

## **Glucosinolatbestimmung in Rapsextraktionsschrot mittels NIRS**

Dr. Tilli Reinhardt, Abschnitt Nahes Infrarot, Panoramastr. 55, 65199 Wiesbaden

### **Zusammenfassung**

Ziel dieser Studie war es mit Hilfe der NIRS-Technik eine Schnellmethode zur Bestimmung des Glucosinolatgehaltes in Rapsextraktionsschrot (RES) zu entwickeln. Datengrundlage der Methodenentwicklung waren 1230 Proben von RES von verschiedenen Ölmühlen und Mischfutterwerken aus vier Jahren für die sowohl NIRS-Spektren als auch HPLC-Ergebnisse vorlagen.

Die NIRS-Methode auf der Basis von 258 Proben erzielte einen mittleren Schätzfehler von 1,6  $\mu\text{mol}$  GSL/g Saat. In den drei Validationen lag der Fehler mit 1,5 bis 1,8  $\mu\text{mol}$  GSL auf vergleichbarem Niveau. Systematische Fehler traten auch bei einem Gerätewechsel und anderer Probenaufarbeitung nicht auf. Die NIRS-Methode ist hinreichend genau und robust um zur Qualitätskontrolle für RES genutzt werden zu können.

Die Qualitätssicherung der Methode selbst durch weitere unabhängige Validationen muss erfolgen.

### **Summary**

#### **Estimating glucosinolat content of rapeseed extracted meal by NIRS**

The objective of this work was to evaluate the potential of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) as a rapid method to estimate the glucosinolate content of samples of rapeseed extracted meal (RSM).

A total of 1230 samples from several oil mills and compound feed plants from four different years were scanned by NIRS and analysed by HPLC. NIRS-method based on 258 samples resulted in a standard error of calibration (SEC) from 1,6  $\mu\text{mol}$  GSL/g seed. Three independent validations gave results of the standard error of prediction from 1,5 to 1,8  $\mu\text{mol}$  GSL/g seed. There were no systematic errors when instrument or sample preparing changed. NIRS-method was shown as solid and accurate and will be used for quality control of RSM.

Quality of the NIRS-Method have to be check with further independent validations.

## **1. Aufgabenstellung**

Ziel des Projekts ist die Entwicklung einer Schnellmethode mittels NIRS-Technik zur Bestimmung des Glucosinolat-Gehalts im Pressrückstand von Rapssaat nach der Ölgewinnung (Rapsextraktionsschrot). Eine damit mögliche Deklaration des GSL-Gehaltes kann die Wertschätzung des Rapsextraktionsschrots als wertvolles einheimisches Eiweißfutter erhöhen und neue Absatzmöglichkeiten auf dem Futtermittelmarkt erschließen.

## **2. Material und Methoden**

### **Grundlagen:**

Grundlage für diese Untersuchung ist die Arbeit von SCHUMANN (2005), in der der Glucosinolatgehalt von Rapssaaten und Rapsfuttermitteln untersucht wurde (UFOP Projekt Nr. 521/001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden über einen Zeitraum von drei Jahren 637 Proben von Rapsextraktionsschrot (RES), das von 10 verschiedenen Ölmühlen stammt, untersucht (Probensatz „RES Ölmühlen“). Ergänzend wurden 517 Proben, die bei 33 verschiedenen Mischfutterwerken gezogen wurden, untersucht (Probensatz „RES MFW“). Die Herkunft der Proben ist ausführlich in den Tabellen 3 und 4 bei SCHUMANN (2005) beschrieben.

Weiterhin standen aus dem UFOP-Projekt 524/051 (2005) weitere 73 Proben von RES von diversen Ölmühlen und Mischfutterwerken aus dem Jahr 2005 zur Verfügung (Probensatz „VDLUFA 05“).

### **Probenaufbereitung**

Das angelieferte RES der Probensätze RES Ölmühlen und RES MFW wurde ca. 6 h bei 40 °C im Umlufttrockenschrank getrocknet und anschließend mit einer Kaffeemühle bei fester Zeitvorgabe geschrotet. Von dieser Probe wurden zeitgleich Teilproben für die NIRS-Untersuchung und die HPLC-Bestimmung gezogen.

