

DIN EN 17504



ICS 65.120

Einsprüche bis 2020-05-27

Entwurf

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Gossypol in Baumwollsamensamen und Futtermitteln mittels
LC-MS/MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17504:2020**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of gossypol in cotton seed and feeding stuff by LC-MS/MS;
German and English version prEN 17504:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-03-27 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 45 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17504:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

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

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 5725-5 siehe DIN ISO 5725-5

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*

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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.10b

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	8
7.3 Prüfmenge	9
7.4 Extraktion	9
8 LC-MS/MS-Analyse	10
8.1 Allgemeines	10
8.2 Analysensequenz	11
9 Ergebnisse	12
9.1 Identifizierung	12
9.2 Quantifizierung	12
10 Präzision	14
10.1 Wiederholpräzision	14
10.2 Vergleichpräzision	14
11 Prüfbericht	15
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	16
Anhang B (informativ) Beispiel für LC-MS/MS-Bedingungen	18
B.1 Allgemeines	18
B.2 HPLC-Bedingungen	18
B.3 MS-Bedingungen	19
Anhang C (informativ) Beispielchromatogramm von Gossypol in einem Mischfuttermittel	20
Literaturhinweise	21

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17504:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel - Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

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 beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von freiem Gossypol, das mittels angesäuertem Acetonitril/Wasser extrahierbar ist, in Baumwollsamensamen, aus Baumwollsamensamen hergestellten Produkten und Alleinfuttermitteln durch Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

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

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 3696:1995, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen* (ISO 3696:1987)

3 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

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

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

4 Kurzbeschreibung

Freies Gossypol wird durch Mischen einer Probe von 0,4 g Baumwollsamensamen oder 1,0 g Baumwollsamensamenprodukt oder Mischfuttermittel mit 40 ml Acetonitril : Wasser : Phosphorsäure (80 : 20 : 0,1) extrahiert. Das Gemisch wird 1 h lang 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 beobachtete 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 %, HPLC-Qualität.

ANMERKUNG 1 Gossypol ist ein racemisches Gemisch aus (+)- und (–)-Gossypol. Bei diesem Verfahren erfolgt keine Trennung der Enantiomeren des Gossypols.

ANMERKUNG 2 Gossypol steht auch in Form eines 1 : 1-Komplexes mit Essigsäure zur Verfügung. Bei diesem Verfahren kann entweder ein Standard von Gossypol oder von Gossypol-Essigsäure verwendet werden.

ANMERKUNG 3 Gossypol ist lichtempfindlich.

5.2 Acetonitril, LC-MS- oder HPLC-Qualität.

5.3 Phosphorsäure 85 %

5.4 Ameisensäure

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) beigemischt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und kann 1 Monat lang 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) beigemischt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und kann 1 Monat lang 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) beigemischt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und kann 1 Monat lang verwendet werden.

5.9 Gossypol-Stammlösung, 1 mg/ml

20 mg Gossypol (5.1) werden eingewogen (6.1) und in einen 20-ml-Messkolben überführt. Das Gewicht, die Reinheit und die Erscheinungsform des Standards sind zu berücksichtigen. Es wird Extraktionslösemittel (5.6) zugegeben, durch Mischen gelöst und mit Extraktionslösung (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 kann die Lösung 6 Monate lang verwendet werden.

5.10 Gossypol-Standardlösung, 10 µg/ml

Mit einer Pipette werden 100 µl Gossypol-Stammlösung (5.9) in eine Flasche aus Braunglas (6.7) überführt. Es werden 9,90 ml Extraktionslösemittel (5.6) zugegeben, und es wird gemischt. Die Standardlösung wird bei $< 18^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung 2 Monate lang verwendet werden. Diese Standardlösung wird zur Erstellung von Kalibrierkurven verwendet.

