

DIN EN 17853



ICS 65.120

Einsprüche bis 2022-07-13

Entwurf**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von intakten Glucosinolaten in Rapssaat mittels LC-MS/MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17853:2022**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of intact glucosinolates in rapeseed by LC-MS/MS;
German and English version prEN 17853:2022

Détermination par chromatographie en phase liquide de la théobromine dans les matières premières destinées aux aliments des animaux, y compris les ingrédients issus du cacao, et dans les aliments composés pour animaux;
Version allemande et anglaise prEN 17853:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-05-13 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 Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 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 109 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17853:2022) 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).

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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-5	siehe	DIN ISO 5725-5
ISO 9167:2019	siehe	DIN EN ISO 9167:2020-03

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 9167:2020-03, *Rapssamen und Rapsschrot — Bestimmung des Glucosinolatgehaltes — Verfahren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (ISO 9167:2019); Deutsche Fassung EN ISO 9167:2019*

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

– *Entwurf* –

E DIN EN 17853:2022-06

– Leerseite –

**Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren – Bestimmung von
intakten Glucosinolaten in Rapssaat mittels LC-MS/MS**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of intact glucosinolates in rapeseed
by LC-MS/MS

Détermination par chromatographie en phase liquide de la théobromine dans les matières premières desti-
nées aux aliments des animaux, y compris les ingrédients issus du cacao, et dans les aliments composés pour
animaux

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
5.6 Referenzmaterialien	12
6 Geräte	12
7 Durchführung	13
7.1 Probenvorbehandlung	13
7.2 Einwaage	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	17
9 Auswertung der Ergebnisse	17
9.1 Identifizierung	17
9.2 Quantifizierung	17
9.2.1 Allgemeines	17
9.2.2 Linearität der Kalibrierkurve	18
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 Genauigkeit	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	45
B.1 Allgemeines	45
B.2 Chromatographische Bedingungen	45
B.3 MS-Bedingungen	45
Anhang C (informativ) Beispiele für Chromatogramme	49
Anhang D (informativ) Glucosinolat-Standards aus kommerziellen Quellen	51
Literaturhinweise	53

Bilder

Bild A.1 — Grafische Darstellung der relativen Vergleichstandardabweichung (RSD_R) in Abhängigkeit von der Konzentration (mmol/kg)	44
Bild C.1 — Extrahierte Ionenchromatogramme (Modus Multiple Reaction Monitoring) einer Glucosinolat-Standardmischung von 1 nmol/ml	49
Bild C.2 — Extrahierte Ionenchromatogramme (Modus Multiple Reaction Monitoring) der im Referenzmaterial ERM-BC366 vorhandenen Glucosinolate	50

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	23
Tabelle A.3 — Präzisionsdaten zu Glucoallysin	24
Tabelle A.4 — Präzisionsdaten zu Glucoarabin	25
Tabelle A.5 — Präzisionsdaten zu Glucobrassicinapin	26
Tabelle A.6 — Präzisionsdaten zu Glucobrassicin	27
Tabelle A.7 — Präzisionsdaten zu Glucocamelinin	28
Tabelle A.8 — Präzisionsdaten zu Glucoerucin	29
Tabelle A.9 — Präzisionsdaten zu Glucoiberin	30
Tabelle A.10 — Präzisionsdaten zu Gluconapin	31
Tabelle A.11 — Präzisionsdaten zu Gluconapoleiferin	32
Tabelle A.12 — Präzisionsdaten zu Gluconasturtiin	33
Tabelle A.13 — Präzisionsdaten zu Glucoraphanin	34
Tabelle A.14 — Präzisionsdaten zu Glucoraphenin	35
Tabelle A.15 — Präzisionsdaten zu Glucotropaeolin	36
Tabelle A.16 — Präzisionsdaten zu Homoglucocamelinin	37
Tabelle A.17 — Präzisionsdaten zu 4-Hydroxyglucobrassicin	38
Tabelle A.18 — Präzisionsdaten zu 4-Methoxyglucobrassicin	39
Tabelle A.19 — Präzisionsdaten zu Neoglucobrassicin	40
Tabelle A.20 — Präzisionsdaten zu Progoitrin	41
Tabelle A.21 — Präzisionsdaten zu Sinalbin	42
Tabelle A.22 — Präzisionsdaten zu Sinigrin	43
Tabelle B.1 — HPLC-Gradientenprogramm	45
Tabelle B.2 — MS-Geräteeinstellungen	46
Tabelle B.3 — Für die MS des Zielanalyten geeignete Ionenübergänge	47
Tabelle D.1	51

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17853:2022) 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 Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinie(n).

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 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (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 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 der einzelnen Glucosinolate in Ölsaaten, Ölsaaten-erzeugnissen und Alleinfuttermitteln durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Verbindung mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) fest.

Das in diesem Dokument beschriebene 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

	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 3696:1987)*

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498:2012)*

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) 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 Futtermittelmatrix 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. Je nach beabsichtigter Anwendung kann eine Auswahl der aufgeführten Glucosinolatstandards verwendet werden.

5.1.1 Epiprogoitrin (2-(S)-Hydroxy-3-butenylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 19237-18-4)

5.1.2 Glucoalyssin (5-(Methylsulfinyl)pentylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 499-37-6)

5.1.3 Glucoarabin (9-(Methylsulfinyl)nonylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 67920-64-3)

5.1.4 Glucobrassicinapin (4-Pentenylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (19041-10-2)

5.1.5 Glucobrassicin (3-indoylmethylglucosinolat) 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 Glucoiberin (3-Methylsulfinylpropylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 554-88-1)

5.1.9 Gluconapin (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-(Methylsulfinyl)undecylglucosinolat) oder sein Kaliumsalz (CAS 186037-18-3)

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

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

5.1.18 Neoglucobrassicin (1-Methoxy-3-indoylmethylglucosinolat) 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 (HPLC-Qualität)

5.2.2 Essigsäure (98 % bis 100 %)

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 bis 10 mg gewonnen. Da es sich bei Glucosinolaten um stark hygroskopische Verbindungen handelt, ist es besser, den festen Standard nur einmal zu verwenden.

