

DIN EN 16858



ICS 67.050

**Lebensmittel –
Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Lebensmitteln mit
Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS);
Deutsche Fassung EN 16858:2017**

Foodstuffs –

Determination of melamine and cyanuric acid in foodstuffs by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS);

German version EN 16858:2017

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en mélamine et en acide cyanurique dans les produits alimentaires par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM);

Version allemande EN 16858:2017

Gesamtumfang 28 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16858:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-14 AA „Prozesskontaminanten“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Für die in diesem Dokument zitierte Europäische und Internationale Norm wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

EN ISO 3696:1995	siehe	DIN ISO 3696:1991-06
ISO 5725-2:1994	siehe	DIN ISO 5725-2:2002-12

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696:1991-06, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696:1987*

DIN ISO 5725-2:2002-12, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:1994 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2002)*

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Lebensmitteln
mit Flüssigchromatographie und Tandem-
Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Foodstuffs —
Determination of melamine and cyanuric acid in
foodstuffs by liquid chromatography and tandem mass
spectrometry (LC-MS/MS)

Produits alimentaires —
Détermination de la teneur en mélamine et en acide
cyanurique dans les produits alimentaires par
chromatographie en phase liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 10. April 2017 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	4
5 Geräte	8
6 Durchführung	9
7 Systemeinstellungen	10
8 Berechnung und Angabe von Ergebnissen	15
9 Präzision	18
10 Untersuchungsbericht	19
Anhang A (informativ) Typische HPLC-Chromatogramme	20
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	24
Literaturhinweise	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16858:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2017 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] ist/sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

WARNUNG — Die Anwendung dieser Norm bringt den Einsatz gefährdender Stoffe, Arbeitsabläufe und Geräte mit sich. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, alle Sicherheitsaspekte, die bei ihrer Anwendung auftreten können aufzuzeigen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz des Personals zu treffen und vor der Anwendung zu prüfen, welche einschränkenden Vorschriften und Regelungen zu berücksichtigen sind.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Lebensmitteln mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) fest. Das Verfahren wurde in einem Ringversuch durch die Analyse von aufgestockten Proben von Babynahrung auf Milchbasis, Babynahrung auf Sojabasis, Milchpulver, Vollmilch, Sojagetränk und Milchsokolade im Bereich von 0,71 mg/kg bis 1,43 mg/kg für Melamin und von 0,57 mg/kg bis 1,45 mg/kg für Cyanursäure validiert. Die Bestimmungsgrenzen (en: limit of quantification, LOQ) für Melamin und Cyanursäure in Lebensmitteln liegen bei 0,05 mg/kg beziehungsweise 0,25 mg/kg. Die Obergrenze des Arbeitsbereichs für Melamin reicht bis 10 mg/kg und für Cyanursäure bis 25 mg/kg.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

Eine Einwaage der homogenen Lebensmittelprobe wird mit ^{13}C -markierten internen Standards (Melamin und Cyanursäure) versetzt. Nach der Inkubation für mindestens eine Stunde wird Wasser zur Probe gegeben und nach Schütteln wird die Aufschlammung in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser gelöst. Die Probe wird geschüttelt und zentrifugiert. Nach Abtrennung des Überstands von den Sedimenten wird Benzoguanamin als Wiederfindungsstandard hinzugefügt. Ein Aliquot des wässrigen Überstands wird in ein LC-MS/MS-System injiziert. Das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer wird entweder mit Hochleistungsflüssigchromatographie (en: high performance liquid chromatography, HPLC) oder mit Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (en: ultra performance liquid chromatography, UHPLC) verbunden. Die Chromatographie beruht auf der hydrophilen Interaktionsflüssigchromatographie (en: hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC). Die Ionisierung erfolgt durch Elektrosprayionisierung (en: electrospray ionization, ESI) bei multiplem Reaktionsmonitoring (en: multiple reaction monitoring, MRM).

4 Reagenzien

Sofern nicht anders festgelegt, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 zu verwenden. Es sind nur Reagenzien mit einer für die Melamin- und Cyanursäure-Analyse geeigneten Reinheit zu verwenden. Die Reinheit der Reagenzien und Referenzmaterialien (z. B. Standardlösungen) wird geprüft, indem eine Blindprobe unter den gleichen Bedingungen untersucht wird, die im Verfahren angewendet werden. Das Chromatogramm darf keine störende Verunreinigung bei der Retentionszeit der zu untersuchenden Verbindung aufweisen.