5.11 Gossypol-Standardlösung, 1 µg/ml

Mit einer Pipette wird 1,00 ml Gossypol-Standardlösung (5.10) in eine Flasche aus Braunglas (6.7) überführt. Es werden 9,00 ml Extraktionslösemittel (5.6) zugegeben, und es wird gemischt. Die Standardlösung wird bei $< 18^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung 2 Monate lang verwendet werden. Diese Standardlösung wird zur Erstellung von Kalibrierkurven verwendet.

5.12 Kalibrierlösungen

Kalibrierlösungen werden unter Verwendung der Standardlösungen (5.10) und (5.11) sowie des Extraktionslösemittels (5.6) nach Tabelle 1 angesetzt. Es wird direkt in HPLC-Fläschchen (6.8) pipettiert.

Tabelle 1 — Herstellung der Kalibrierstandards

	Konzentration µg/ml	Standardlösung von 1 µg/ml (5.11) µl	Standardlösung von 10 µg/ml (5.10) µl	Extraktions- lösemittel (5.6) µl
Kal 1	0,00	0	0	1 000
Kal 2	0,025	25	0	975
Kal 3	0,05	50	0	950
Kal 4	0,10	100	0	900
Kal 5	0,25	0	25	975
Kal 6	0,50	0	50	950
Kal 7	0,75	0	75	925
Kal 8	1,00	0	100	900

6 Geräte

Übliche Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:

6.1 Analysenwaage, mit einer Fehlergrenze von 0,1 mg oder besser.

6.2 Laborwaage, mit einer Fehlergrenze von 0,01 g oder besser.

6.3 Pipettierer

Einstellbar, geeignet für organische Lösemittel, ordnungsgemäß kalibriert, mit entsprechenden Spitzen.

6.4 Filterscheibeneinheiten, Polytetrafluorethylen (PTFE), mit einer Porengröße von 0,45 µm oder kleiner.

6.5 Zentrifugenröhrchen, Polypropylen, 50 ml, mit Schraubverschluss.

6.6 Zentrifuge, für 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.5) geeignet.

6.7 Glasflaschen, braun, verschiedene Größen.

6.8 HPLC-Autosampler-Fläschchen, Braunglas, 1,5 ml, mit Kappen.

6.9 Minishaker oder Vortex-Mischer

6.10 Ultraschallbad

6.11 Vertikal- oder Horizontalschüttler, einstellbar.

6.12 Labormühle

6.13 HPLC-System, bestehend aus:

6.13.1 Autosampler, thermostatisiert

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

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 mindestens $40\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ zu halten.

6.13.4 Analytische Säule

Enthält C18-Umkehrphasen-Packungsmaterial, das zur Basislinientrennung des Analyten von Verbindungen mit identischer Molekülmasse geeignet ist.

6.13.5 Vorsäule, optional

Mit dem gleichen Material für die stationäre Phase wie die analytische Säule und mit geeigneten Abmessungen.

6.14 Tandem-Massenspektrometer

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

7 Verfahren

7.1 Allgemeines

Ein Futtermittel stellt eine komplexe Matrix dar, die sehr viele verschiedene Inhaltsstoffe in unterschiedlichen Mengen enthält. Es können proben- und instrumentenabhängige Matrixeffekte (Unterdrückung/Verstärkung) auftreten, die die Quantifizierung des Analyten in der Probe beeinflussen können (siehe ANMERKUNG). Um diese Matrixeffekte zu korrigieren, wird eine Wiederfindungsprobe (7.4.3) einbezogen.

Je nach Empfindlichkeit und linearem Bereich des Massenspektrometers kann es erforderlich sein, die Probenextrakte (7.4) einem geeigneten Faktor entsprechend mit Extraktionslösemittel (5.6) zu verdünnen, wobei die erwartete Konzentration des Analyten in der Probe zu berücksichtigen ist, um die Response des Detektors innerhalb des Dynamikbereiches des Massenspektrometers zu halten. Als Alternative darf das Injektionsvolumen der Probe innerhalb des kalibrierten Bereiches des Injektionssystems reduziert werden.

