

DIN EN 17212

ICS 65.120

Einsprüche bis 2018-02-01

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung des Gehaltes von Melamin und Cyanursäure mittels
flüssigkeitschromatographischen Verfahrens mit
massenspektrometrischem Nachweis (LC-MS/MS);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17212:2017**

Animal Feeding stuffs –

Methods of sampling and analysis –

Determination of melamine and cyanuric acid content by liquid chromatographic method with mass spectrometric detection (LC-MS/MS);

German and English version prEN 17212:2017

Aliments des animaux –

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –

Détermination des teneurs en mélanine et en acide cyanurique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS);

Version allemande et anglaise prEN 17212:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-12-01 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, 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 74 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)



Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17212:2017) wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Organische Kontaminanten“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ (Spiegelausschuss zu CEN/TC 327) im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

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 internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 3534-2:2006	siehe	DIN ISO 3534-2:2013-12
ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2:1994	siehe	DIN ISO 5725-2:2002-12
ISO 11843-2	siehe	DIN ISO 11843-2
ISO 24276:2006	siehe	DIN EN ISO 24276:2013-10

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 24276:2013-10, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO 24276:2006 + Amd 1:2013); Deutsche Fassung EN ISO 24276:2006 + A1:2013*

DIN ISO 3534-2:2013-12, *Statistik — Begriffe und Formelzeichen — Teil 2: Angewandte Statistik (ISO 3534-2:2006); Text Deutsch und Englisch*

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

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)*

DIN ISO 11843-2, *Erkennungsfähigkeit — Teil 2: Verfahren im Fall der linearen Kalibrierung*

**Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Bestimmung
des Gehaltes von Melamin und Cyanursäure mittels
flüssigkeitschromatographischen Verfahrens mit
massenspektrometrischem Nachweis (LC-MS/MS)**

*Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination des teneurs en mélanine et en
acide cyanurique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)*

*Animal Feeding stuffs — Methods of sampling and analysis — Determination of melamine and cyanuric acid
content by liquid chromatographic method with mass spectrometric detection (LC-MS/MS)*

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	10
5 Reagenzien	11
5.1 Allgemeines	11
5.2 Chemikalien	11
5.3 Standardlösungen	12
6 Prüfeinrichtung	14
7 Vorbereitung der Probe	16
7.1 Allgemeines	16
7.2 Laborprobe	16
7.3 Untersuchungsmaterial	16
7.4 Probenmaterial	16
8 Durchführung	16
8.1 Allgemeines	16
8.2 Screening-Verfahren	17
8.3 Bestätigungsverfahren	17
8.4 Maßnahmen zu Qualitätskontrolle beim Screening-Verfahren	19
8.5 Maßnahmen zu Qualitätskontrolle beim Bestätigungsverfahren	20
9 HPLC-MS/MS-Analyse	21
9.1 Allgemeines	21
9.2 HPLC-Betriebsbedingungen	21
9.3 Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Prüflösungen der Probe	22
10 Berechnung	23
10.1 Peakidentifizierung	23
10.2 Quantitative Bestimmung (Bestätigungsverfahren)	23
11 Präzision	24
11.1 Ringversuch	24
11.2 Wiederholgrenze	24
11.3 Vergleichgrenze	24
12 Untersuchungsbericht	25
Anhang A (informativ) Beispiele für geeignete MS-Nachweisbedingungen	26
A.1 Für SCIEX API 4000 Q-Trap oder API 4000 geeignetes Beispiel	26
Anhang B (informativ) Ergebnisse des internationalen Ringversuchs	28
Anhang C (informativ) Ergebnisse der laborinternen Validierung des Verfahrens	31
Anhang D (informativ) Typische Chromatogramme	34
Literaturhinweise	36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17212:2017) 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 Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Einleitung

Das vorliegende Dokument wurde als Antwort auf den Bedarf an einem zuverlässigen Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Futtermitteln erarbeitet. Beide Substanzen wurden illegal in Futtermittel eingemischt.

WARNUNG — Die Anwendung dieser Vorschrift bringt den Einsatz gefährdender Stoffe, Arbeitsabläufe und Geräte mit sich. Diese Vorschrift beansprucht nicht, sämtliche mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Vorschrift, die angemessenen Maßnahmen in Bezug auf den Gesundheits- und Arbeitsschutz einzuleiten und vor der Anwendung die Anwendbarkeit regulatorischer Einschränkungen zu bestimmen.

1 Anwendungsbereich

Das vorliegende Dokument legt ein hochleistungsflüssigkeitschromatographisches Verfahren (HPLC) mit massenspektrometrischem Nachweis (MS) für das Screening und die quantitative Bestimmung von Melamin in dem Konzentrationsbereich zwischen < 1 mg/kg und 100 mg/kg Futtermittel fest.

Das Verfahren wurde in einem internationalen Ringversuch für Melamin in Alleinfuttermittel, Ergänzungsfuttermittel, Einzelfuttermittel, Milchaustausch-Futtermittel und Heimtierfuttermittel, einschließlich Dosenfutter für Heimtiere, im Bereich zwischen 1 mg/kg und 80 mg/kg unter besonderer Berücksichtigung des durch die Europäische Kommission festgelegten Höchstgehaltes von 2,5 mg/kg validiert.

Laborerfahrungen haben gezeigt, dass das Verfahren auch für Cyanursäure im gleichen Konzentrationsbereich in Alleinfuttermittel ($n = 7$), Ergänzungsfuttermittel ($n = 6$), Einzelfuttermittel ($n = 7$, bzw. 9), Milchaustausch-Futtermittel ($n = 7$) und Heimtierfuttermittel ($n = 7$), einschließlich Dosenfutter für Heimtiere, anwendbar ist.

Da die Empfindlichkeit der LC-MS/MS für Cyanursäure wesentlich geringer ist als für Melamin, ist sicherzustellen, dass sich das LC-MS/MS-System in ausgezeichnetem Betriebszustand befindet. Das Verfahren gilt für Futtermittel, wurde jedoch nicht für Vormischungen und Futtermittelzusatzstoffe geprüft.

Die quantitative Bestimmung von Konzentrationen über 100 mg/kg ist möglich, aber das Verfahren muss durch den Bearbeiter validiert werden.