- 4.1 Ameisensäure**, Massenanteil 98 % bis 100 % (CAS 64-18-6).
- 4.2 Acetonitril**, HPLC-Qualität (CAS 75-05-8).
- 4.3 Ammoniumacetat**, Massenanteil etwa 98 % (CAS 631-61-8).
- 4.4 Methanol**, Ultra LC-MS-Qualität (CAS 67-56-1).
- 4.5 Melamin**, Massenanteil ≥ 99 %, fest (CAS 108-78-1).
- 4.6 Cyanursäure**, fest, (CAS 108-80-5).
- 4.7 Benzoguanamin**, fest, (CAS 91-76-9).
- 4.8 ^{13}C -Melamin**, $^{13}\text{C}_3$ (99 %), Amino- $^{15}\text{N}_3$ (98 %), Lösung mit der Massenkonzentration $\rho = 1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$.
- 4.9 ^{13}C -Cyanursäure**, $^{13}\text{C}_3$ (99 %), $^{15}\text{N}_3$ (98 %), Lösung mit $\rho = 1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$.

4.10 Herstellung der Stammlösungen

4.10.1 Melamin-Stammlösung, $\rho = 1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$

Etwa 100 mg Melamin (4.5) werden auf 0,01 mg in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) eingewogen und eine Menge Wasser unter Wägen so hinzugegeben, dass sich eine Konzentration von $1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$ ergibt. Die Lösung wird im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.10.2 Cyanursäure-Stammlösung, $\rho = 1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$

Etwa 100 mg Cyanursäure (4.6) werden auf 0,01 mg in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) eingewogen und eine Menge Wasser unter Wägen so hinzugegeben, dass sich eine Konzentration von $1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$ ergibt. Die Lösung wird im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.10.3 Benzoguanamin-Stammlösung, $\rho = 1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$

Etwa 100 mg Benzoguanamin (4.7) werden auf 0,01 mg in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) eingewogen und eine Menge Methanol (4.4) unter Wägen so hinzugegeben, dass sich eine Konzentration von $1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$ ergibt. Die Lösung wird im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.10.4 ^{13}C -Melamin-Stammlösung, $\rho = 20\text{ }\mu\text{g/ml}$

1,0 ml ^{13}C -Melamin (4.8) wird in einen 50-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und gemischt. Die Endkonzentration beträgt $20\text{ }\mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) überführt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.10.5 ^{13}C -Cyanursäure-Stammlösung, $\rho = 20\text{ }\mu\text{g/ml}$

1,0 ml ^{13}C -Cyanursäure (4.9) wird in einen 50-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und gemischt. Die Endkonzentration beträgt $20\text{ }\mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) überführt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.11 Herstellung der Standardlösungen

4.11.1 Melamin-Standardlösung I, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$

1,0 ml Melamin-Stammlösung (4.10.1) wird in einen 50-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Verdünnungslösung (4.16) aufgefüllt und gemischt. Die Konzentration beträgt $20 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) überführt und im Kühlschrank bei $4^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.11.2 Cyanursäure-Standardlösung I, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$

1,0 ml Cyanursäure-Stammlösung (4.10.2) wird in einen 50-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Verdünnungslösung (4.16) aufgefüllt und gemischt. Die Konzentration beträgt $20 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) überführt und im Kühlschrank bei $4^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.11.3 Melamin-Standardlösung II, $\rho = 0,2 \mu\text{g/ml}$

1,0 ml verdünnte Melamin-Stammlösung I (4.11.1) wird in einen 100-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Verdünnungslösung (4.16) aufgefüllt und gemischt. Die Konzentration beträgt $0,2 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) überführt und im Kühlschrank bei $4^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.11.4 Cyanursäure-Standardlösung II, $\rho = 0,2 \mu\text{g/ml}$

1,0 ml verdünnte Cyanursäure-Stammlösung I (4.11.2) wird in einen 100-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Verdünnungslösung (4.16) aufgefüllt und gemischt. Die Konzentration beträgt $0,2 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) überführt und im Kühlschrank bei $4^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.11.5 Benzoguanamin-Standardlösung I, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$

