

**Untersuchungen zur Eignung des Gaschromatographen mit  
Tandemmassenspektrometrikopplung zur Analyse von Melamin und  
Cyanursäure**

**Bachelorarbeit**

im Studiengang Lebensmitteltechnologie der Hochschule Neubrandenburg  
- University of Applied Science -

zur Erlangung des Akademischen Grades  
eines Bachelor of Science (B.Sc.)

vorgelegt von  
Lisa Oellerking

Neubrandenburg,  
März 2015

# Inhalt

<b>Inhalt</b>	<b>2</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
<i>1.1. Thematische Einleitung</i>	<i>4</i>
<i>1.2. Theoretischer Hintergrund</i>	<i>5</i>
1.2.1 Der Analyt Melamin und seine Strukturanaloga	5
1.2.2 Die Melamin-Komplex-Bildung	6
<i>1.3. Stand der Analytik</i>	<i>8</i>
<i>1.4. Ziel der Arbeit</i>	<i>10</i>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<i>2.1. Material</i>	<i>11</i>
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Chemikalien	14
<i>2.2. Methoden</i>	<i>15</i>
<i>2.3. Auswertung des Gaschromatographen-Chromatogramms</i>	<i>18</i>
<i>2.4. Durchführung</i>	<i>20</i>
<b>3. Ergebnisse, Diskussion und Ausblick</b>	<b>22</b>
<i>3.1. Ergebnisse</i>	<i>22</i>
<i>3.2. Diskussion und Ausblick</i>	<i>26</i>
<b>4. Zusammenfassung</b>	<b>30</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>31</b>
<i>6.1. Abbildungsverzeichnis</i>	<i>35</i>
<i>6.2. Tabellenverzeichnis</i>	<i>35</i>
<i>6.3. Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>48</i>
<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>49</b>
<b>Danksagung</b>	<b>50</b>

## Abstract

The scientific dissertation investigates if gas chromatography/tandem mass spectrometry is able to detect melamine and cyanuric acid or whether liquid chromatography/tandem mass spectrometry is may working better.

Melamine was added to increase the protein content of food and animal feed which leads to intoxication and death.

The study is also about the question how the sample preparation influences the quantifiability before measurement. U.S. Food and Drug Administration and “Bundesinstitut für Risikobewertung” publications about melamine detection were used among other sources as references.

The alkaline sample preparation shows better results than the acid preparation. In addition, sample extracts should be degreased.

Samples should currently be better analyzed with liquid chromatography/tandem mass spectrometry melamine because it offers more reliable results.

# 1. Einleitung

## 1.1. Thematische Einleitung

Melamin wird hauptsächlich für die Synthese von Melamin-Formaldehyd-Harzen genutzt. Sie dienen der Herstellung von Verpackungsmaterialien aus Kunststoff sowie von Lackfarben, Klebstoffen und Brandschutzmitteln. Zudem kann Melamin als Spurenverunreinigung in stickstoffhaltigen Futtermittelzusatzstoffen oder durch Migration aus Verpackungen in Lebens- und Futtermitteln nachgewiesen werden. Es ist ein Abbauprodukt des Pestizids und Tierarzneimittels Cyromazin [1].

In den Jahren 2007 und 2008 kam es zu zwei Skandalen, bei denen große Mengen von Melamin in Lebens- und Futtermitteln nachgewiesen wurden und die zu Vergiftungen und Todesfällen führten [1].

Nachforschungen der EFSA (European Food Safety Authority) ergaben [2], dass Melamin zur anscheinenden Erhöhung des Proteingehaltes in Säuglingsnahrung und Tierfutter untergemischt wurde und so in den Stoffwechsel der Säuglinge und Haustiere gelangen konnte [5].

Die US-Food and Drug Administration (US-FDA), die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und das wissenschaftliche Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette der EU (CONTAM) legten einen Grenzwert von 2,5 mg/kg Melamin in Lebens- und Futtermitteln sowie 1 mg/kg Melamin in Säuglingsnahrung fest [1].

In der Verordnung (EU) Nr. 574/2011 vom 16. Juni 2011 [32] sowie der Verordnung (EU) Nr. 284/2011 vom 22. März 2011 [33] sind dazu nähere Informationen zu finden.

Um Verbraucher vor verseuchten Lebens- und Futtermitteln schützen zu können, müssen funktionierende Methoden vorhanden sein, die den Melamingehalt genau nachweisen können.

## 1.2. Theoretischer Hintergrund

### 1.2.1 Der Analyt Melamin und seine Strukturanaloga

Melamin oder auch 2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin ist ein farbloser Stoff mit der Summenformel  $C_3H_6N_6$  und besitzt die CAS-Nummer 108-78-1. Er hat ein Molekulargewicht von 126 g/mol und mit sechs N-Atomen einen hohen Stickstoffanteil [2], wie in Abbildung 1 zu sehen.

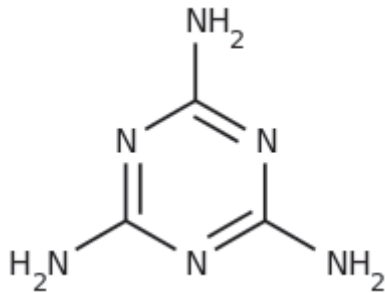


Abb. 1: Strukturformel Melamin [2]

Melamin wird verwendet bei der Herstellung von Kunststoffen, Lacken, Beschichtungen und Lebensmittelkontaktmaterial wie Geschirr und Kochutensilien. Da Melamin in Kontakt mit Lebensmitteln steht, kann es zu Migrationen kommen [1].

In der Tierernährung wird Melamin als Stickstoffquelle eingesetzt und kommt in der Umwelt als Abbauprodukt von Pestiziden und Tierarzneimitteln (Cyromazin) vor.

Bei der Herstellung von Melamin können sich durch ein bis drei Desaminierungsreaktionen auch seine Strukturanaloga Cyanursäure, Ammelin oder Ammelid bilden (siehe Abb. 2) [2, 30].

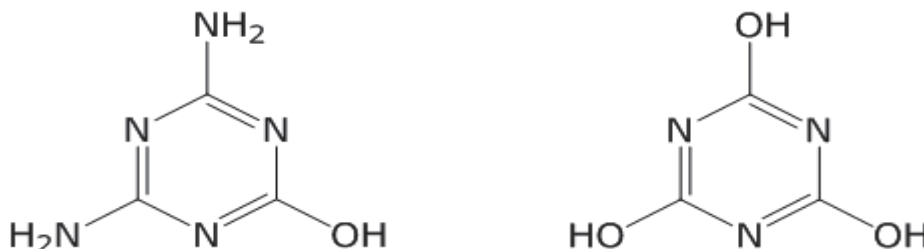


Abb. 2: Ammelin (links) und Cyanursäure (rechts) [2]

Im Boden und im Gastrointestinaltrakt kann Melamin mikrobiell zu seinen Strukturanaloga abgebaut werden, indem durch Hydrolyse ein, zwei oder drei Aminogruppen ersetzt werden [4].

Cyanursäure wird zur Stabilisierung von Chlor bei der Desinfektion von Wasser in Schwimmbädern zugegeben und wird zudem bei der Herstellung von Lacken verwendet.

Die Stoffe Melamin und Cyanursäure haben einzeln eine sehr geringe Toxizität auf den menschlichen Organismus. Die mittlere letale Dosis (LD50-Wert) liegt bei über 1 g/kg Körpergewicht. [2]

In den Jahren 2007 und 2008 führte Melamin-verseuchte Babynahrung und belastetes Tierfuttermittel zu Vergiftungen von Kleinkindern und Haustieren [1]. Die nötigen Mengen Melamin, die zu diesen Folgen führten, konnten nicht aus dem Migrieren des Stoffes aus der Verpackung stammen, da sie zu massiv vorhanden waren. Das für die Vergiftungen verantwortliche Melamin wurde schließlich in Weizengluten, Sojakonzentrat und Milchpulver nachgewiesen, das für die Zubereitung des Tierfutters und der Säuglingsnahrung eingesetzt wurde [1].

Die Lebensmittel- oder Futtermittelproduzenten setzten Melamin ihren Erzeugnissen zu, um den Proteingehalt durch die Bestimmung nach Kjedahl zu erhöhen. Die Stickstoffbestimmung nach Kjedahl wird oft durchgeführt, um den Stickstoffgehalt eines Lebensmittels zu bestimmen und daraus auf den Proteingehalt zu schließen. Proteine bestehen zu einem Großteil aus Stickstoff, somit wird durch die Zugabe von Stickstoff bei der Bestimmung nach Kjedahl auch der errechnete Proteingehalt erhöht und Verbraucher können getäuscht werden. [18]

### 1.2.2 Die Melamin-Komplex-Bildung

Melamin kann mit den Stoffen Cyanursäure oder auch Harnsäure einen Komplex bilden.

Der Komplex aus gleichen Teilen Melamin und Cyanursäure wird industriell in Kunststoffmaterialien zu Erhöhung der Hitzebeständigkeit und als

Festschmierstoff genutzt. Die genaue Struktur dieses Komplexes ist noch nicht erforscht, ein Modell nach dem Chemiker Ostrogorich [4] ist jedoch auf Abbildung 3 zu sehen. Ostrogorich ging davon aus, dass der Komplex aus zwei Arten von sechsgliedrigen Ringen aufgebaut ist, aus Triazinmolekülen besteht und eine ebene Struktur besitzt. Zusammengehalten wird dieses Konstrukt von Wasserstoffbrücken. Die farblosen Kristalle selbst sollen eine Prismaform haben [4].

Der Melamin-Cyanursäure-Komplex besitzt eine deutlich schlechtere Löslichkeit in Wasser als die einzelnen Stoffe Melamin und Cyanursäure [4].

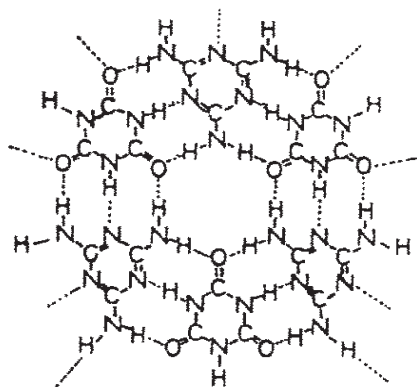


Abb. 3: Strukturmodell des Melamin-Cyanursäure-Komplex nach Ostrogorich [4]

Die Komplexbildung ist stark abhängig vom pH-Wert. Ist der pH-Wert niedriger, so kann die Stabilität des Komplexes reduziert werden, höhere pH-Werte beeinflussen die Stabilität weniger.

Mit Harnsäure bildet Melamin einen Komplex, der ein pH-Optimum von 5,5 hat. Die Niere ist mit einem pH-Wert von 5-7,3 ein optimales Milieu, um Komplexe zu bilden, zudem liefert der Stoffwechsel die nötige Harnsäure [4]. Doch auch ohne das Vorhandensein von Harnsäure kann Melamin in der Niere zum Teil zu Cyanursäure umgewandelt werden und einen Komplex bilden [2].

Das Optimum für die Bildung eines Melamin-Cyanursäurekomplexes liegt bei pH 5,0 [4].

Die Komplexe können zum Verstopfen der Nierentubuli und dadurch zum Nierenversagen führen. Die Komplexe werden als Kristalle in den Harnsteinen der verstorbenen Haustiere und in Steinen der Nieren [3], Harnleiter und Harnblasen der erkrankten Kleinkinder gefunden. [4]

### 1.3. Stand der Analytik

Für die Bestimmung von Melamin und Strukturanaloga gibt es bereits einige Analyseverfahren, die wegen der vergangenen Skandale entwickelt wurden und weiterentwickelt werden um bessere Ergebnisse zu erzielen.

Momentan liegen mit folgende Analyseverfahren vor:

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [25],

GC/MS (Gaschromatograph gekoppelt mit einem Massenspektrometer) [23],

GC-MS/MS (Gaschromatograph gekoppelt mit zwei Massenspektrometern) [21],

HPLC/UV (Hochleistungsflüssigchromatograph mit UV-Detektor),

LC/MS (Flüssigchromatograph gekoppelt mit einem Massenspektrometer) [27] und

LC-MS/MS (Flüssigchromatograph gekoppelt mit zwei Massenspektrometern) [22].