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 6497, *Futtermittel — Probenahme (ISO 6497)*

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

EN ISO/IEC 17043:2010, *Konformitätsbewertung — Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen (ISO/IEC 17043:2010)*

ISO 3534-2:2006, *Statistics — Vocabulary and symbols — Part 2: Applied statistics*

ISO 16577:2016, *Molecular biomarker analysis — Terms and definitions*

ISO 24276:2006, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

ISO/IEC GUIDE 99:2007, *International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1 Kalibrierung
vollständiger Satz von Tätigkeiten, mit dem die Kalibrierfunktion unter den angegebenen Bedingungen geschätzt wird aus Beobachtungswerten der Messgröße, die für mehrere Bezugzustände erhalten worden sind

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.5.13]

3.2 Kalibrierfunktion
funktionale Beziehung zwischen dem erwarteten Wert der Messgröße und dem Wert der Zustandsgrößendifferenz

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.5.12]

3.3 Dosenfutter für Heimtiere
Futtermittelprodukt für Heimtiere, das in Dosen oder ähnlichen Behältnissen zur Konservierung verarbeitet, verpackt, luftdicht verschlossen und sterilisiert wurde

[QUELLE: EN ISO 6498:2012, 2.3.15]

3.4 Ringversuch
Vergleichsprüfung zwischen Laboratorien
Organisation, Durchführung und Bewertung von Messungen oder Prüfungen gleicher oder gleichartiger Prüfgegenstände durch zwei oder mehrere Laboratorien nach vorgegebenen Bedingungen

Anmerkung 1 zum Begriff: Vergleichsprüfungen zwischen Laboratorien werden für vielfältige Zwecke genutzt und kommen in zunehmendem Maße international zur Anwendung. Vergleichsprüfungen zwischen Laboratorien kommen üblicherweise für folgende Zwecke zum Einsatz: [...]

h) Bewertung der Leistungsmerkmale eines Verfahrens – häufig beschrieben als Ringversuche

[QUELLE: EN ISO/IEC 17043:2010, 3.4]

3.5 Ergänzungsfuttermittel
Mischfuttermittel, das einen hohen Gehalt an bestimmten Stoffen aufweist, aber aufgrund seiner Zusammensetzung nur mit anderen Futtermitteln zusammen für die tägliche Ration ausreicht

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009 (Artikel 3, 1j)] [1]

3.6 Alleinfuttermittel
Mischfuttermittel, das wegen seiner Zusammensetzung für eine tägliche Ration ausreicht

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009 (Artikel 3, 1i)] [1]

3.7

Mischfuttermittel

Mischung aus mindestens zwei Einzelfuttermitteln, mit Futtermittelzusatzstoffen oder ohne Futtermittelzusatzstoffe, die zur oralen Fütterung in Form eines Alleinfuttermittels oder Ergänzungsfuttermittels bestimmt sind

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009 (Artikel 3, 1h)] [1]

3.8

kontaminierte Materialien

Futtermittel, die einen höheren Gehalt an unerwünschten Stoffen enthalten als gemäß der Richtlinie 2002/32/EG zulässig ist

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009 (Artikel 3, 1p)] [1]

3.9

Nachweisgrenze

Grenze der Nachweisbarkeit

gemessener Größenwert, der mittels eines vorgegebenen Messverfahrens erhalten wird, für den die Wahrscheinlichkeit, fälschlich das Fehlen einer Komponente in einem Material anzugeben, β ist, bei einer Wahrscheinlichkeit von α , ihre Anwesenheit fälschlicherweise anzugeben

Anmerkung 1 zum Begriff: Die IUPAC empfiehlt Standardwerte für α und β von 0,05.

Anmerkung 2 zum Begriff: Manchmal wird auch die englische Abkürzung LOD benutzt.

Anmerkung 3 zum Begriff: Von der Benennung „Empfindlichkeit“ für „Nachweisgrenze“ wird abgeraten.

[QUELLE: ISO/IEC Guide 99:2007, 4.18]

3.10

Einzelfuttermittel

Erzeugnisse pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, die vorrangig zur Deckung des Ernährungsbedarfs von Tieren dienen, im natürlichen Zustand, frisch oder haltbar gemacht, und Erzeugnisse ihrer industriellen Verarbeitung sowie organische oder anorganische Stoffe, mit Futtermittelzusatzstoffen oder ohne Futtermittelzusatzstoffe, die zur Tierernährung durch orale Fütterung bestimmt sind, sei es unmittelbar als solche oder in verarbeiteter Form, für die Herstellung von Mischfuttermitteln oder als Trägerstoff für Vormischungen

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009 (Artikel 3, 1g)] [1]

3.11

HorRat

Verhältnis der relativen Vergleichstandardabweichung zu der nach der Horwitz-Gleichung berechneten Standardabweichung

Anmerkung 1 zum Begriff: Vorhergesagte relative Standardabweichung $PRSD_R = 2C - 0,15$.

$$\text{HorRat}_R = RSD_R / PRSD_R \quad (1)$$

$$\text{HorRat}_r = RSD_r / PRSD_R \quad (2)$$

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei Anwendung auf Untersuchungen innerhalb eines Laboratoriums beträgt der übliche Bereich von $\text{HorRat}(r)$ 0,30 bis 1,30.

Anmerkung 3 zum Begriff: Um die ordnungsgemäße Berechnung von $PRSD_R$ zu überprüfen, sollte eine C von 10^{-6} eine $PRSD_R$ von 16 % ergeben. C ist die Konzentration, angegeben als Massenanteil (sowohl Zähler als auch Nenner werden in den gleichen Einheiten angegeben). Der HorRat-Wert lässt bei einer überwiegenden Mehrheit von Verfahren in der Chemie auf die Verfahrensleistung schließen. Übliche Werte liegen zwischen 0,50 und 2,00.

[QUELLE: ISO 16577:2016, 3.75]

3.12

Milchaustausch-Futtermittel

Mischfuttermittel, das in trockener Form oder nach Auflösung in einer bestimmten Flüssigkeitsmenge jungen Tieren in Ergänzung oder als Ersatz der postkolostralen Muttermilch verabreicht oder an zur Schlachtung bestimmte junge Tiere wie Kälber, Lämmer oder Kitze verfüttert wird

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009 (Artikel 3, 1l)] [1]

3.13

Präzision

Ausmaß der Übereinstimmung von Anzeigen oder gemessenen Größenwerten, die durch wiederholte Messungen an denselben oder ähnlichen Objekten unter festgelegten Bedingungen erhalten wurden

Anmerkung 1 zum Begriff: Messpräzision wird üblicherweise numerisch durch Maße der Ungenauigkeit angegeben, wie Standardabweichung, Varianz oder Variationskoeffizient, unter den festgelegten Messbedingungen.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die „festgelegten Messbedingungen“ können z. B. Wiederholbedingungen, Zwischenbedingungen der Präzision oder Vergleichbedingungen der Messung (siehe ISO 5725-1) [2] sein.