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

ANMERKUNG 4 Die Standard-Stammlösungen sind 24 Monate lang stabil, wenn sie unterhalb von -18°C gelagert werden. Methanol : Wasser (70 : 30) ist das bevorzugte Lösemittel, da es eine bessere Stabilität der Glucosinolate bietet als Wasser.

Tabelle 2 — Vorbereitung der Standard-Stammlösungen

	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
Sinabin	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 µmol/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 werden 100 µl jeder Stammlösung 5.3.1 bis 5.3.22 (10 µmol/ml) pipettiert 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 unter $< -18^{\circ}\text{C}$ ist die Lösung 1 Jahr lang stabil. Das Extraktionslösemittel [Methanol : Wasser (70 : 30)] 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 pipettiert und mit Extraktionslösemittel (5.4.1) bis zur Marke aufgefüllt.

ANMERKUNG Bei Lagerung unter $< -18^{\circ}\text{C}$ ist die Lösung 1 Jahr lang stabil. Das Extraktionslösemittel [Methanol : Wasser (70 : 30)] 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 pipettiert und mit Extraktionslösemittel (5.4.1) bis zur Marke aufgefüllt.

ANMERKUNG Bei Lagerung unter $< -18^{\circ}\text{C}$ ist die Lösung 1 Jahr lang stabil. Das Extraktionslösemittel [Methanol : Wasser (70 : 30)] 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.

Tabelle 3 — Herstellung der Kalibrierstandards in wässriger Lösung

	Konzentration nmol/ml	Mischstandardlösung 1 nmol/ml (5.3.25) μl	Mischstandardlösung 10 nmol/ml (5.3.24) μl	Mischstandardlösung 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 Kalibrierungsstandards sollten an jedem neuen Analysentag erstellt werden.

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. Es wird empfohlen, alle Kalibrierstandards zu verwenden, jedoch mindestens die Kalibrierstandards Kal 1, 3 bis 8.

5.4 Reagenzien

5.4.1 Extraktionslösemittel: Methanol : Wasser (70 : 30)

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. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und kann einen Monat verwendet werden.

ANMERKUNG Die Essigsäurekonzentration kann in einem 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, d. h. ein Referenzmaterial (5.6) bzw. ein Material mit bekannter natürlicher Kontamination oder eine mit bekannten Mengen der Glucosinolate angereicherte Blindprobe, wird in jede Serie aufgenommen und für Qualitätszwecke verwendet.

5.6 Referenzmaterialien

Referenzmaterialien können zu Zwecken der internen Qualitätskontrolle verwendet werden. Beispiele für Referenzmaterialien sind:

5.6.1 ERM®-BC366R Rapssamen

5.6.2 ERM®-BC190R Rapssamen

5.6.3 ERM®-BC367R Rapssamen

6 Geräte

Übliche Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte

6.1 Analysenwaage mit einer Präzision von 0,02 mg

6.2 Analysenwaage mit einer Präzision von 1 mg

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 Propylen, 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

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 Probenvorbehandlung

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 $< 1\text{ mm}$ homogenisiert.

7.2 Einwaage

7.2.1 Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnisse

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

Die Menge der homogenisierten Ölsaaten- oder Ölsaatenerzeugnisprobe darf auf $(0,5 \pm 0,01)\text{ g}$ reduziert werden. In diesem Fall muss die Menge des Extraktionslösemittels entsprechend angepasst werden (7.3.1).

7.2.2 Mischfuttermittel

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

7.3 Extraktion

7.3.1 Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnisse

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

Das Zentrifugieren des Röhrchens erfolgt 5 min bei 2 000 *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 % 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 oder 50 % Ethanol) führt zu einer vergleichbaren Extraktionseffizienz, aber auch zu einer stark erhöhten Myrosinaseaktivität. Dies kann zu einem teilweisen Abbau der Analyten und zu einer geringeren Vergleichpräzision führen. ISO 9167:2019 beschreibt ein alternatives Extraktionsverfahren für Rapssamen und Rapsschrot unter Verwendung von 50 % Ethanol als Extraktionslösemittel. Dieses alternative Extraktionsverfahren wurde in diesem Ringversuch nicht geprüft.

ANMERKUNG 2 In bestimmten Produkten können Konzentrationen vorhanden sein, die den Arbeitsbereich der Kalibrierkurve überschreiten. Für diese Produkte wird der Extrakt weiter mit Wasser verdünnt, um eine Konzentration zu erhalten, die in den Arbeitsbereich der Kalibrierkurve fällt.

7.3.2 Mischfuttermittel

Eine Prüfmenge von $(1,0 \pm 0,02)$ g der homogenisierten Probe (7.2.2) wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.4) eingewogen. 25 ml Extraktionslösemittel (5.4.1) werden zugegeben, 10 s lang geschüttelt und das Röhrchen in ein Wasserbad bei 75 °C (6.5) gestellt. Die Probe wird 15 min lang erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Röhrchen wird 60 min lang in einen Schüttler gestellt, der mit mäßiger Geschwindigkeit rotiert (6.7).

Das Zentrifugieren des Röhrchens erfolgt 5 min bei 2 000 *g* und Raumtemperatur (6.10). 25 µl des Überstandes werden in ein HPLC-Fläschchen (6.9) überführt, es werden 975 µl Wasser zugegeben, und das Fläschchen wird geschlossen.