Flüssigchromatographie gekoppelt mit zwei Massenspektrometern erwies sich als beste Möglichkeit Melamin nachzuweisen, da sie die beste Erkennungsfähigkeit und Selektivität erreicht.

Flüssigchromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer bringt ebenfalls gute Ergebnisse, jedoch muss eine Probe zur Untersuchung erst derivatisiert werden, was einen größeren Arbeitsaufwand bedeutet.

Hochleistungsflüssigchromatographie mit UV-Detektor wird als kostengünstigere Analysealternative eingesetzt, es besteht aber eine geringere Empfindlichkeit und Identifikationskraft.

Die Messungen mit einem Flüssigchromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer und Gaschromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer können gleichzeitig eine Probe auf Melamin und seine Strukturanaloga analysieren. Wird ein isotopenmarkierter interner Standard verwendet, so erhöht sich die Zuverlässigkeit der Messung nochmals.

Die Gaschromatographie wird oft zum Nachweis von Melamin und seinen Strukturanaloga genutzt [21, 23, 28, 29]. Zur Derivatisierung kommen die Reagenzien: MSTFA [21, 28], BSTFA + 1% TMCS [23], BSA [29] zum Einsatz.



Es wird in verschiedenen Matrices gemessen. Eine Matrix ist der Bestandteil einer Analyseprobe, die nicht analysiert wird [19].

Verwendete Matrices sind:

- Milch und Milchprodukte [21, 22, 29],
- Babynahrung [26], Tierfuttermittel [24, 25] und
- Proteinpulver (Weizengluten, Sojaprotein, Reisprotein, Maiskleber) [23].

Für die Bestimmung von Melamin in einer Matrix müssen bestimmte Dinge beachtet werden:

Liegen Melamin und Cyanursäure als Komplex vor, so ist die Löslichkeit im Extraktionsmittel geringer (0,01g/l) als die des einzelnen Analyten (2-3g/l). Für die Probenextraktion wird ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril genutzt [23]. Da nicht sicher ist, ob eine Probe einen Komplex enthält, wird zusätzlich noch Trichloressigsäure [24] oder Diethylamin [21, 28, 29] zur Spaltung eingesetzt. [2]

Wird diese Erkenntnis nicht berücksichtigt, so kann es zu falschen Ergebnissen kommen, wie das folgende Beispiel zeigt:

In einem Ringversuch im Jahr 2010 sollte eine Futtermittelprobe mit 10 mg/kg Melamin und Cyanursäure untersucht werden.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung schnitt bei diesem Versuch am besten ab, weil es Diethylamin einsetzte und somit auf einen Analysewert von 9 mg/kg kam, anstatt 3 mg/kg wie andere Labore, die kein Diethylamin einsetzten.

Nachdem das Bundesinstitut für Risikobewertung bereits eine Methode zur Bestimmung von Melamin und Cyanursäure an Flüssigchromatograph gekoppelt mit zwei Massenspektrometern validiert [24], soll nun auch die Methode für den GC-MS/MS untersucht werden um ebenfalls damit arbeiten zu können.

#### 1.4. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen am Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometrikopplung.

Es wird geprüft, ob sich dieses Gerät eignet, um Melamin und Cyanursäure in Futtermitteln nachzuweisen. Dabei ist darauf zu achten, dass die beiden Stoffe auch als Komplex vorliegen können. Als Grundlage dient der Entwurf der zu validierenden Methode „Animal Feeding stuffs – Determination of melamine and cyanuric acid content by liquid chromatographic method with mass spectrometric detection (Flüssigchromatograph gekoppelt mit zwei Massenspektrometern)“ des Bundesinstituts für Risikobewertung vom 10.07.2014 [6] sowie die Bachelorarbeit von Hanna von Heymann: „Untersuchungen zum Einfluss von Cyanursäure auf die Analyse von Melamin in Futtermitteln“ von 2013 [7]. Zudem soll verglichen werden, ob sich der Gaschromatograph ebenso gut wie der Flüssigchromatograph eignet, um die zu untersuchenden Stoffe nachzuweisen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1 Geräte

In den vorliegenden Versuchen wurde mit einem Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometrikopplung gearbeitet.

Die Gaschromatographie ist eine physikalisch-chemische Trennmethode, die als mobile Phase ein Gas (Trägergas) und als stationäre Phase einen Feststoff oder eine Flüssigkeit nutzt. Zur Analyse müssen die Proben flüssig oder gasförmig und unzersetzt verdampfbar sein (das trifft nur für 10% aller organischen Verbindungen zu) bzw. zu einem unzersetzt verdampfbaeren Derivat umgewandelt worden sein (das ist bei weiteren 10-15% aller Verbindungen möglich) [7,8].

Die Gaschromatographie wird mit der Quadrupolmassenspektrometrie kombiniert, um eine Strukturidentifizierung oder quantitative Analyse von komplexen Gemischen und Verbindungen zu erlauben.

Die Massenspektrometrie beruht auf dem Prinzip des Zerfalls eines ionisierten Moleküls, das strukturspezifische Fragmente bildet, die in einem Magnetfeld mittels Masse-zu-Ladungsverhältnisses getrennt werden können [9].

Der GC-MS/MS besteht demnach aus zwei grundlegenden Teilen:

zum einen dem Gaschromatographen (GC), der aus Gasversorgung (1), Probeneinlass/Injektor (3), Ofen (4) und Säule (5) besteht, zum anderen aus dem gekoppelten Massenspektrometer (MS), das die Bauteile Einlass (6), Ionenquelle (7), Massenanalysator (8), Detektor (9) und Vakuum System (10) beinhaltet. Schematisch ist der GC-MS/MS in folgender Abbildung 4 veranschaulicht.

Das MS arbeitet unter einem Hochvakuum ( $<10^{-4}$  Pa).

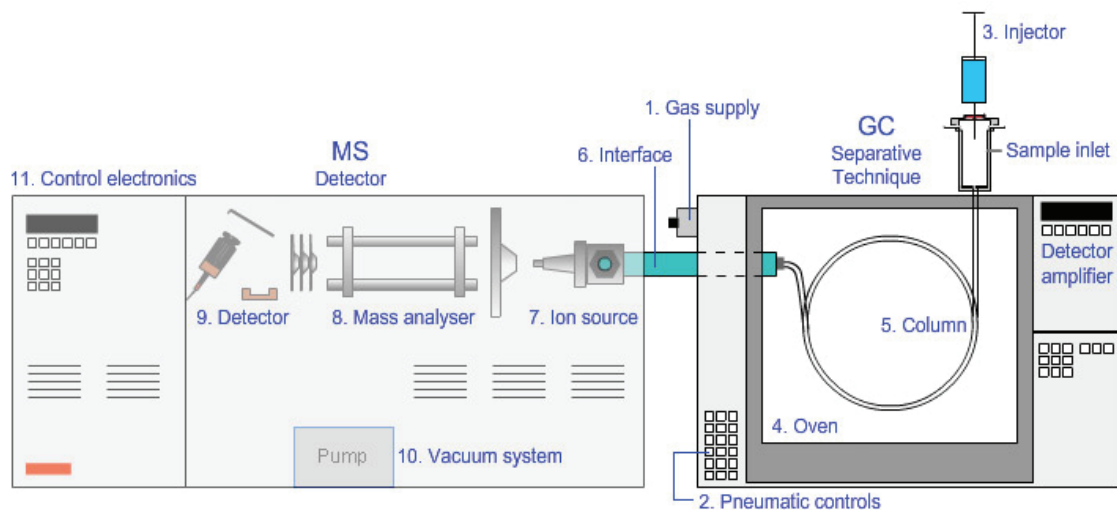


Abb. 4: schematische Darstellung eines GC-MS/MS [10]

Zur Analyse wird die flüssige Probe mit einer Spritze durch ein Septum im *Injektor* in die Säule eingespritzt. Der Injektor ist beheizt (200-350°C), um die injizierte Probe schnell verdampfen zu können.

In der *Säule* (in diesem Fall eine Kapillarsäule), einem langen Kapillarrohr (30-300m, 0,1-1 mm Innendurchmesser) meist aus Quarzglas, findet die chromatographische Trennung statt. Sie beinhaltet die stationäre Phase als dünnen Film auf der Innenwand der Säule und ist im Säulenofen angesiedelt. Die gasförmige Probe durchläuft die Säule mit Hilfe eines Trägergases, das aus der *Gasversorgung* (Druckflaschen) stammt. Als Trägergas eignet sich vor allem Stickstoff, da ein Massenspektrometer anschließt welches auch Stickstoff nutzt und so kein neues Gas eingeleitet werden muss.

Die Stoffmoleküle der Probe werden vom Trägergas durch die Säule transportiert. Während das Gas stetig die Säule durchwandert, wird der Analyt von der stationären Phase kurzzeitig adsorbiert. Es kommt zu einer Verzögerung der Wandergeschwindigkeit der Analytenmoleküle, zur sogenannten Retention.

Die Verweilzeit, die die Moleküle in der Säule verbringen, bevor sie wieder aus ihr austreten, wird als Retentionszeit bezeichnet und gibt Aufschluss über die Identität eines Stoffes [7,8].

Über die *Kopplung* zwischen Gaschromatographen und Massenspektrometer werden die getrennten Verbindungen der eingespritzten Probe vom Gaschromatographen in die Ionenquelle des Massenspektrometers überführt. In der Kopplung findet zudem ein Übergang von Atmosphärendruck in ein Hochvakuum statt.

Treffen die Moleküle auf die *Ionenquelle* (Elektronenionisator EI), kommt es zur Ionisierung. Diese erfolgt durch den Beschuss mit Elektronen mit hoher und niedriger Energie und bildet positive und negative Ionen. Diese Ionen werden beschleunigt, zu einem Ionenstrahl fokussiert und an das Triplequad-Massenspektrometer weitergeleitet [9].

Das erste Massenspektrometer (= erstes Quadrupol) wählt ein beliebiges Ionenbündel mittels Masse-Zuladungs-Verhältnis aus. Durch einen Stoß mit Hilfe eines Stoßgases in der angeschlossenen Stoßkammer (= zweites Quadrupol/ Kollisionszelle) wird das Ionenbündel energetisch angeregt und eine Fragmentation erzeugt. Diese Fragmentation nimmt das zweite MS (= drittes Quadrupol) auf, trennt und detektiert die Fragmente und erzeugt daraus ein zweites Massenspektrum [11].

Es wird mit der sogenannten MRM-Technik (Multiple Reaction Monitoring) gearbeitet. Dabei „scannt“ das dritte Quadrupol alle Elternionen, die das erste Quadrupol erzeugt. Es hat aber auch die Möglichkeit, nur ein oder zwei Fragmente zu betrachten [12].

Der MS-Detektor erfasst die Ionen und stellt diese am Computer dar. Es wird ein Spektrum erzeugt.

Für die Durchführung wurde ein Gaschromatograph mit Tandemmassenspektrometrikopplung (7000 GC/MS Triple Quad) der Firma Agilent genutzt, der über einen Autosampler der Firma MPS-Gerstel verfügt. Der Injektor arbeitet im Pulsed Spitless Modus. Das Injektionsvolumen beträgt 1,0 µl und die Injektortemperatur 280°C. Die Gaschromatographie-Säule besteht aus zwei 15 m langen „DB-5-Säulen“, die einen Durchmesser von 0,25 mm haben und durch ein Backflushsystem miteinander verbunden werden. Der Fluss in der ersten Säule beträgt 1,3 ml/min und in der zweiten Säule 1,4 ml/min. Als Trägergas, aber auch Quenchgas wird Helium genutzt. Die Ionenquelle führt eine Elektronenstoß-Ionisation bei einer Temperatur von 230°C durch. Die Temperatur der Transferline beträgt 300°C. Das Kollisionsgas in der Kollisionszelle des MS ist Stickstoff, die dort vorherrschende Temperatur liegt bei 150°C.

Die Quantifizierung der Analyten erfolgt über die Ionenübergänge  $m/z$  343  $\rightarrow$  327; 342  $\rightarrow$  285; 327  $\rightarrow$  171 für Melamin-Trimethylsilyl-Derivat bzw. über die Übergänge  $m/z$  330  $\rightarrow$  215; 345  $\rightarrow$  188; 345  $\rightarrow$  214 für Cyanursäure-Trimethylsilyl-Derivat. Die isotopenmarkierten Standards werden über die Ionenübergänge  $m/z$  345  $\rightarrow$  330; 330  $\rightarrow$  172 für Melamin- $^{13}\text{C}_3$ -Trimethylsilyl-Derivat sowie  $m/z$  333  $\rightarrow$  217; 348  $\rightarrow$  217 für Cyanursäure- $^{13}\text{C}_3$ -trimethylsilyl-Derivat quantifiziert [7].