ANMERKUNG Unter den in diesem Dokument beschriebenen Bedingungen waren Matrixeffekte (Ionenunterdrückung oder -verstärkung) bei Baumwollsaamen und Baumwollsaamenprodukten nicht signifikant. Bei Mischfuttermitteln wurden Matrixeffekte festgestellt.

7.2 Probenvorbehandlung

Laborproben sollten, falls möglich, in Übereinstimmung mit Europäischen Rechtsvorschriften [2] oder in jedem anderen Fall nach EN ISO 6498 genommen und vorbereitet werden.

Die Proben werden in einer Labormühle (6.12) auf < 1 mm homogenisiert.

Baumwollsaamen können große Mengen an Gossypol enthalten. Um eine signifikante Verschleppung zu vermeiden, sind zwischen den Proben alle Teile der Mühle sorgfältig zu reinigen. Wenn Baumwollsaamenproben zusammen mit Baumwollsaamenprodukten oder Mischfuttermitteln analysiert werden, sollten die Proben der Baumwollsaamenprodukte und des Mischfutters vor den Baumwollsaamenproben gemahlen werden.

7.3 Prüfmenge

7.3.1 Baumwollsaamen

Die Menge des homogenisierten Baumwollsaamens, die untersucht wird, beträgt $0,4 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$.

Das Laboratorium darf eine größere Untersuchungsprobenmenge verwenden, um die Repräsentativität der Probe zu verbessern. In diesem Fall muss die Menge des Extraktionslösemittels entsprechend angepasst werden (7.4).

7.3.2 Baumwollsaamenprodukte und Mischfuttermittel

Die Menge des homogenisierten Baumwollsaamenprodukts oder Mischfuttermittels, die untersucht wird, beträgt $1,0 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$.

Das Laboratorium darf eine größere Untersuchungsprobenmenge verwenden, um die Repräsentativität der Probe zu verbessern. In diesem Fall muss die Menge des Extraktionslösemittels entsprechend angepasst werden (7.4).

7.4 Extraktion

7.4.1 Baumwollsaamen

Eine Prüfmenge von $0,4 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ der homogenisierten Probe (7.3) wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.5) eingewogen (6.2). Es werden 40,0 ml Extraktionslösemittel (5.6) zugegeben, und mit einem Vortex-Mischer (6.9) wird 15 s lang gemischt. Das Röhrchen wird für 5 min in ein Ultraschallbad (6.10) gestellt, und anschließend wird das Röhrchen 1 h lang geschüttelt (6.11).

Das Zentrifugieren des Röhrchens erfolgt 5 min lang bei $3\,000 \text{ min}^{-1}$ und Raumtemperatur (6.6). 10 μl des Extrakts werden in ein HPLC-Fläschchen (6.8) überführt, es werden 990 μl Extraktionslösemittel (5.6) zugegeben, und es wird gemischt (siehe ANMERKUNG).

ANMERKUNG Baumwollsaamen kann Gossypol in hohen Konzentrationen (im Bereich von 2 000 mg/kg bis 8 000 mg/kg) enthalten. Die erwartete Gossypolkonzentration in unverdünnten Baumwollsaamenextrakten liegt im Bereich von 20 $\mu\text{g/ml}$ bis 80 $\mu\text{g/ml}$. Nach der Verdünnung des Probenextrakts liegt die erwartete Konzentration im Bereich von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,8 $\mu\text{g/ml}$.

7.4.2 Baumwollsaamenprodukte und Mischfuttermittel

Eine Prüfmenge von $1,0 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ der homogenisierten Probe (7.3) wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.5) eingewogen (6.2). Es werden 40,0 ml Extraktionslösemittel (5.6) zugegeben, und mit einem Vortex-Mischer (6.9) wird 15 s lang gemischt. Das Röhrchen wird für 5 min in ein Ultraschallbad (6.10) gestellt, und anschließend wird das Röhrchen 1 h lang geschüttelt (6.11).

