

Im Sommer 2021 wurde die Validierung von drei Prüfmethode zur Bestimmung unerwünschter Stoffe in Milch und Milchzeugnissen durch die DAkkS im Rahmen der Akkreditierung begutachtet. Nach erfolgreichem Abschluss dieser Begutachtung stehen der MLUA nun die drei hier aufgeführten akkreditierten Prüfmethode zur Verfügung. Zum einen können Melamin und dessen Abbauprodukt Cyanursäure, sowie Perchlorat als unerwünschte Kontaminanten, Chlorat als Pestizidrückstand oder Kontaminant und zum anderen Chloramphenicol und Thiamphenicol als Tierarzneimittelrückstände sensitiv quantifiziert werden.

Melamin und Cyanursäure

Melamin und Cyanursäure werden mit Acetonitril und heißem Wasser mittels Zentrifugation aus der Probe extrahiert. Störendes Fett wird durch Ausfrieren entfernt.

Beide Analyten werden chromatografisch über einen Gradienten aus Ammoniumacetatlösung (10 mmol/l) und Acetonitril getrennt.

Die Detektion erfolgt massenspektrometrisch über die Methode „MRM“, wobei die Precursor- und zugehörige Produkt-Ionen über die Software „MassHunter“ ermittelt wurden. Hierbei wurden die Produkt-Ionen mit höherer Signalintensität als Quantifier und die mit niedrigerer Signalintensität als Qualifier ausgewählt.

Für beide Analyten wird jeweils ein isotopenmarkierter interner Standard (¹³C) zur Kompensation von Matrix-Effekten eingesetzt.

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde über die Methode des kleinsten Standards ermittelt und beträgt für beide Analyten jeweils 0,1 mg/kg.

Die Wiederholpräzision wurde für beide Analyten bei niedrigen Gehalten (< 1 mg/kg) mit r = 0,1 mg/kg und bei Gehalten über 1 mg/kg mit r = 10 % vom Mittelwert bestimmt.

Eine Übersicht über wichtige Validierungskenngrößen ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Ringversuche sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die erzielten z-Scores mit einem Betrag < 2 zeigen die Vergleichbarkeit der Methode mit anderen Ringversuchsteilnehmern.

Insgesamt wurde die Methode erfolgreich validiert, so dass Gehalte an Melamin und Cyanursäure mit ausreichender Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit quantifiziert werden können.

Tabelle 2: Übersicht Ergebnisse Ringversuche

Jahr	Melamin	Gehalt [mg/kg]	z-score	Soll [mg/kg]	Wdf. zu Soll [%]
2019	FAPAS 3096	1,15	0,2	1,118	102,9
2020	FAPAS 30106	1,218	-0,4	1,31	93,0
	Cyanursäure				
2020	FAPAS 30106	1,158	0,6	1,05	110,3

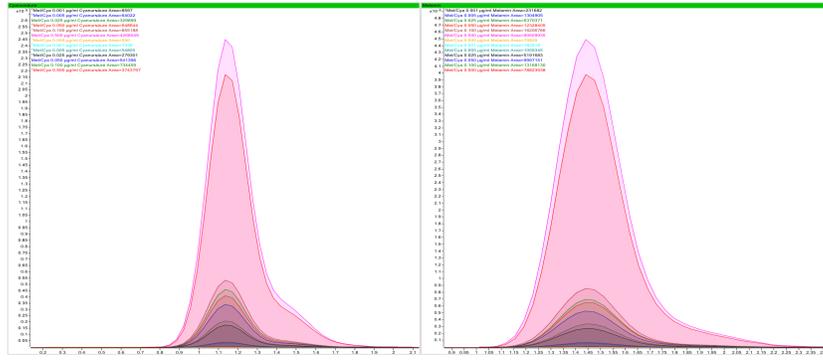


Abbildung 1: Beispiel Peaks Standardreihe Melamin (links) / Cyanursäure (rechts) (0,001 mg/l bis 0,500 mg/l) (TIC)

