VERORDNUNG (EWG) Nr. 1864/90 DER KOMMISSION

vom 29. Juni 1990

zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1470/68 über die Entnahme und Verkleinerung von Proben und über die Analyseverfahren für Ölsaaten

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung Nr. 136/66/EWG des Rates vom 22. September 1966 über die Errichtung einer gemeinsamen Marktorganisation für Fette (1), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 2902/89 (2), insbesondere auf Artikel 24a,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Der für Raps- und Rübsensamen verwendete Begriff „Doppelnull" hängt vom Glukosinolatgehalt der Samen ab. Daher sollte eine geeignete Methode für die Bestimmung dieses Gehalts festgesetzt werden.

Mit der Verordnung (EWG) Nr. 1470/68 der Kommission (3), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 2435/86 (4), wurde für die Gemeinschaft die zur Bestimmung des Glukosinolatgehalts von Rapssamen anzuwendende gemeinsame Methode bestimmt. Seither wurde eine besser geeignete Nachweismethode entwickelt und erprobt. Die für die Gemeinschaft zur Bestimmung des Glukosinolatgehalts vorgesehene Methode sollte deshalb geändert werden.

Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Fette —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Der Anhang VIII der Verordnung (EWG) Nr. 1470/68 wird durch den Anhang der vorliegenden Verordnung ersetzt.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am Tag ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Sie gilt ab 1. Juli 1990.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 29. Juni 1990

Für die Kommission

Ray MAC SHARRY

Mitglied der Kommission

(1) ABl. Nr. 172 vom 30. 9. 1966, S. 3025/66.
(2) ABl. Nr. L 280 vom 29. 9. 1989, S. 2.
(3) ABl. Nr. L 239 vom 28. 9. 1968, S. 2.
(4) ABl. Nr. L 210 vom 1. 8. 1986, S. 55.

ANHANG

„ANHANG VIII

BESTIMMUNG DES ÖLSAATEN GLUCOSINOLATGEHALTS

durch HPLC

1. ANWENDUNGSBEREICH

In diesem Anhang wird eine Methode zur Bestimmung der verschiedenen Glucosinolate in Ölsamen der Gattung Brassica, insbesondere von Rapssamen, unter Anwendung der Hochleistungsflüssigchromatographie beschrieben. Glucosinolate, die am Glucose-Molekül substituiert sind, werden mit dieser Methode nicht erfaßt; diese Verbindungen sind aber in kommerziellen Rapsproben von untergeordneter Bedeutung.

2. ANMERKUNGEN

Die Vorbereitung der Proben für die Analyse muß gemäß den jeweiligen Anhängen dieser Verordnung durchgeführt werden. Insbesondere folgende Anhänge sind wichtig:

Anhang II — Verkleinerung von Kontraktproben zu Analyseproben

Anhang III — Bestimmung des Gehaltes an Feuchtigkeit und flüchtigen Bestandteilen

3. PRINZIP

Extraktion von Glucosinolaten in einer Methanollösung, dann Reinigung und enzymatische Desulfatierung an Ionenaustauscherharzen. Die Bestimmung erfolgt mittels Reversed Phase-HPLC unter Anwendung einer Gradientenelution und UV-Detektion.

4. REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Alle Reagenzien besitzen Analysenqualität, und bei dem verwendeten Wasser handelt es sich um destilliertes Wasser oder Wasser mit mindestens gleichwertiger Reinheit.

4.1. Methanol, Lösung zu 70 % (V/V) in Wasser

4.2. Natriumazetat-Lösung, 0,02 mol/l mit pH 4,0

4.3. Natriumazetat-Lösung, 0,2 mol/l

4.4. Imidazolformiat-Lösung, 6 mol/l

204 g Imidazol in einem 500 ml/Meßkolben in 113 ml Ameisensäure lösen und mit Wasser auf 500 ml auffüllen.

4.5. **Innerer Standard**

Es sollte Sinigrin (Kalium-Allylglucosinolat-Monohydrat, MW = 415,49) verwendet werden, dessen Reinheit gemäß 4.5.3 zu überprüfen ist.

4.5.1. *Sinigrin-Lösung, 5 mmol/l*

207,7 mg Kalium-Allylglucosinolat-Monohydrat in einem 100 ml-Meßkolben in Wasser lösen und bis zur Marke auffüllen.

