

DIN EN 16858

ICS 67.050

Einsprüche bis 2015-06-17

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Lebensmitteln mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS);****Deutsche und Englische Fassung prEN 16858:2015**

Foodstuffs –

Determination of melamine and cyanuric acid in foodstuffs by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS);
German and English version prEN 16858:2015

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 et anglaise prEN 16858:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-04-17 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme 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 (Hausanschrift: 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 48 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16858:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom 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).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 16858 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

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

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.5a

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	4
5 Geräte	7
6 Durchführung	8
7 Systemeinstellungen	9
8 Berechnung und Angabe von Ergebnissen	14
9 Präzision	16
10 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	18
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	21
Literaturhinweise	23

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16858:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Dokuments ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

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, Sojamilch und Milkschokolade 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 bzw. 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

Ein Teil der zu untersuchenden Probe der homogenen Lebensmittelprobe wird mit ^{13}C -markierten internen Standards (Melamin und Cyanursäure) angereichert. Nach der Inkubation für mindestens eine Stunde wird Wasser zur Probe gegeben und nach dem Schütteln wird die Aufschlammung in einem Gemisch von Acetonitril und Wasser gelöst. Die Probe wird geschüttelt und zentrifugiert. Nach der Trennung des Extrakts von den Sedimenten wird ein Aliquot des wässrigen Extrakts in ein LC-MS/MS-System injiziert. Das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer wird entweder mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (en: high performance liquid chromatography, HPLC) oder mit einer Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (en: ultra performance liquid chromatography, UPLC) verbunden. Die Chromatographie beruht auf der hydrophilen Interaktionsflüssigkeitschromatographie (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 Referenzstandards (z. B. Standardlösungen) wird durch die Durchführung einer Blindprobe unter den gleichen Bedingungen geprüft, die im Verfahren angewendet werden. Das Chromatogramm sollte keine störende Verunreinigung bei der Retentionszeit der zu untersuchenden Verbindung aufweisen.

4.1 Ameisensäure, der Massenanteil beträgt 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 Melamin $^{13}\text{C}_3$, Massenanteil 99 %, Amino- $^{15}\text{N}_3$ (98 %), Lösung mit der Massenkonzentration $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

4.9 Cyanursäure, Massenanteil $\geq 90\%$, U- $^{13}\text{C}_3$ (99 %), U- $^{15}\text{N}_3$ (98 %), Lösung mit $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

4.10 Herstellung der Stammlösungen

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

Etwa 100 mg Melamin (4.5) werden auf 0,01 mg genau in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) eingewogen und eine Menge Wasser durch Wiegen hinzugegeben, um eine Konzentration von $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ zu erhalten. Die Lösung wird in einem Kühlschrank bei $4\ ^\circ\text{C}$ ($\pm 3\ ^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

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

Etwa 100 mg Cyanursäure (4.6) werden auf 0,01 mg genau in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) eingewogen und eine Menge Wasser durch Wiegen hinzugegeben, um eine Konzentration von $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ zu erhalten. Die Lösung wird in einem Kühlschrank bei $4\ ^\circ\text{C}$ ($\pm 3\ ^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

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

Etwa 100 mg Benzoguanamin (4.7) werden auf 0,01 mg genau in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) eingewogen und eine Menge Methanol (4.4) durch Wiegen hinzugegeben, um eine Konzentration von $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ zu erhalten. Die Lösung wird in einem Kühlschrank bei $4\ ^\circ\text{C}$ ($\pm 3\ ^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

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

1,0 ml ^{13}C -Melamin (4.8) werden in einem 50-ml-Messkolben (5.3) mit 50 ml Wasser verdünnt. Die Endkonzentration beträgt $20\ \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für mindestens 1 Jahr stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

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

1,0 ml ^{13}C -Cyanursäure (4.9) werden in einem 50-ml-Messkolben (5.3) mit 50 ml Wasser verdünnt. Die Endkonzentration beträgt $20\ \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für 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. Der Kolben wird mit Verdünnungslösung (4.16) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt. Die Konzentration beträgt $20\ \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt und in einem Kühlschrank bei $4\ ^\circ\text{C}$ ($\pm 3\ ^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für 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. Der Kolben wird mit Verdünnungslösung (4.16) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt. Die Konzentration beträgt $20 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt und in einem Kühlschrank bei 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für 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 (4.11.1) wird in einen 100-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Der Kolben wird mit Verdünnungslösung (4.16) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt. Die Konzentration beträgt $0,2 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt und in einem Kühlschrank bei 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für 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 (4.11.2) wird in einen 100-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Der Kolben wird mit Verdünnungslösung (4.16) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt. Die Konzentration beträgt $0,2 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt und in einem Kühlschrank bei 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für 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. Der Kolben wird mit Verdünnungslösung (4.16) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt. Die Konzentration beträgt $20 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 100-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt und in einem Kühlschrank bei 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für 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 verdünnte Benzoguanamin-Standardlösung (4.11.5) wird in einen 10-ml-Messkolben (5.3) pipettiert. Der Kolben wird mit Verdünnungslösung (4.16) bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt. Die Konzentration beträgt $2 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 20-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt und in einem Kühlschrank bei 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