Außerdem kamen zwei temperierbare Zentrifugen zum Einsatz, eine Laborzentrifuge (max. 15.200 rpm) der Firma Thermo Scientific und eine Eppendorfszentrifuge (max. 16.400 rpm) der Firma Eppendorf. Eine Eindampfstation mit Stickstoffanschluss der Firmen vapotherm und Barkey wurde ebenfalls benutzt. Dazu kommen weitere Laborutensilien, die der Tabelle 1 im Anhang zu entnehmen sind.

### 2.1.2 Chemikalien

Melamin und Cyanursäure der Firma Sigma Aldrich mit einer Reinheit von mindestens 99% wurden für die Versuche benutzt. Die internen Standards  $^{13}\text{C}_3$  Melamin und  $^{13}\text{C}_3$  Cyanursäure wurden bei der Firma Witga erworben. BSTFA mit 1% TMCS ist ebenfalls von der Firma Sigma Aldrich. Alle Reagenzien und Lösungsmittel sind von analytischer Reinheit, sofern nicht anders angegeben: Acetonitril (LCMS-grade), Aceton, Cyclohexan, iso-Octan, Methanol (LCMS-grade) der Firma Merck; BSA (N,O-Bis-trimethylsilyl-acetamid), Diethylamin, MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid), Trichloressigsäure der Firma Sigma Aldrich. Das Reinstwasser wurde in dem Wasseraufbereitungssystem „Milli-Q Plus“ der Firma Millipore gereinigt. Zur besseren Übersicht sind alle verwendeten Chemikalien nochmal in der Tabelle 4 im Anhang aufgeführt.

Da Melamin und Cyanursäure schlecht in Wasser löslich sind, wurde für die Stammlösung (S0-Lösung) 10 mg Melamin/Cyanursäure in 10 ml Lösungsmittel gelöst, das aus 80% Reinstwasser und 20% Diethylamin besteht. Alle weiteren Standardlösungen wurden jeweils aus 1 ml S0/S1/S2/...-Lösung in 10 ml Reinstwasser hergestellt. Die Haltbarkeiten betragen zwei Jahre (S0),

ein Jahr (S1, S2, S3) und sechs Monate (S4, S5). Die einzelnen Konzentrationen sind ersichtlich in Tabelle 7 im Anhang.

Als Matrix wird Legehennen-Futtermittel (QS-Futter, ID-Nr.:4031735180176) benutzt. Es ist zusammengesetzt aus Weizen, Sojaextraktionsschrot, dampferhitzt, Mais, Calciumcarbonat, Sojaöl, Natriumchlorid, Natrium-Calcium-Magnesiumphosphat, Monocalciumphosphat, DL-Methionin, Natriumcarbonat und Magnesiumphosphat. Weitere Informationen finden sich in Tabelle 5 im Anhang.

Als Kontrollsubstanz wird eine Mischung aus Melamin,  $^{13}\text{C}_3$  Melamin, Cyanursäure und  $^{13}\text{C}_3$  Cyanursäure in einer S5-Konzentration bei jeder Analyse mit gemessen („Mix 85 S5“). Die Retentionszeiten dienen der Orientierung, um bei Matrixproben die richtigen Peaks zu erkennen. Daneben wird mit Hilfe des Mixes für Qualitätszwecke eine Regelkarte erstellt werden (zum Vergleichen der Peakgrößen).

## 2.2. Methoden

### *Extrahieren*

Nach dem Einwiegen von 2 g (+/- 0,1 g) Probenmaterial mittels Präzisionswaage in ein 50-ml-Zentrifugengefäß wird das erste Extraktionsmittel (2 g Trichloressigsäure + 15 ml (Reinstwasser + Acetonitril (3+1))) mit einem Dispenser auf die Probe gegeben. Das Zentrifugengefäß wird mit einem passenden Deckel verschlossen und mittels Vortexmischer 15 s stark geschüttelt (= gevortext). Die Probe kommt für 15 min ins Ultraschallbad und wird anschließend 10 min bei 4000 g und 15°C zentrifugiert.

Der Überstand wird unter Zuhilfenahme eines Glastrichters in einen 50 ml-Messkolben überführt.

Zur zweiten Extraktion wird das zweite Extraktionsmittel (15 ml (Reinstwasser + Acetonitril (3+1))) auf die Probe gegeben. Das Probengefäß wird wieder verschlossen und für 15 min in den Überkopfschüttler

gegeben, anschließend kommt die Probe in die Zentrifuge und es wird wie in Schritt eins weiter verfahren.

Zur dritten Extraktion wird die zweite Extraktion mit 10 ml Extraktionsmittel 2 wiederholt. Der 50 ml-Messkolben ist dazu mit dem Extraktionsmittel 2 bis zum Eichstrich aufzufüllen.

#### *Verdünnen, Zugabe der internen Standards*

2 ml Acetonitril werden in einen 10 ml-Messkolben pipettiert sowie die internen Standards  $^{13}\text{C}_3$  Melamin und  $^{13}\text{C}_3$  Cyanursäure. Dazu wird für Proben  $>10$  mg/kg Analytgehalt 0,1 ml des Probenextraktes gegeben bzw. 1 ml, wenn die Probe  $<10$  mg/kg Analyt enthält.

Das Auffüllen der Kolben erfolgt mit Acetonitril bis zum Eichstrich.

#### *Zentrifugieren*

Dem 10 ml-Kolben werden 2 ml Extrakt mittels Kolbenhubpipette entnommen und in Safe-Lock-Tubes (Kunststoffzentrifugegefäße) mit dem Volumen von 2 ml gefüllt.

Diese werden verschlossen und für 10 min in der Eppendorfzentrifuge bei 20.000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert.

#### *Eindampfen und Derivatisieren*

Der zentrifugierte Extrakt wird in starkwandige Reagenzgläser mit Schliff gefüllt und bei  $40^\circ\text{C}$  bis zur Trockne (keine Flüssigkeit ist mehr sichtbar) in die Eindampfstation gestellt. Danach wird 50  $\mu\text{l}$  BSTFA (*N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) +1% TMCS (Trimethylchlorosilane) sowie 50  $\mu\text{l}$  Acetonitril darauf gegeben, gevortext, und das Reagenzglas mit einem Glasstopfen verschlossen. Die Reagenzgläser inkubieren für 45 min bei  $70^\circ\text{C}$  in einem Trockenschrank.

Für die Analyse von Proben am Gaschromatographen ist es notwendig, die nicht flüchtigen Proben zu derivatisieren. Ziel der Derivatisierung ist es, polare funktionelle Gruppen mit apolaren Molekülteilen zu sättigen und sie so weniger polar zu machen.



Es wird in den vorliegenden Versuchen das Silylierungsmittel BSTFA + 1 % TMCS, auch Silyl-991 genannt, genutzt. TMCS fungiert als Katalysator, da BSTFA allein einige Amine nicht derivatisieren kann [8].

Eine Silylierung ist eine Form der Derivatisierung, bei der das aktive Wasserstoffatom des polaren Stoffes durch einen Alkylsilylrest bzw. eine Trisilyl (TMS)-Gruppe ersetzt wird. Silyl-991 besitzt besonders gute Silylierungseigenschaften und wird für Amine und schwer silylierbare Verbindungen genutzt [17].

Bei einer Derivatisierung ist darauf zu achten, dass in der Probe keine Feuchtigkeit vorhanden ist. Derivatisierungsreagenzien bilden mit Wasser Hexamethylsiloxan, das im Chromatogramm am Computer als Störpeak sichtbar wird und somit eine Analyse unmöglich macht [14, 15].

### *Messung*

Die Derivate werden in Vials (Glasfläschchen) mit Inserts (ein kleineres Glasgefäß im Vial) gefüllt, fest mit einem Teflondeckel verschlossen und am Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometrikopplung gemessen.

Zur besseren Übersicht kann auf Abbildung 6 im Anhang ein Fließschema der Methoden betrachtet werden.

### *Matrixkalibrierung*

Für die Matrixkalibrierung verläuft die Aufarbeitung von „Null-Futtermittel“, das weder Melamin noch Cyanursäure enthält, nahezu identisch zur Probenaufarbeitung. Zum Herstellen einer Matrixkalibration wird Null-Futtermittel in einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser, Acetonitril und Trichloressigsäure extrahiert und laut den oben genannten Aufarbeitungsschritten aufgearbeitet. In die 10-ml Kolben wird der interne Standard und Standard mit zunehmender Konzentration (siehe Tabelle 8 im Anhang) pipettiert, um eine Kalibrationsreihe herzustellen.

Die weitere Verarbeitung verläuft analog der in Kapitel „Methoden“ beschriebenen Probenaufarbeitung.

### 2.3. Auswertung des Gaschromatographen-Chromatogramms

Die Quantifizierung des Analyten erfolgt durch die Verwendung eines isotoopenmarkierten internen Standards (IS). Durch z. B. Verschmutzen der Quelle oder Variationen des Einspritzvolumens kommt es zu Veränderungen der Ionenausbeute, die der IS kompensieren bzw. korrigieren soll. Der interne Standard unterscheidet sich durch einen Marker von dem normalen Analyten, hierfür dient Kohlenstoff als Marker in Form eines stabilen  $^{13}\text{C}_3$  Isotops [9].

Nach dem Messen einer Probe kann am Computer mit Hilfe des Programms „MassHunter“ aus dem gemessenen Spektrum ein Chromatogramm erstellt werden, das sogenannte Peaks zeigt (siehe Abb. 5).

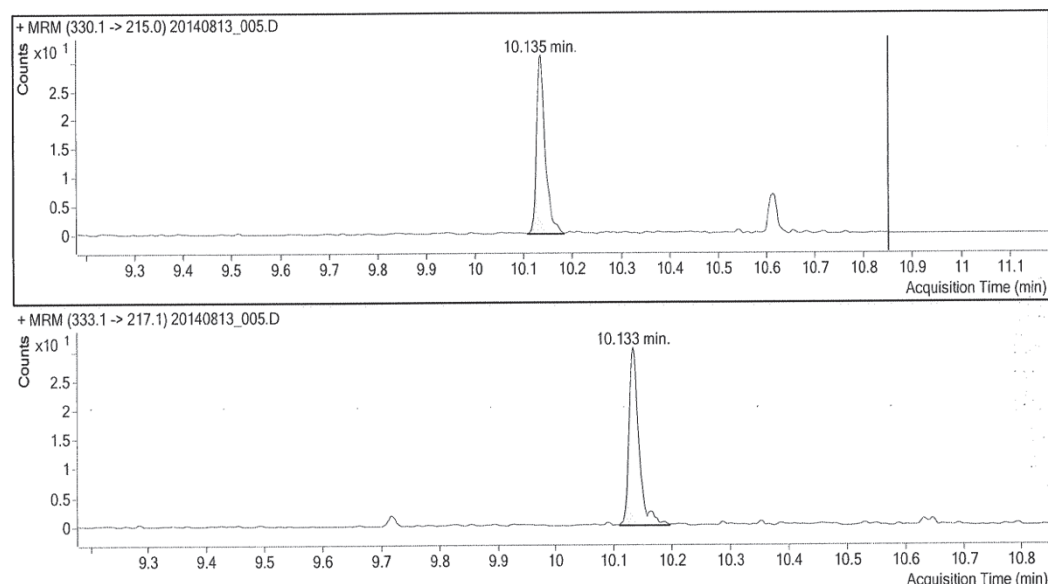


Abb. 5: Chromatogramm von Cyanursäure (oben) und  $^{13}\text{C}_3$ -Cyanursäure (unten) [34]

Ein Peak ist eine Gaußkurve und liefert sowohl qualitative als auch quantitative Informationen.

Die Retentionszeit (auf der x-Achse), die die Moleküle zum Durchwandern der Säule benötigen, führt zu einer qualitativen Aussage, die Höhe (Intensität = Counts) bzw. Fläche des Peaks zu einer quantitativen Aussage.

Eine Substanz wird über die Retentionszeit identifiziert. Dazu werden Analyt und sein zugehöriger interner Standard (isotoopenmarkierter Standard) zusammen im Chromatogramm dargestellt.