Das angelieferte RES des Probensatzes VDLUFA 05 wurde für die NIRS-Untersuchung mit einer Ultrazentrifugalmühle entsprechend VDLUFA-Methode für RES vermahlen. Die Aufarbeitung einer Teilprobe für die HPLC-Untersuchung erfolgte analog der beiden anderen Probensätze.

### **Referenzanalytik**

Die Untersuchung der GSL-Gehalte erfolgte mittels HPLC-Technik durch jeweils eine Doppelbestimmung entsprechend der Methode EN ISO 9167-1. Es wurde ein

Gradienten-Gerätesystem der Fa. Merck-Hitachi verwendet (weitere Details bei SCHUMANN 2005). Die GSL-Gehalte werden auf die Trockenmasse bezogen ( $\mu\text{mol/g RES i TS}$ ).

### NIRS-Analytik

Die Probenpräsentation bei der NIRS-Datenerfassung erfolgte in der Standardküvette. Je Probe wurden drei Wiederholungen gemessen, die nach interner Kontrolle als gemitteltetes Spektrum abgespeichert wurden.

Die NIRS-Messung der Probensätze „RES Ölmühlen“ und „RES MFW“ erfolgte am Monochromator NIRSystems 5000 der Landesforschungsanstalt in Gülzow, die NIRS-Messung des Probensatzes „VDLUFA 05“ am NIRSystems 5000 der VDLUFA Kassel.

Über mathematisch, statistische Verfahren erfolgt mit Hilfe des Softwarepakets ISI die Probenauswahl und Methodenentwicklung.

### 3. Ergebnisse

Aus den Probensätzen „RES Ölmühlen“ und RES MFW“ wurden zunächst 125 bzw. 100 Proben nach dem Zufallsprinzip zur **Validation** entnommen. Anschließend wurden aus den verbleibenden Probensätzen über die spektrale Variation jeweils 129 Proben für das Kalibrations-Set selektiert (Tab. 1). Die identische Anzahl selektierter Proben aus beiden Pools ist ein Zufallsergebnis, der Probenumfang  $n=129$  war nicht vorgegeben.

**Tab. 1: Übersicht über das Material sowie die Probenauswahl**  
*Sample collection and sample selection*

Probensatz	n	n (nutzbar)	zufällige Auswahl	H-Selektion aus n	Nutzung
RES Ölmühlen	637	635	↳ 125	510 129	Kalibrations-Set Validation
RES MFW	517	517	↳ 100	417 129	Kalibrations-Set Validation
RES VDLUFA 05	73	73			Validation

Der somit aus 258 Spektren bestehende Kalibrationsprobensatz repräsentiert mindestens drei Erntejahre und drei Produktionsjahre des Rapsverarbeitungsprodukts RES.

Ohne steuernd einzugreifen sind durch die Auswahl über die spektrale Variation nahezu gleich viele Proben aus den drei Anlieferungsjahren ausgewählt worden. Tabelle 2 zeigt die Verteilung über die Anlieferungsjahre sowie die statistischen Angaben zum GSL-Gehalt für die 258 Proben. Der GSL-Gehalt reicht von 0,6 bis 26,7  $\mu\text{mol}$  GSL/g RES, alle bei SCHUMANN (2005) beschriebenen Qualitäten finden sich somit in diesem Probensatz wieder.

Die Methode wurde als MPLS-Modell in der Datentransformation 2/4/4 unter Einbeziehung des Wellenlängenbereichs 1100 bis 1800 nm aus diesem Kalibrations-Set entwickelt und liegt als Regressionsfunktion elektronisch als RES06.EQA mit der Bezeichnung „RES06“ vor.

Die Methode weist eine Schätzgenauigkeit von 1,6  $\mu\text{mol}$  GSL/g RES auf (Tabelle 3). In der Validation wurde diese Schätzgenauigkeit durch alle drei Probensätze bestätigt. Der Schätzfehler liegt für die beiden abhängigen Probensätze bei 1,8 bzw. 1,5  $\mu\text{mol}$ , für die unabhängige Validation mit VDLUFA 05 bei 1,8  $\mu\text{mol}$ . Der systematische Fehler ist in allen drei Sets gering.