Anmerkung 3 zum Begriff: Messpräzision wird gebraucht, um die Wiederholpräzision, die Präzision unter Zwischenbedingungen und die Vergleichpräzision einer Messung zu definieren.

Anmerkung 4 zum Begriff: Manchmal wird „Messpräzision“ auch fälschlicherweise für „Messgenauigkeit“ benutzt.

[QUELLE: ISO/IEC Guide 99:2007, 2.15]

3.14

Wiederholpräzision

Präzision unter Wiederholbedingungen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Wiederholpräzision kann zahlenmäßig ausgedrückt werden durch Merkmale für die Streuung der Ergebnisse.

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.3.5]

3.15

Wiederholbedingungen

Beobachtungsbedingungen, bei denen voneinander unabhängige Ergebnisse nach demselben Verfahren an identischen Untersuchungseinheiten in demselben Laboratorium von demselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung innerhalb einer kurzen Zeitspanne ermittelt werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Wiederholbedingungen umfassen:

- denselben Bearbeiter;
- dieselbe Geräteausrüstung, die unter denselben Bedingungen benutzt wird;
- denselben Ort;
- die Wiederholung innerhalb einer kurzen Zeitspanne.

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.3.6]

3.16

Wiederholgrenze

r

kritischer Wiederholdifferenzbetrag für eine festgelegte Wahrscheinlichkeit von 95 %

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.3.9]

3.17

Wiederholstandardabweichung

Standardabweichung von Ermittlungsergebnissen oder Messergebnissen, die unter Wiederholbedingungen ermittelt werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Wiederholstandardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Verteilung der Ermittlungs- oder der Messergebnisse unter Wiederholbedingungen.

Anmerkung 2 zum Begriff: In gleicher Weise können „Wiederholvarianz“ und „Wiederholvariationskoeffizient“ definiert werden; diese können als Maße für die Streuung der Ermittlungs- oder der Messergebnisse unter Wiederholbedingungen benutzt werden.

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.3.7]

3.18

Vergleichpräzision

Präzision unter Vergleichbedingungen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Vergleichpräzision kann zahlenmäßig ausgedrückt werden durch die Merkmale für die Dispersion der Ergebnisse.

Anmerkung 2 zum Begriff: Unter Ergebnissen werden üblicherweise korrigierte Ergebnisse verstanden.

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.3.10]

3.19

Vergleichbedingungen

Beobachtungsbedingungen, bei denen voneinander unabhängige Ergebnisse erhalten werden, die mit demselben Verfahren an identischen Untersuchungseinheiten in verschiedenen Laboratorien von verschiedenen Bearbeitern mit verschiedener Geräteausrüstung gewonnen wurden

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.3.11]

3.20

Vergleichsgrenze

R

kritischer Vergleichdifferenzbetrag für eine festgelegte Wahrscheinlichkeit von 95 %

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.3.14]

3.21

Vergleichstandardabweichung

Standardabweichung von Ermittlungsergebnissen oder Messergebnissen, die unter Vergleichbedingungen erhalten wurden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Vergleichstandardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Verteilung der Ermittlungs- oder der Messergebnisse unter Vergleichbedingungen.

Anmerkung 2 zum Begriff: In gleicher Weise können „Vergleichvarianz“ und „Vergleichvariationskoeffizient“ definiert werden; diese können als Maße für die Streuung der Ermittlungs- oder der Messergebnisse unter Wiederholbedingungen benutzt werden.

[QUELLE: ISO 3534-2:2006, 3.3.12]

3.22

Screening-Verfahren

Verfahren zum schnellen und zuverlässigen Aussondern („screen“) einer großen Anzahl negativer (oder positiver) Untersuchungsproben und Beschränken der Anzahl an Untersuchungsproben, die die Anwendung eines exakten Verfahrens erfordern

[QUELLE: ISO 24276:2006, 3.1.24]

4 Kurzbeschreibung

Um das Vorliegen von Melamin und Cyanursäure in einem Screening-Verfahren zu überprüfen, werden die Proben mit einem Gemisch aus Trichloressigsäure, Acetonitril und Wasser extrahiert.

Der Extrakt wird weiter mit Acetonitril verdünnt, zentrifugiert und in das LC-MS/MS-System injiziert. Bei Proben, die im Screening-Verfahren positiv geprüft wurden, muss ein Bestätigungsverfahren durchgeführt werden.

Beim Bestätigungsverfahren wird ein interner Standard hinzugefügt. Die Extraktion wird dreimal durchgeführt. Das erste Mal erfolgt sie mit einem Gemisch aus Trichloressigsäure, Acetonitril und Wasser. Das zweite Mal erfolgt sie zweifach mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser.

Nach dem Verdünnen und Zentrifugieren wird der Überstand in das LC-MS/MS-System injiziert.

Die quantitative Bestimmung von Melamin und/oder Cyanursäure erfolgt mittels Standardaddition.

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

Sofern nicht anders festgelegt, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit oder besser zu verwenden.

WARNUNG — Die Inhalation von und das Aussetzen gegenüber toxischen Materialien und Lösungen davon ist zu vermeiden. Bei der Handhabung von Lösemitteln und Lösungen ist in einem Abzugschrank zu arbeiten. Sicherheitsbrille und Schutzkleidung sind zu tragen und Hautkontakt ist zu vermeiden.

5.2 Chemikalien

5.2.1 Diethylamin (DEA).

5.2.2 Trichloressigsäure (TCA).

5.2.3 Wasser, Reinheitsgrad für HPLC oder vergleichbare Qualität (z. B. mit Milli-Q gereinigtes Wasser).

5.2.4 Acetonitril, hochrein für LCMS.

5.2.5 Methanol, hochrein für LCMS.

5.2.6 Extraktionslösemittel A: 80 g TCA (5.2.2) werden eingewogen und 600 ml Extraktionslösemittel B (Lösemittel B, 5.2.7) werden hinzugefügt.

5.2.7 Extraktionslösemittel B: Acetonitril (5.2.4) und Wasser (5.2.3) werden in einem Verhältnis von 10 + 30 (V/V) gemischt.