7.3.3 Wiederfindungsprobe für Mischfuttermittel

Zur Herstellung der Wiederfindungsprobe wird eine repräsentative Futtermittel-Blindwertprobe genommen (5.5) (siehe ANMERKUNG), vorzugsweise dieselbe, die für die Herstellung des Kalibrierbereichs im Blindextrakt (7.3.4) verwendet wird.

Eine Prüfmenge von $(1,0 \pm 0,02)$ g der homogenisierten Probe (7.2.2) wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.4) eingewogen. 1,00 ml der Mischstandardlösung 100 nmol/ml (5.3.22) werden der Probe zugegeben. Dies ist äquivalent zu 0,1 mmol/kg. 10 s lang wird kräftig geschüttelt.

25 ml Extraktionslösemittel (5.4.1) werden zugegeben, 10 s lang geschüttelt und das Röhrchen in ein Wasserbad bei 75 °C (6.5) gestellt. Die Probe wird 15 min lang erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Röhrchen wird 60 min lang in einen Schüttler gestellt, der mit mäßiger Geschwindigkeit rotiert (6.7).

Das Zentrifugieren des Röhrchens erfolgt 5 min bei 2 000 *g* und Raumtemperatur (6.10). 25 µl des Überstandes werden in ein HPLC-Fläschchen (6.9) überführt, es werden 975 µl Wasser zugegeben, und das Fläschchen wird geschlossen.

ANMERKUNG Eine Probe, die nach einer vorangegangenen Analyse die Zielanalyten nicht in einer Konzentration oberhalb der Nachweisgrenze enthält.

7.3.4 Herstellung der Kalibrierstandards in einem Blindprobenextrakt

Zur Herstellung der Kalibrierkurve wird eine repräsentative Futtermittel-Blindwertprobe (5.5) genommen (siehe ANMERKUNG).

Eine Prüfmenge von $(1,0 \pm 0,02)$ g der homogenisierten Probe (7.2.2) wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.4) eingewogen. 25 ml Extraktionslösemittel (5.4.1) werden zugegeben, 10 s lang geschüttelt und das Röhrchen in ein Wasserbad bei 75 °C (6.5) gestellt. Die Probe wird 15 min lang erhitzt und dann auf

Raumtemperatur abgekühlt. Das Röhrchen wird 60 min lang in einen Schüttler gestellt, der mit mäßiger Geschwindigkeit rotiert (6.7).

Das Zentrifugieren des Röhrchens erfolgt 5 min bei 2 000 *g* und Raumtemperatur (6.10). Ein aliquoter Teil von 1 ml wird in ein neues 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.4) überführt, 39 ml Wasser hinzugegeben und gut gemischt. Dieser verdünnte Extrakt wird zur Herstellung von Kalibrierlösungen nach Tabelle 4 verwendet. Es wird direkt in HPLC-Fläschchen pipettiert.

ANMERKUNG Eine Probe, die nach einer vorangegangenen Analyse die Zielanalyten nicht in einer Konzentration oberhalb der Nachweisgrenze enthält.

Tabelle 4 — Herstellung der Kalibrierstandards in einem Blindprobenextrakt

	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	Blindproben- extrakt (7.3.4) 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

8 LC-MS/MS-Analyse

8.1 Allgemeines

Die chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen können frei gewählt werden. Die optimalen Messbedingungen hängen in starkem Maße von der verwendeten gerätetechnischen Ausrüstung ab. Nachfolgend werden jedoch einige wichtige Kriterien und Parameter hinsichtlich der chromatographischen Trennung und des Nachweises der Analyten behandelt.

Analytische Säulen mit C18-Umkehrphasen-Packungsmaterial können für die Trennung von Analyten mit identischer Molekülmasse verwendet werden. Es sollte auf die stärker polaren Glucosinolate geachtet werden, die früh im Chromatogramm eluieren. Diese Analyten reagieren empfindlicher auf kleine Unterschiede in der Zusammensetzung der mobilen Phase, was zu instabilen Retentionszeiten und verzerrten Peakformen führt. Eine stationäre C18-Phase mit chemisch geladener Oberfläche hat sich als gut geeignet erwiesen und bietet eine verbesserte Retention und Peakform.

Das Injektionsvolumen sollte auf die Säulenmaße und die Empfindlichkeit des Massenspektrometersystems abgestimmt sein. Je nach Empfindlichkeit und linearem Dynamikbereich des Massenspektrometers kann es erforderlich sein, die Kalibrierstandards und die Probenextrakte um einen zusätzlichen Faktor mit Wasser zu verdünnen.

Die massenspektrometrischen Bedingungen sollten geeignet sein, die Analyten mit ausreichender Empfindlichkeit und Spezifität zu messen. Glucosinolate lassen sich am besten im negativen Ionisationsmodus analysieren. Mindestens zwei Übergänge sollten ausgewählt werden und in das Verfahren des multiplen Reaktionsmonitorings (MRM) aufgenommen werden. Im Allgemeinen ist das intensivste Produkt-Ion die Bildung des Hydrogensulfat-Anions (m/z 97). Weitere Produkt-Ionen, die in den Spektren der meisten Glucosinolate vorkommen, sind das C_2H_3OS -Anion (m/z 75) und das Glucose-Sulfat-Anion (m/z 259). Bei mehreren Glucosinolaten werden auch strukturspezifische Anionen gebildet. Ausführliche Informationen darüber, welche anderen Produkt-Ionen gebildet werden, sind in Tabelle B.3 enthalten. Vorzugsweise sollten keine Produkt-Ionen ausgewählt werden, die durch den Verlust von Wasser aus dem protonierten Molekülion gebildet werden.