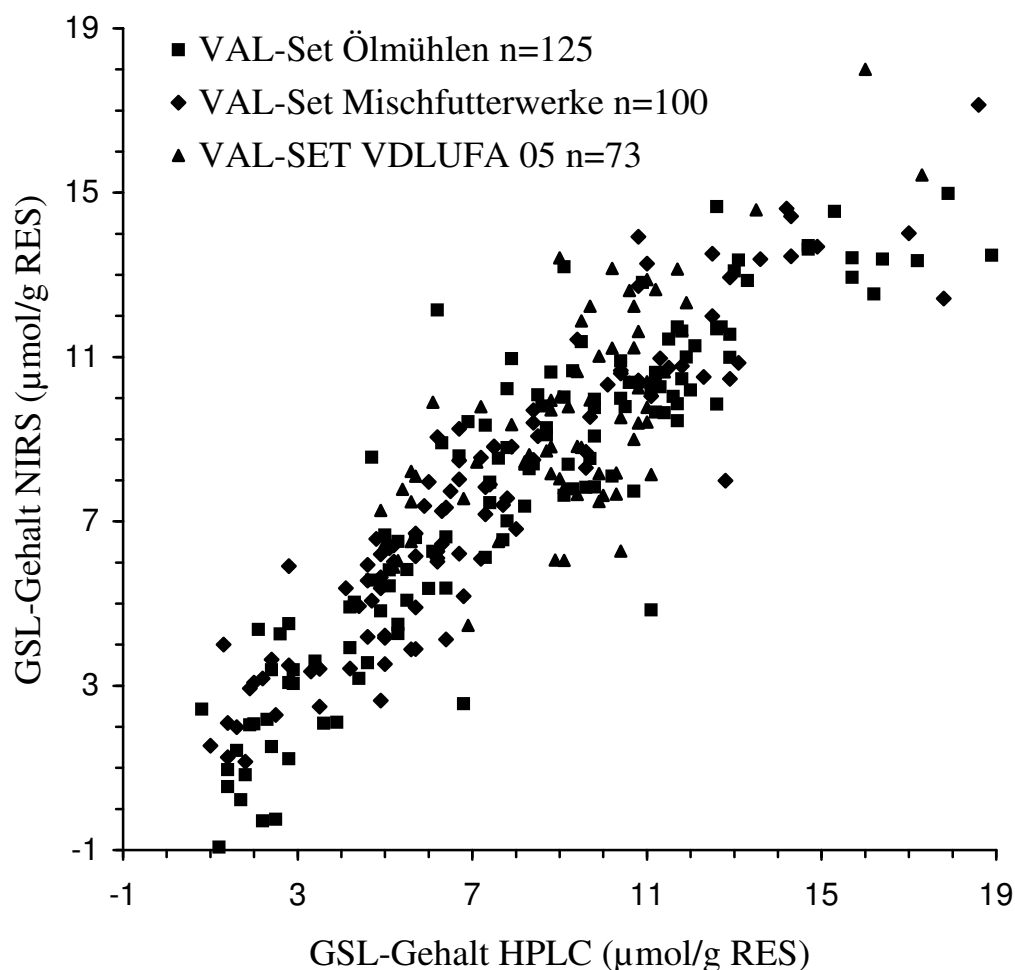
Das Bestimmtheitsmaß ist ebenfalls mit dem Ergebnis der Kalibration vergleichbar. Das geringe Bestimmtheitsmaß von 0,53 für das Set VDLUFA 05 ist eine Folge der geringeren Variationsbreite dieses Sets (4,5-18,0  $\mu\text{mol}$  GSL), die beiden anderen Sets beinhalten Proben von 1,0-18,6 bzw. 1,4 bis 18,9  $\mu\text{mol}$  GSL.

**Tab. 2: Zusammensetzung und GSL-Gehalt des Kalibrations-Sets (n=258)**  
*Origin, number of samples and GSL content of calibration set (n=258)*

Herkunft	Anlieferungsjahr	Anzahl Proben	$\mu\text{mol}$ GSL/g RES		
			Mittelwert	SD	von - bis
Ölmühle	2000/2001	43	6,9	4,15	0,8 – 16,6
	2001/2002	45	9,7	4,16	1,5 – 19,1
	2002/2003	41	6,8	3,34	0,6 – 13,1
Mischfutterwerk	2000/2001	40	8,1	3,99	0,9 – 15,2
	2001/2002	38	11,3	6,60	1,8 – 26,7
	2002/2003	51	7,4	3,83	1,2 – 18,3
Kalibrations-Set	2000-2003	258	8,3	4,64	0,6 – 26,7