5.2.8 LC-MS/MS.

5.2.8.1 Ammoniumacetat.

5.2.8.1.1 Ammoniumacetat-Lösung, $c = 10 \text{ mmol/l}$.

0,77 g Ammoniumacetat (5.2.8.1) werden auf 0,01 g in einen 1 000-ml-Messkolben (6.11) eingewogen und in Wasser (5.2.3) gelöst. Mit Wasser (5.2.3) wird auf 1 000 ml aufgefüllt. Wöchentlich wird eine neue Lösung hergestellt.

5.2.9 Mobile Phase für HPLC.

5.2.9.1 Mobile Phase A.

Acetonitril (5.2.4) und Ammoniumacetat-Lösung (5.2.8.1.1) werden in einem Verhältnis von 95 + 5 (V/V) gemischt.

5.2.9.2 Mobile Phase B.

Ammoniumacetat-Lösung (5.2.8.1.1) und Acetonitril (5.2.4) werden in einem Verhältnis von 95 + 5 (V/V) gemischt.

5.2.10 Referenzsubstanzen

Angaben zu Reinheit von jeder Charge des Referenzstandards sind notwendig.

ANMERKUNG Die Standardsubstanzen oder Standardlösungen können von Sigma-Aldrich, Restek oder Witega bezogen werden. Das sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch CEN. Andere Produkte können verwendet werden, wenn die Ergebnisse vergleichbar sind.

5.2.10.1 Melamin (2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin, sym-Triaminotriazin).

5.2.10.1.1 Melamin-Standardsubstanz mit einer Reinheit von mindestens 99 %.

5.2.10.1.2 Alternativ Melamin-Standardlösung, $c = 1$ mg/ml oder $c = 0,1$ mg/ml.

5.2.10.2 Cyanursäure (1,3,5-Triazin-2,4,6-triol, 2,4,6-Trihydroxy-1,3,5-triazin).

5.2.10.2.1 Cyanursäure-Standardsubstanz mit einer Reinheit von mindestens 98 %.

5.2.10.2.2 Alternativ Cyanursäure-Standardlösung, $c = 1$ mg/ml oder $c = 0,1$ mg/ml.

5.2.10.3 $^{13}\text{C}_3$ -Melamin.

5.2.10.3.1 $^{13}\text{C}_3$ -Melamin-Standardsubstanz mit einer Reinheit von mindestens 95 %.

5.2.10.3.2 Alternativ, $^{13}\text{C}_3$ -Melamin-Standardlösung $c = 0,1$ mg/ml.

5.2.10.4 $^{13}\text{C}_3$ -Cyanursäure.

5.2.10.4.1 $^{13}\text{C}_3$ -Cyanursäure-Standardsubstanz mit einer Reinheit von mindestens 97 %.

5.2.10.4.2 Alternativ, $^{13}\text{C}_3$ -Cyanursäure-Standardlösung $c = 0,1$ mg/ml.

5.3 Standardlösungen

ANMERKUNG Die Herstellung von gemischten Lösungen von Melamin und Cyanursäure ist nicht ratsam.

5.3.1 Melamin-Stammlösung 1, $c = 1$ mg/ml.

10 mg Melamin-Referenzstandard (5.2.10.1.1) werden auf 0,1 mg in einen 10-ml-Messkolben (6.11) eingewogen. Die wahre Masse ist aufzuzeichnen. Der Standard wird in 2,5 ml DEA (5.2.1) und etwa 5 ml Wasser (5.2.3) gelöst, für 15 min bis 30 min in einem Ultraschallbad (6.8) angeordnet und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Stammlösung wird bei -20 °C aufbewahrt und ist nach sechs Monaten frisch herzustellen.

Alternativ: Verwendung von handelsüblichen Standardlösungen (5.2.10.1.2).

5.3.2 Melamin-Stammlösung 2, $c = 0,1$ mg/ml.

Alternativ zu 5.3.2 werden 10 mg Melamin-Referenzstandard (5.2.10.1.1) auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben (6.11) eingewogen. Die wahre Masse ist aufzuzeichnen. Der Standard wird in Wasser (5.2.3) gelöst, für 15 min bis 30 min in einem Ultraschallbad (6.8) angeordnet und mit Wasser (5.2.3) auf 100 ml verdünnt. Die Stammlösung wird bei $+4$ °C aufbewahrt und ist nach sechs Monaten frisch herzustellen.

Alternativ: Verwendung von handelsüblichen Standardlösungen (5.2.10.1.2).

5.3.3 Melamin-Arbeitslösung 1, $c = 0,01$ mg/ml.

1 ml der Melamin-Stammlösung 2 (5.3.2) oder alternativ 100 µl der Melamin-Stammlösung 1 (5.3.1) werden mit einer geeigneten Pipette (6.5) in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei +4 °C aufbewahrt und ist nach drei Monaten frisch herzustellen.

5.3.4 Melamin-Arbeitslösung 2, $c = 0,001$ mg/ml.

1 ml der Melamin-Arbeitslösung 1 (5.3.1) wird mit einer geeigneten Pipette (6.5) in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei +4 °C aufbewahrt und ist nach drei Monaten frisch herzustellen.

5.3.5 Melamin-Arbeitslösung 3, $c = 0,01$ µg/ml.

1 ml der Melamin-Arbeitslösung 2 (5.3.2) wird mit einer geeigneten Pipette (6.5) in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei +4 °C aufbewahrt und ist nach drei Monaten frisch herzustellen.

5.3.6 Cyanursäure-Stammlösung 1, $c = 1$ mg/ml.

10 mg Cyanursäure-Referenzstandard (5.2.10.2.1) werden auf 0,1 mg in einen 10-ml-Messkolben (6.11) eingewogen. Die wahre Masse ist aufzuzeichnen. Der Standard wird in 1 ml DEA (5.2.1) und etwa 5 ml Wasser (5.2.3) gelöst, für 15 min bis 30 min in einem Ultraschallbad (6.8) angeordnet und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt und ist nach sechs Monaten frisch herzustellen.

Alternativ: Verwendung von handelsüblichen Standardlösungen (5.2.10.2.2).

5.3.7 Cyanursäure-Stammlösung 2, $c = 0,1$ mg/ml.

Alternativ zu 5.3.6 werden 10 mg Cyanursäure-Referenzstandard (5.2.10.2.1) auf 0,1 mg in einen 100-ml Messkolben (6.11) eingewogen. Die wahre Masse ist aufzuzeichnen. Der Standard wird in Wasser (5.2.3) gelöst, für 15 min bis 30 min in einem Ultraschallbad (6.8) angeordnet und mit Wasser (5.2.3) auf 100 ml verdünnt. Die Stammlösung wird bei +4 °C aufbewahrt und ist nach sechs Monaten frisch herzustellen.