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

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. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durchmischt. Die Konzentrationen der beiden Verbindungen betragen $2 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in einen 20-ml-Messkolben aus Braunglas (5.2) überführt und in einem Kühlschrank bei 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung für mindestens 1 Monat stabil, wenn deren Masse sorgfältig überprüft wird.

4.12 Mobile Phase A für HPLC, Substanzkonzentration c (Ammoniumacetat) = 10 mmol/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 UPLC

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

4.15 Mobile Phase B für UPLC, c (Ammoniumacetat) = 20 mmol/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 der Inhalt kräftig geschüttelt. Das trübe Gemisch wird über Nacht klar.

4.16 Verdünnungslösung

Mit Messzylindern werden 70 ml Acetonitril (4.2) und 30 ml Wasser in einen 100-ml-Messkolben (5.3) überführt und der Inhalt durchmischt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur nicht länger als einen Monat aufbewahrt.

5 Geräte

Sämtliche technischen Beschreibungen sind Beispiele möglicher System-Ansätze und -parameter und müssen maßstabsgerecht umgesetzt oder an die Ausrüstung des Anwenders angepasst werden. Übliche Laborglasgeräte und -ausrüstung und insbesondere Folgendes:

5.1 Einweg-Kulturröhrchen aus Polypropylencarbonat (PPC), Fassungsvermögen etwa 50 ml.

5.2 Messkolben aus Braunglas, mit Volumina von 20 ml und 100 ml.

5.3 Messkolben, mit Volumina von 5 ml, 10 ml, 50 ml und 100 ml.

5.4 Schüttelvorrichtung, einstellbar von 0 Hub/min bis 300 Hübe/min.

5.5 Ultraschallbad

5.6 Zentrifuge, mit dem Leistungsvermögen zum Zentrifugieren von 50-ml-Kulturröhrchen (siehe 5.1) und einer maximalen g -Kraft von mindestens 4 000 g .

5.7 Zentrifuge, mit dem Leistungsvermögen zum Zentrifugieren von Standard-Mikro-Reagenzgläsern (siehe 5.8) und einer maximalen g -Kraft von mindestens 8 000 g .

5.8 Standard-Mikro-Reagenzgläser, 1,5 ml.

5.9 Fläschchen, für LC.

5.10 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer für Flüssigkeitschromatographie bestehend aus:

5.10.1 Pumpensystem, geeignet zur Lieferung eines Gradienten mit dem geforderten Durchfluss.

5.10.2 Injektor, zur Injektion von 5 μ l geeignet.

5.11 TSKgel® Amide-80¹⁾ HILIC-Säule, Länge 100 mm, Innendurchmesser 3,0 mm und Partikelgröße 3 μ m.

5.12 UPLC BEH (bridged ethyl hybrid) HILIC-Säule, Länge 150 mm, Innendurchmesser 2,1 mm und Partikelgröße 1,7 μ m.

1) Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

6 Durchführung

6.1 Vorbereitung der Probe

Sämtliche Produkte auf Milchbasis, z. B. Vollmilch, Magermilch, Rohmilch und Schokoladenmilch, werden auf 40 °C erwärmt und sorgfältig geschüttelt.

Sofern erforderlich werden sämtliche Trockenprodukte auf Milch-, Soja- oder Weizenbasis, z. B. Milchpulver, Babynahrung und Kekse, bis zu einer Partikelgröße kleiner als 1 mm gemahlen.

Sämtliche Produkte auf Milch- oder Kakaobasis, z. B. Schokolade, Bonbons und Süßwaren (Toffee), werden kryogen gemahlen, beispielsweise mit flüssigem Stickstoff nach dem Schneiden in kleine Würfel ≤ 1 cm.