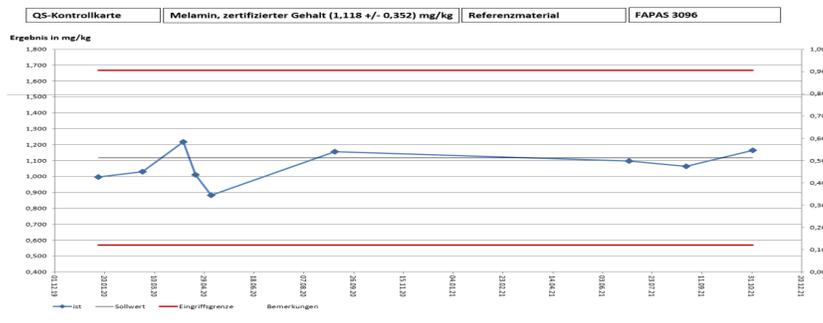


Abbildung 2: QS-Kontrollkarte Melamin (FAPAS, Referenzmaterial)

Tabelle 1: Übersicht Validierung Melamin / Cyanursäure

Leistungsparameter	Parameter	Kriterium	Ergebnis Validierung	Bewertung
Sensitivität / Spezifität Reinstanz	Retentionszeitstabilität	± 0,1 min.	$\phi_{\text{Melamin}} = 1,42 \text{ min} / s_{\text{Melamin}} = 0,03 \text{ min}$ $\phi_{\text{Cyanursäure}} = 1,67 \text{ min} / s_{\text{Cyanursäure}} = 0,06 \text{ min}$	erfüllt
	Signal-Rauschverhältnis (S/N)	$S/N \geq 3$	Exemplarisch kl. St.: Melamin: 71 Cyanursäure: 24	erfüllt
	Spezifität	Signal BW ≤ 30 % of LOQ	Melamin 10,6 % Cyanursäure 2,4 %	erfüllt
Matrix	LOQ (Limit of Quantification)	≤ MRL (Höchstmenge)	0,1 mg/kg ± 1/10 MRL (Melamin und Cyanursäure)	erfüllt
	Recovery (Wdf.) Melamin	70 – 120 % (30 – 140 % für Routinev.)	Referenzmaterial: 3 verschiedene FAPAS: $\phi_{\text{Wdf.}} = 93 \% / s_{\text{alle}} = 11 \%$ Zusatz Referenzstandard zur Matrix: $\phi_{\text{Wdf.}} = 100 \% / s_{\text{alle}} = 11 \%$	erfüllt
	Recovery (Wdf.) Cyanursäure	70 – 120 % (30 – 140 % für Routine)	Referenzmaterial: 3 verschiedene FAPAS: $\phi_{\text{Wdf.}} = 107 \% / s_{\text{alle}} = 19 \%$ Zusatz Matrix (Milch/Käse): $\phi_{\text{Wdf.}} = 107 \% / s_{\text{alle}} = 7 \%$	erfüllt
Richtigkeit	Zertifiziertes Referenzmaterial	Gemäß Zertifikat, Ringversuchsmaterial ± z = 2	eingehalten, siehe Beispiel in Abbildung 2	erfüllt
	Wiederholbarkeit (r)	Ziel: relativ etwa 20 %	Bei Gehalt jeweils ≤ 1 mg/kg: r = 0,1 mg/kg Bei Gehalt jeweils > 1 mg/kg: r = 10 % vom MW	erfüllt

Chlorat und Perchlorat

Chlorat und Perchlorat werden mit Methanol, der 1 % Ameisensäure enthält, extrahiert. Nach Ausfrieren und Zentrifugation des Fettes wird der Extrakt durch einen PTFE-Filter filtriert. Der so gewonnene Extrakt wird über die LC-MS untersucht.

Chromatografisch werden die beiden Analyten über eine Graphit-Säule mittels eines Gradienten aus Wasser mit 1 % Essigsäure, 5 % Methanol und Methanol mit 1 % Essigsäure getrennt.