4.5.2. *Sinigrin-Lösung, 20 mmol/l*

831,0 mg Kalium-Allylglucosinolat-Monohydrat in einem 100 ml-Meßkolben in Wasser lösen und bis zur Marke auffüllen. Diese Lösungen werden in einem Kühlschrank bei ca. 4 °C aufbewahrt, falls die Lagerung für einen kurzen Zeitraum (z. B. 1 Woche) erfolgt, oder aber in einem Tiefkühlschrank bei −18 °C für längere Lagerung.

4.5.3. *Prüfung der Reinheit des Sinigrins*

Hierzu wird einer oder mehrere der drei folgenden Tests durchgeführt:

— die HPLC-Analyse nach der vorliegenden Methode darf nur einen Hautpeak ergeben,

— die HPLC-Analyse des Intakten Sinigrins (Ionenpaartechnik) darf nur einen Hauptpeak ergeben,

— die Analyse des desulfatierten und silylierten Sinigrins mittels Gaschromatographie darf nur einen Hauptpeak ergeben.

Bei diesen Tests sollte der Hauptpeak wenigstens 98 % der Gesamtpeakflächen ausmachen.

Bestätigung durch Bestimmung der durch Hydrolyse mit Myrosinase (Thioglucosid-Glucohydrolase EC 3.2.3.1) freigesetzten Mengen an Glucose. Die Glucose wird enzymatisch mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Testkits bestimmt. Hierbei ist es erforderlich ohne Zugabe von Myrosinase auch die Menge an freier Glucose zu ermitteln. Die gemessene molare Glucosekonzentration muß mindestens 98 % der molaren Sinigrinkonzentration der getesteten Lösungen betragen.

4.5.4. *Alternativer innerner Standard: Glucotropaeolin*

In den Samen einiger Brassica- oder ähnlicher Arten (angebaut oder wild wachsend) kann Sinigrin natürlicherweise vorhanden sein. Wo natürlicherweise vorhandenes Sinigrin vorliegt, sollte als alternativer innerer Standard Glucotropaeolin (Benzylglucosinolat, Kaliumsalz, MW = 447,52) verwendet werden ; allerdings ist es manchmal schwierig, es von anderen, natürlich vorkommenden Minor-Glucosinolaten abzutrennen.

Glucotropaeolin wird in der gleichen Weise (5 und 20 mmol/l-Lösungen) wie Sinigrin benutzt, nachdem seine Reinheit gemäß den unter 4.5.3 beschriebenen Verfahren geprüft und festgestellt wurde, ob sein Response-Faktor im Vergleich zu Sinigrin dem unter 7.2 angegebenen Wert entspricht.

4.6. **Mobile Phasen**

4.6.1. Eluent A : Wasser (HPLC-Qualität).

4.6.2. Eluent B : Acetonitril (HPLC-Qualität) 20 %ige-Lösung (V/V) in Wasser (HPLC-Qualität). Die Konzentration ist entsprechend der verwandten Säulen zu modifizieren.

4.7. **Ionen-Austauscherharz :**

4.7.1. DEAE Sepharose CI-6B gebrauchsfertige Suspension

4.7.2. DEAE Sephadex A-25-Suspension, die wie folgt hergestellt wird :

10 g des Harzes in einen Überschuß Essigsäure (2 mol/l) geben und absetzen lassen.

Anschließend soviel Essigsäure (2 mol/l) hinzufügen, bis das Volumen der Suspension dem doppelten Volumen des abgesetzten Materials entspricht.

4.8. **Sulfatase**, Helix pomatia Typ H1 (EC 3.1.6.1), vor Gebrauch gereinigt und wie unten beschrieben überprüft, dann verdünnt.

4.8.1. *Vorbereitung der Ionen-Austauschersäulen*

5 Pasteurpipetten (5.9) 7 cm über dem Hals abschneiden und einen Glaswollepropfen in den Hals (5.8) stecken. Die Pipetten senkrecht auf einen Ständer geben und in jede Pipette eine Suspension des Ionen-Austauscherharzes DEAE Sepharose C1-6B (4.7.1) einfüllen, daß nach dem Ablaufen des Wassers ein Volumen von 500 µl Harz erhalten wird.

1 ml Imidazolformiatlösung (6 mol/l) (4.4) in jede Säule geben und dann zweimal mit 1 ml Wasser waschen.