6.2 Extraktion

6.2.1 Allgemeines

Die folgenden Proben werden in jeder Reihe analysiert:

- Kalibrierkurve
- verfahrensbezogene Blindprobe ($n = 1$);
- (zertifizierte) Referenzstandards mit geeigneter Konzentration oder eine im Laboratorium selbst hergestellte Referenzprobe;
- sämtliche Proben (Höchstwert je Reihe: 20);
- Kalibrierlösung Nummer 4 (siehe Tabelle 5).

Die verfahrensbezogene Blindprobe sollte frei von Kontaminanten bei oder über der Bestimmungsgrenze (LOQ) sein. Die für die Extraktion verwendete Probenmenge ist 1 g. Abweichungen von der Probeneingabe sollte bei der in 8.4 angegebenen Gleichung (m = Probenmasse, in g) berücksichtigt werden.

Die Kalibrierkurve wird für die Identifizierung und Quantifizierung und Kalibrierlösung 4 nach der Serie für die Kontrolle der Stabilität verwendet. Die Fläche von diesem Standard sollte gleich desselben Standards in der Kalibrierkurve, mit einer maximalen Abweichung von 10 %, sein.

6.2.2 Extraktionsverfahren

1 g der Probe wird auf 0,01 g in ein Einweg-Kulturröhrchen (5.1) eingewogen. 250 μ l ^{13}C -Melaminlösung (4.10.4) und ^{13}C -Cyanursäurelösung (4.10.5) werden hinzugefügt. Für mindestens 1 h wird bei Umgebungstemperatur inkubiert. 5 ml Wasser werden zugegeben und der Inhalt für 30 s geschüttelt, um eine Aufschlammung zu erhalten. 5 ml Acetonitril (4.2) werden hinzugefügt und der Inhalt wird erneut geschüttelt. Die Aufschlammung wird mit 30 ml Acetonitril (4.2) und 10 ml heißem Wasser (96 °C bis 100 °C) gemischt. Der Inhalt wird für 5 min gründlich geschüttelt und für 10 min bei 3 400 g zentrifugiert. 1,5 ml des Extraktes werden in ein Standard-Mikro-Reagenzglas (5.8) überführt und für 10 min bei 7 800 g zentrifugiert. Aus der oberen Schicht werden 1 000 μ l in ein LC-Fläschchen (5.9) überführt und 50 μ l Benzoguanaminlösung (4.11.6) hinzugefügt.

6.3 Erstellen der Kalibrierkurve

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

Tabelle 1 — Erstellen der Kalibrierkurve

Kalibrier- lösung Nr.	Melamin- Standard- lösung I (4.11.1)	Cyanur- säure- Standard- lösung I (4.11.2)	Melamin- Standard- lösung II (4.11.3)	Cyanur- säure- Standard- lösung II (4.11.4)	Benzo- guanamin- Standard- lösung II (4.11.6)	¹³ C-Melamin- und ¹³ C-Cyanur- säure- Standardlösung (4.11.7)	Konzentra- tionsgrad	Konzen- tration nativ
	ml	ml	ml	ml	ml	ml	µg/ml	µg/ml
1	0	0	0	0	0,5	0,5	0,1	0
2	0	0	0,05	0,05	0,5	0,5	0,1	0,001
3	0	0	0,25	0,25	0,5	0,5	0,1	0,005
4	0	0	1,25	1,25	0,5	0,5	0,1	0,025
5	0	0	2,5	2,5	0,5	0,5	0,1	0,05
6	0,05	0,05	0	0	0,5	0,5	0,1	0,1
7	0,25	0,25	0	0	0,5	0,5	0,1	0,5

6.4 Bestimmung

5 µl der Kalibrierlösungen (1 bis 7, siehe Tabelle 1) und 5 µl der Probenextraktanteile werden injiziert. Die Peaks von Melamin und Cyanursäure werden auf der Grundlage der Retentionszeit, der Übergänge und des Ionenverhältnisses identifiziert. Die Menge des Melamins und der Cyanursäure wird durch Vergleich der Peakflächen der Probe mit den entsprechenden Peaks der bekannten Menge von Melamin und Cyanursäure in den Kalibrierlösungen bestimmt. Die Kalibrierung beruht auf dem Prinzip der Isotopenverdünnung.

7 Systemeinstellungen

7.1 HPLC-Parameter

Die Gradientenparameter, wie in Tabelle 2 dargestellt, haben zu erfolgreichen Ergebnissen geführt. Abhängig vom LC-MS/MS-System könnte es notwendig sein, die Parameter geringfügig anzupassen. Alternativ kann ein UPLC-System eingesetzt werden, siehe 7.3.