Aus dem Verhältnis der Peakfläche des internen Standards, zu der Fläche des Peaks des Analyten (Standards) lässt sich die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes berechnen. Werden dazu noch die Ergebnisse einer Kalibrierkurve betrachtet, so lässt sich die Konzentration einer unbekannten Probe mittels Excelvorlagen bestimmen [13].

Die voraussichtliche Retentionszeit für Melamin beträgt 12,3 Minuten und für Cyanursäure 9,4 Minuten [23]. Nur die Peaks in diesem Bereich ( $\pm 1,5$  Minuten) sollten bei der Auswertung berücksichtigt werden.

## 2.4. Durchführung

Insgesamt wurden 19 Versuche für die vorliegende Arbeit durchgeführt. Diese sind ausführlich und chronologisch in Tabelle 9 im Anhang nachzulesen.

Zu Beginn wurde aufgearbeiteter Futtermittel-Extrakt untersucht, der von Versuchen am Flüssigchromatographen im Kühlschrank einige Wochen eingelagert und dessen Analytgehalt bekannt war.

Dieser Extrakt musste noch eingedampft und derivatisiert werden.

Um die optimale Menge des einzudampfenden Extraktes und die optimale Trocknungsdauer zum Nachweis der Analyten am Gaschromatographen zu ermitteln, wurde 0,5 ml, 1,0 ml und 2,0 ml Extrakt in ein Reagenzglas gegeben und bis zur Trockne, also keine Flüssigkeit ist mehr sichtbar, sowie 10 Minuten nach der Trockne mit Stickstoff bei 40 °C eingedampft.

Nachdem die Proben mittels Gaschromatographie mit Tandemmassenspektrometrikopplung analysiert waren, konnten die Ergebnisse mit den bereits ermittelten Werten am Flüssigchromatographen gekoppelt mit zwei Massenspektrometern, die im Zuge der Erarbeitung einer Methode an LC-MS/MS zum Nachweis von Melamin und Cyanursäure vorlagen, verglichen werden [16].

Danach wurde fein vermahlene Legehennenfutter in Lösungsmittel extrahiert und der entstandene Extrakt derivatisiert.

Um die Wirksamkeit des Derivatisierungsmittel zu testen, da es beim Kontakt mit Wasser leicht wirkungslos werden kann, wurde bei zwei Proben ein bereits geöffnetes Fläschchen BSTFA zum Derivatisieren genutzt. Bei zwei weiteren Proben wurde eine neue ungeöffnete Flasche BSTFA verwendet.

Zudem wurde untersucht, ob andere Derivatisierungsmittel den gleichen Erfolg beim Nachweis von Melamin und Cyanursäure bringen. BSTFA wurde wieder eingesetzt jedoch zusammen mit dem Lösungsmittel Pyridin anstelle von Acetonitril. Als weitere Möglichkeit kam MSTFA zusammen mit Acetonitril und BSA mit Pyridin zum Einsatz. Die Mittel wurden nach den Herstellerangaben von Marchery-Nagel angewendet [20].

Da sich die Verwendung von BSTFA zur Derivatisierung der Proben durchsetzte, wurde untersucht wie BSTFA am besten wirksam wird. Dazu wurde den eingedampften Proben unterschiedlich viel BSTFA zugegeben: 50 µl/100 µl und jeweils 50/ 100 µl Acetonitril oder 50/ 100 µl Pyridin oder 25/50 µl Acetonitril und 25/50 µl Pyridin.

Auch wurde untersucht, wie sich die Wirkung einer Matrix auf die Analysierbarkeit der Proben auswirkt. Dazu wurde eine Matrixkalibration im Bereich von 0,625 – 2,5 mg Analyt/kg Matrix hergestellt und im Vergleich dazu eine Standardkalibration im selben Bereich durchgeführt.

Um weiterhin den Einfluss der Zeit zu erforschen, erfolgte eine Lagerung der Probenextrakte 0, 24, 48 oder 120h bei Zimmertemperatur mit anschließender Eintrocknung und Derivatisierung.

Zum Testen des Einflusses verschiedener Aufreinigungsarten der Probenextrakte auf die Analysierbarkeit sollte festgestellt werden, ob das Enfetten mit n-Hexan eine bessere Analysierbarkeit zur Folge hat. Auch das Filtern des Extraktes während des Zentrifugierens in speziellen Filtereppendorftubes wurde überprüft.

Die bisherige Extraktion des Futtermittels mit einem saurem Extraktionsmittel, hergestellt aus Wasser, Acetonitril und Trichloressigsäure, setzte sich während der Untersuchungen am Flüssigchromatographen mit Tandemmassenspektrometriekopplung gegen eine basische Aufarbeitung durch.

Da auch eine basische Aufarbeitung möglich ist, wurde diese noch einmal bei der Probenanalyse an Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometriekopplung geprüft. Dem Extraktionsmittelgemisch aus Wasser und Acetonitril wird Diethylamin zugesetzt.

### 3. Ergebnisse, Diskussion und Ausblick

#### 3.1. Ergebnisse

Die Versuche zeigen, dass der Gaschromatograph grundsätzlich zum Nachweis von Melamin und Cyanursäure geeignet ist. Da aber sieben der 19 Untersuchungen durch Probleme bei der Messbarkeit der Proben zu keinen Ergebnissen führten, sollte momentan eher der Flüssigchromatograph für die Analyse von Melamin und Cyanursäure genutzt werden. Funktioniert die Probenanalyse mit dem Gaschromatographen, so ähneln sich die Ergebnisse stark.

Die Messung am Flüssigchromatographen ist einfacher durchzuführen, da kaum eine Probenvorbereitung notwendig ist [31]. Werden Proben am Gaschromatographen analysiert, müssen sie erst derivatisiert werden, was einen größeren Arbeitsaufwand darstellt. Der Preis für die Anschaffung eines Flüssigchromatographen mit Tandemmassenspektrometrikopplung beträgt 250.000-500.000 €, für einen Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometrikopplung dagegen nur 200.000-300.000 € [31].

Die größten Probleme treten bei der Probenaufarbeitung auf, deshalb werden in der Arbeit die meisten Untersuchungen dazu durchgeführt.

Extrakte können nicht eingedampft und somit nicht analysiert werden da ein feuchter Rückstand im Gefäß verbleibt. Zudem fällt ein weißer Niederschlag in den Proben aus, der einen negativen Einfluss auf die Messbarkeit hat.

Während der ersten Versuche blieb in den Reagenzgläsern nach dem Eindampfen mit Stickstoff ein gelber gelartiger Stoff zurück, der stark an Fett erinnerte und ein Eindampfen und somit auch Analysieren unmöglich machte.

Vor dem Eindampfen werden die Probenextrakte mit n-Hexan entfettet um mögliches Fett, das das Eindampfen behindert, zu entfernen.

Nach dem Entfetten funktioniert das Trocknen der Extrakte besser.

Die Menge an Extrakt, die im Reagenzglas zum Trocknen gebracht wird, hat einen Einfluss auf die Peakflächen im Chromatogramm am Computer der Proben. Je mehr Probenextrakt eingetrocknet wird, desto größer die Peakflächen. Die getrockneten Extrakte werden in der gleichen Menge Lösungsmittel und Derivatisierungsmittel gelöst (100 µl), daher ist der

Analytgehalt im Vial prozentual höher, je mehr Extrakt vorher vorhanden war, in dem der Melamin- und Cyanursäuregehalt gleich ist.

Beispielrechnung:

- Extrakt enthält 1 mg/ml Melamin und Cyanursäure
- davon wird 0,5 ml, 1 ml, 2 ml eingedampft und in 100 µl (50 µl BSTFA + 50 µl ACN) gelöst

Rechnung:

Mel-/Cya-Gehalt x Eindampfvolumen =

Mel-/Cya-Gehalt im trocknen Rückstand /

(Menge Derivatisierungsmittel + Lösungsmittel) = Mel-/Cya-Gehalt in Vial

1,0 mg/ml x 0,5 ml = 0,5 mg / 100 µl = 0,005 mg/µl

1,0 mg/ml x 1 ml = 1 mg / 100 µl = 0,01 mg/µl

1,0 mg/ml x 2 ml = 2 mg / 100 µl = 0,02 mg/µl

Die Beispielrechnung zeigt, dass mit steigender Eindampfmenge auch der Analytgehalt im Vial steigt. Da die gleiche Menge Probe in den Gaschromatographen injiziert wird (1 µl), ist die Analytmenge, die die Säule durchwandert und später gemessen wird, auch höher. Dies hat den Vorteil, dass selbst kleine Mengen Melamin und Cyanursäure besser nachgewiesen werden können. Nachteilig ist die hohe Matrixbelastung, die durch das Injizieren hoch konzentrierter Proben auf die Säule wirkt. Die Belastung kann zu Ablagerungen und somit dem Verschmutzen der Säule führen, wodurch sie schneller ausgewechselt werden muss.

Nur mit Hilfe eines geeigneten Derivatisierungsmittels können die Proben analysiert werden. Wie in der Veröffentlichung der FDA [23] wurde dazu BSTFA + 1% TMCS (auch Silyl-991 genannt) benutzt und zusammen mit dem Lösungsmittel Acetonitril zum Derivatisieren verwendet. In anderen Veröffentlichungen [20] wird Silyl-991 zusammen mit Pyridin eingesetzt. In den durchgeführten Versuchen (siehe Seite 43 im Anhang) zeigten sich 50 µl Silyl-991 zusammen mit 50 µl ACN als beste Silylierungsvariante. Mehr Silylierungsmittel (100 µl) führt ebenfalls zur erfolgreichen Silylierung, ist aber nicht nötig, da das Ergebnis nicht besser wird sondern gleichwertig ist. Die Derivatisierung mit Pyridin ist auch möglich. Da Acetonitril genau so wirksam ist

und schon als Extraktionsmittel für das Futtermittel benutzt wird, wird es an dieser Stelle weiter verwendet, um nicht unnötig mehr Reagenzien zu nutzen.

Um herauszufinden, ob andere Derivatisierungsmittel zu besseren Ergebnissen führen, wurden MSTFA und BSA im Vergleich zu BSTFA (+1% TMCS) getestet. BSA in Verwendung mit Pyridin als Lösungsmittel ist auch zur Derivatisierung von Melamin und Cyanursäure geeignet. MSTFA bringt keine Ergebnisse und wird daher nicht verwendet. Für weitere Versuche setzt sich BSTFA (+1% TMCS) zum Derivatisieren von Melamin und Cyanursäure durch.

Beim Eindampfen des Extraktes mit Stickstoff in einer Eindampfstation bleibt zum Teil ein gelber geelartiger Rückstand zurück, der nicht getrocknet werden kann. Um zu prüfen, ob es Fett ist, was das Eindampfen stört, werden die Proben in einem Versuch mit 2 ml n-Hexan entfettet. Danach können sie eingetrocknet werden, ohne dass ein Rückstand übrig bleibt. Ein unzureichendes Eindampfen führt dazu, dass in der Probe weiterhin Wasser vorhanden ist, das die Derivatisierung stört und somit kann die Probe nicht mit dem Gaschromatographen analysiert werden.

Während der Probenaufarbeitung fällt aus dem stark verdünnten Probenextrakt im 10 ml-Kolben ein weißer Niederschlag aus, der innerhalb von mindestens 48h zu einem Bodensatz absinkt. Es wird angenommen, dass es sich dabei um einen Stoff handelt, der sich negativ auf die Messbarkeit der Proben auswirkt. Dieser Niederschlag bildet sich nur im Matrixextrakt und nicht in den Standardproben. Daher wird vermutet, dass die Matrix mit einem im Extraktionsmittel enthaltenen Stoff reagiert und ausfällt.

In einem weiteren Versuch wird getestet, den Niederschlag durch verschiedene Aufreinigungsschritte zu entfernen. Das Zentrifugieren in Filtereppendorfgefäßen führt nicht zum gewünschten Ergebnis. Der weiße Stoff dringt zusammen mit dem Extrakt durch den Filter und kann nicht abgetrennt werden.

Ein Extrahieren in n-Hexan nach dem Derivatisieren hat keinen positiven Einfluss auf die Messbarkeit der Proben. Die größten Peakflächen haben im Vergleich der verschiedenen Aufreinigungen die Proben der Aufarbeitung ohne zusätzliches Filtern oder Extrahieren.