Massenspektrometrisch erfolgt die Auswertung über die Methode „MRM“ wobei die Precursor- und zugehörige Produkt-Ionen über die Software „MassHunter“ ermittelt wurden. Hierbei wurden die Produkt-Ionen mit der höheren Signalintensität als Quantifier und die mit der niedrigeren Signalintensität als Qualifier ausgewählt.

Der isotopenmarkierte Perchlorat-Standard (¹⁸O₄) wird als interner Standard zur Kompensation von Matrix-Effekten eingesetzt.

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde über die Methode des kleinsten Standards ermittelt und beträgt für beide Analyten jeweils 0,006 mg/kg.

Die Kalibrierung erfolgt mit 7 externen Standards. Beispielhaft sind die Kalibriergeraden für beide Analyten in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

Die Wiederholpräzision wurde für beide Analyten mit r = 20 % vom Mittelwert bestimmt.

Eine Übersicht über wichtige Validierungskenngrößen ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Bisher wurde an einem Ringversuch teilgenommen. Hierbei war nur Perchlorat mit einem Gehalt von 192 µg/kg dotiert, so dass für Chlorat keine statistische Auswertung erfolgte. Für Perchlorat wurde mit einem ermitteltem Gehalt von 205 µg/kg ein z-Score von 0,3 erzielt. Aus dem Ringversuchsbericht wurde für Chlorat aus den Ergebnissen des Homogenitäts-Tests ein vergleichender Gehalt von 13 µg/kg ermittelt, der sehr gut durch eigene Untersuchungen (9 – 12 µg/kg) wiedergefunden wurde.

Insgesamt wurde die Methode erfolgreich validiert, so dass Gehalte an Chlorat und Perchlorat mit ausreichender Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit quantifiziert werden können.

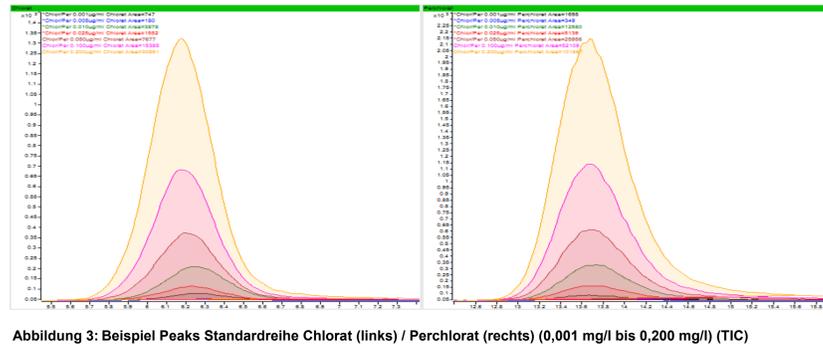


Abbildung 3: Beispiel Peaks Standardreihe Chlorat (links) / Perchlorat (rechts) (0,001 mg/l bis 0,200 mg/l) (TIC)

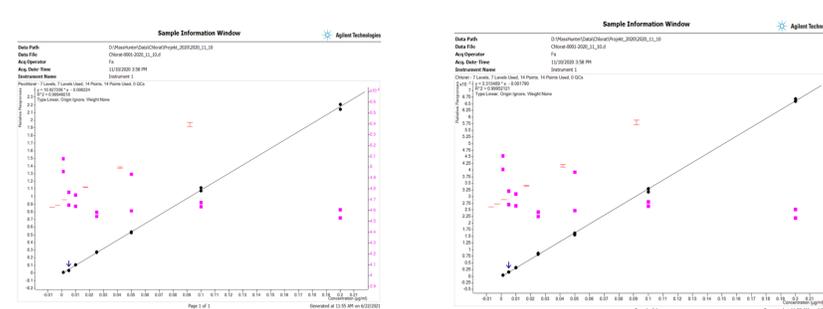


Abbildung 4: Kalibrierung Chlorat (R² = 0,9995)