1,0 ml Benzoguanamin-Stammlösung (4.10.3) wird in einen 50-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Verdünnungslösung (4.16) aufgefüllt und gemischt. Die Konzentration beträgt $20 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in ein 100-ml-Glasgefäß (5.2) überführt und im Kühlschrank bei $4^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.11.6 Benzoguanamin-Standardlösung II, $\rho = 2 \mu\text{g/ml}$

1,0 ml Benzoguanamin-Standardlösung I (4.11.5) wird in einen 10-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Verdünnungslösung (4.16) aufgefüllt und gemischt. Die Konzentration beträgt $2 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in ein 20-ml-Glasgefäß (5.2) überführt und im Kühlschrank bei $4^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.11.7 ^{13}C -Melamin- und ^{13}C -Cyanursäure-Standardlösung, $\rho = 2 \mu\text{g}/\text{ml}$

0,5 ml ^{13}C -Melamin-Stammlösung (4.10.4) und 0,5 ml ^{13}C -Cyanursäure-Stammlösung (4.10.5) werden in einen 5-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und gemischt. Die Konzentrationen der beiden Verbindungen betragen $2 \mu\text{g}/\text{ml}$. Diese Lösung wird in ein 20-ml-Glasgefäß (5.2) überführt und im Kühlschrank bei $4^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.11.8 Herstellung der Kalibrierlösungen

Die in Tabelle 1 angegebenen Volumina werden in einen 10-ml-Messkolben (5.3) pipettiert und bis zur Marke mit der Verdünnungslösung (4.16) aufgefüllt.

Tabelle 1 — Herstellung der Kalibrierlösung

	Kalibrierlösung Nr.						
	1	2	3	4	5	6	7
Melamin-Standardlösung I (4.11.1), ml	0	0	0	0	0	0,05	0,25
Cyanursäure-Standardlösung I (4.11.2), ml	0	0	0	0	0	0,05	0,25
Melamin-Standardlösung II (4.11.3), ml	0	0,05	0,25	1,25	2,5	0	0
Cyanursäure-Standardlösung II (4.11.4), ml	0	0,05	0,25	1,25	2,5	0	0
Benzoguanamin-Standardlösung II (4.11.6), ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
^{13}C -Melamin- und ^{13}C -Cyanursäure-Standardlösung (4.11.7), ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Konzentration ^{13}C -Melamin – ^{13}C -Cyanursäure, $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Konzentration nativ Melamin – Cyanursäure, $\mu\text{g}/\text{ml}$	0	0,001	0,005	0,025	0,05	0,1	0,5

4.12 Mobile Phase A für HPLC, Stoffmengenkonzentration $c(\text{Ammoniumacetat}) = 10 \text{ mmol}/\text{l}$.

0,77 g Ammoniumacetat (4.3) werden in 1 000 ml Wasser gelöst.

4.13 Mobile Phase B für HPLC

Acetonitril (4.2).

4.14 Mobile Phase A für UHPLC

3 Volumenteile Ameisensäure (4.1) werden mit 97 Volumenteilen Wasser gemischt.

4.15 Mobile Phase B für UHPLC, $c(\text{Ammoniumacetat}) = 20 \text{ mmol}/\text{l}$ in einem Gemisch aus 3 Volumenteilen Wasser und 97 Volumenteilen Acetonitril.

1,54 g Ammoniumacetat (4.3) werden in 30 ml Wasser gelöst. 970 ml Acetonitril (4.2) werden dem Gemisch zugefügt und es wird kräftig geschüttelt. Das trübe Gemisch wird über Nacht klar.

ANMERKUNG Die optimale Auswahl der mobilen Phasen A und B können von der Geräteeinstellung abhängen (siehe 5.10 bis 5.12), insbesondere von der Art der verwendeten Säule. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

4.16 Verdünnungslösung

70 ml Acetonitril (4.2) und 30 ml Wasser werden mit Messzylindern in einen 100-ml-Messkolben (5.3) überführt und gemischt. Es wird bei Raumtemperatur nicht länger als einen Monat aufbewahrt.