Glucosinolate, die einen Indol-Substituenten enthalten (Glucobrassicin und seine 4-Hydroxy-, 4-Methoxy- und N-Methoxy-Derivate), können im Massenspektrometer 7-Hydroxy- und 7-Methoxy-Addukte erzeugen. Die Menge der gebildeten Addukte hängt von der Bauart des Massenspektrometers ab und ist daher je nach Typ oder Marke des Massenspektrometers sehr unterschiedlich. Die Neigung zur Bildung dieser Addukte nimmt in der Reihenfolge ab: 4-Hydroxyglucobrassicin > 4-Methoxyglucobrassicin > Glucobrassicin > Neoglucobrassicin. Die Bildung von Addukten kann zu einer (stark) verminderten Empfindlichkeit des Muttermoleküls führen. Es wird daher empfohlen, die 7-Hydroxy- und 7-Methoxy-Addukte in das Analyseverfahren einzubeziehen. Die Produkt-Ionen, die während des Analyselaufs am empfindlichsten und stabilsten sind, sollten für die Quantifizierung verwendet werden.

Das Gerät sollte über eine ausreichende Empfindlichkeit verfügen, um die Analyten bei einem Gehalt von 0,1 mmol/kg in der Ölsaart oder dem Ölsaatenerzeugnis bei einem Gehalt von 0,02 mmol/kg im Mischfuttermittel mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3 für das schwächste ausgewählte Produkt-Ion und einem Signal-Rausch-Verhältnis von 10 für das stärkste Produkt-Ion nachzuweisen.

Die Linearität des Massendetektors sollte über den gesamten Kalibrierbereich verifiziert werden, bevor die Analyse der Proben durchgeführt wird. Je nach Empfindlichkeit und linearem Dynamikbereich des Massenspektrometers kann es erforderlich sein, das Injektionsvolumen zu vermindern. Wenn dies nicht möglich ist, wird empfohlen, die Kalibrierstandards und die Probenextrakte um einen zusätzlichen Faktor mit Extraktionslösemittel (5.4.1) zu verdünnen.

Ein Beispiel für geeignete Messbedingungen ist in Anhang B gegeben, und Beispielchromatogramme sind in Anhang C angegeben.

8.2 Analysensequenz

8.2.1 Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnisse

Eine geeignete Analysensequenz für Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnisse:

- Kalibrierstandard 8 von 1 nmol/ml in Wasser, der mindestens dreimal oder so lange injiziert wird, bis stabile Messbedingungen erreicht sind;
- Wasser;
- Bereich des Kalibrierstandards in wässriger Lösung (5.3.25);
- Wasser;
- Probenextrakt für die Qualitätskontrolle (5.5);
- Probenextrakte (7.3.1);
- Wasser;
- Bereich des Kalibrierstandards in wässriger Lösung (5.3.25).

In Abhängigkeit von der Probenanzahl dürfen zwischen den Proben zusätzliche Kalibrierstandards eingefügt werden.

8.2.2 Mischfuttermittel

Eine für Mischfuttermittel geeignete Analysensequenz:

- Kalibrierstandard 8 von 1 nmol/ml in Blindmatrixextrakt, der mindestens dreimal oder so lange injiziert wird, bis stabile Messbedingungen erreicht sind;
- Wasser;
- Bereich des Kalibrierstandards in Blindmatrixextrakt (7.3.4);
- Wasser;
- Wiederfindungsprobe (7.3.3);
- Probenextrakte (7.3.2);
- Wasser;
- Bereich des Kalibrierstandards in Blindmatrixextrakt (7.3.4).

In Abhängigkeit von der Probenanzahl dürfen zwischen den Proben zusätzliche Kalibrierstandards eingefügt werden.

9 Auswertung der Ergebnisse

9.1 Identifizierung

Nachweis und Identifizierung der einzelnen Glucosinolate in der Probe basieren auf dem Vorhandensein von koeluerenden chromatographischen Peaks für die gemessenen Übergänge. Retentionszeit und relative Häufigkeit der Übergänge sollten mit denen der Kalibrierstandards übereinstimmen. Die Abweichung der Retentionszeit des Analyten in der Probe sollte nicht mehr als 0,2 min gegenüber der durchschnittlichen Retentionszeit in den Kalibrier-Extrakten betragen. Die relativen Intensitäten der Übergänge in der Probe sollten nicht mehr als 30 % vom Durchschnitt der relativen Intensitäten der Übergänge bei den Kalibrier-Extrakten abweichen.

9.2 Quantifizierung

9.2.1 Allgemeines

Bei Ölsaaten und Ölsaatenerzeugnissen basiert die Quantifizierung auf einer Mehrpunktkalibrierung mit einem Kalibrierstandard in wässriger Lösung (5.3.25). Bei Mischfuttermitteln basiert die Quantifizierung auf einer Mehrpunktkalibrierung unter Verwendung von Kalibrierstandards in einem Blindmatrixextrakt (7.3.4) (siehe ANMERKUNG 1). Für sämtliche Berechnungen wird die summierte Fläche beider Produkt-Ionen verwendet (siehe ANMERKUNG 2).

ANMERKUNG 1 Unter den in diesem Dokument beschriebenen Bedingungen waren Matrixeffekte (Ionenunterdrückung oder -verstärkung) bei Ölsaatenproben nicht signifikant. Bei Mischfuttermitteln können Matrixeffekte festgestellt werden.

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-Ionenflächen wird für den Analyten in den Kalibrierstandards in wässriger Lösung (5.3.25) oder für die Kalibrierstandards im Matrixextrakt (7.3.4) in Abhängigkeit von der zugesetzten Konzentration aufgetragen. Die Schätzung der Steigung und des Ordinatenabschnitts der Kalibriergeraden erfolgt mittels gewichteter linearer Regression über alle Datenpunkte. Die Linearität der Kalibrierkurven wird mit einem geeigneten Test auf Linearität geprüft (z. B. Auftragen der Residuen gegen die angepassten Werte; Berechnung des Korrelationskoeffizienten). Wenn die Prüfung eine Nichtlinearität erkennen lässt, ist ihre Ursache zu ermitteln und es sind geeignete Maßnahmen zu ergreifen (z. B. durch Verringerung des Injektionsvolumens, durch Verringerung des Arbeitsbereichs der Kalibrierkurve, durch Verwendung einer gewichteten Kalibrierung oder durch Verdünnung der Extrakte).