Alternativ: Verwendung von handelsüblichen Standardlösungen (5.2.10.2.2).

5.3.8 Cyanursäure-Arbeitslösung 1, $c = 0,01$ mg/ml.

1 ml der Cyanursäure-Stammlösung 2 (5.3.7) oder alternativ 100 µl der Cyanursäure-Stammlösung 1 (5.3.6) werden mit einer geeigneten Pipette (6.5) in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei +4 °C aufbewahrt und ist nach drei Monaten frisch herzustellen.

5.3.9 Cyanursäure-Arbeitslösung 2, $c = 0,001$ mg/ml.

1 ml der Cyanursäure-Arbeitslösung 1 (5.3.6) wird mit einer geeigneten Pipette (6.5) in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei +4 °C aufbewahrt und ist nach drei Monaten frisch herzustellen.

5.3.10 Cyanursäure-Arbeitslösung 3, $c = 0,1$ µg/ml.

1 ml der Cyanursäure-Arbeitslösung 2 (5.3.9) wird mit einer geeigneten Pipette (6.5) in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei +4 °C aufbewahrt und ist nach drei Monaten frisch herzustellen.

5.3.11 $^{13}\text{C}_3$ -Melamin-Stammlösung, $c = 0,1 \text{ mg/ml}$.

10 mg $^{13}\text{C}_3$ -Melamin-Referenzstandard (5.2.10.3.1) werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben (6.11) eingewogen. Die wahre Masse ist aufzuzeichnen. Der Standard wird in Wasser (5.2.3) gelöst, für 15 min bis 30 min in einem Ultraschallbad (6.8) angeordnet und mit Wasser (5.2.3) auf 100 ml verdünnt. Die Stammlösung wird bei +4 °C aufbewahrt.

Alternativ: Verwendung von handelsüblichen Standardlösungen (5.2.10.3.2).

5.3.12 $^{13}\text{C}_3$ -Melamin-Arbeitslösung, $c = 0,01 \text{ mg/ml}$.

1 ml der $^{13}\text{C}_3$ -Melamin-Stammlösung (5.3.12) wird mit einer geeigneten Pipette (6.5) in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei +4 °C aufbewahrt.

5.3.13 $^{13}\text{C}_3$ -Cyanursäure-Stammlösung, $c = 0,1 \text{ mg/ml}$.

10 mg $^{13}\text{C}_3$ -Cyanursäure-Referenzstandard (5.2.10.4.1) werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben (6.11) eingewogen. Die wahre Masse ist aufzuzeichnen. Der Standard wird in Wasser (5.2.3) gelöst, für 15 min bis 30 min in einem Ultraschallbad (6.8) angeordnet und mit Wasser (5.2.3) auf 100 ml verdünnt. Die Stammlösung wird bei +4 °C aufbewahrt.

Alternativ: Verwendung von handelsüblichen Standardlösungen (5.2.10.4.2).

5.3.14 $^{13}\text{C}_3$ -Cyanursäure-Arbeitslösung, $c = 0,01 \text{ mg/ml}$.

1 ml der $^{13}\text{C}_3$ -Cyanursäure-Stammlösung (5.3.14) wird mit einer geeigneten Pipette (6.5) in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert und mit Wasser (5.2.3) auf 10 ml verdünnt. Die Lösung wird bei +4 °C aufbewahrt.

6 Prüfeinrichtung

6.1 Allgemeines

Übliche Laborglasgeräte und -ausstattung und insbesondere Folgendes:

6.2 HPLC-System, fähig zur Gradientenelution, bestehend aus:

6.2.1 Pumpe.

6.2.2 Unterdruck-Entgasungsgerät.

6.2.3 LC-Injektionssystem.

6.2.4 Thermostatisches Säulenfach.

6.2.5 Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrosprayionisierung und MRM-Modus.

6.2.6 Computersystem für Datenerfassung und -auswertung.

6.2.7 Säule, HILIC, 150 mm (Länge) × 2,1 mm (Durchmesser), 5 µm Partikelgröße, 200 Å.

Das S/N -Verhältnis für den Standard mit 2 pg/µl muss mindestens 150 für Melamin und 30 für Cyanursäure betragen.

6.2.8 Vorsäule, HILIC Guard PEEK, 20 mm (Länge) × 2,1 mm (Durchmesser), metallfreie Vorsäule (empfohlen).

6.3 durchsichtige 2-ml-HPLC-Glasfläschchen.

6.4 11-mm-Bördelkappen mit PTFE-/Silicon-Dichtungen.

6.5 Automatische Pipetten oder Glaspipetten (Klasse A).

6.6 Kühlzentrifuge, Tischgerät.

6.7 Vortex-Mischer.

6.8 Ultraschallbad.

6.9 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubkappen, Fassungsvermögen 50 ml und 15 ml.

6.10 Schüttelvorrichtung für Probenhomogenisierung und -extraktion, Geschwindigkeit stufenlos regelbar.

6.11 Messkolben, 10 ml, 50 ml, 100 ml, 1 000 ml.

6.12 Trichter.

6.13 Dispenser.

6.14 Messzylinder, verschiedene Volumina.

6.15 Mikrozentrifuge für mindestens 20 000 × g.

6.16 20 ml Gewindeglasfläschchen zur Aufbewahrung mit Schraubverschluss mit festem Oberteil und Septum.

Um eine Migration zu vermeiden, sollte das Material der Verschlüsse kein oder nur geringe Mengen von Melamin enthalten.

6.17 2-ml-Mikro-Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Verschluss.

6.18 Zentrifugenfilter aus Nylon, 0,2 µm.

6.19 Analysenwaage, mit einer Fehlergrenze von nahezu 0,1 mg.

6.20 Mühle mit Rotor aus nichtrostendem Stahl zum Zerkleinern auf mindestens 1 mm.

6.21 Zerkleinerungsgerät für Futtermittel mit einem hohen Feuchtegehalt (z. B. Heimtierfuttermittel).

7 Vorbereitung der Probe

7.1 Allgemeines

Der Umfang der Probe muss ausreichend sein und Verpackung, Transport und Lagerung müssen die Unversehrtheit der Probe bewahren.

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des vorliegenden Dokuments. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 angeführt.

Die Probe wird nach EN ISO 6498 hergestellt.

7.2 Laborprobe

Die Laborprobe (üblicherweise 50 g) wird in der Mühle (6.20) auf eine Partikelgröße von mindestens 1 mm zerkleinert, um repräsentative Daten sicherzustellen. Die Probe wird gründlich gemischt.