**Tab. 3: Statistik der Kalibrierung und Validierung für GSL in RES**  
*Calibration and Validation Statistics for GSL content of RSM*

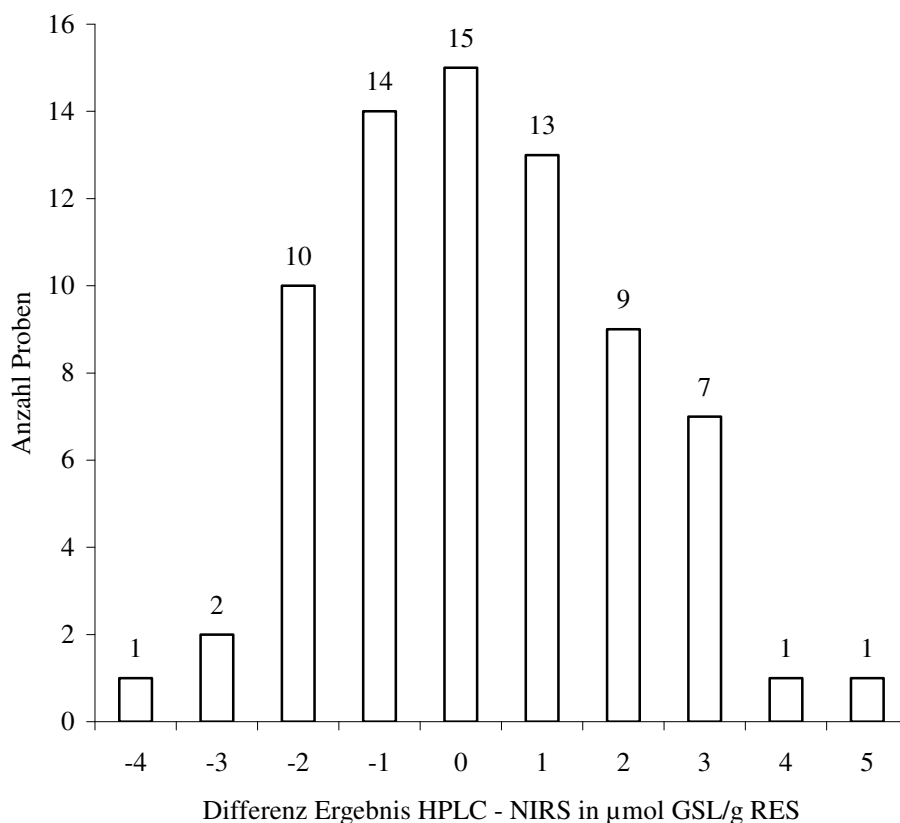
Probensatz	n	$\mu\text{mol GSL/ g RES}$						$r^2$	Slope
		Mittelwert		SD		SEP(C)	Bias		
		HPLC	NIRS	HPLC	NIRS				
Kalibration-Set	258	8,3	8,3	4,64	4,35	(1,63)		0,88	1,00
Validation-Sets									
Ölmühlen	125	8,1	7,8	4,21	3,91	1,78	0,34	0,82	0,98
MFW	100	7,4	7,5	3,92	3,57	1,47	-0,12	0,86	1,02
VDLUFA 05	73	9,5	9,7	2,34	2,54	1,80	-0,21	0,53	0,67



**Abb. 1: GSL-Gehalte als Gegenüberstellung NIRS – HPLC für die Validation**  
*Prediction plots for GSL content (NIRS vs. HLPC) in validation*

Die Einzelergebnisse der GSL-Gehalte für alle Validationsproben sind in Abbildung 1 dargestellt. Proben der Validations-Sets Ölmühlen und MFW mit höheren GSL-Gehalten werden durch die NIRS-Methode z.T. erheblich unterschätzt. Proben des Validations-Sets VDLUFA 05 mit höheren GSL-Gehalten werden dagegen durch die NIRS-Methode vergleichbar genau wie Proben aus anderen Konzentrationsstufen geschätzt. In der unabhängigen Validierung bestätigt sich somit die zunächst beobachtete Schwäche der Methode in der zuverlässigen Schätzung von RES mit höheren GSL-Gehalten nicht.

