfahren mit Gradientenelution. Anhang B stellt dar, wie der Titer der hergestellten internen Standardlösung überprüft wird. Anhang C stellt dar, wie die gereinigte Sulfatase-Lösung hergestellt und geprüft wird und wie der Desulfatierungsschritt an der Ionenaustauschersäule überprüft wird. Anhang D stellt die Qualifikation der HPLC- und Säulenleistungskriterien dar.

Die Analyse des Glucosinolatgehalts in Rapssamen kann auch unter Anwendung eines isokratischen Elutionsmodus erfolgen. Das erfordert einige Modifikationen des Verfahrens (interner Standard, HPLC-Säule und HPLC-Pufferlösungen), wie in Anhang E beschrieben.

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).

ISO 664, *Oilseeds — Reduction of laboratory sample to test sample*

ISO 665, *Oilseeds — Determination of moisture and volatile matter content*

ISO 771, *Oilseed residues — Determination of moisture and volatile matter content*

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 5502, *Oilseed residues — Preparation of test samples*

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 <http://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

4 Kurzbeschreibung

Extraktion der Glucosinolate mit einem Wasser-Ethanol-Gemisch, danach Reinigung sowie enzymatische Desulfatierung mit Ionenaustauschersäulen. Bestimmung mittels Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie und Gradientenelution (Referenzverfahren) oder isokratischer Elution (Schnellverfahren) mit anschließender Detektion mittels UV-Absorptionsmessung.

5 Reagenzien

Soweit nicht anders festgelegt, sind Reagenzien mit anerkanntem Reinheitsgrad „zur Analyse“ zu verwenden sowie Wasser, das der Qualität 2 nach ISO 3696 entspricht.

5.1 Ethanol, Volumenanteil = 50 %.

5.2 Natriumacetat, $c = 0,02 \text{ mol/l}$ bei pH 4,0, hergestellt durch Mischen von Natriumacetat, $c = 0,02 \text{ mol/l}$ und Essigsäure, $c = 0,02 \text{ mol/l}$, um eine Lösung mit pH = 4,0 zu erhalten.

5.3 Sulfatase, *Helix pomatia*, Typ H1, gereinigt und verdünnt wie in Anhang C beschrieben.

5.4 Imidazolformiat, $c = 6 \text{ mol/l}$.

204 g Imidazol werden in einem 500-ml-Becherglas in 113 ml Ameisensäure gelöst. Das Gemisch wird in einen 500-ml-Messzylinder überführt und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

5.5 Interner Standard.

Es wird entweder Sinigrin (Kalium-Allylglucosinolat-Monohydrat, $M = 415,5 \text{ g/mol}$) (5.6) oder Glucotropaeolin (Kalium-Benzylglucosinolat, $M = 447,5 \text{ g/mol}$ oder Tetramethylammonium-Benzylglucosinolat, $M = 482,6 \text{ g/mol}$) (5.7) verwendet. Das Glucotropaeolin darf in hydratisierter Form verwendet werden; dann müssen die Molmasse und die Reinheit bekannt sein und bei der Herstellung der Lösung berücksichtigt werden.

Die Wahl des internen Standards wird durch seine perfekte chromatographische Trennung von anderen Glucosinolaten der Probe abhängig gemacht. Das naturgemäße Nichtvorhandensein des internen Standards oder von Glucosinolaten, die nicht von letzterem getrennt sind, in der Probe kann mit einem Blindversuch (siehe 9.3) überprüft werden.

Bei der Gradientenelution an einer Octyl- oder Octadecyl-Phase als stationäre Phase kann Sinigrin oder Glucotropaeolin verwendet werden. Es ist jedoch manchmal schwierig, Glucotropaeolin von anderen natürlich vorkommenden Glucosinolaten von geringerer Bedeutung (Minor-Glucosinolaten) zu trennen.

Bei der isokratischen Elution an einer Cyanopropyl-Phase als stationäre Phase (siehe Anhang E) kann Sinigrin nicht für die Analyse von Rapssamen verwendet werden, weil es nicht von den anderen Glucosinolaten getrennt wird. Stattdessen muss Glucotropaeolin verwendet werden.

In den häufigsten Fällen (d. h. wenn Rapssamen einen angenommenen Glucosinolatgehalt zwischen jeweils einschließlich $10 \mu\text{mol/g}$ und $50 \mu\text{mol/g}$ haben) wird der interne Standard in Form einer Lösung von 20 mmol/l verwendet. Für Rapssamen mit einem angenommenen Glucosinolatgehalt von weniger als $10 \mu\text{mol/g}$ oder mehr als $50 \mu\text{mol/g}$ sind die je Probe verwendeten Konzentrationen der internen Standardlösungen in Tabelle 1 angegeben.

Der Titer der hergestellten internen Standardlösung wird wie in Anhang B beschrieben überprüft.