4.8.2. *Reinigung der Sulfatase*

25 mg (Helix pomatia Typ H1) auf 0,1 mg genau einwiegen, in 2,5 ml Wasser lösen und 500 µl dieser Lösung auf jede der regenerierten Säulen (4.8.1) geben. Jede Säule mit 1,5 ml Wasser waschen, das verwendete Wasser entfernen. Dann 1,5 ml der 0,2 mol Natriumazetatlösung (4.3) aufgeben, die Eluate der fünf Säulen auffangen und in einem Reagenzglas vereinigen.

Die Eluate mit Hilfe eines Eintauchfilters Millipore PTGC11K25 auf ca. 100 µl Endvolumen einengen (Sulfatase mit einem Molekulargewicht von über 5 000 wird nicht entfernt). Zu der konzentrierten Enzymlösung 2,5 ml Wasser hinzufügen und erneut bis auf 100 µl Volumen konzentrieren. Anschließend wird mit Wasser auf 2,5 ml verdünnt und die gereinigte Sulfatase in einem Tiefkühlschrank bei −18 °C aufbewahrt (es werden kleine Volumina eingefroren, so daß immer nur die gerade benötigte Menge aufgetaut werden muß.).

4.8.3. *Bestimmung der Sulfatase-Aktivität*

4.8.3.1. Herstellung einer Sinigrinlösung (0,15 mmol/l), gepuffert auf pH 5,8.

Nacheinander folgende Lösungen herstellen :

a) 1 ml Eisessig in einen 500 ml-Meßkolben pipettieren und bis zur Marke mit Wasser auffüllen.

b) 1 ml Ethylendiamin in einen 500 ml-Meßkolben pipettieren und bis zur Marke mit Wasser auffüllen.

c) 73 ml der Lösung a) und 40 ml der Lösung b) mischen.

d) Den pH-Wert dieser Lösung mit den Lösungen a) oder b) auf pH 5,8 einstellen.

3 ml der 5 mmol/l Sinigrin-Lösung (4.5.1) in einen 100 ml-Meßkolben geben und bis zur Marke mit Lösung c) auffüllen.

4.8.3.2. Aktivitätstest

Eine Aktivitätseinheit entspricht der Bildung von 1 Mikromol desulfatiertem Sinigrin pro Minute bei 30 °C und pH 5,8.

Für diesen Test werden je 2 ml der gepufferten Sinigrinlösung (4.8.3.1) in die Referenz- und Meßküvette des Spektralphotometers (5.3) überführt, dessen Wellenlänge auf 228 nm eingestellt ist und eine Meßtemperatur von 30 °C aufweist.

Zur Zeit t = 0 werden 50 µl der gereinigten Sulfatase (4.8.2) in die Meßküvette gegeben und der Rekorder eingeschaltet. Den Rekorder abschalten, wenn sich die Absorption (Ae) nicht mehr verändert, die Tangente im Punkt t = 0 anlegen und ihre Steigung $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ bestimmen.

Die Aktivität der Sulfatase, ausgedrückt in Aktivitätseinheiten pro Milliliter Sulfataselösung, entspricht

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V}{\Delta E} \times \frac{1000}{50} \times 10^6$$

dabei ist:

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ die Steigung der Tangente im Punkt t = 0, in Absorptionseinheiten pro Minute

V das Reaktionsvolumen in Litern, (d. h. $2{,}05 \times 10^{-3}$ l)

ΔE die Differenz zwischen den molaren Extinktionskoeffizienten von Sinigrin und des Desulphosinigrin bei 228 nm

$$\Delta E = \frac{\Delta Ae}{e \times c}$$

dabei ist:

ΔAe die Differenz zwischen der Absorption des desulfatierten Sinigrins im Gleichgewichtszustand und Absorption zur Zeit t = 0

e die optische Weglänge in Zentimetern (d. h. 1 cm)

c die Konzentration des desulfatierten Sinigrins im Gleichgewichtszustand in mol/l (d. h.

$$c = \frac{0{,}15 \times 10^{-3} \times 0{,}95 \times 2}{2{,}05} = 1{,}39 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$$

Die Produktion im Gleichgewichtszustand der Desulfatierung von Sinigrin beträgt 0,95.

ΔE errechnen, das im Bereich von 1 500 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ liegen soll.

Die Aktivität der Sulfatase kann auch mit Hilfe der nachfolgenden, vereinfachten Formel berechnet werden:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta A \times 5{,}7}{\Delta t \times \Delta Ae}$$

Die ermittelte Aktivität der gereinigten Sulfatase-Lösung (4.8.2) sollte größer als 0,5 µmol/min × ml sein.

