

Projectnummer: 971.578.19  
BAS-code: WOT-02-438-IV-016  
Projecttitel: VWA Nationaal Plan diervoeders  
  
Projectleider: H.J. van Egmond

## BRIEFRAPPORT

Rapport 2009.101

januari 2009

# **Melamine in sojaschilfers**

## oorzaak van verschillen tussen laboratoria

J.G.J. Mol, H.J. van Egmond, J. de Jong

**RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid**  
Wageningen Universiteit en Researchcentrum  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Tel 0317 480 256  
Fax 0317 417 717  
Internet [www.rikilt.wur.nl](http://www.rikilt.wur.nl)

## **Copyright 2009, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.**

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

Het onderzoek beschreven in dit rapport is uitgevoerd in opdracht van de Voedsel- en Waren Autoriteit en gefinancierd door: LNV, programma 438-IV, WOT-diervoerders.

### **Verzendlijst**

- Voedsel en Waren Autoriteit, Centrale Eenheid (VWA): mr.dr.s. R.G. Herbes.
- Voedsel en Waren Autoriteit, Team Diervoerders (VWA): drs. E. Olde Heuvel.
- Voedsel en Waren Autoriteit, Noord-West (VWA): drs. G.M. van der Horst, dr. H.A. van der Schee.
- Voedsel en Waren Autoriteit, Bureau Risicobeoordeling (VWA): dr. M.J.B. Mengelers.
- Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, directie Voedselkwaliteit en Diergezondheid (LNV-VD): drs. E.R. Deckers.
- Europese Commissie, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (EC, JRC-IRMM): A. Breidbach.

Bij de totstandkoming van dit rapport is de grootst mogelijke zorgvuldigheid betracht. Tenzij vooraf schriftelijk anders overeengekomen aanvaardt RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid geen aansprakelijkheid voor schadeclaims die worden uitgebracht n.a.v. de inhoud van dit rapport.

## Samenvatting

In november 2008 is door het bedrijfsleven in een tweetal partijen diervoedergrondstoffen (sojaschilfers/-meel) melamine aangetroffen op niveaus tussen 40 en 800 mg/kg. Naar aanleiding hiervan heeft de VWA aan RIKILT verzocht om deze monsters (genomen door het bedrijfsleven) te analyseren op melamine en daarnaast, ten behoeve van de risicobeoordeling, op de hydrolyseproducten ammeline, ammelide en cyanuurzuur.

De aangeleverde monsters waren eerder door twee laboratoria onderzocht op melamine. De analyseresultaten van RIKILT en de twee andere laboratoria gaven grote verschillen te zien. Er werd respectievelijk 60, 800 en 2400 mg/kg in het eerste en 11, 43 en 123 mg/kg in het tweede monster gerapporteerd, waarbij door RIKILT de hoogste waarden werden gevonden. Hierop is door RIKILT op verzoek van de VWA een onderzoek gestart naar de oorzaak van deze verschillen. Daaruit is gebleken dat de extractieprocedure, met name bij hoog gecontamineerde monsters, sterk van invloed kan zijn op het gemeten gehalte. Dit wordt veroorzaakt door beperkingen in de oplosbaarheid van melamine-cyanuraat in het monster dan wel van melamine in aanwezigheid van cyanuurzuur in het extract. Hierop hebben de twee laboratoria hun extractieprocedure aangepast en het hoogst gecontamineerde monster opnieuw geanalyseerd waarbij voor melamine gehalten van 1100 tot 3700 mg/kg werden gevonden.

Het onderzoek toont aan dat er bij de analyse van diervoeder/-grondstoffen een risico bestaat op onderschatting van het melamine gehalte. Of dit daadwerkelijk zo is, hangt samen met de vorm van de melamine contaminatie. Het maakt uit of het product alleen melamine bevat, of zowel melamine als cyanuurzuur, of melamine-cyanuraat. Met name in geval van de laatste twee vormen van contaminatie kan de gebruikte extractiemethode van grote invloed zijn op het analyseresultaat.



# 1 Aanleiding

In november 2008 is, door het bedrijfsleven, bij ingangscntrole van een tweetal partijen diervoedergrondstof, omschreven als sojaschilfers, melamine aangetroffen. Er werden gehalten gerapporteerd op niveaus tussen 40 en 800 mg melamine/kg product. Deze gehalten liggen ver boven de afkeurgrens van 2,5 mg/kg zoals gesteld in beschikking 2008/798/EG [1].

Op basis van de aangetroffen gehalten is door VWA aan het bedrijfsleven gevraagd om de de positieve sojaschilfer-monsters naar het RIKILT te sturen. De VWA heeft RIKILT verzocht om de monsters te onderzoeken op melamine en daarnaast, ten behoeve van de risicobeoordeling, op de hydrolyseproducten ammeline, ammelide en cyanuurzuur. De monsters zijn genomen door het bedrijfsleven.