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

9.2.3 Berechnung der Glucosinolatkonzentration in der Ölsaart oder dem Ölsaatenerzeugnis

Die Konzentration des Analyten in der Ölsaatenprobe wird nach Gleichung (1) berechnet.

$$C = \left(\frac{A - b}{a} \right) \times \frac{V}{W} \times D \quad (1)$$

Dabei ist

- C die Konzentration des Analyten in der Ölsaart oder dem Ölsaatenerzeugnis, in mmol/kg;
- A die Summe der Fläche der Produkt-Ionen;
- b der Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden (5.3.25);
- a die Steigung der Kalibriergeraden (5.3.25);
- V das Volumen des zur Probe gegebenen Extraktionslösemittels, in ml;
- W die Probenmenge, in g;
- D der Verdünnungsfaktor des Ausgangsextrakts.

9.2.4 Berechnung der Glucosinolatkonzentration im Mischfuttermittel

Die Konzentration des Analyten in der Mischfuttermittel-Probe wird nach Gleichung (2) berechnet.

$$C = \left(\frac{A - b}{a} \right) \times \frac{V}{W} \times D \times \frac{100}{R} \quad (2)$$

Dabei ist

- C die Konzentration des Analyten im Mischfuttermittel, in mmol/kg;
- A die Summe der Fläche der Produkt-Ionen;
- b der Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden im Matrixextrakt (7.3.4);
- a die Steigung der Kalibriergeraden im Matrixextrakt (7.3.4);
- V das Volumen des zur Probe gegebenen Extraktionslösemittels, in ml;

W die Probenmenge, in g;

D der Verdünnungsfaktor des Ausgangsextrakts;

R die Wiederfindung, in %.

Die Wiederfindung wird nach Gleichung (3) berechnet.

$$R = \left(\frac{A_{\text{Rec}} - b}{a} \right) \times \frac{V}{W} \times D \quad (3)$$

Dabei ist

R die Wiederfindung, in %;

A_{Rec} die Summe der Fläche der Produkt-Ionen des Analyten in der Wiederfindungsprobe von 0,1 mmol/kg (7.3.3);

b der Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden;

a die Steigung der Kalibriergeraden;

V das Volumen des zur Probe gegebenen Extraktionslösemittels, in ml;

W die Probenmenge, in g;

D der Verdünnungsfaktor des Ausgangsextrakts;

R die Wiederfindung, in %;

A_{Rec} die Summe der Fläche der Produkt-Ionen des Analyten in der Wiederfindungsprobe von 0,1 mmol/kg (7.3.3);

b der Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden;

9.3 Angabe der Ergebnisse

Die erhaltene Konzentration wird in mmol/kg angegeben. Neben der Konzentration der einzelnen Glucosinolate kann auch die Gesamtkonzentration der Glucosinolate angegeben werden. Die Gesamtkonzentration der Glucosinolate ist die Summe der quantifizierten Glucosinolate. Die für Ölsaaten oder Ölsaatenerzeugnisse erhaltenen Ergebnisse werden nicht um die Wiederfindung korrigiert. Die für Mischfuttermittel erhaltenen Ergebnisse werden um die Wiederfindung korrigiert, wenn die Wiederfindung für den Analyten weniger als 90 % oder mehr als 110 % beträgt.

Zusätzlich muss bei einer Probenanalyse im Rahmen der EU-Richtlinie 2002/32 das Endergebnis für Berichtszwecke auf der Grundlage eines Feuchtegehalts von 12 % angegeben werden, und die Konzentration muss unter Berücksichtigung des tatsächlichen Feuchtegehalts der Probe angepasst werden [6].

Um den Gesamtgehalt an Glucosinolaten in mg/kg Allylisothiocyanat auszudrücken, wird die Konzentration in mmol/kg mit dem Faktor 99,15 multipliziert.

10 Genauigkeit

10.1 Allgemeines

Die Präzisionsdaten wurden im Rahmen eines Ringversuchs gewonnen. Die Details zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang A dargestellt. Neben der Wiederholpräzision und Vergleichpräzision werden auch die funk-

tionellen Zusammenhänge zwischen der gemessenen Analytkonzentration und der Wiederholpräzision und Vergleichpräzision gezeigt.

10.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial durch einen Bearbeiter mit derselben Geräteausstattung in kürzest möglichem Zeitabstand gewonnen werden, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten. Daraus kann die Wiederholgrenze r wie folgt berechnet werden:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (4)$$

Dabei ist

r die Wiederholgrenze;

s_r die Wiederholstandardabweichung.

10.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die von zwei Laboratorien an identischen Untersuchungsmaterialien erhalten wurden, überschreitet die Vergleichgrenze R in nicht mehr als 5 % der Fälle. Daraus kann die Vergleichgrenze R wie folgt berechnet werden:

$$R = 2,8 \times s_R \quad (5)$$

Dabei ist

R die Vergleichgrenze;

s_R die Vergleichstandardabweichung.

11 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens folgende Daten enthalten:

- a) die zur Identifizierung der Probe notwendigen Informationen;
- b) das Datum des Probeneingangs;
- c) eine Verweisung auf dieses Dokument und das Jahr der Veröffentlichung;
- d) das in diesem Dokument angewendete Verfahren;
- e) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- f) jegliche Abweichungen vom Verfahren;
- g) jegliche ungewöhnlichen Beobachtungen;
- h) das Datum der Analyse der Probe.