4.8.4. *Verdünnung*

Mit Hilfe einer Pipette wird 1 ml der gereinigten Sulfatase (4.8.2) in einen 10 ml-Meßkolben überführt, bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und vermischt.

Die Lösung wird in kleine Portionen aufgeteilt und bei −18 °C gelagert.

5. GERÄTE

Übliche Laborausstattung, und insbesondere

5.1. Hochleistungsflüssigchromatograph mit Lösungsmittelgradient, Säulentemperaturkontrolle bei 30 °C, verbunden mit einem UV-Detektor, der Messungen bei 229 nm erlaubt.

5.2. Chromatographiesäulen für HPLC, C18 oder C8-Füllmaterial mit einer Partikelgröße von ≤ 5 µm oder zum Beispiel:

LiChrosorb RP-18 Säule	≤ 5 µm (150 mm × 4,6 mm)
Spherisorb ODS 2 Säule	≤ 5 µm (250 mm × 4-5 mm)
Novapak C18 Säule	4 µm (150 mm × 4 mm)
LiChrospehr RP-8 Säule	≤ 5 µm (125 mm × 4 mm)
Nucleosil C18 Säule	≤ 5 µm (200 mm × 4 mm)

Die Leistung der gewählten Säule ist regelmäßig zu prüfen, vorzugsweise anhand einer Rapssamen-Referenzprobe (Desulfoglucosinolate verwenden, die aus Proben des Referenzbüros der Gemeinschaft hergestellt wurden). Insbesondere soll die Säule des 4-Hydroxyglucobrassicin, ein wichtiges aber relativ instabiles Glucosinolat, nicht abbauen.

Neue Säulen sollten einer vorbereitenden Messung unterworfen werden, damit reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

5.3. Zweistrahl-Spektralphotometer mit der Möglichkeit im UV-Bereich und bei 30 °C zu messen, ausgerüstet mit Quarzküvetten und einem Rekorder.

5.4. Mikromühle, z. B. eine Kaffeemühle.

5.5. Zentrifuge für 6 ml-Zentrifugengläser, mit einer erreichbaren Zentrifugalbeschleunigung von 5 000 *g*.

5.6. Heißwasserbad oder Heizblock, einstellbar auf 75 °C.

5.7. Polypropylenröhren mit 6 ml Inhalt.

5.8. Glaswolle.

5.9. Pasteurpipetten mit 150 mm Länge.

6. VERFAHREN

6.1. **Vorbereitung der Untersuchungsprobe**

Kontraktprobe gemäß Anhang II verkleinern ; in der Mikromühle (5.4) 20 Sekunden lang mahlen ; das Mahlgut vermischen und weitere 5 Sekunden mahlen.

Wenn die Samen einen Feuchtigkeitsgehalt von über 10 % (m/m) aufweisen, so werden sie zuerst in einem Trockenschrank mit Luftumwälzung bei maximal 45 °C getrocknet.

Anmerkung :

Wenn behandelte Samen analysiert werden, so werden diese vor dem Mahlen mit Dichlormethan gewaschen.

6.2. **Bestimmung des Gehalts an Feuchtigkeit und flüchtigen Bestandteilen.**

Der Gehalt an Feuchtigkeit und flüchtigen Bestandteilen der Analysenprobe wird gemäß Anhang III ermittelt.

6.3. **Untersuchungsprobe**

Zwei Zentrifugengläser (5.7) vorbereiten und jeweils 200 mg der Untersuchungsproben bis auf 0,1 mg genau in jedes Glas einwiegen.

6.4. **Extraktion der Glucosinolate**

Die Zentrifugengläser werden in das heiße Wasserbad oder den Heizblock (5.6) justiert, auf 75 °C gestellt und 1 Minute lang stehen gelassen. Dann werden 2 ml einer siedenden 70 %igen Methanollösung (4.1) und anschließend sofort

— in das erste Glas A, 200 µl der 5 mmol/l Sinigrinlösung (4.5.1)

— in das zweite Glas B, 200 µl der 20 mmol/l Sinigrinlösung (4.5.2)

hinzugefügt.