Der Einflusses des Faktors Zeit auf das Absinken des Niederschlags und somit möglicherweise auch auf die Probenmessbarkeit zeigt, dass mit zunehmender Wartezeit mehr Niederschlag ausfallen und besser absinken kann und somit eine Trennung möglich ist.

Nach 48 h Wartezeit werden die Probenextrakte weiter verarbeitet und können analysiert werden.

Um auszuschließen, dass TCA zusammen mit der Matrix den Niederschlag bildet, wird die basische Aufarbeitung mit DEA zum Vergleich herangezogen. Nachdem die Extrakte im 10 ml-Kolben (1:10) verdünnt wurden, ist schon erkennbar, dass der sauer aufgearbeitete Extrakt eine starke Trübung aufweist und der basische Extrakt klar ist. Nach 24 h ist im sauren Extrakt ein Niederschlag zu erkennen, der im Laufe der Zeit nach unten sinkt. Am Tag der Probenaufarbeitung lassen sich nur die mit DEA aufgearbeiteten Proben analysieren. 48 h nach der Probenaufarbeitung können auch die mit TCA extrahierten Proben gemessen werden.

Zum besseren Überblick werden alle durchgeführten Versuche der vorliegenden Arbeit noch einmal in der Tabelle 9 im Anhang mit Durchführung, Ergebnissen und Bemerkungen zusammengefasst.

### 3.2. Diskussion und Ausblick

Wie bereits in der Zielsetzung beschrieben, werden in dieser Arbeit Untersuchungen unternommen, durch die die Eignung des Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometrikopplung zum Nachweis von Melamin und Cyanursäure festgestellt wird. Dies geschah durch unterschiedliche Versuche, bei denen die Probenaufarbeitung variiert, wurde um die Proben anschließend analysieren zu können.

Grundsätzlich ist die Analyse von Melamin und Cyanursäure am Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometrikopplung möglich.

Auch die FDA (U.S. Food and Drug Administration) kam bei ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis [23], dass unter Verwendung einer ähnlichen Probenaufarbeitung der Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometrikopplung geeignet ist, Melamin und Cyanursäure aus einer Matrix zu extrahieren und nachzuweisen.

Zum Extrahieren nutzte die FDA ein Lösungsmittelgemisch aus 10 % DEA + 40% Wasser + 50 % Acetonitril. In den Versuchen wurde 8 % TCA + 69 % Wasser + 23 % ACN eingesetzt. Unter Verwendung dieses Extraktionsmittels fällt ein weißer Niederschlag aus, der beim Einsatz von DEA nicht entsteht. Der Nachteil der Verwendung von DEA ist die unzureichende Komplexaufspaltung von Melamin und Cyanursäure. In einem basischen Milieu kann der Komplex zwar bei seiner Bildung behindert werden, jedoch wird ein vorhandener nicht zerstört. Um die Mutmaßung zu überprüfen, wurden weitere vergleichende Versuche im Institut für Risikobewertung durchgeführt. Diese sollen zeigen, ob bei einer sauren oder basischen Aufarbeitung die gleichen Analyseergebnisse erreicht werden. Trifft dies nicht zu, so ist das ein Beweis dafür, dass die unterschiedlichen Aufarbeitungen nicht gleichwertig sind.

In der Veröffentlichung der FDA [23] wird die Methode bereits für verschiedene Matrices verwendet und die Wirksamkeit überprüft. Dabei wurden keine solchen Probleme dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Derivatisieren BSTFA + 1% TMCS verwendet, da dies zu den besten Ergebnissen führte. Die FDA [23] setzte ebenfalls auf dieses Mittel, jedoch wurde für die Derivatisierung nur 200 µl Probenextrakt eingedampft und der Rückstand in 200 µl Pyridin und 200 µl BSTFA gelöst. Nach diesem Arbeitsschritt wurde das verschlossene Reagenzglas im Trockenschrank für 45 Minuten bei 70°C

inkubiert. Während der Untersuchungen der FDA stellte sich heraus, dass in Anwesenheit von viel Zucker in der Matrix vor allem Cyanursäure schlecht derivatisiert werden kann. Grund dafür ist, dass das Derivatisierungsmittel bevorzugt mit  $\text{NH}_3$ -Gruppen und OH-Gruppen reagiert.

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit ist diese Tatsache von Bedeutung, da das verwendete Legehennenfutter vorwiegend aus Getreide besteht, das wiederum zum Großteil Kohlenhydrate enthält und diese in ihrem chemischen Aufbau viele OH-Gruppen enthalten. Das würde erklären, dass bei den Messungen oft Melamin nachgewiesen werden konnte, Cyanursäure aber nicht. Während der Arbeit wurde auf diesen Aspekt nicht weiter eingegangen, sollte aber zukünftig weiter untersucht werden. Dazu ist die Menge an Derivatisierungsmittel zu variieren, aber auch die Matrix selbst.

Um eine Verschleppung der Analyten zwischen den einzelnen Injektionen der Messung zu erkennen und zu vermeiden, wird in regelmäßigen Abständen (z. B. nach einer Messreihe) eine Kontrollprobe injiziert, in der weder Melamin noch Cyanursäure nachgewiesen ist. Dazu wird Acetonitril genutzt. Erscheint bei der Analyse von Acetonitril im Chromatogramm ein Peak, der Melamin und/oder Cyanursäure darstellt, so müssen mehrere Injektionen folgen, um die Säule wieder klar zu spülen.

Die Retentionszeit für Cyanursäure lag in den Versuchen bei 10,1 Minuten und für Melamin bei 11,1 Minuten. Die Abweichung zu den erwarteten Retentionszeiten (für Melamin 12,3 Minuten, für Cyanursäure: 9,4 Minuten) [23] kann durch verschiedene Aspekte zustande kommen.

Eine wichtige Rolle spielt die Länge der Säule. Je länger diese ist, desto länger brauchen die Moleküle zum Durchwandern der Säule. Im Laufe der Zeit verkürzt sich die Retentionszeit immer weiter um einige Sekunden, da die Säule regelmäßig aus Wartungsgründen gekürzt wird.

Die Flussrate der mobilen Phase (des Trägergases) hat auch einen Einfluss auf die Retentionszeit. Je geringer die Flussgeschwindigkeit ist, desto mehr Zeit brauchen die Analyten zum Durchwandern der Säule. In der Veröffentlichung der FDA wurde eine Flussrate von 35 cm/sec eingestellt [23].

Der Gaschromatograph mit Tandemmassenspektrometriedkopplung ist ein hochmodernes aber auch hochkomplexes Gerät und kann kleinste Mengen eines Stoffes nachweisen. Für das einwandfreie Funktionieren des Gerätes ist es notwendig, regelmäßige Wartungsarbeiten durchzuführen. Deshalb muss vor jeder Messung der Liner (ein 10 cm langes Glasröhrchen) und das Septum (eine Gummidichtung) gewechselt sowie die Spritze gründlich mit Lösungsmitteln gespült werden. Diese Stellen im Gerät können leicht verschmutzen, da sie direkt mit den Proben in Berührung kommen. Der Liner enthält zudem Glaswolle, die Verschmutzungen aufnimmt und so die Säule schützt.

Das regelmäßige Kürzen der Säule am GC-Eingang ist unumgänglich, um Verschmutzungen und somit Messfehlern vorzubeugen. Dazu wird die Säule am Inlet abgeschraubt, mit einem Keramikmesser angeritzt und abgebrochen. Die Säule mit der sauberen Bruchkannte wird nun wieder eingeschraubt.

Im Vergleich zu der Flüssigchromatographie birgt der Gaschromatograph zum Nachweis von Melamin und Cyanursäure viele Probleme. Die Derivatisierung ist als Fehlerquelle nicht zu unterschätzen. Derivatisierungsmittel sind extrem empfindlich beim Kontakt mit Wasser und sind daher trocken zu lagern. Sie dürfen auch während der Verarbeitung nicht geöffnet stehen gelassen werden um, ein mögliches Reagieren mit Luftbestandteilen zu vermeiden. Matrixbestandteile können auch dazu führen, dass die Analyten Melamin und Cyanursäure selbst nicht derivatisiert werden [23]. Daher ist die richtige Dosierung des Derivatisierungsmittels wichtig.

Eine weitere Fehlerquelle gerade in Hinsicht auf die Derivatisierung ist das Eindampfen. Bleiben nicht getrocknete Rückstände zurück, so reagiert das Derivatisierungsmittel zuerst mit dem Wasser und kann die Analyten nicht derivatisieren. Fett kann den Vorgang der Trocknung erschweren und ist vorher immer zu entfernen.

Beim Flüssigchromatographieren ist ein Derivatisieren nicht nötig [16]. Somit entfällt diese Fehlerquelle und Proben können problemloser analysiert werden. Auch aus Sicht des Arbeitsaufwands ist der Flüssigchromatograph als Analysegerät im Vorteil. Das Eindampfen (ca. 1,5 h bei 2 ml Matrixextrakt) und Derivatisieren (45 min) ist relativ zeitaufwändig und entfällt.

Fazit: Die Untersuchungen ergaben, dass der Gaschromatograph mit Tandemmassenspektrometrikopplung zum Nachweis von Melamin und Cyanursäure fähig ist. Die erhaltenen Erkenntnisse können zum weiteren Entwickeln einer Methode zur Analyse von Melamin und Cyanursäure in Futtermittel mittels Gaschromatographie beitragen. Nach dem derzeitigen Stand der Erkenntnisse sollte jedoch der Flüssigchromatograph mit Tandemmassenspektrometrikopplung zum verlässlichen Nachweis von Melamin und Cyanursäure eingesetzt werden.

## 4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Eignung des Gaschromatographen mit Tandemmassenspektrometriekopplung zur Analyse von Melamin und Cyanursäure durchgeführt.

Melamin wird hauptsächlich für die Herstellung von Kunststoffen genutzt und ist eine Verbindung, die einen hohen Stickstoffgehalt hat. Aus diesem Grund wird Melamin illegal unter Lebens- und Futtermittel gemischt, um deren nach Kjehldahl errechneten Proteingehalt zu erhöhen. In den Jahren 2007 und 2008 kam es zu zwei Skandalen, bei denen Menschen und Tiere durch melaminbelastete Lebens- und Futtermittel erkrankten und sogar verstarben. Um vor solchen Straftaten und deren Folgen für die Verbraucher zu schützen, wurden viele Methoden zum Nachweis von Melamin entwickelt. Kaum eine Methode berücksichtigte jedoch die Möglichkeiten von Melamin-Komplexen und deren genauer Analyse.

Für Flüssigchromatographen mit Tandemmassenspektrometriekopplung konnte bereits eine Methode entwickelt werden, die mit Hilfe einer pH-sauren Probenaufarbeitung den Komplex löst und somit den Komplex vollständig auf Melamin sowie dessen Strukturanaloga untersuchen kann.

Da der Gaschromatograph mit Tandemmassenspektrometriekopplung einen präziseren Nachweis ermöglicht, wird überprüft, ob sich dieses Gerät auch für die Analyse eignet.

Nachdem die basische Aufarbeitung der Proben zu Problemen führte, wurde neben der basischen auch die saure Probenaufarbeitung untersucht. Die Probenextrakte werden vor dem Eindampfen mit n-Hexan entfettet, um Schwierigkeiten beim Eindampfen zu vermeiden. Die optimale Extraktmenge zum Eindampfen beträgt nach den Versuchen 2 ml.

Zudem liefen Versuche zur Derivatisierung, die ergaben, dass BSTFA + 1% TCMS zusammen mit Acetonitril die besten Ergebnisse lieferten und deshalb weiter verwendet werden.

Auch wenn einige neue Erkenntnisse zur Methode gewonnen werden konnten, sollte derzeit noch der Flüssigchromatograph mit Tandemmassenspektrometriekopplung zum Nachweis von Melamin und Cyanursäure bevorzugt werden, da er verlässlichere Ergebnisse bringt.