Das Zentrifugieren des Röhrchens erfolgt 5 min lang bei $3\,000 \text{ min}^{-1}$ und Raumtemperatur (6.6). 200 μl des Extrakts (siehe ANMERKUNG 1) werden in ein HPLC-Fläschchen (6.8) überführt, es werden 800 μl Extraktionslösung (5.6) zugegeben, und es wird gemischt (siehe ANMERKUNG 2).

Wenn eine Probe Gossypol in einer Konzentration enthält, die den Bereich der Kalibrierkurve übersteigt, ist eine erneute Analyse erforderlich (siehe ANMERKUNG 3). Dazu wird der Probenextrakt mit Extraktionslösungsmittel (5.6) in einem geeigneten Verhältnis verdünnt, sodass eine Konzentration des Probenextrakts erhalten wird, die innerhalb des Bereiches der Kalibrierkurve liegt.

ANMERKUNG 1 Bei trüben Extrakten kann 1 ml des Extrakts zunächst durch ein 0,45-µm-PFTE-Membranfilter (6.4) in ein neues HPLC-Fläschchen filtriert werden. 200 µl dieses Extrakts werden mit 800 µl Extraktionslösung verdünnt.

ANMERKUNG 2 Der erwartete Bereich von Gossypol in Baumwollsaamenprodukten oder in Mischfuttermitteln umfasst 10 mg/kg bis 200 mg/kg. Es wird erwartet, dass die Gossypolkonzentration in unverdünnten Extrakten, die aus Baumwollsaamenprodukten oder Mischfuttermitteln gewonnen werden, im Bereich von 0,25 µg/ml bis 5 µg/ml liegt. Nach der Verdünnung des Probenextrakts wird die Konzentration voraussichtlich im Bereich von 0,05 µg/ml bis 1 µg/ml liegen.

ANMERKUNG 3 In bestimmten Produkten können höhere Konzentrationen von Gossypol vorliegen, und zwar im Bereich von 200 mg/kg bis 1 000 mg/kg. Bei diesen Produkten wird die Gossypolkonzentration in unverdünnten Extrakten voraussichtlich im Bereich von 5 µg/ml bis 25 µg/ml und in den verdünnten Extrakten im Bereich von 1 µg/ml bis 5 µg/ml liegen. Bei Ausführung eines zusätzlichen Fünffach-Verdünnungsschritts wird die Gossypolkonzentration in den Probenextrakten voraussichtlich im Bereich von 0,2 µg/ml bis 1,0 µg/ml liegen.

7.4.3 Wiederfindungsprobe für Mischfuttermittel

Zur Herstellung der Wiederfindungsprobe wird eine repräsentative Futtermittel-Blindwertprobe genommen (siehe ANMERKUNG).

Eine Prüfmenge von $1,0 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ der homogenisierten Probe wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.5) eingewogen (6.2). Es werden 100 µl der Gossypol-Stammlösung mit 1 mg/ml (5.9) zugegeben. Dies ist äquivalent zu 100 mg/kg. Die mit Gossypol versetzte Probe wird 15 s lang mit dem Vortex-Mischer (6.9) gemischt und 30 min eingeweicht. Es werden 40,0 ml Extraktionslösung (5.6) zugegeben, und mit einem Vortex-Mischer (6.9) wird 15 s lang gemischt. Das Röhrchen wird für 5 min in ein Ultraschallbad (6.10) gestellt, und anschließend wird das Röhrchen 1 h lang geschüttelt (6.11).

Das Zentrifugieren des Röhrchens erfolgt 5 min lang bei $3\,000 \text{ min}^{-1}$ und Raumtemperatur (6.6). 1 ml des Extrakts wird durch ein 0,45-µm-Membranfilter (6.4) in ein HPLC-Fläschchen (6.8) filtriert. 200 µl dieses Extrakts werden in ein neues HPLC-Fläschchen (6.8) pipettiert, es werden 800 µl Extraktionslösung (5.6) zugegeben, und es wird gemischt.