Die Differenz zwischen HPLC und NIRS-Ergebnis für den Probensatz VDLUFA 05 ist in Abbildung 2 wiedergegeben.



**Abb. 2:** Verteilung der Differenzen zwischen HPLC und NIRS-GSL-Gehalt für die Validierung mit VDLUFA 05 (n=73)  
*Distribution of differences between GSL content of HPLC and NIRS analysis for the validation set VDLUFA 05 (n=73)*

#### **4. Diskussion**

Die Methode zur Bestimmung des Glucosinolat-Gehalts mittels NIRS in intakter Rapssaat ist bei einer Genauigkeit von 2  $\mu\text{mol}$  GSL/g Saat seit Jahren bei Saatzuchtunternehmen, in Labors und bei wissenschaftlichen Einrichtungen etabliert (TILLMANN und REINHARDT, 1999). Die NIRS Technik ist somit nachweislich geeignet, den Glucosinolat-Gehalt spektroskopisch aus der Matrix der intakten Rapssaat zu differenzieren. Die Chance, eine NIRS-Bestimmung im RES entwickeln zu können, war somit hoch. Die hier vorgestellte Methode weist einen mittleren Schätzfehler von 1,6  $\mu\text{mol}$  GSL/g RES auf. Die Genauigkeit ist damit etwas höher als für die Standardmethode für Rapssaat. Da es sich hier um vermahlendes Material muss zwangsläufig wegen der geringeren Effekte durch die Matrix eine höhere Genauigkeit erreicht werden.

Die gute Validationsstatistik für die komplett unabhängigen Proben aus 2005 belegt die Güte der Methode und berechtigt dazu, diese für eine Qualitätskontrolle von RES bei der VDLUFA Kassel einzusetzen. Die kontinuierliche Qualitätssicherung durch weitere unabhängige Validationen muss dabei gewährleistet werden.

#### **5. Schlussfolgerungen**

Mit der bereitgestellten Methode bietet sich die Chance, den Status der Wertschätzung des Rapsschrotes zu steigern. Durch diese kostengünstige Schnellmethode kann eine durchgängige Qualitätskontrolle der Abgabeprodukte bei den Ölmühlen aber auch eine Inputkontrolle bei den Mischfutterherstellern erfolgen. Mit der Verfügbarkeit von validen GSL-Schätzwerten wird die Einsatzmöglichkeit von Rapsextraktionsschrot als wertvolle Eiweißkomponente in der Tierernährung erhöht. Die vorgestellte Methode kann unmittelbar über das Netzwerk von Dr. Tillmann VDLUFA Kassel zentral bereitgestellt werden. Die zentrale Bereitstellung ermöglicht und gewährleistet eine kontinuierliche Kontrolle und gegebenenfalls Weiterentwicklung der Methode zum Nutzen aller.

## **6. Literatur**

- ISO 9167-1: Rapeseed. Determination of glucosinolate content - Part 1: Method using high-performance liquid chromatography. Edi. 1992-07. ISO, Genf.
- SCHUMANN, W., 2005: Untersuchungen zum Glucosinolatgehalt von in Deutschland erzeugten und verarbeiteten Rapssaaten und Rapsfuttermitteln. UFOP-Schriften, Heft 27, 1-69
- TILLMANN, P. und T.-C. REINHARDT, 1999: Qualitätsbestimmung von Körnerraps mit der vernetzten Nahinfrarotspektroskopie (NIRS). UFOP-Schriften, Heft 12, 135-162
- UFOP-Projekt 524/051 (2005): Monitoring Rapsextraktionsschrot. Projektbetreuung: Bundesarbeitskreis der Fütterungsreferenten der Bundesländer und Landwirtschaftskammern bei der DLG, Eschborner Landstraße 122, 60489 Frankfurt/M. , unveröffentlicht

## **Danksagung**

Die Autorin dankt der UFOP für die Beauftragung und Finanzierung. Herrn Dr. Schumann und Frau Balmer, Gülzow gilt jenseits der vertraglichen Zusammenarbeit mein besonderer Dank für die perfekte Datenbereitstellung und alle weiteren Informationen.