Bei Proben mit einem Feuchtegehalt $> 75 \%$ wird die Probe in einem Zerkleinerungsgerät (6.21) zerkleinert.

7.3 Untersuchungsmaterial

Die Laborprobe (7.2) wird vor der Weiterverarbeitung für mindestens 10 min in einer Schüttelvorrichtung (6.10) bei geringer Geschwindigkeit homogenisiert. Laborproben mit einem Feuchtegehalt $> 75 \%$ wurden mit einem Spatel gemischt.

7.4 Probenmaterial

Bei Probenmaterial mit einem Feuchtegehalt $< 20 \%$ werden 2,0 g des Untersuchungsmaterials (7.3) auf 0,1 g in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.9) eingewogen. Die Masse der Probe, in g, wird aufgezeichnet.

Bei Probenmaterial mit einem Feuchtegehalt $> 75 \%$ werden 10,0 g des Untersuchungsmaterials (7.3) auf 0,1 g in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.9) eingewogen. Die Masse der Probe, in g, wird aufgezeichnet.

Die Probe wird weiter nach dem beschriebenen Verfahren gereinigt.

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

In einem Screening-Verfahren wird das Vorliegen von Melamin und Cyanursäure untersucht. Nach einer positiven Prüfung auf die Analyten im Screening-Verfahren ist das Bestätigungsverfahren durchzuführen. Aufgrund der Vielfalt von Futtermittelproben wurden verschiedene Matrixeffekte (Verstärkung/Unterdrückung) beobachtet. Diese Effekte werden nicht immer durch isotoopenmarkierte Standards kompensiert. Deshalb erfolgt die quantitative Bestimmung bei positiv geprüften Proben mittels einer Drei-Punkt-Standardaddition.

Es ist möglich, Ammelin und Ammelid mit diesem Verfahren zu identifizieren. Eine quantitative Bestimmung ist als problematisch anzusehen, weil die Standardsubstanzen dieser Analyten häufig mit Melamin und/oder Cyanursäure verunreinigt sind.

8.2 Screening-Verfahren

Beim Screening-Verfahren wird kein interner Standard hinzugefügt.

8.2.1 Probenextraktion

15 ml Extraktionslösemittel A (5.2.6) werden mit einem Dispenser (6.13) zu der Probe (7.4) hinzugefügt und alles wird für 15 s auf einem Vortex-Mischer (6.7) gemischt. Die Probe wird für 15 min in einem Ultraschallbad (6.8) angeordnet. Anschließend wird die Mischung bei etwa $4\,000 \times g$ und $15\,^{\circ}\text{C}$ für 10 min in der Zentrifuge (6.6) zentrifugiert. Der Überstand wird in einen 50-ml-Messkolben (6.11) dekantiert und dieser wird mit Extraktionslösemittel B (5.2.7) bis zur Marke aufgefüllt.

8.2.2 Probenverdünnung.

Zuerst werden 900 μl Acetonitril (5.2.4) in die 2-ml-Mikro-Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (6.17) pipettiert, 100 μl Probenextrakt (8.2.1) werden hinzugefügt, alles wird für 15 s auf einem Vortex-Mischer (6.7) geschüttelt und bei $20\,000 \times g$ für 10 min bei $+4\,^{\circ}\text{C}$ in der Mikrozentrifuge (6.15) zentrifugiert. Alternativ oder zusätzlich dürfen 0,2- μm -Zentrifugenfilter aus Nylon (6.18) verwendet werden.

8.2.3 Injektionslösungen für LC-MS/MS.

Der Überstand wird vorsichtig ohne den möglicherweise auftretenden Niederschlag (8.2.2) in das HPLC-Glasfläschchen (6.3) dekantiert und diese Lösung wird in das LC-MS/MS-System (6.2) injiziert.

8.3 Bestätigungsverfahren

8.3.1 Zugabe eines internen Standards

Bei dem Bestätigungsverfahren für Proben mit einer erwarteten Konzentration von weniger als 10 mg/kg werden 0,15 ml der Lösung des internen Standards Melamin (5.3.11) und 0,15 ml der Lösung des internen Standards Cyanursäure (5.3.13) zu den Proben (7.4) hinzugefügt.

Für Proben mit einer erwarteten Konzentration zwischen 10 mg/kg und 100 mg/kg werden 1,5 ml der Lösung des internen Standards Melamin (5.3.11) und 1,5 ml der Lösung des internen Standards Cyanursäure (5.3.13) zu den Proben (7.4) hinzugefügt.

ANMERKUNG Wenn ein Analyt $> 10\text{ mg/kg}$ und der andere $< 10\text{ mg/kg}$ aufweist, unterscheiden sich die Volumina der hinzugefügten Standards voneinander.

8.3.2 Probenextraktion

15 ml Extraktionslösemittel A (5.2.6) werden mit einem Dispenser (6.13) zu der Probe (8.3.1) hinzugefügt und alles wird für 15 s auf einem Vortex-Mischer (6.7) gemischt. Die Probe wird für 15 min in einem Ultraschallbad (6.8) angeordnet. Anschließend wird die Mischung bei etwa $4\,000 \times g$ und $15\,^{\circ}\text{C}$ für 10 min in der Zentrifuge (6.6) zentrifugiert. Der Überstand wird in einen 50-ml-Messkolben (6.11) dekantiert.

Zusätzlich werden für eine zweite Extraktion mit einem Dispenser (6.13) 15 ml Extraktionslösemittel B (5.2.7) zu dem verbliebenen Rückstand hinzugefügt, alles wird kräftig auf einem Vortex-Mischer (6.7) geschüttelt, bis der Rückstand aufgeschüttelt ist, und die Probe wird für 15 min in einen Überkopfschüttler (6.10) gegeben. Anschließend wird die Mischung bei etwa $4\,000 \times g$ und $15\,^{\circ}\text{C}$ für 10 min in der Zentrifuge (6.6) zentrifugiert. Der zweite Überstand wird mit dem ersten Extrakt in dem 50-ml-Messkolben (6.11) vereinigt und die zweite Extraktion wird mit 10 ml Extraktionslösemittel B (5.2.7) wiederholt.

Abschließend werden die vereinigten Überstände im 50-ml-Messkolben (6.11) bis zur Marke mit Extraktionslösemittel B (5.2.7) verdünnt.

Die Extraktion einiger Futtermittel führt zu kleinen Partikeln und Fett auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Diese kleinen Partikel müssen sich nach dem Auffüllen oberhalb der Marke des Messkolbens befinden.