ANMERKUNG Eine Blindwertprobe ist eine Probe, bei der in einer vorausgehenden Analyse nachgewiesen wurde, dass sie kein Gossypol in einer Konzentration oberhalb der Nachweisgrenze enthält.

8 LC-MS/MS-Analyse

8.1 Allgemeines

Die chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen dürfen frei gewählt werden. Die optimalen Messbedingungen hängen in starkem Maße von der verwendeten gerätetechnischen Ausrüstung ab. Wichtige Kriterien und Parameter hinsichtlich der chromatographischen Trennung und Detektion des Analyten sind:

Die gewählten Säulenmaße und die chromatographischen Bedingungen sollten geeignet sein, eine Basislinientrennung des Analyten von anderen Substanzen mit gleichem Molekülmasse-zu-Ladungs-Verhältnis zu erzielen.

Die gewählten massenspektrometrischen Bedingungen sollten geeignet sein, den Analyten mit ausreichender Empfindlichkeit und Spezifität zu messen. Vorzugsweise sollte das deprotonierte Eltern-Molekülion als Vorläufer-Ion ausgewählt werden, und es sollten mindestens zwei für die Verbindung

spezifische Produkt-Ionen ausgewählt werden. Die chromatographischen Peaks sollten aus mindestens 10 Datenpunkten bestehen.

Die Analysenreihe sollte nicht begonnen werden, bevor nicht durch mindestens dreimalige Injektion einer Standardarbeitslösung (5.12) nachgewiesen wurde, dass das System stabile Retentionszeiten des Analyten liefert und die Empfindlichkeit des Detektors ausreichend und stabil ist.

Es sollte geprüft werden, ob Verschleppungseffekte auftreten, und zwar durch Injizieren eines hohen Lösemittel- oder Matrixextrakt-Standards gefolgt von einer Lösemittel-Blindprobe oder einem Leerextrakt. Durch die Auswahl eines geeigneten Waschverfahrens für das Injektorsystem sollte die Verschleppung betragsmäßig so weit wie möglich verringert werden. Durch den Einsatz eines Waschlösemittels mit hohem Anteil an organischem Lösemittel in Kombination mit einer organischen Säure (z. B. mobile Phase B (5.8)) kann die Verschleppung deutlich reduziert werden. Es kann erforderlich sein, zwischen den einzelnen Probenextrakten eine oder mehrere Extraktionslösemittel-Blindproben zu injizieren.

Je nach Empfindlichkeit und linearem Dynamikbereich des Massenspektrometers kann es erforderlich sein, die Kalibrierstandards und die Probenextrakte einem zusätzlichen Faktor entsprechend mit Extraktionslösemittel (5.6) zu verdünnen.

Ein Beispiel für geeignete Messbedingungen ist in Anhang B gegeben, und ein beispielhaftes Chromatogramm ist in Anhang C angegeben. Andere Geräte können bei entsprechenden Bedingungen ebenfalls geeignet sein.

8.2 Analysensequenz

Eine für Baumwollsaamen- und Baumwollsaamenprodukt-Proben geeignete Analysensequenz ist die folgende:

- Kalibrier-Standardlösung 0,1 µg/ml (5.12), die mindestens dreimal oder so lange injiziert wird, bis stabile Messbedingungen erreicht sind;
- Kalibrierstandards (5.12);
- Extraktionslösungs-Blindprobe (5.6);
- Probenextrakte (7.4.1 und/oder 7.4.2);
- Extraktionslösungs-Blindprobe (5.6);
- Kalibrierstandards (5.12).

In Abhängigkeit von der Probenanzahl können zwischen den Proben zusätzliche Kalibrierstandards eingefügt werden (z. B. alle 20 Proben), um innerhalb der Sequenz auftretende Abweichungen der Response des Analyten zu korrigieren.