## 5. Literaturverzeichnis

- [1] EFSA (2010): *Scientific Opinion on Melamin in Food and Feed*, EFSA Journal, Ausgabe 8(4): 1573, S. 1-145
- [2] Dorne J., Doerge D.R., Vandenbroeck M., Fink-Gremmels J., Mennes W., Kuntzen H.K., Vernazza F., Castle L., Edler L., Benford D. (2013): *Recent advances in the risk assessment of melamine and cyanuric acid in animal feed*, Toxicology and applied pharmacology, Jahrgang 270, Nr. 3, Seite 218-229
- [3] Osborne C., Lulich J., Ulrich L., Koehler L., Albasan H., Sauer L. and Schubert G. (2009): *Melamine and cyanuric acid-induced crystalluria, uroliths, and nephrotoxicity in dogs and cats*. Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice, 39, 1-14
- [4] Wang Y., Wei B., and Wang Q. (1990): *Crystal structure of melamine cyanuric acid complex (1:1) trihydrochloride, MCA·3HCl*, Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research, vol. 20, no. 1, pp. 79–84
- [5] Dobson R., Motlagh S., Quijano M., Cambron R., Baker T., Pullen A., Regg B., Bigalow-Kern A., Vennard T., Fix A., Reimschuessel R., Overmann G., Shan Y. and Daston G. (2008): *Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs*. Toxicological Sciences, 106, 251-262.
- [6] Bundesinstitut für Risikobewertung (2014): *Animal Feeding stuffs – Determination of melamine and cyanuric acid content by liquidchromatographic method with mass spectrometric detection (LC-MS/MS)*
- [7] von Heyermann H. (2013): *Untersuchungen zum Einfluss von Cyanursäure auf die Analyse von Melamin in Futtermitteln* (Bachelorarbeit)
- [8] Blau K., Halket J. M. (1994): *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Wiley, 2. Auflage

- [9] Oehme M. (1996): *Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen*, Hüthing Verlag Heidelberg
- [10] Chromacademy: Abbildung eines GC-MS/MS unter: <http://www.chromacademy.com/essential-guide/nov2010/fig-1.jpg> (abgerufen am 23.01.15)
- [11] Schröder E. (1991): *Massenspektrometrie*, Springer-Verlag
- [12] Wikipedia: Massenspektrometrie unter: <http://de.wikipedia.org/wiki/Massenspektrometrie#Quadrupol-Massenspektrometer> (abgerufen am 23.01.15)
- [13] Meyer V. R. (2006): *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*; Wiley-VCH 9. Auflage
- [14] Macherey-Nagel: Silylation with SILYL-991 (BSTFA + 1% TMCS) unter: [www.mn-net.com/tabid/10221/default.aspx](http://www.mn-net.com/tabid/10221/default.aspx) (abgerufen am 15.01.15)
- [15] Chemgapedia: Quantitative Bestimmung von Vitamin C unter: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/vitamin\\_c/quant\\_analytik.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/vitamin\\_c/4\\_quanti/4\\_3\\_methoden/4\\_3\\_4\\_chroma/4\\_3\\_4\\_1\\_gc/vertiefung/sily\\_m87ht0203.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/vitamin_c/quant_analytik.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/vitamin_c/4_quanti/4_3_methoden/4_3_4_chroma/4_3_4_1_gc/vertiefung/sily_m87ht0203.vscml.html) (abgerufen am 15.01.15)
- [16] Oellerking L. (2014): *Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Futtermittel*
- [17] Sigma-Aldrich Co.: BSTFA+ TMCS Product Specification unter: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Product\\_Information\\_Sheet/4747.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/4747.pdf) (abgerufen am 15.01.15)
- [18] Wikipedia: Kjeldahlsche Stickstoffbestimmung unter: [http://de.wikipedia.org/wiki/Kjeldahlsche\\_Stickstoffbestimmung](http://de.wikipedia.org/wiki/Kjeldahlsche_Stickstoffbestimmung) (abgerufen am 15.01.15)



[19] Wikipedia: Suchbegriff „Matrix“ unter: <http://de.wikipedia.org/wiki/Matrix>

[20] Macherey-Nagel: Derivatisierungsmittel für die GC unter: <http://www.mn-net.com/GCStart/Derivatization/tabid/5688/language/de-DE/Default.aspx>  
(abgerufen am 15.01.15)

[21] Veyrand B., Durand S., Marchand P., Antignac J.-P., Le Bizec B., Hancock P. (2009): *ANALYSIS OF MELAMINE AND ITS DEGRADATION PRODUCTS IN MILK-BASED PRODUCTS USING GC-MS/MS*, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ENVN), Nantes, France, Waters Corporation, Manchester, UK

[22] Battaglia M., Cruywagen C.W., Bertuzzi T., Gallo A., Moschini M., Piva G., Masoero F. (2010): *Transfer of melamine from feed to milk and from milk to cheese and whey in lactating dairy cows fed single oral doses*, Journal of Dairy Science Vol. 93 No. 11

[23] FDA (2008): *GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid* unter: <http://www.fda.gov/cvm/GCMSMelamine.htm> (abgerufen am 15.01.15)

[24] Oellerking L. (2014): *Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Futtermittel*

[25] Garber, E.A.E., (2008): *Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology*. J. Food Prot. 71, 590–594

[26] Garber, EA. & Brewer, VA. (2010): *Enzyme-linked immunosorbent assay detection of melamine in infant formula and wheat food products*; Journal of Food Protection. Vol.73, No.4, (April 2010), pp. 701-707

[27] Kim, B.; Perkins, LB.; Bushway, RJ.; Nesbit, S.; Fan, T.; Sheridan, R. & Greene, V. (2008): *Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array*

*detection, and ultra- performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*; Journal of AOAC International, Vol.91, No.2, (March 2008), pp. 408-413

[28] Laberca (2008): *Identification and quantification of melamine and its degradation compounds in food by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, LABERCA/08MEL-AI.7 Method

[29] Amzad Hossain M., Salehuddin S. M., Kabir M., Ali M. (2009): *Identification of melamine derivative in powdered milk samples by gas chromatography-mass spectrometry*, As. J. Food Ag-Ind. 2009, 2(02), 110-115

[30] Lorenz N., Fry H., Deventer A., Dinse D., Lochotzke H.-M., Hiller A., Mietle K., Preiss-Weigert A., Schafft H., Lahrssen-Wiederholt M. (2014): *Transfer von Melamin aus dem Futter in das Ei der Legehennen*, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Volume 9, Issue 4 , pp 345-357

[31] Ruderisch Dr. A. (2011): „Totgesagt leben länger“: Warum es trotz LC-MS/MS ohne die GC (doch) nicht geht...!?! unter: [http://www.lw-online.de/fileadmin/downloads/service\\_fachbeitraege/LWF\\_2012/LWF\\_2011\\_-\\_Vortrag\\_2\\_5\\_-\\_Ruderisch.pdf](http://www.lw-online.de/fileadmin/downloads/service_fachbeitraege/LWF_2012/LWF_2011_-_Vortrag_2_5_-_Ruderisch.pdf)

[32] VERORDNUNG (EU) Nr. 574/2011 DER KOMMISSION vom 16. Juni 2011 zur Änderung des Anhangs I der Richtlinie 2002/32/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Höchstgehalte für Nitrit, Melamin, Ambrosia spp. und der Verschleppung bestimmter Kokzidiostatika und Histomonostatika sowie zur Konsolidierung der Anhänge I und II derselben

[33] VERORDNUNG (EU) Nr. 284/2011 DER KOMMISSION vom 22. März 2011 mit besonderen Bedingungen und detaillierten Verfahren für die Einfuhr von Polyamid- und Melamin-Kunststoffküchenartikeln, deren Ursprung oder Herkunft die Volksrepublik China bzw. die Sonderverwaltungsregion Hongkong, China, ist

[34] MassHunter Workstation Software: Computerprogramm der Firma Agilent

## 6. Anhang

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel Melamin [2].....	5
Abb. 2: Ammelin (links) und Cyanursäure (rechts) [2] .....	5
Abb. 3: Strukturmodell des Melamin-Cyanursäure-Komplex nach Ostrogorich [4] .....	7
Abb. 4: schematische Darstellung eines GC-MS/MS [10].....	12
Abb. 5: Chromatogramm von Cyanursäure (oben) und <sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Cyanursäure (unten) [34].....	18
Abb. 6: Fließschema der Probenaufarbeitung.....	42

### 6.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Parameter des GC-MS/MS bei der verwendeten Methode .....	36
Tab. 2: GC-MS/MS-Parameter im MRM-Modus .....	37
Tab. 3: Verwendete Chemikalien .....	37
Tab. 4: Verwendete Standards .....	38
Tab. 5: Nähere Informationen zum Legehennenfutter .....	38
Tab. 6: Verwendete Geräte .....	39
Tab. 7: Standardlösungen, Konzentrationen, Herstellung und Haltbarkeiten ...	40
Tab. 8: Beispiel - Pipettierschema für Matrixkalibrierung .....	41
Tab. 9: Durchgeführte Versuche im Überblick .....	43

### 6.3. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 1: Parameter des GC-MS/MS bei der verwendeten Methode

Bezeichnung	Parameter
Gerät	GC/MS Triple Quad - Agilent 7000 mit Autosampler – MPS Gerstel
GC-Säule	2x DB 5: 2 x 15 m x 250 µm x 25 µm mit Backflushsystem (unpolare Säule)
Ionenquelle	EI – Elektronenstoß-Ionisation
Injektormodus	Pulsed Splitless
Injektionsvolumen	1,0 µl
Injektortemperatur	280 °C
Liner	einseitig verjüngt, silanisiert, mit Glaswolle gefüllt
Fluss der ersten Säule	1,3 ml/ min
Fluss der zweiten Säule	1,4 ml/ min
Trärgas	Stickstoff
Quenchgas	Helium
Temperatur der Transferline	300 °C
Ofenprogramm	75 °C für 1 min; mit 10°C/ min bis 130 °C 1 min halten; mit 30°C/ min bis 275°C Post Run: 300°C für 5 min
Temperatur der Ionenquelle	230 °C
Temperatur des ersten Quadrupols (Q1)	150 °C
Temperatur des zweiten Quadrupols (Q3)	150 °C

Tab. 2: GC-MS/MS-Parameter im MRM-Modus

<b>Analyt</b>	<b>Retentionszeit ca. in min</b>	<b>Ionenübergänge (m/z)</b>		<b>Kollisions- energie</b>
<b>Melamin-tri- TMS-Derivat</b>	11,3	342 → 327	342 → 285 327 → 171	14 20 21
<b>Melamin-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>- tri-Tms- Derivat</b>		345 → 330	330 → 172	13 24
<b>Cyanursäure- tri-TMS- Derivat</b>	10,1	330 → 215	345 → 188 345 → 214	2 10 6
<b>Cyanursäure- <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-tri-Tms- Derivat</b>		333 → 217	348 → 217	2 6

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril (ACN) Reinheitsgrad LCMS	75-05-8	Merck
Aceton	67-64-1	Merck
BST	152571-61-4	Sigma Aldrich
BSTFA (1% TMCS)	25561-30-2	Sigma Aldrich
Cyclohexan	110-82-7	Merck
Diethylamin (DEA)	109-89-7	Sigma Aldrich
iso-Octan	540-84-1	Merck
Methanol (MeOH)	67-56-1	Merck
MSTFA	24589-78-4	Sigma Aldrich
n-Hexan	110-54-2	LGC Standards
Trichloressigsäure (TCA)	25561-30-2	Sigma Aldrich
Reinstwasser (TOC ≤ 2mg/l, Widerstand ≥ 18,2 MΩ)	/	/

Tab. 4: Verwendete Standards

<b>Substanz</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
Melamin	108-78-1	Sigma Aldrich
<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Melamin	1173022-88-2	Witega
Cyanursäure	108-80-5	Sigma Aldrich
<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Cyanursäure	201996-37-4	Witega

Tab. 5: Nähere Informationen zum Legehennenfutter

<i>Analytische Bestandteile</i>	Rohprotein (16,3%), Rohasche (14%), Rohfett (4,4%), Calcium (3,5%), Rohfaser (3,1%), Lysin (0,76%), Phosphor (0,4%), Methionin (0,38%)
<i>Zusatzstoffe</i>	Ernährungsphysiologisch: Vitamine A, D3, E; Kupfer; Eisen; Zink; Mangan; Kobalt; Jod; Selen verdaulichkeitsfördernd: 500FTU 3_phytase Konservierungsstoffe: Ameisensäure, Milchsäure, Propionsäure Farbstoff: Canthaxanthin