Tabelle 2 — Gradient-Parameter der HPLC

	Zeit min	Durchfluss ml/min	Mobile Phase A %	Mobile Phase B %
1	Initial	0,25	10	90
2	8,00	0,25	10	90
3	13,00	0,25	65	35
4	14,00	0,25	90	10
5	15,00	0,25	90	10
6	15,50	0,25	10	90
7	25,00	0,25	10	90

7.2 HPLC-MS/MS-Parameter

Während der Validierung des Verfahrens, wurde ein Massenspektrometer des folgenden Typs verwendet: Micromass Quattro Ultima auf den sich die Geräteeinstellungen beziehen. Das Massenspektrometer wird im abwechselnden Modus für positive und negative Ionen in zwei verschiedenen Fenstern betrieben. Fenster 1 ist für die positiven Ionen (Melamin, MEL) und Fenster 2 für negative Ionen (Cyanursäure, CYA). Das Fenster zur Festlegung der Retentionszeiten wird vor jeder Reihe durch die Analyse einer Kalibrierlösung von Melamin und Cyanursäure zuerst im positiven Modus und anschließend im negativen Modus für die Dauer des LC-Gradienten bestimmt.

Die Optimierung der MS-Übergangsparameter kann abhängig von den Kenngrößen des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers abweichen. Die Parameter sollten durch Infusion (Injektion) von Melamin und Cyanursäure bestimmt werden und die Konusenergie und die Kollisionsenergie für den Übergang sollten optimiert werden.

Quelle	(ES-)	(ES+)
Kapillarspannung (kV)	3,00	2,70
Konusspannung (V)	25	35
Quellentemperatur (°C)	120	120
Desolvatisierungstemperatur (°C)	350	350
Konusgasfluss (l/h)	190 bis 193	190 bis 193
Fluss des Desolvatisierungsgases (l/h)	560 bis 565	560 bis 565
Kollisionszellendruck (Pa)	± 0,26	± 0,26

Analysator

LM-Auflösung 1 (niedrig auflösende MS)	12,5	14,0
HM-Auflösung 1 (hoch auflösende MS)	12,5	14,0
Ionenenergie 1 (V)	1,0	1,0
LM-Auflösung 2	12,5	13,0
HM-Auflösung 2	12,5	13,0
Ionenenergie 2 (V)	1,0	1,0
Vervielfacher (Multiplifier) (V)	650	650

Die Parameter, wie in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt, haben zu erfolgreichen Ergebnissen geführt. Abhängig vom LC-MS/MS-System könnte es notwendig sein, die Parameter geringfügig anzupassen. Alternativ kann ein UPLC-System eingesetzt werden, siehe 7.3

Tabelle 3 — MRM-Parameter der HPLC

Analyt	Übergang	Ionisations- modus	Verweilzeit s	Konus- spannung V	Kollisions- energie eV
CYA	128 > 85	ES–	0,2	25	10
	128 > 42		0,2	25	15
CYA IS	134 > 89	ES–	0,2	25	10
	134 > 44		0,2	25	15
MEL	127 > 85	ES+	0,2	35	20
	127 > 68		0,2	35	30
MEL IS	133 > 89	ES+	0,2	35	20
	133 > 71		0,2	35	30
BENZ IS	188 > 85	ES+	0,2	35	20
	188 > 104		0,2	35	25

Zwischenkanalverzögerung (s)	0,010
Zwischenscanzeit (s)	0,100
Injektionsvolumen (µl)	5
Säulentemperatur (°C)	40
Beginn der Lösungsmittelverzögerung 1 (min)	0
Ende der Lösungsmittelverzögerung 1 (min)	3,5
Beginn der Lösungsmittelverzögerung 2 (min)	15
Ende der Lösungsmittelverzögerung 2 (min)	23
Zeit MRM ES– (min)	4 bis 8,5
Zeit MRM ES+ (min)	1,5 bis 4; 8,5 bis 16
Mobile Phase A	Wasser mit 10 mmol/l Ammoniumacetat (4.12)
Mobile Phase B	Acetonitril (4.13)
Säule	TSKgel®1) Amide-80 HILIC-Säule (5.11)

Tabelle 4 — Gradient-Parameter der HPLC

	Zeit min	Durchfluss ml/min	Mobile Phase A %	Mobile Phase B %
1	Initial	0,25	10	90
2	8,00	0,25	10	90
3	13,00	0,25	65	35
4	14,00	0,25	90	10
5	15,00	0,25	90	10
6	15,50	0,25	10	90
7	25,00	0,25	10	90