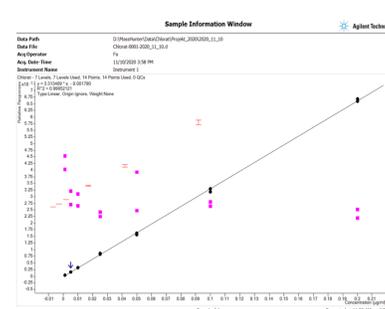


Abbildung 5: Kalibrierung Perchlorat (R² = 0,9995)

Tabelle 3: Übersicht Validierung Chlorat / Perchlorat

Leistungsparameter	Parameter	Kriterium	Ergebnis Validierung	Bewertung
Sensitivität / Spezifität Reinstanz	Retentionszeitstabilität	± 0,1 min.	$\phi_{\text{Chlorat}} = 5,85 \text{ min}$ $s_{\text{Chlorat}} = 0,51 \text{ min}$ $\phi_{\text{Perchlorat}} = 12,74 \text{ min}$ $s_{\text{Perchlorat}} = 0,61 \text{ min}$	nicht erfüllt, aber o.K.
	Signal-Rauschverhältnis (S/N)	$S/N \geq 3$	Exemplarisch kl. Std. (0,001 µg/ml) Chlorat: 15 Perchlorat: 7	erfüllt
	Sensitivität/ Linearität	Abweichung der rückgerechneten Konzentration zur theoret. Konz.: ≤ ± 20 % (80 % ≤ Accuracy ≤ 120 %)	Accuracy: Chlorat: 118 % (kl. Std.) / 99 % (höchster Std.) Perchlorat: 103 % (kl. Std.) / 100 % (höchster Std.)	erfüllt
Matrix	Spezifität	Signal BW ≤ 30 % of LOQ	Chlorat: 0,26 Perchlorat: 0,29	erfüllt
	LOQ	≤ MRL (Höchstmenge)	Perchlorat: LOQ: 0,006 mg/kg < MRL 0,01 mg/kg Chlorat: LOQ: 0,006 mg/kg < MRL 0,1 mg/kg	erfüllt
Richtigkeit	Recovery (Wdf.) Perchlorat	70 – 120 %	Referenzmaterial/ Vergleich $\phi_{\text{Wdf.}} = 99 \% / s_{\text{alle}} = 11,7 \%$ Zusatz Matrix (Milch/Käse): $\phi_{\text{Wdf.}} = 111 \% / s_{\text{alle}} = 17 \%$	erfüllt
	Zertifiziertes Referenzmaterial	Gemäß Zertifikat, Ringversuchsmaterial ± z = 2, bzw. Grenze ± r	Derzeit noch keins im Einsatz. FAPAS 05419 ab Juni 2021 für Perchlorat, für Chlorat „Orientierungswert“	eingeschränkt erfüllt
Wiederholbarkeit (r)	Ziel: relativ etwa 20 %	Beide Analyten: r = 20 % relativ	erfüllt	

Chloramphenicol / Thiamphenicol

Chloramphenicol (CAP) und Thiamphenicol (TAP) werden nach dem hier vorgestellten Verfahren als freies CAP/TAP (CAP - Base), also als unverändertes und nicht metabolisiertes CAP/TAP, verstanden.

Durch Fällung der Milcheiweiße mit Acetonitril (ACN) werden beide Analyten extrahiert. Die überstehende Lösung wird leicht mit Wasser verdünnt.

Chromatografisch werden die beiden Analyten über eine C-18-Säule mittels eines Gradienten aus Ammoniumacetatlösung (10 mmol/l) und Methanol getrennt.

Massenspektrometrisch erfolgt die Auswertung über die Methode „MRM“ wobei die Precursor- und zugehörige Produkt-Ionen über die Software „MassHunter“ ermittelt wurden. Hierbei wurden die Produkt-Ionen mit der höheren Signalintensität als Quantifier und die mit der niedrigeren Signalintensität als Qualifier ausgewählt.