Tab. 6: Verwendete Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Präzisionswaage, d=1mg (LA 1200 S)	Sartorius
Centrifuge Tubes (50 ml)	VWR
Ultraschallbad (RK 514 H)	Bandelin/ Sonorex
Überkopfschüttler (Reax 2)	Heidolph
Laborzentrifuge (Heraeus Megafuge 40R)	Thermo Scientific
Kolbenhubpipetten (Reference, verschiedene Größen)	Eppendorf
Multipipette (M4)	Eppendorf
Dispenser (Varipenser plus)	Eppendorf
Vortex (Genie-2T)	Scientific Industries
Safe-Lock-Tubes 1,5 ml/ 2 ml	Eppendorf
Eppendorf-Zentrifuge (5417R)	Eppendorf
Vials (Flasche R1 klar/6mm)	CS
Bördekappen, rot (11mm, PTFE/Rubber TF2 Septum)	Agilent
Reinstwasseranlage (Milli-Q Reference A+)	Millipore
Eindampfstation mit Stickstoffanschluss (vapotherm)	Barkey
Trockenschrank (T 6060)	Heraeus Instruments
Glasvials (Flasche R1 klar/ 6 mm)	Chromatographie Service
GC-MS/MS (7000 GC/MS Triple Quad)	Agilent
GC-MSD 1 (xxx)	Agilent

Tab. 7: Standardlösungen, Konzentrationen, Herstellung und Haltbarkeiten

Bezeichnung	Konzentration	Herstellung	Haltbarkeit
S 0-Lösung (Stammlösung)	1,0 mg/ml 1000 µg/ml 1000 ng/µl	10 mg Standardsubstanz in 10 ml Lösungsmittel (80% Reinstwasser + 20% Diethylamin)*	2 Jahre
S 1	0,1 mg/ml 100 µg/ml 100 ng/µl	1ml S0-Lösung in 10 ml Reinstwasser	1 Jahr
S 2	0,01 mg/ml 10 µg/ml 10 ng/µl	1ml S1-Lösung in 10 ml Reinstwasser	1 Jahr
S 3	0,001 mg/ml 1 µg/ml 1 ng/µl	1ml S2-Lösung in 10 ml Reinstwasser	1 Jahr
S 4	0,0001 mg/ml 0,1 µg/ml 0,1 ng/µl	1ml S3-Lösung in 10 ml Reinstwasser	6 Monate
S 5	0,00001 mg/ml 0,01 µg/ml 0,01 ng/µl 10 ng/ml	1ml S4-Lösung in 10 ml Reinstwasser	6 Monate



Tab. 8: Beispiel - Pipettierschema für Matrixkalibrierung

		Zugabe in 10 ml		
<b>Matrix-Kali zu Null- Extrakt in 10 ml</b>	<b>entspricht [mg/kg] Cya / Mel</b>	<b>S3 Standard Zugabe jeweils [µl]</b>	<b>S3 Interner Standard <sup>13</sup>C<sub>3</sub> jeweils [µl]</b>	<b>GC-MS/MS Gehalt in Inj.Vial [pg/µl]</b>
MK_0	0	0	50	0
MK_1	0,63	25 S3	50	50
MK_2	0,94	38 S3	50	75
MK_3	1,25	50 S3	50	100
MK_4	1,56	63 S3	50	125
MK_5	1,87	75 S3	50	150
MK_6	2,17	87 S3	50	175
MK_7	2,50	100 S3	50	200

## Flussdiagramm

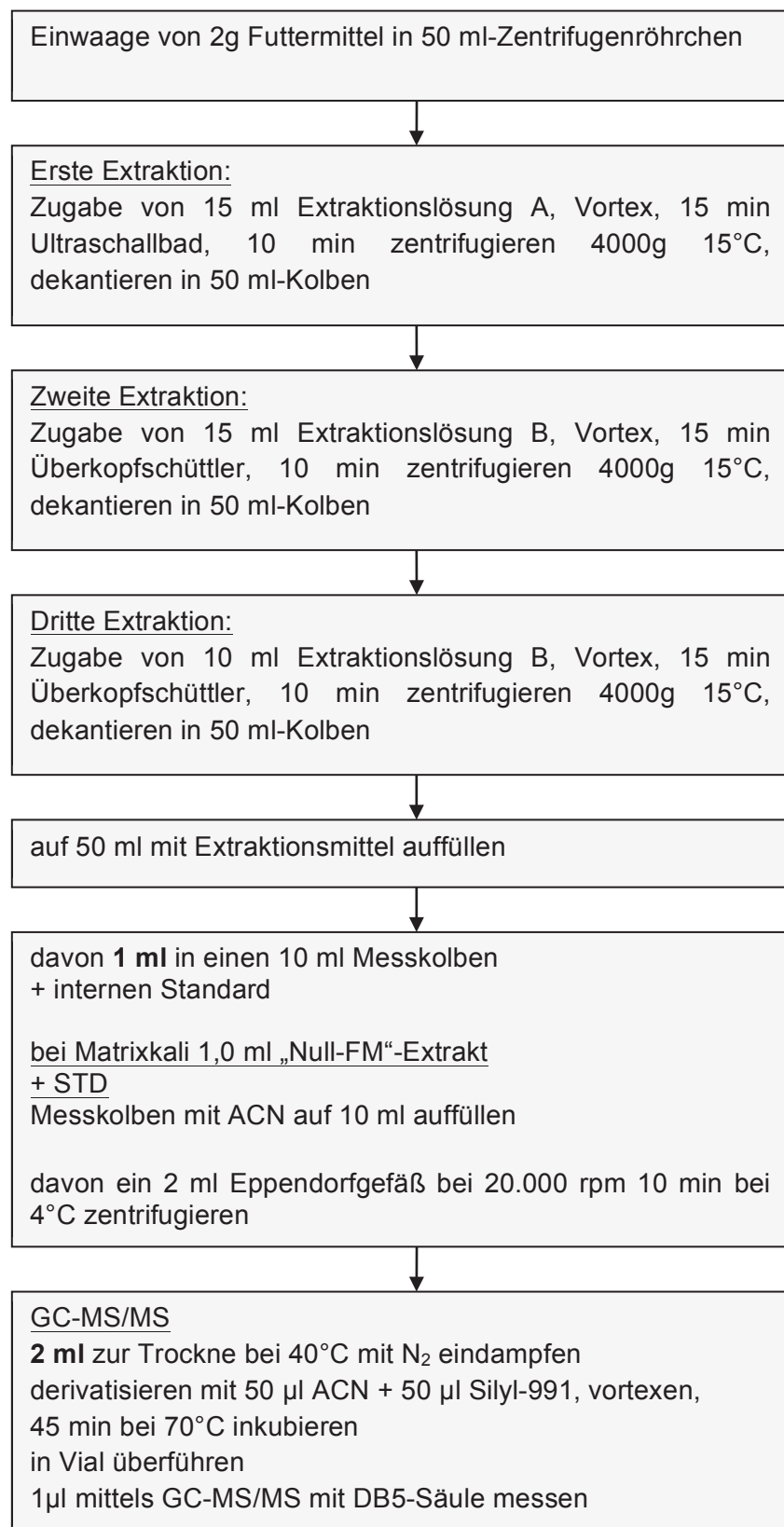


Abb. 6: Fließschema der Probenaufarbeitung

Extraktionslösung A: 2 g TCA + 15 ml (Reinstwasser + ACN (3+1))

Extraktionslösung B: Reinstwasser + ACN (3+1)

Tab. 9: Durchgeführte Versuche im Überblick

Ver-suche	Ziel der Untersuchung	Durchführung	Ergebnis	Bemerkungen
1	Vergleich von Analyse mit Gas-chromatographen und Flüssig-chromatographen	Extrakt, der von LC-Messungen eingelagert war wird für den GC aufgearbeitet, Analyseergebnisse werden verglichen	die Werte der LC- und GC-Messung unterschieden sich kaum von einander, GC-Messung ist zur Analyse von Melamin und Cyanursäure fähig	LC-Ergebnisse wurden während einer älteren Versuchsreihe ermittelt
2	Einfluss des Eindampfens auf Analysierbarkeit	1ml/2 ml gelagerter Futtermittelextrakt wird bis zur Trockne, 10 weitere Minuten nach der Trockne eingedampft	Längeres Eindampfen hat keinen Effekt auf die Analysierbarkeit der Proben. 1 ml Extrakt führt zu kleineren Peakflächen und einem geringerem Analytgehalt, somit sollte 2 ml Extrakt zur Analyse eingedampft werden.	Umso mehr Matrix auf die Säule gegeben wird, desto mehr verschmutzt diese
3	Einfluss der Extraktmenge beim Eindampfen auf die Analysierbarkeit	0,5 ml/1 ml eingelagerter Futtermittelextrakt wird eingedampft, derivatisiert, analysiert	Der Gehalt an Melamin und Cyanursäure der Proben, für die 1 ml Extrakt eingedampft wurde, war höher als der Gehalt der Proben für die nur 0,5 ml eingedampft wurde. Deshalb sollte besser mehr Extrakt eingedampft werden.	wird weniger Extrakt eingedampft, so kommt später weniger Matrix auf die Säule und schützt somit vor verschmutzen der Säule
4	Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Melamin und Cyanursäure in Legehennenfutter soll an GC ermittelt werden	2g Futtermittel wird laut Methode aufgearbeitet und eine Matrixkalibration im Bereich von 0,0625-0,25 mg/kg (= 5,0-20,0 pg/µl im Vial) erstellt	Versuch erbrachte keine brauchbaren Ergebnisse. Proben konnten nicht ausgewertet werden, da im Chromatogramm keine Peaks zu sehen waren. Kontrollprobe Mix 85 S5 war jedoch sichtbar.	Der Versuch wird in Versuch 5 noch einmal mit einer höheren Standard-Konzentration wiederholt
5	Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Melamin und Cyanursäure in Legehennenfutter soll an GC ermittelt werden	2g Futtermittel wird laut Methode aufgearbeitet und eine Matrixkalibration im Bereich von 0,625-2,5 mg/kg (= 50,0-200,0 pg/µl im Vial) erstellt	Versuch erbrachte keine brauchbaren Ergebnisse. Proben konnten nicht ausgewertet werden, da im Chromatogramm keine Peaks zu sehen waren. Kontrollprobe Mix 85 S5 war jedoch sichtbar.	Über Nacht fällt ein weißer Niederschlag in den Extrakten aus, es wird vermutet, dass er für die erfolglose Messung verantwortlich sein könnte
6	Vergleich der Analysierbarkeit von eingelagertem Futtermittelextrakt aus LC-Versuchen mit frisch aufgearbeitetem Futtermittelextrakt	Extrakt aus Versuch 5 und eingelagerter Extrakt aus dem Kühlschrank wird mit GC -MS/MS analysiert	Versuch war wieder erfolglos. Es konnten keine Proben analysiert werden bzw. es war bei keiner Probe ein Peak erkennbar.	Es wird vermutet, dass das Derivatisierungsmittel mit Wasser in Kontakt gekommen ist und somit seine Wirkung verloren hat und die Proben nicht analysiert werden können.