7.3 UPLC-Parameter

Die Parameter, wie in Tabelle 5 dargestellt, haben zu erfolgreichen Ergebnissen geführt. Abhängig vom UPLC-MS/MS-System könnte es notwendig sein, die Parameter geringfügig anzupassen. Alternativ kann ein HPLC-System eingesetzt werden, siehe 7.1

Tabelle 5 — Gradient-Parameter der UPLC (Splitverhältnis 1:1)

	Zeit min	Durchfluss ml/min	Mobile Phase A %	Mobile Phase B %
1	Initial	0,7	0	90
2	1,00	0,7	0	90
3	3,20	0,7	6,0	94
4	3,50	0,7	50	50
5	5,00	0,7	50	50
6	5,20	0,7	0	100
7	9,00	0,7	0	100

7.4 UPLC-MS/MS-Parameter

7.4.1 Allgemeines

Während der Validierung des Verfahrens, wurde ein Massenspektrometer des folgenden Typs verwendet: Micromass Quattro Ultima auf den sich die Geräteeinstellungen beziehen. Das Massenspektrometer wird abwechselnd für positive und negative Ionen in zwei verschiedenen Fenstern betrieben. Fenster 1 ist für die positiven Ionen (Melamin, MEL) und Fenster 2 für negative Ionen (Cyanursäure, CYA). Das Fenster zur Festlegung der Retentionszeiten wird vor jeder Reihe durch die Analyse einer Kalibrierlösung von Melamin und Cyanursäure zuerst im positiven Modus und anschließend im negativen Modus für die Zeit des Gradienten bestimmt. Die Parameter, wie in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt, haben zu erfolgreichen Ergebnissen geführt.

Quelle	(ES–)	(ES+)
Kapillarspannung (kV)	3,00	2,70
Konusspannung (V)	30	35
Quellentemperatur (°C)	120	120
Desolvatisierungstemperatur (°C)	350	350
Konusgasfluss (l/h)	190 bis 193	190 bis 193
Fluss des Desolvatisierungsgases (l/h)	560 bis 565	560 bis 565
Kollisionszellendruck	± 0,26	± 0,26

Analysator

LM-Auflösung 1	12,5	15,0
HM-Auflösung 1	12,5	15,0
Ionenenergie 1 (V)	1,0	1,0
LM-Auflösung 2	12,5	15,0
HM-Auflösung 2	12,5	15,0
Ionenenergie 2 (V)	1,0	1,0
Vervielfacher (Multiplikator) (V)	650	650

Tabelle 6 — MRM-Parameter der UPLC

Analyt	Übergang	Ionisations- modus	Verweilzeit s	Konus- spannung V	Kollisions- energie eV
CYA	128 > 85	ES–	0,05	25	10
	128 > 42		0,05	25	15
CYA IS	134 > 89	ES–	0,05	25	10
	134 > 44		0,05	25	15
MEL	127 > 85	ES+	0,05	35	20
	127 > 68		0,05	35	30
MEL IS	133 > 89	ES+	0,05	35	20
	133 > 71		0,05	35	30
BENZ IS	188 > 85	ES+	0,2	35	20
	188 > 104		0,2	35	25

Zwischenkanalverzögerung (s)	0,010
Zwischenscanzeit (s)	0,030
Injektionsvolumen (µl)	5
Säulentemperatur (°C)	40
Zeit MRM ES– (min)	0 bis 2
Zeit MRM ES+ (min)	2 bis 10
Mobile Phase A	Gemisch aus Wasser und Ameisensäure (4.14)
Mobile Phase B	Gemisch aus Acetonitril und Wasser mit Ammoniumacetat (4.15)
Säule	UPLC BEH HILIC-Säule (5.15)

7.4.2 Vorbereitung des Systems

Das Flüssigchromatographie-System wird unter den empfohlenen Betriebsbedingungen abgeglichen.

7.4.3 Abstimmung des LC-MS/MS-Systems

In Bezug auf die korrekte Massenkali­brierung wird das LC-MS/MS-System alle zwei Wochen mit einer Natriumiodidlösung geprüft (dafür werden sechs theoretische Massen der Natriumiodidlösung innerhalb des Massenbereichs von 50 bis 1 250 verwendet). Das System wird nur kalibriert, wenn eine Differenz zwischen der gemessenen und der theoretischen Masse beobachtet wird.

7.4.4 Überprüfung der Geräteeinstellungen

5 µl einer Lösung der mittleren Kalibrierebene werden injiziert und die Peakform und die Retentionszeiten für Melamin und Cyanursäure überprüft.