8.3.3 Probenverdünnung und Standardaddition

Beim Bestätigungsverfahren wird in diesem Schritt die Standardaddition durchgeführt. Bei Proben mit erwarteten Konzentrationen von weniger als 10 mg/kg wird jeweils 1,0 ml Extrakt (8.3.2) in vier 15-ml-Polypropylen-Röhrchen (6.9) pipettiert. Zu den Extrakten werden 9 ml Acetonitril (5.2.4) pipettiert.

Bei Proben mit erwarteten Konzentrationen zwischen 10 mg/kg und 100 mg/kg wird jeweils 0,1 ml Extrakt (8.3.2) in vier 15-ml-Polypropylen-Röhrchen (6.9) pipettiert. Zu den Extrakten werden 9,9 ml Acetonitril (5.2.4) pipettiert.

In drei Röhrchen werden Standardlösungen unterschiedlicher Konzentrationen hinzugefügt. Die empfohlenen hinzugefügten Konzentrationsstufen sollten im Bereich von 20 %, 60 % und 100 % der erwarteten Konzentration in gleichmäßigen Schritten liegen. In ein Röhrchen wird kein Standard hinzugefügt. Ein Beispiel ist in Tabelle 1 angeführt. Das hinzugefügte Volumen der Standardlösung sollte 100 µl für jeden Analyten (zusammen 200 µl) nicht überschreiten.

ANMERKUNG 1 Proben im Konzentrationsbereich zwischen 10 mg/kg und 100 mg/kg werden in diesem Schritt zehnmal stärker verdünnt (0,1 ml Probenextrakt in 10 ml) als Proben mit Konzentrationen < 10 mg/kg (1,0 ml Probenextrakt in 10 ml). Deshalb sind die Mengen der hinzugefügten Standardlösungen gleich denen beim Bereich zwischen 1 mg/kg und 10 mg/kg.

ANMERKUNG 2 Wenn ein Analyt > 10 mg/kg und der andere < 10 mg/kg aufweist, wird die Standardaddition für jeden Analyten getrennt in zwei eigenständigen Abfolgen durchgeführt.

ANMERKUNG 3 Es kann ein weißer Niederschlag auftreten (möglicherweise TCA). Vor der Durchführung von 8.3.4 ist zu warten, bis sich der Niederschlag abgesetzt hat.

8.3.4 Injektionslösung für LC-MS/MS

0,25 ml Probenextrakt (8.3.3) werden in die 2-ml-Mikro-Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (6.17) pipettiert, 0,75 ml Acetonitril (5.2.4) werden hinzugefügt, alles wird für 15 s auf einem Vortex-Mischer (6.7) geschüttelt und bei $20\,000 \times g$ für 10 min in der Mikrozentrifuge (6.15) zentrifugiert. Alternativ oder zusätzlich dürfen 0,2-µm-Zentrifugenfilter aus Nylon (6.18) verwendet werden.

Der Überstand wird in das HPLC-Glasfläschchen (6.3) dekantiert und diese Lösung wird in das LC-MS/MS-System (6.2) injiziert.

Tabelle 1 — Beispiel einer Standardaddition für eine Probe mit einem Feuchtegehalt < 20 % (Masse der Probe 2 g) und mit einer geschätzten Konzentration von 1 mg/kg bzw. 10 mg/kg. Pipettierschema für Melamin und Cyanursäure (Zugabe in einen 10-ml-Messkolben)

Kalibrierkurve	Erwartete Konzentration (1 mg/kg) + hinzugefügte Konzentration [mg/kg]	Erwartete Konzentration (10 mg/kg) + hinzugefügte Konzentration [mg/kg]	Hinzugefügte Konzentration in der Probenlösung (8.3.3) [pg µl]	Volumen der Arbeitslösung [Nummer der Arbeitslösung] [µl]
MC - 0	1 + 0,0	10 + 0	0,0	+ 0
MC - 1	1 + 0,2	10 + 2	0,2	+80 MEL [3 (5.3.5)] +80 CYA [3 (5.3.10)]
MC - 2	1 + 0,6	10 + 6	0,6	+24 MEL [2 (5.3.4)] +24 CYA [2 (5.3.9)]
MC - 3	1 + 1,0	10 + 10	1,0	+40 MEL [2 (5.3.4)] + 0 CYA [2 (5.3.9)]

Tabelle 2 — Beispiel einer Standardaddition für eine Probe mit einem Feuchtegehalt > 75 % (Masse der Probe 10 g) und mit einer geschätzten Konzentration von 1 mg/kg und 10 mg/kg. Pipettierschema für Melamin und Cyanursäure (Zugabe in einen 10-ml-Messkolben)

Kalibrierkurve	Erwartete Konzentration (1 mg/kg) + hinzugefügte Konzentration [mg/kg]	Erwartete Konzentration (10 mg/kg) + hinzugefügte Konzentration [mg/kg]	Hinzugefügte Konzentration in der Probenlösung (8.3.3) [pg µl]	Volumen der Arbeitslösung [Nummer der Arbeitslösung] [µl]
MC - 0	1 + 0,0	10 + 0	0,0	+ 0
MC - 1	1 + 0,2	10 + 2	1,0	+ 40 MEL [2 (5.3.4)] + 40 CYA [2 (5.3.9)]
MC - 2	1 + 0,6	10 + 6	3,0	+ 12 MEL [1 (5.3.3)] + 12 CYA [1 (5.3.8)]
MC - 3	1 + 1,0	10 + 10	5,0	+ 20 MEL [1 (5.3.3)] + 20 CYA [1 (5.3.8)]

8.4 Maßnahmen zu Qualitätskontrolle beim Screening-Verfahren

8.4.1 Leerextrakt

Es ist sicherzustellen, dass das Material frei von Melamin und Cyanursäure ist.

Anschließend werden 50 ml Leerwertmaterial-Extrakt wie in 8.2 beschrieben hergestellt.

8.4.2 Kontrollstandards

8.4.2.1 Allgemeines

Im Screening-Verfahren werden die Qualitätskontrollmaßnahmen genutzt, um die Konzentrationsniveaus von potentiell positiven Ergebnissen zu schätzen. Deshalb werden Standards bei einem Konzentrationsniveau von 20 pg/µl und 2,0 pg/µl hergestellt. Das entspricht Konzentrationen von 0,5 mg/kg bzw. 5 mg/kg in den Proben. Aufgrund der Matrixunterdrückung wurde diese niedrigere Konzentration des Standards gewählt, um eine Unterschätzung der Konzentration in der Probe zu vermeiden.