7	Testen der Wirksamkeit des geöffneten Derivatisierungsmittels und den Einfluss von Pyridin als Lösungsmittel bei der Zugabe vor der Messung	Die Kontrollsubstanz Mix 85 S5 (500 µl eindampfen) wird derivatisiert mit dem bereits geöffneten Derivatisierungsmittel sowie mit einem Derivatisierungsmittel aus einer neuen Verpackung. Zudem wird getestet, ob die Derivatisierung mit Hilfe von 50 µl Pyridin besser funktioniert (wird zusammen mit Silyl-991 zugegeben).	Alle Proben können analysiert werden, jedoch sind nur die Melamin-Peaks sichtbar. Somit hat das geöffnete Derivatisierungsmittel seine Wirkung nicht verloren und Pyridin kann die Wirksamkeit nicht verbessern.	
8	Vergleich der Wirksamkeit von verschiedenen Derivatisierungsmitteln	Die Kontrollsubstanz Mix 85 S5 (500 µl) wird eingedampft und mit verschiedenen Varianten derivatisiert. (1) 100 µl Silyl-991 + 100 µl ACN zugeben und bei 90°C für 60 min. inkubieren (2) 100 µl Silyl-991 + 100 µl Pyridin zugeben und bei 70°C für 60 min. inkubieren (3) 200 µl MSTFA + 800 µl ACN zugeben und bei 70°C für 60 min. inkubieren (4) 100 µl BSA + 100 µl Pyridin zugeben und bei 70°C für 20 min. inkubieren. Zusätzlich werden die Proben aus Versuch 7 nochmal gemessen.	Varianten 1, 2 und 4 führten zu einer erfolgreichen Messung, zudem konnten nun auch die Proben aus Versuch 7 analysiert werden (Melamin und Cyanursäure sichtbar)	Um eine Verursachung der Phänomene durch ein Problem des Geräts auszuschließen, wurde eine Wartung durchgeführt
9	Funktionsfähigkeit des GC-MS/MS testen	Proben aus Versuch 7 und 8 werden nochmal analysiert	Die Peaks haben ca. die 8-fache Größe wie vor der Wartung. Die Proben aus Versuch 7 waren wiederum analysierbar. Die Proben aus Versuch 8 zeigten allesamt keine Cyanursäurepeaks. Nur Variante 2 führte zu Melamin-Peaks	

10	Vergleich von Standardkalibration und Matrixkalibration, Testen des Einflusses von Entfetten, um einen Defekt des GC-MS/MS auszuschließen werden die Proben zudem am GC-MSD analysiert	Herstellen einer Standard- und Matrixkalibration im Bereich von 0,5-14,5 mg/kg (= 40-1160 pg/µl im Vial). Entfetten von 2 ml Extrakt der Matrixkalibration, nachdem er in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert wurde. Dazu werden die 2 ml Extrakt mit 2 ml n-Hexan versetzt, geschüttelt, 10 Minuten bei 250xg und 4°C zentrifugiert und anschließend die obere Phase abgenommen. Dieser Arbeitsschritt wird wiederholt und anschließend 1 ml vom entfetteten Extrakt eingetrocknet und derivatisiert. Zum Vergleich wird ebenfalls nicht entfetteter Matrixextrakt untersucht.	GC-MS/MS – nur die Proben der Standardkalibration konnten analysiert werden  GC-MSD – nur Melamin der Standardkalibration konnte analysiert werden Da an GC-MS ebenfalls kein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht werden konnte, wird mit diesem Gerät nicht weiter gearbeitet	
11	Vergleich verschiedener Derivatisierungsvariationen mit Silyl-991	bereits vorhandener Extrakt wird mit (1) 100 µl Silyl-991 + 100 µl ACN (2) 100 µl Silyl-991 + 100 µl Pyridin (3) 100 µl Silyl-991 + 50 µl ACN + 50 µl Pyridin (4) 50 µl Silyl-991 + 50 µl ACN (5) 50 µl Silyl-991 + 50 µl Pyridin (6) 50 µl Silyl-991 + 25 µl ACN + 25 µl Pyridin (7) 100 µl Silyl-991 + 100 µl ACN, extrahieren in 200 µl n-Hexan derivatisiert	Alle Proben konnten analysiert werden, die größten Peakflächen waren bei Variante 4 erkennbar und wird auch weiterhin zum Derivatisieren genutzt	
12	Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Melamin und Cyanursäure in Legehennenfutter soll an GC ermittelt werden	2g Futtermittel wird laut Methode aufgearbeitet und eine Matrixkalibration im Bereich von 0,625-2,5 mg/kg (= 50,0-200,0 pg/µl im Vial) erstellt	Proben konnten nicht analysiert werden	

13		Versuch 12 wird wiederholt und Probe 4 von Versuch 11 gegenübergestellt	Proben der Matrixkalibration können wieder nicht werden. Probe 4 aus Versuch 11 kann analysiert werden.	Während der Aufarbeitung lassen sich Extrakte schlecht eindampfen. Teilweise bleibt gelartiger hellgelber Bodensatz im Reagenzglas zurück, lässt sich nicht trocknen. Vermutung: es ist Fett, Versuche nur mit entfetteten Extrakten durchgeführt
14	Untersuchen der Wirkung des Entfetten des Extraktes auf die Messbarkeit der Proben	Es werden 2 ml des Extrakts aus Versuch 12 in zwei Stufen mit 2 ml n-Hexan entfettet, eingedampft und derivatisiert	Proben können analysiert werden. Entfetten wirkt sich positiv auf die Analysierbarkeit aus und wird daher in die Methode als Arbeitsschritt aufgenommen.	In den Extrakten aus den 10 ml Kolben setzt sich nach ca. einem Tag ein weißer Niederschlag ab
15	Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Melamin und Cyanursäure in Legehennenfutter soll an GC ermittelt werden, Vergleichend wird eine Standardkalibration durchgeführt	Futtermittel (Legehennenfutter) wird in 3 Extraktionsschritten aufgearbeitet (Extraktionsmittel: H <sub>2</sub> O + ACN [3+1] + 2 g Trichloressigsäure). Eine Matrix- und Standardkalibration wird im Bereich von 0,625-2,5 mg/kg (= 50,0-200,0 pg/µl im Vial) erstellt. Es werden 2 ml des Matrixextrakts in zwei Stufen mit 2 ml n-Hexan entfettet, eingedampft und derivatisiert	Die Matrixkalibration kann nicht analysiert werden, die Standardkalibration hingegen schon.	Nachdem die Matrixextrakte am Tag der Aufarbeitung nicht eingetrocknet werden konnten, bleiben sie über Nacht (ca. 12h) stehen. Es setzt sich der in Versuch 5 bereits erwähnte Niederschlag ab. Am nächsten Tag trocknen sie normal und können analysiert werden. Es wird vermutet, dass der nach einem Tag entstandene weiße Niederschlag etwas mit dem Analyseverhalten der Matrixproben zu tun hat, deshalb wird über weitere Aufreinigungsschritte nachgedacht
16	Testen des Einflusses verschiedener Aufreinigungsvarianten der Probenextrakte auf die Analysierbarkeit	Die Probenextrakte aus Versuch 15 werden unterschiedlich aufgearbeitet (1) zentrifugiert in Filtereppendorfgefäßen (2) normal eingedampft (3) nach dem Derivatisieren in n-Hexan extrahiert	Alle Proben können analysiert werden. Die größten Peakflächen lassen sich bei der normalen Aufarbeitung ohne zusätzliches filtern oder extrahieren finden.	

17	Testen des Einflusses der Zeit auf die Analysierbarkeit der Proben	Futtermittel (Legehennenfutter) wird in 3 Extraktionsschritten aufgearbeitet (Extraktionsmittel: H <sub>2</sub> O + ACN [3+1] + 2 g Trichloressigsäure). Eine Matrixkalibration wird im Bereich von 0,625-2,5 mg/kg (= 50,0-200,0 pg/μl im Vial) erstellt. Die Extrakte werden nach 0, 24h, 48h, und 120h Ruhezeit derivatisiert und anschließend analysiert	0 h – Proben können nicht analysiert werden (außer Kontrollprobe Mix 85 S5), 24h – Proben können nicht analysiert werden (außer Kontrollprobe Mix 85 S5), 48h – Proben können analysiert werden, Melamin bildet eine schöne Kalibrationsgerade wie in Abbildung 8 zu sehen (R <sup>2</sup> = 0,991) 120h - Proben können analysiert werden, Melamin und Cyanursäure bilden jeweils schöne Kalibrationsgeraden (R <sup>2</sup> = Melamin 0,993; R <sup>2</sup> = Cyanursäure 0,985)	R <sup>2</sup> = Bestimmtheitsmaß sagt aus, wie stark die Punkte von der Regressionsgeraden abweichen (0 = keine Übereinstimmung, 1 = komplette Übereinstimmung) Während der fortschreitenden Ruhezeit ist zu erkennen, dass sich ein weißer Niederschlag bildet, der sich am Boden absetzt. Mit der Zeit nimmt dieser deutlich zu. Mit der Bildung dieses Bodensatzes nimmt auch die Messbarkeit zu
18	Testen der basischen Probenaufarbeitung mit DEA im Vergleich zur sauren mit TCA	Futtermittel (Legehennenfutter) wird in 3 Extraktionsschritten aufgearbeitet (Extraktionsmittel: H <sub>2</sub> O + ACN [3+1] + 2 g Trichloressigsäure bzw. 0,5 ml Diethylamin). Eine Matrixkalibration wird im Bereich von 0,625-2,5 mg/kg (= 50,0-200,0 pg/μl im Vial) erstellt	TCA: Proben können nicht analysiert werden (außer Melamin bei Probe 1, 2, 3) DEA: Melamin kann bei allen Proben analysiert werden Cyanursäure kann bei MK_0, MK_1, MK_4, MK_6, MK_7, Probe 1,2,3 analysiert werden	
19	Testen der basischen Probenaufarbeitung mit DEA im Vergleich zur sauren mit TCA und Einfluss der Zeit auf die Analysierbarkeit der Proben	Futtermittel (Legehennenfutter) wird in 3 Extraktionsschritten aufgearbeitet (Extraktionsmittel: H <sub>2</sub> O + ACN [3+1] + 2 g Trichloressigsäure bzw. 0,5 ml Diethylamin). Eine Matrixkalibration wird im Bereich von 0,625-2,5 mg/kg (= 50,0-200,0 pg/μl im Vial) erstellt. Die Extrakte werden nach 0h, 24h und 120h Ruhezeit derivatisiert und anschließend analysiert	0h: TCA – Analyse ergibt keine Ergebnisse DEA – Melamin bildet eine schöne Kalibrationsgerade (R <sup>2</sup> = 0,9997) Cyanursäure lässt sich zwar nachweisen, jedoch nicht als Gerade 24h: TCA – Analyse ergibt keine Ergebnisse DEA – Melamin bildet eine schöne Kalibrationsgerade (R <sup>2</sup> = 0,995) Cyanursäure lässt sich zwar nachweisen, jedoch nicht als Gerade 48h: TCA – Melamin und Cyanursäure bilden jeweils eine schöne Kalibrationsgerade (Mel: R <sup>2</sup> = 0,998), (Cya: R <sup>2</sup> = 0,903) DEA - Melamin bildet eine schöne Kalibrationsgerade (R <sup>2</sup> = 0,995) Cyanursäure lässt sich zwar nachweisen, jedoch nicht als Gerade	Die Aufarbeitung mit DEA und TCA unterscheidet sich vor allem durch das Verhalten der Extrakte im 10 ml Kolben im Laufe der Zeit. Während in den TCA-Probenextrakten immer mehr weißer Niederschlag ausfällt und einen Bodensatz bildet, bleibt der DEA-Extrakt klar.

### 6.3. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BSA	N,O-Bis-trimethylsilyl-acetamid
BSTFA	N,O-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid
CAS-Nr.	Chemical Abstracts Service-Nummer
Cya	Cyanursäure
DEA	Diethylamin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GC	Gaschromatograph
GC-MSD	Gaschromatograph mit Massenspektrometrikopplung
GC-MS/MS	Gaschromatograph mit Tandemmassenspektrometrikopplung
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatograph (high performance liquid chromatography)
LC	Flüssigchromatograph
LC-MS/MS	Flüssigchromatograph mit Tandemmassenspektrometrikopplung
Mel	Melamin
MS	Massenspektrometer
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
TCA	Trichloressigsäure (trichloricacid)
TMCS	Trimethylchlorsilan
RPM	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)



## Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 20.03.2015

.....

Unterschrift des Verfassers

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlich allen Personen danken, die mich während meiner Arbeit unterstützt und zum Verfassen beigetragen haben.

Den Mitarbeitern des Instituts für Risikobewertung Abteilung 82 danke ich für die Betreuung meiner Bachelorarbeit, vor allem für die uneingeschränkte Nutzung der Labore sowie aller Materialien, die umfangreiche Unterstützung während der Durchführung meiner Versuche; die Denkanstöße zur Weiterführung der Versuchsreihen und das gute Arbeitsklima, was die Zeit hier wie im Flug vergehen ließ.

Ich danke zudem für das Vertrauen, das mir und meiner Arbeit entgegengebracht wurde. Ich lernte dabei selbstständig zu arbeiten und konnte mir viele Dinge aneignen, die mich auch für zukünftige Arbeiten weiter bringen werden.

Mein Dank geht dabei vor allem an Hildburg Fry, Kerstin Mietle, Eileen Mähnert, Sebastian Zinke, Mandy Schwieters und Martin Clare. Außerdem danke ich der Praktikantin Lisa Kasprik.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir das Studium ermöglicht hat und während dieser Zeit eine große Stütze war.