Die Zentrifugengläser werden weitere 10 Minuten bei 75 °C erhitzt, dabei wird regelmäßig geschüttelt. Der Inhalt der Zentrifugengläser wird nochmals gut durchmischt und dann bei 5 000 *g* 3 Minuten lang zentrifugiert. Die überstehenden Lösungen werden jeweils in ein anderes Röhrchen überführt (5.7).

Zu den Rückständen werden 2 ml einer siedenden 70 %igen Methanol-Lösung (4.1) gegeben und für weitere 10 Minuten bei 75 °C erhitzt, dabei wird regelmäßig geschüttelt. Es wird 3 Minuten lang zentrifugiert und die überstehende Lösung zu dem ersten Extrakt hinzugefügt. Das Gesamtvolumen wird mit Wasser auf etwa 5 ml aufgefüllt und gut durchmischt.

Dieser Extrakt kann zwei Wochen lang im Dunkeln in einem Gefriergerät bei −18 °C aufbewahrt werden.

6.5. **Herstellung der Ionen-Austauschersäulen**

Von der erforderlichen Anzahl von Pasteurpipetten (5.9), d. h. einer Pipette pro Probe, wird soviel abgeschnitten, damit ein Volumen von 1,2 ml über dem Hals verbleibt. Ein Glaswollepfropfen (5.8) wird in den Hals gesteckt. Die Pipetten werden senkrecht in einen Ständer gestellt.

In jede der Säulen werden 0,5 ml der gut durchmischten DEAE Sephadex A-25 Suspension (4.7.2) gegeben und zum Absetzen stehen gelassen.

Die Säulen werden mit 2 ml der 6 mol/l Imidazolformiatlösung (4.4) und dann zweimal mit 1 ml Wasser gewaschen.

6.6. **Reinigung und Desulfatierung**

1 ml Extrakt (6.4) auf die vorbereitete Säule (6.5) aufgeben, ohne die Harzoberfläche zu zerstören und ablaufen lassen. Zweimal 1 ml Natriumazetat-Pufferlösung (0,02 mol/l und pH 4,0) (4.2) hinzufügen und jedesmal ablaufen lassen.

75 µl der verdünnten gereinigten Sulfataselösung (4.8.4) aufgeben und zur Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen. Die erhaltenen Desulfoglucosinolate werden zweimal mit je 1 ml Wasser eluiert, wobei vor jeder Zugabe das Wasser ganz ablaufen muß. Die gut vermischten Eluate werden in einem Tiefkühlschrank im Dunkeln bei −18 °C aufbewahrt, sofern sie nicht sofort chromatographiert werden sollen.

6.7. **Referenz-Untersuchung**

Falls erforderlich (siehe 7.3), eine Referenz-Untersuchung unter den gleichen Bedingungen an einer identischen Probemenge aber ohne die interne Standardsinigrinlösung durchführen, um in der Probe etwa vorhandenes Sinigrin nachzuweisen und zu quantifizieren.

6.8. **Chromatographie**

6.8.1. *Einstellung des Geräts*

Flußrate der mobilen Phase: hängt von der Art der Säule (siehe 6.8.2) ab

Temperatur der Säule: 30 °C

Wellenlänge des Nachweises: 229 nm

6.8.2. *Probenmenge und Lösungsmittelgradient*

Unter Beachtung der Hinweise für das verwandte Gerät werden nicht mehr als 50 µl der nach 6.6 erhaltenen Lösungen der Desulfoglucosinolatelösung eingespritzt.

Je nach der verwendeten Säule eignen sich eine Reihe von Gradienten.

— Spherisorb RP-18 5 µm Säule (150 mm × 4,6 mm)
  — 100 % Eluent A (4.6.1) + 0 % Eluent B (4.6.2) für 1 Minute,
  — ein linearer Lösungsmittelgradient in 20 Minuten bis 0 % Eluent A und 100 % Eluent B erhalten werden,
  — ein linearer Lösungsmittelgradient in 5 Minuten bis 100 % Eluent A und 0 % Eluent B erzielt sind,
  — 100 % Eluent A und 0 % Eluent B für 5 Minuten zur Gleichgewichtseinstellung.
— LiChrospher RP-8 5 µm Säule (125 mm × 4,0 mm)
  — 100 % Eluent A für 2 Minuten und 30 Sekunden,
  — ein linearer Lösungsmittelgradient in 18 Minuten bis 0 % Eluent A + 100 % Eluent B,
  — 100 % Eluent B für 5 Minuten,
  — ein linearer Lösungsmittelgradient in 2 Minuten von 0 % Eluent A + 100 % Eluent B bis 100 % Eluent A und 0 % Eluent B erhalten werden,
  — 5 Minuten zur Gleichgewichtseinstellung.