8.4.2.2 Herstellung eines Kontrollstandards ($c = 20 \text{ pg}/\mu\text{l}$)

Die Konzentration in der Standardlösung entspricht einer Konzentration von 5 mg/kg in den Proben.

20 µl Melamin-Arbeitslösung 1 (5.3.3) und 20 µl Cyanursäure-Arbeitslösung 1 (5.3.8) werden in einen 10-ml-Messkolben (6.11) pipettiert. Zusätzlich werden 10 µl der Lösungen der internen Standards (5.3.12 und 5.3.14) hinzugefügt und das Volumen wird mit Acetonitril (5.2.4) aufgefüllt.

Wenn die Peakfläche der Probe größer ist als die Peakfläche des Standards, wird das Verfahren für Proben mit mehr als 10 mg/kg durchgeführt.

8.4.2.3 Herstellung eines Kontrollstandards ($c = 2,0 \text{ pg}/\mu\text{l}$)

Die Konzentration in der Standardlösung entspricht einer Konzentration von 0,5 mg/kg in den Proben.

20 µl Melamin-Arbeitslösung 2 (5.3.4) und 20 µl Cyanursäure-Arbeitslösung 2 (5.3.9) werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Zusätzlich werden 10 µl der Lösungen der internen Standards (5.3.12 und 5.3.14) hinzugefügt und das Volumen wird mit Acetonitril (5.2.4) aufgefüllt.

Wenn die Peakfläche der Probe größer ist als die Peakfläche des Standards, wird das Bestätigungsverfahren für Proben mit weniger als 10 mg/kg durchgeführt.

ANMERKUNG Bei Proben mit einem Feuchtegehalt $> 75 \%$ beträgt die Masse das Fünffache. Deshalb ist die Peakfläche der Proben etwa fünfmal größer.

8.5 Maßnahmen zu Qualitätskontrolle beim Bestätigungsverfahren

8.5.1 Leerextrakt

Vorher ist sicherzustellen, dass das Material frei von Melamin und Cyanursäure ist.

0,15 ml der Lösung des internen Standards Melamin (5.3.11) und 0,15 ml der Lösung des internen Standards Cyanursäure (5.3.13) werden wie in 8.3.1 beschrieben zu dem eingewogenen Leerwertmaterial (7.4) hinzugefügt. Die 50 ml Leerwertmaterial-Extrakt werden wie in 8.3 beschrieben hergestellt.

8.5.2 Aufgestockte Matrixprobe

Um die Leistung innerhalb eines Laufs zu überprüfen, hat es sich als notwendig erwiesen, mindestens eine QM-Probe je Abfolge im Bestätigungsverfahren mitzuführen. Diese Probe sollte eine bekannte Konzentration von Melamin und Cyanursäure enthalten, wie z. B. eine in einem Ringversuch verwendete Probe mit einem zugewiesenen Wert, ein Labor-Referenzmaterial oder ein mit Standards aufgestocktes Leerwertmaterial. Die Konzentration der Probe für die Qualitätskontrolle sollte im erwarteten Bereich der Proben liegen. Auch die Injektion einer Standardlösung ohne Matrix wird empfohlen. Für alle Qualitätskontrollmaßnahmen wird das Anlegen und Führen von Regelkarten empfohlen.

BEISPIEL Für die Herstellung einer Matrixprobe (1 mg/kg) werden zu dem Leerwertmaterial wie in 8.3.1 beschrieben 0,15 ml der Lösung des internen Standards Melamin (5.3.11), 0,15 ml der Lösung des internen Standards Cyanursäure (5.3.13), zusätzlich 200 µl Melamin-Arbeitslösung 1 (5.3.3) und 200 µl Cyanursäure-Arbeitslösung 1 (5.3.8) hinzugefügt. Extraktion und Verdünnung der Probe werden wie in 8.3.2 und 8.3.3 beschrieben durchgeführt.

8.5.3 Kontrollstandards

Herstellung eines Kontrollstandards ($c = 2,0 \text{ pg}/\mu\text{l}$).

Es wird die in 8.4.2 für das Screening-Verfahren hergestellte Standardlösung verwendet, im Bestätigungsverfahren beträgt die Konzentration in den Proben jedoch 2 mg/kg .

9 HPLC-MS/MS-Analyse

9.1 Allgemeines

Die angegebenen Messbedingungen haben lediglich Hinweisscharakter; sie dürfen an die entsprechenden örtlichen Bedingungen angepasst werden. Tripel-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie sollte angewendet werden. Da Cyanursäure im ESI (–)-Modus gemessen wird und Melamin im ESI (+)-Modus, muss die chromatographische Trennung ausreichend sein, um ein Umschalten des Modus zu ermöglichen.

Bei Anwendung einer Polaritätumschaltung ist eine Trennung der Analyten nicht notwendig, es ist jedoch sicherzustellen, dass die Empfindlichkeit und die vorgegebenen Parameter (z. B. LOQ und LOD) erfüllt sind.

Vor Beginn der Messungen muss das HPLC-System gründlich gespült werden (unter Anwendung der Ausgangsbedingungen). Es wird empfohlen, vor Beginn der Abfolge mindestens eine Injektion eines Standards vorzunehmen, um sicherzustellen, dass die Empfindlichkeit des Gerätes ausreichend ist, besonders für die Analyse von Cyanursäure.

9.2 HPLC-Betriebsbedingungen

Die chromatographischen Bedingungen dürfen frei gewählt werden. Die annehmbare Mindestretentionszeit beträgt das Doppelte der Retentionszeit für das Totvolumen der Säule.

Bei Anwendung der in 6.2.7 festgelegten HILIC-Säule und der mobilen Phasen A (5.2.9.1) und B (5.2.9.2) haben sich die Bedingungen in Tabelle 2 als geeignet erwiesen.

Tabelle 3 — HPLC-Betriebsbedingungen

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
0,0	100,0	0,0
5,0	100,0	0,0
7,0	80,0	20,0
8,0	80,0	20,0
9,0	50,0	50,0
12,0	50,0	50,0
12,5	100,0	0,0
20,0	100,0	0,0

Durchflussrate der mobilen Phase: $0,3 \text{ ml/min}$.

Injektionsvolumen: $5 \mu\text{l}$.

Säulenofentemperatur: $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Um eine Verschleppung während der Abfolge zu vermeiden, wird empfohlen, einen automatischen Injektor mit interner und/oder externer Nadelreinigung zu verwenden.