Anhang A (informativ)

Präzisionsdaten

Die folgenden Daten wurden bei einem Ringversuch ermittelt, der nach den Leitlinien der Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) zu den Verfahrensweisen bei Ringversuchen zur Validierung der Merkmale eines Analyseverfahrens [7] durchgeführt wurde. Um die Notwendigkeit eines Ausschlusses einzelner „Ausreißer“ von den Ergebnissen zu vermeiden, wurden robuste statistische Verfahren, wie in ISO 5725-5 [8] beschrieben, eingesetzt.

Die Materialien 1 bis 4 waren gemahlene Ölsaatenproben. Material 1 bestand aus einer Mischung von 3 *Brassica-oleracea*-Proben (3 verschiedene Sorten), die in gleichen Mengen gemischt wurden. Material 2 bestand aus einer Mischung von 7 verschiedenen Ölsaatenarten (*Eruca sativa*, *Iberis umbellata*, *Lepidium campestre*, *Lepidium sativum*, *Nasturtium officinale*, *Rhaphanus sativus*, *Sinapis alba*), die in gleichen Mengen gemischt wurden. Material 3 war eine Probe aus Rapssamen (*Brassica napus*), die als zertifiziertes Referenzmaterial ERM®BC366R erhältlich ist. Material 4 war gemahlener Leindottersamen (*Camelina sativa*). Material 5 waren gemahlene Rapssamenflocken. Material 6 war ein Mastgeflügelfuttermittel, das mit 10 % gemahlenen Samen von *Camelina sativa* und 20 % Rapsflocken gemischt war. Material 7 war ein Ergänzungsfuttermittel für Kühe, das mit 10 % gemahlenen Samen von *Brassica oleracea* und 5 % gemahlenen Samen von *Camelina sativa* gemischt war. Material 8 war ein Mischfuttermittel für Schweine, das mit 25 % Rapsschrot gemischt war.

Am Hauptringversuch nahmen zwölf Laboratorien teil. Alle Laboratorien legten Ergebnisse vor. Die akzeptierten Datensätze wurden mittels robuster statistischer Verfahren ausgewertet. Bei der Datenauswertung wurden 17 Datenpunkte entfernt, die als nichtkonform angesehen wurden. Dabei handelte es sich um Daten, bei denen die angegebene Konzentration einer oder beider Wiederholungen weniger als 0,01 mmol/kg betrug, was als Meldegrenzwert angesehen wurde. Die im Ringversuch erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle A.1 bis Tabelle A.22 angegeben. Es sollte beachtet werden, dass die HorRat-Werte lediglich zur Information dienen. In diesem Fall sind die HorRat-Werte aufgrund der hohen Mengen an Glucosinolaten nicht für auf LC-MS/MS basierende Verfahren geeignet, da aufgrund der hohen Empfindlichkeit des massenselektiven Detektors Probenextrakte stark verdünnt werden müssen, um sich an den linearen, dynamischen Arbeitsbereich des Massendetektors wie in CEN/TS 17455 [9] erläutert anzupassen.

Bei den acht Materialien reichte der Gesamtglucosinolatgehalt von 1,48 mmol/kg bis 117,3 mmol/kg, und die erzielte relative Vergleichstandardabweichung (RSD_R) lag zwischen 7,8 % und 12,7 %. Insgesamt wurden 90 einzelne Matrix-Analyt-Kombinationen bewertet. Für 72 Matrix-Analyt-Kombinationen wurden annehmbare RSD_R erzielt, die zwischen 5,5 % und 22,2 % lagen. Die Konzentration dieser Analyten reichte von 0,01 mmol/kg bis 41,1 mmol/kg. Für 18 Matrix-Analyt-Konzentrationen wurde eine höhere, aber immer noch annehmbare RSD_R erzielt, die zwischen 22,6 % und 41,8 % lag. Die Konzentration dieser Analyten reichte von 0,01 mmol/kg bis 0,25 mmol/kg. Eine grafische Darstellung der RSD_R für die Analyten und den Gesamtgehalt an Glucosinolaten in der gemeinsamen Studie ist in Bild A.1 zu sehen.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird der Schluss gezogen, dass dieses Dokument für die Bestimmung von Glucosinolaten in Rapssaat und anderen Ölsaaten, Ölsaatenenerzeugnissen und Mischfuttermitteln, die Ölsaaten-erzeugnisse als Zutat enthalten, geeignet ist.

- Entwurf -

Tabelle A.1 — Präzisionsdaten zum Gesamtgehalt an Glucosinolaten

	<i>B. oleracea</i>	Ölsaaten	Rapssamen	Leindotter- samen	Rapssamen	Mast- geflügel	Rinder	Schweine
	Saatgut- mischung	Mischung	BC366R	Samen	Flocken	Futter- mittel	Futter- mittel	Futtermittel
Beschreibung	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Jahr des Ringversuchs	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021	2021
Anzahl der Laboratorien	12	12	12	12	12	12	12	12
Anzahl der nicht konformen Laboratorien	0	0	0	0	0	0	0	0
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse	12	12	12	12	12	12	12	12
Mittelwert $\bar{x}$, mmol/kg	72,9	117,3	13,7	25,7	9,40	5,32	15,2	1,48
Wiederholstandardabweichung, s_r , mmol/kg	3,56	4,80	1,13	0,74	0,40	0,26	0,72	0,04
Relative Wiederholstandardabweichung, RSD_r	4,9 %	4,1 %	8,2 %	2,9 %	4,2 %	4,9 %	4,7 %	2,9 %
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), mmol/kg	10,0	13,4	3,17	2,09	1,11	0,73	2,02	0,12
Funktionelle Beziehung zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,042 \bar{x} + 0,09$				$R = 0,985$			
Vergleichstandardabweichung, s_R , mmol/kg	7,53	9,66	1,70	2,47	1,19	0,41	1,30	0,17
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R	10,3 %	8,2 %	12,3 %	9,6 %	12,7 %	7,8 %	8,6 %	11,4 %
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), mmol/kg	21,1	27,0	4,75	6,92	3,34	1,16	3,65	0,47
Funktionelle Beziehung zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,085 \bar{x} + 0,27$				$R = 0,990$			
HorRat	3,1	2,6	2,8	2,5	2,8	1,5	1,9	1,9