Anmerkung: Je nach vewandter HPLC-Säule muß das Gradientenprofil so verändert werden, daß eine optimale Trennung erhalten wird.

6.8.3. *Auswertung der Chromatogramme*

Es sollen lediglich Glucosinolat-Peaks mi einer Fläche von mehr als 1 % der Summe aller Glucosinolat-Peakflächen berücksichtigt werden.

Die Elutionsreihenfolge der Peaks von einer C18-Säule bei Anwendung der Lösungsmittelgradienten nach 6.8.2 ist wie folgt:

1. Desulfoglucoiberin
2. Desulfoprogoitrin
3. Desulfoepi-Progoitrin
4. Desulfosinigrin
5. Desulfoglucoraphanin
6. Desulfogluconapoleiferin
7. Desulfoglucoalyssin
8. Desulfogluconapin
9. Desulfo-4-Hydroxyglucobrassicin
10. Desulfoglucobrassicanapin
11. Desulfoglucotropaeolin
12. Desulfoglucobrassicin
13. Desulfogluconasturtiin
14. Desulfo-4-Methoxyglucobrassicin
15. Desulfoneoglucobrassicin



7. ANGABE DER ERGEBNISSE

7.1. **Berechnung des Gehalts an einzelnen Glucosinolaten**

Der Gehalt eines jeden Glucosinolats, ausgedrückt in Mikromol pro Gramm trockene Samen, entspricht:

$$\frac{\text{Desulfoglucosinolat Peakfläche}}{\text{Desulfosinigrin Peakfläche}} \times \frac{\text{Innerer Standard (in µmol), die dem Reagenzglas in 6.4 zugesetzt wurde}}{\text{Gewicht der extrahierten Untersuchungsprobe (6.3)}}$$

$$\times \text{ Response-Faktor des Desulfoglukosinolats (7.2)} \times \frac{100}{100 - H}$$

dabei ist:

H = Gehalt an Feuchtigkeit und flüchtigen Bestandteilen der Analysenprobe ausgedrückt in Massenprozent (6.2)

In bestimmten Fällen müssen die Ergebnisse mit genauer Feuchtigkeitsangabe ausgedrückt werden (z. Z. 9 %). In diesen Fällen wird das Ergebnis, welches für die trockenen Samen erhalten wurde, multipliziert mit

$$\frac{(100 - \text{Feuchtigkeit})}{100}$$

7.2. **Response-Faktoren**

Die Response-Faktoren sind experimentell bestimmt worden. Sie sind zwischen den verschiedenen beteiligten Laboratorien einvernehmlich festgesetzt worden und können zu gegebener Zeit offiziell überarbeitet werden.

Desulfoglucoiberin	1,07
Desulfoglucobrassicanapin	1,15
Desulfoglucoraphanin	1,07
Desulfo-4-Hydroxyglucobrassicin	0,28
Desulfoglucoalyssin	1,07
Desulfoglucobrassicin	0,29
Desulfoprogoitrin	1,09
Desulfoneoglucobrassicin	0,20
Desulfoepi-Progoitrin	1,09
Desulfoglucotropaeolin	0,95
Desulfosinigrin	1,00
Desulfogluconasturtiin	0,95
Desulfogluconapin	1,11
Desulfogluconapoleiferin	1,00
Desulfo-4-Methoxyglucobrassicin	0,25
Sonstige Desulfoglucosinolate	1,00

7.3. **Gesamtglucosinolatgehalt**

Der Gesamtglucosinolatgehalt, angegeben in Mikromol pro Gramm trockene Probe, entspricht der Summe der Glucosinolate, deren Peakfläche größer als 1 % der Summe aller Glucosinolat-Peakflächen ist.

Die Verwendung des inneren Standards mit zwei verschiedenen Konzentrationen (4.5.1 und 4.5.2) macht es möglich, das in der Probe enthaltene Sinigrin oder das Vorhandensein einer mit dem Singrinpeak eluierenden Verunreinigung zu berücksichtigen.