Der isotopenmarkierte Chloramphenicol-Standard (CAP-d5) wird als interner Standard zur Kompensation von Matrix-Effekten eingesetzt. Weiterhin wird eine matrixbezogene Kalibrierung erstellt. Für Milch erfolgt die Kalibrierung hierbei durch Aufstockung einer CAP/TAP-freien Milch mit 7 Standards (Bsp. in Abbildung 7).

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde über die Methode des kleinsten Standards ermittelt und beträgt für CAP in Milch: 0,2 µg/kg und für TAP: 1 µg/kg.

Die Wiederholpräzision wurde für beide Analyten mit r = 20 % vom Mittelwert bestimmt.

Bisher wurde für CAP an drei Ringversuchen und für TAP an einem Ringversuch teilgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und in Abbildung 6 dargestellt.

Insgesamt wurde die Methode erfolgreich validiert, so dass Gehalte an CAP und TAP mit ausreichender Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit quantifiziert werden können.

Tabelle 4: Übersicht Ergebnisse Ringversuche

Jahr	CAP	Gehalt [µg/kg]	z-score	Soll [µg/kg]	Wdf. zu Soll [%]
2017	FAPAS 02331	0,304	-1,7	0,477	63,7
2018	FAPAS 02357	0,66	-0,8	0,800	75,0
2019	FAPAS 02382	0,60	-1,5	0,886	67,7
	TAP				
2018	FAPAS 02357	65,1	-0,4	71,7	90,8

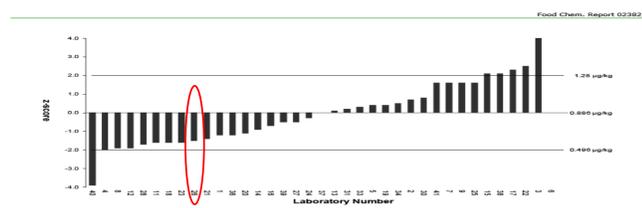


Abbildung 6: Auszug Ringversuche

Oben: CAP aus FAPAS 02832 (Labor 26)
Mitte: CAP aus FAPAS 02357 (Labor 10)
Unten: TAP aus FAPAS 02357 (Labor 10)

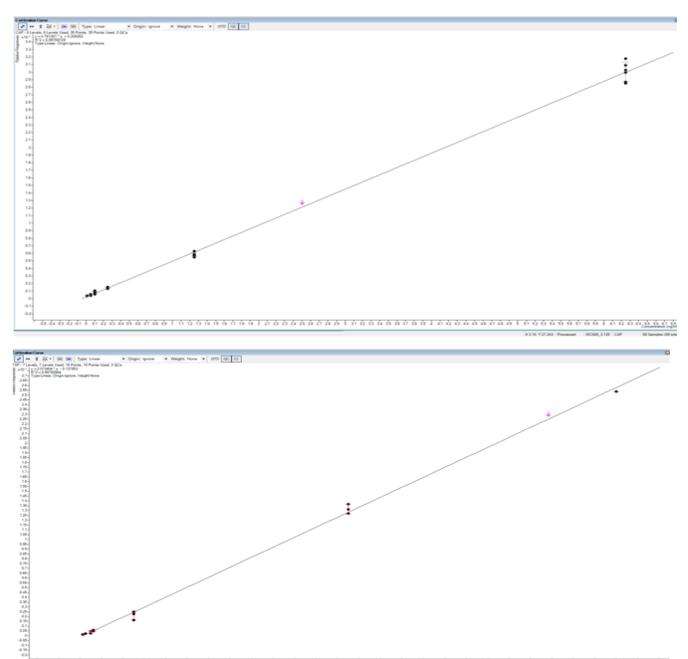


Abbildung 7: Beispiele für Kalibrierungen

Oben: CAP (R² = 0,9977)
Unten: TAP (R² = 0,9978)