Tabelle A.2 — Präzisionsdaten zu Epiprogoitrin

	<i>B. oleracea</i>	Ölsaaten	Rapssamen	Leindotter-samen	Rapssamen	Mast-geflügel	Rinder	Schweine
	Saatgut-mischung	Mischung	BC366R	Samen	Flocken	Futter-mittel	Futtermittel	Futtermittel
Beschreibung	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Jahr des Ringversuchs	2021	2021	2021		2021	2021	2021	2021
Anzahl der Laboratorien	9	12	9		8	7	9	9
Anzahl der nicht konformen Laboratorien	0	0	0		0	0	0	0
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse	9	12	9		8	7	9	9
Mittelwert $\bar{x}$, mmol/kg	0,26	0,93	0,12		0,05	0,01	0,09	0,02
Wiederholstandardabweichung, s_r , mmol/kg	0,0	0,1	0,0		0,01	0,00	0,0	0,00
Relative Wiederholstandardabweichung, RSD_r	7,0 %	6,9 %	6,8 %		23,0 %	12,1 %	11,4 %	7,1 %
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), mmol/kg	0,05	0,18	0,02		0,03	0,00	0,03	0,00
Funktionelle Beziehung zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,066 \bar{x} + 0,00$				$R = 0,991$			
Vergleichstandardabweichung, s_R , mmol/kg	0,02	0,10	0,02		0,01	0,00	0,02	0,01
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R	7,6 %	10,4 %	20,0 %		25,1 %	27,4 %	20,5 %	28,8 %
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), mmol/kg	0,06	0,27	0,07		0,04	0,01	0,05	0,01
Funktionelle Beziehung zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,096 \bar{x} + 0,01$				$R = 0,983$			
HorRat	1,0	1,6	2,2		2,4	2,2	2,2	2,4

- Entwurf -

Tabelle A.3 — Präzisionsdaten zu Glucoallysin

	<i>B. oleracea</i>	Ölsaaten	Rapssamen	Leindotter-samen	Rapssamen	Mast-geflügel	Rinder	Schweine
Beschreibung	Saatgut-mischung (1)	Mischung (2)	BC366R (3)	Samen (4)	Flocken (5)	Futter-mittel (6)	Futtermittel (7)	Futtermittel (8)
Jahr des Ringversuchs		2021	2021		2021	2021	2021	2021
Anzahl der Laboratorien		12	12		12	12	12	12
Anzahl der nicht konformen Laboratorien		0	1		0	0	0	0
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse		12	11		12	12	12	12
Mittelwert $\bar{x}$, mmol/kg		2,10	0,05		0,12	0,02	0,03	0,03
Wiederholstandardabweichung, s_r , mmol/kg		0,13	0,01		0,01	0,00	0,00	0,00
Relative Wiederholstandardabweichung, RSD_r		6,2 %	10,7 %		5,9 %	6,8 %	6,8 %	4,3 %
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), mmol/kg		0,37	0,01		0,02	0,00	0,00	0,00
Funktionelle Beziehung zwischen s_r und $\bar{x}$ a	$s_r = 0,062 \bar{x} + 0,00$				$R = 1,000$			
Vergleichstandardabweichung, s_R , mmol/kg		0,18	0,02		0,03	0,00	0,00	0,00
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R		8,4 %	35,4 %		25,8 %	12,6 %	11,8 %	10,2 %
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), mmol/kg		0,49	0,05		0,09	0,01	0,01	0,01
Funktionelle Beziehung zwischen s_R und $\bar{x}$ a	$s_R = 0,081 \bar{x} + 0,01$				$R = 0,993$			
HorRat		1,5	3,5		2,9	1,1	1,1	0,9

- Entwurf -

Tabelle A.4 — Präzisionsdaten zu Glucoarabin

	<i>B. oleracea</i>	Ölsaaten	Rapssamen	Leindotter-samen	Rapssamen	Mast-geflügel	Rinder	Schweine
	Saatgut-mischung	Mischung	BC366R	Samen	Flocken	Futter-mittel	Futtermittel	Futtermittel
Beschreibung	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Jahr des Ringversuchs				2021		2021	2021	
Anzahl der Laboratorien				12		12	12	
Anzahl der nicht konformen Laboratorien				0		0	0	
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse				12		12	12	
Mittelwert $\bar{x}$, mmol/kg				6,15		0,64	0,31	
Wiederholstandardabweichung, s_r , mmol/kg				0,26		0,04	0,02	
Relative Wiederholstandardabweichung, RSD_r				4,2 %		6,0 %	6,0 %	
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), mmol/kg				0,73		0,11	0,05	
Funktionelle Beziehung zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,041 \bar{x} + 0,01$				$R = 1,000$			
Vergleichstandardabweichung, s_R , mmol/kg				0,66		0,05	0,03	
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R				10,8 %		7,3 %	9,5 %	
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), mmol/kg				1,85		0,13	0,08	
Funktionelle Beziehung zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,110 \bar{x} - 0,01$				$R = 1,000$			
HorRat				2,3		1,1	1,3	