— Wenn die Differenz zwischen dem Gesamtglucosinolatgehalt der beiden Wiederholungen den Bedingungen für die Wiederholbarkeit (8.2) entsprecht, liegt keine Kontamination des inneren Standards vor. Das Ergebnis ist das arithmetische Mittel der beiden Bestimmungen.

— Wenn die Differenz der beiden Wiederholungen nicht den Bedingungen für die Wiederholbarkeit (8.2) entspricht, dann ist die Bestimmung mit zwei anderen Untersuchungsproben zu wiederholen und zusätzlich eine Vergleichsprobe ohne die innere Standardlösung (6.7) durchzuführen. Die Fläche der Kontamination wird von der Fläche der inneren Standardlösung abgezogen, um die wahre Fläche des inneren Standards zu erhalten, die dann in die Formel in 7.1 eingesetzt wird. Das Ergebnis ist das arithmetische Mittel dieser beiden neuen Bestimmungen.

8. PRÄZISION UND RICHTIGKEIT

8.1. **Präzision (Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit)**

Ein 1988 mit 12 Laboratorien international durchgeführter Ringversuch, bei dem jedes Laboratorium an jeder von vier Rapsproben je zwei Bestimmungen durchführte, ergab die Werte für die Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit, die in der Tabelle 1 aufgeführt sind. Die Ergebnisse wurden nach der Norm ISO 5725 ausgewertet (Präzision von Meßverfahren — Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichspräzision von festgelegten Meßverfahren durch Ringversuche).

Tabelle 1 : Werte für Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit ermittelt im Ringversuch (1988)

Proben	Rapssamen A	Rapssamen B	Rapssamen C	Rapssamen D
Anzahl Laboratorien nach Eliminierung von Ausreißern	11	11	11	11
Mittelwert	20,6	14,1	4,9	25,6
Wiederhol-Standard-Abweichung	1,7	0,6	0,3	0,8
Variations-Koeffizient der Wiederholbarkeit	8,5 %	4,4 %	6,7 %	3,3 %
Wiederholbarkeit	4,9	1,7	0,9	2,4
Vergleichs-Standard-Abweichung	3,4	2,5	1,5	2,4
Variations-Koeffizient der Vergleichbarkeit	17 %	18 %	31 %	9,4 %
Vergleichbarkeit	9,6	7,1	1,4	6,8

8.1.1. *Wiederholbarkeit*

Gemäß obenstehenden Ergebnissen (8.1) darf die Differenz zwischen zwei Bestimmungen, die zügig nacheinander vom selben Analytiker unter Verwendung der selben Geräte und an der gleichen Probe durchgeführt wurden, nicht mehr als 2 µmol/g bei Gehalten unter 20 µmol/g und nicht mehr als 4 µmol bei Gehalten zwischen 20 und 35 µmol/g betragen.

8.1.2. *Vergleichbarkeit*

Gemäß obenstehenden Ergebnissen (8.1) darf die Differenz zwischen den Endergebnissen, die zwei Laboratorien nach der vorliegenden Methode an der gleichen Kontraktprobe erhalten, nicht mehr als 4 µmol/g bei Gehalten unter 20 µmol/g und nicht mehr als 8 µmol/g für Gehalte zwischen 20 und 35 µmol/g betragen.

8.2. **Richtigkeit**

Die richtige Anwendung der Methode wird überprüft durch die wiederholte Messung an Referenzmaterialien mit zertifiziertem Gesamtglucosinolatgehalt in der betroffenen Größenordnung.

Geeignetes Referenzmaterial mit zertifiziertem Glucosinolatgehalt kann bezogen werden beim Gemeinschaftlichen Referenzbüro (Bureau Communautaire de Référence — BCR) der Kommission der Europäischen Gemeinschaften.

Hinweise zum Vergleich der Laborergebnisse, die mit dem Referenzmaterial mit zertifiziertem Gehalt erhalten wurden, ist in dem Abschnitt „Instructions for use" des Berichtes wiedergegeben, der dem Referenzmaterial beiliegt.

9. ANALYSENBERICHT

Der Analysenbericht soll die angewandte Methode angeben und das Ergebnis enthalten. Außerdem soll jeder Verfahrensschritt, der nicht in diesem internationalen Standard enthalten ist oder als optional erachtet wird, zusammen mit jeder Beobachtung, die einen Einfluß auf das Ergebnis gehabt haben kann, angegeben werden.

Der Analysenbericht soll alle Informationen enthalten, die für eine vollständige Identifizierung der Probe notwendig sind."