Eine für Mischfuttermittel-Proben geeignete Analysensequenz ist die folgende:

- Kalibrier-Standardlösung 0,1 µg/ml (5.12), die mindestens dreimal oder so lange injiziert wird, bis stabile Messbedingungen erreicht sind;
- Kalibrierstandards (5.12);
- Extraktionslösungs-Blindprobe (5.6);
- Wiederfindungsprobe (7.4.3);

- Extraktionslösungs-Blindprobe (5.6);
- Probenextrakte (7.4.2);
- Extraktionslösungs-Blindprobe (5.6);
- Kalibrierstandards (5.12).

In Abhängigkeit von der Probenanzahl können zwischen den Proben zusätzliche Kalibrierstandards eingefügt werden (z. B. alle 20 Proben), um innerhalb der Sequenz auftretende Abweichungen der Response des Analyten zu korrigieren.

9 Ergebnisse

9.1 Identifizierung

Nachweis und Identifizierung von Gossypol in der Probe basieren auf dem Vorhandensein von koeluerenden chromatographischen Peaks für die für den Analyten gemessenen Übergänge. Retentionszeit und relative Häufigkeit der Übergänge sollten mit denen der Kalibrierstandards übereinstimmen. Die Abweichung der Retentionszeit von Gossypol in der Probe sollte nicht mehr als 0,2 min gegenüber der durchschnittlichen Retentionszeit von Gossypol in den Kalibrierstandards 3 bis 8 (Tabelle 1) betragen. Die relativen Intensitäten der Übergänge in der Probe sollten nicht mehr als 30 % vom Durchschnitt der relativen Intensitäten der Übergänge bei den Kalibrierstandards 3 bis 8 abweichen (Tabelle 1).

9.2 Quantifizierung

9.2.1 Allgemeines

Bei Baumwollsaamen und Baumwollsaamenprodukten basiert die Quantifizierung von Gossypol auf einer Mehrpunktkalibrierung in einem Extraktionslösemittel (5.12). Bei Mischfuttermitteln basiert die Quantifizierung auf einer Mehrpunktkalibrierung in Extraktionslösemittel (5.12) und wird um die beobachtete Wiederfindung korrigiert (siehe ANMERKUNG 1). Für sämtliche Berechnungen wird die summierte Fläche beider Produkt-Ionen verwendet (siehe ANMERKUNG 2).

ANMERKUNG 1 Die beobachtete Wiederfindung ist die Kombination von Verlusten des Analyten bei der Extraktion und von Matrixeffekten, die bei der massenspektrometrischen Analyse auftreten.

ANMERKUNG 2 Optional kann bei den Berechnungen der Analytkonzentration und der Wiederfindung nur die Fläche des Quantifier-Ions verwendet werden.

9.2.2 Linearität der Kalibrierkurve

Die Summe der Produkt-Ion-Flächen für Gossypol in den Kalibrierstandards (5.12) wird als Funktion der zugegebenen Konzentration aufgetragen. Die Schätzung der Steigung und des Ordinatenabschnitts der Kalibriergeraden erfolgt mittels gewichteter linearer Regression über alle Datenpunkte. Die Linearität der Kalibrierkurve wird mit einem geeigneten Linearitätstest (z.B. Auftragen der Residuen gegen die angepassten Werte (rvfplot); Berechnung des Korrelationskoeffizienten) überprüft. Wenn der Test eine Nichtlinearität erkennen lässt, ist ihre Ursache zu ermitteln und es sind geeignete Maßnahmen zu ergreifen (z. B. Verwendung eines eingeschränkten Bereiches von Kalibrierstandards oder Verdünnung der Extrakte).

Bei der Darstellung der Residuen gegen die angepassten Werte (rvfplot) sollten die für einzelne Kalibrierpunkte berechneten Konzentrationen um weniger als 20 % abweichen. Der Korrelationskoeffizient der Kalibrierkurve sollte mindestens 0,990 betragen.