- Entwurf -

Tabelle A.5 — Präzisionsdaten zu Glucobrassicinapin

	<i>B. oleracea</i>	Ölsaaten	Rapssamen	Leindotter-samen	Rapssamen	Mast-geflügel	Rinder	Schweine
Beschreibung	Saatgut-mischung (1)	Mischung (2)	BC366R (3)	Samen (4)	Flocken (5)	Futter-mittel (6)	Futtermittel (7)	Futtermittel (8)
Jahr des Ringversuchs			2021		2021	2021	2021	2021
Anzahl der Laboratorien			12		12	12	12	12
Anzahl der nicht konformen Laboratorien			0		0	0	2	0
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse			12		12	12	10	12
Mittelwert $\bar{x}$, mmol/kg			0,31		0,38	0,09	0,02	0,08
Wiederholstandardabweichung, s_r , mmol/kg			0,03		0,02	0,00	0,00	0,00
Relative Wiederholstandardabweichung, RSD_r			9,2 %		4,0 %	5,3 %	4,1 %	3,1 %
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), mmol/kg			0,08		0,04	0,01	0,00	0,01
Funktionelle Beziehung zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,060 \bar{x} - 0,00$				$R = 0,832$			
Vergleichstandardabweichung, s_R , mmol/kg			0,05		0,04	0,01	0,00	0,00
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R			14,9 %		10,5 %	7,9 %	21,6 %	5,3 %
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), mmol/kg			0,13		0,11	0,02	0,01	0,01
Funktionelle Beziehung zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,125 \bar{x} - 0,00$				$R = 0,956$			
HorRat			1,9		1,4	0,8	1,8	0,6

- Entwurf -

Tabelle A.6 — Präzisionsdaten zu Glucobrassicin

	<i>B. oleracea</i>	Ölsaaten	Rapssamen	Leindotter-samen	Rapssamen	Mast-geflügel	Rinder	Schweine
	Saatgut-mischung	Mischung	BC366R	Samen	Flocken	Futter-mittel	Futtermittel	Futtermittel
Beschreibung	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Jahr des Ringversuchs	2021		2021	2021	2021	2021		2021
Anzahl der Laboratorien	12		9	12	12	12		10
Anzahl der nicht konformen Laboratorien	0		0	0	0	0		1
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse	12		9	12	12	12		9
Mittelwert $\bar{x}$, mmol/kg	0,31		0,08		0,18	0,04		0,02
Wiederholstandardabweichung, s_r , mmol/kg	0,02		0,01		0,01	0,00		0,00
Relative Wiederholstandardabweichung, RSD_r	5,9 %		12,9 %		8,1 %	7,2 %		6,4 %
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), mmol/kg	0,05		0,03		0,04	0,01		0,00
Funktionelle Beziehung zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,058 \bar{x} + 0,00$				$R = 0,939$			
Vergleichstandardabweichung, s_R , mmol/kg	0,04		0,02		0,03	0,00		0,00
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R	14,0 %		31,0 %		16,6 %	9,4 %		24,7 %
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), mmol/kg	0,12		0,07		0,09	0,01		0,01
Funktionelle Beziehung zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,133 \bar{x} + 0,00$				$R = 0,937$			
HorRat	1,8		3,3		2,0	0,9		2,1

- Entwurf -

Tabelle A.7 — Präzisionsdaten zu Glucocamelinin

	<i>B. oleracea</i>	Ölsaaten	Rapssamen	Leindotter-samen	Rapssamen	Mast-geflügel	Rinder	Schweine
Beschreibung	Saatgut-mischung (1)	Mischung (2)	BC366R (3)	Samen (4)	Flocken (5)	Futter-mittel (6)	Futtermittel (7)	Futtermittel (8)
Jahr des Ringversuchs				2021		2021	2021	
Anzahl der Laboratorien				12		12	12	
Anzahl der nicht konformen Laboratorien				0		0	0	
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse				12		12	12	
Mittelwert $\bar{x}$, mmol/kg				16,1		1,73	0,82	
Wiederholstandardabweichung, s_r , mmol/kg				0,43		0,10	0,04	
Relative Wiederholstandardabweichung, RSD_r				2,7 %		5,7 %	4,7 %	
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), mmol/kg				1,21		0,28	0,11	
Funktionelle Beziehung zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,025 \bar{x} + 0,04$				$R = 0,996$			
Vergleichstandardabweichung, s_R , mmol/kg				1,70		0,15	0,08	
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R				10,6 %		8,5 %	9,5 %	
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), mmol/kg				4,77		0,41	0,22	
Funktionelle Beziehung zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,108 \bar{x} - 0,02$				$R = 1,000$			
HorRat				2,6		1,5	1,5	

- Entwurf -

Tabelle A.8 — Präzisionsdaten zu Glucoerucin

	<i>B. oleracea</i>	Ölsaaten	Rapssamen	Leindotter-samen	Rapssamen	Mast-geflügel	Rinder	Schweine
	Saatgut-mischung	Mischung	BC366R	Samen	Flocken	Futtermittel	Futtermittel	Futtermittel
Beschreibung	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Jahr des Ringversuchs	2021	2021					2021	
Anzahl der Laboratorien	12	12					12	
Anzahl der nicht konformen Laboratorien	0	0					0	
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse	12	12					12	
Mittelwert $\bar{x}$, mmol/kg	3,22	15,6					1,07	
Wiederholstandardabweichung, s_r , mmol/kg	0,14	0,77					0,05	
Relative Wiederholstandardabweichung, RSD_r	4,4 %	4,9 %					4,7 %	
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), mmol/kg	0,39	2,15					0,14	
Funktionelle Beziehung zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,050 \bar{x} - 0,01$				$R = 1,000$			
Vergleichstandardabweichung, s_R , mmol/kg	0,36	1,29					0,06	
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R	11,0 %	8,3 %					5,5 %	
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), mmol/kg	1,00	3,60					0,17	
Funktionelle Beziehung zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,081 \bar{x} + 0,03$				$R = 0,995$			
HorRat	2,0	1,9					0,9	