De resultaten van de analyse van de monsters zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1 Overzicht analyseresultaten drie laboratoria.

	monstercode	0843089-02	0842258-01
	omschrijving	Biosojaschilfers (volgens opgave hoog melamine, tussen 60 en 800 ppm)	Biosojaschilfers (volgens opgave melamine ca. 40 ppm)
		gehalte in mg/kg product	
<b>Lab A</b>	<b>melamine</b>	<b>60</b>	<b>11</b>
<b>Lab B</b>	<b>melamine</b>	<b>797</b>	<b>43</b>
<b>RIKILT</b>	<b>melamine</b>	<b>2400</b>	<b>123</b>
RIKILT	cyanuurzuur	1110	80
RIKILT	ammeline	620	39
RIKILT	ammelide	1280	41

Uit Tabel 1 blijkt dat er grote verschillen zijn in de gerapporteerde gehalten voor melamine tussen de drie laboratoria. Hoewel het duidelijk is dat de betreffende partijen de norm ver overschrijden, zijn juiste waarden nodig ten behoeve van rapportage naar de Europese Commissie en risicobeoordeling. VWA heeft om deze reden RIKILT verzocht nader onderzoek te doen naar de oorzaak van deze verschillen om zo goed mogelijk de werkelijke gehalten vast te kunnen stellen.

## 2 Werkwijze

Verschillen in analyseresultaten tussen monsters genomen uit een partij diervoedergrondstof kunnen worden veroorzaakt door

- inhomogeniteit binnen een partij (monstername)
- verschillen in monstervoorbewerking en analyse (laboratorium).

In eerste instantie is er van uitgegaan dat monstername volgens de geldende richtlijnen is gebeurd, en dat de aangeleverde monsters aan de laboratoria representatief waren voor de betreffende partijen. Om deze reden heeft het onderzoek zich gericht op de gehanteerde procedures in de analyselaboratoria.

Door RIKILT is in eerste instantie via e-mail navraag gedaan bij de laboratoria over de gehanteerde analysemethoden. De door laboratoria aangegeven referenties zijn geëvalueerd. Daarnaast is een beperkte aanvullende evaluatie van in de literatuur beschreven methoden gedaan. Vervolgens is via e-mail en telefonisch meer gedetailleerde informatie opgevraagd.

Op basis van de verkregen informatie werden een aantal mogelijke oorzaken gevonden. Deze verklaringen zijn door experimenteel onderzoek door RIKILT aan de hand van het hoogst gecontamineerde monster geverifieerd.

## 3 Resultaten

### 3.1 Inventarisatie gebruikte analysemethoden

Voor alle drie de laboratoria geldt dat de methoden beperkt waren gevalideerd en niet waren geaccrediteerd. In Annex I is een overzicht gegeven van de gebruikte analysemethoden door de drie laboratoria.

In eerste instantie gaf laboratorium A aan dat gebruik werd gemaakt van FDA methode No 4396 [2]. Deze methode beschrijft de bepaling van melamine in vis op laag niveau. Bij navraag bleek dat het laboratorium in feite slechts enkele onderdelen van de beschreven procedure volgde. Relevante aspecten van de werkelijk gehanteerde procedure zijn vermeld in Annex I.

Laboratorium B gaf aan dat gebruikt werd gemaakt van een methode "die later is uitgebracht" als FDA methode No 4396 [2], dezelfde als aangegeven door laboratorium A. Ook hier bleek bij navraag dat in feite een eigen methode werd gebruikt die een aantal onderdelen bevatte van de aangegeven methode.

De methode gebruikt door RIKILT betrof een update van de methode voor de analyse van diervoer/ingrediënten welke was geïmplementeerd in 2007 [3]. Ook hier gaat het om een FDA methode, No 4423 [4]. De methode werd grotendeels uitgevoerd zoals beschreven in [4]. De afwijkingen zijn beschreven in Annex I.

### 3.2 Mogelijke oorzaken voor verschillen in methoden

#### 3.2.1 *Monstervoorbehandeling*

Alle drie de laboratoria malen het aangeleverde monster (doorgaans enkele honderden grammen) tot < 1 mm, waarna een submonster wordt genomen, variërend van 1 tot 10 gram, waarop de feitelijke analyse plaats vindt. Een zeer inhomogene verdeling van melamine (/gerelateerde producten) in het monster zou aanleiding kunnen geven tot spreiding in meetresultaten. Bij microscopisch onderzoek door RIKILT zijn kristallen aangetroffen (zie voetnoot <sup>1</sup>). Ook laboratorium A maakte melding van witte

---

<sup>1</sup> "Het product sojaschilfers bevat sporen van product-vreemde bestanddelen. De volgende bestanddelen zijn in lage concentraties aangetroffen (in afnemende volgorde): amorfe kristallen, zetmeel en haren van granen (vermoedelijk gerst), zetmeel van rijst, en vezels. De amorfe kristallen kunnen onderscheiden worden van de

deeltjes in het monster. Herhaalde analyse van het gemalen monster door RIKILT toont echter aan dat malen tot <1 mm toereikend is om submonsters van 1 gram te nemen voor verdere bewerking. De verschillen in de hoeveelheid in bewerking genomen monster kunnen de gevonden verschillen in analyse resultaten dus niet verklaren.

### 3.2.2 *Extractie*

De extractiemiddelen en de verhouding van de hoeveelheid monster ten opzichte van de hoeveelheid extractievloeistof verschillen voor elk van de laboratoria. Laboratorium A en B gebruiken mengsels water/acetonitril, al dan niet aangezuurd, RIKILT gebruikt een mengsel van diethylamine/water/acetonitril. De verhouding monster:extractievloeistof varieert van 1:2,5 tot 1:20. In de manier van extraheren zijn de verschillen beperkt: ultrasoon en/of schudden bij kamertemperatuur, gedurende 15-30 minuten.

Melamine en de hydrolyseproducten zijn redelijk oplosbaar in water en mengsels van water/acetonitril (zie Annex II en [5]). Uit de literatuur is bekend dat melamine en cyaanuurzuur een complex kunnen vormen (hydrogen-bonded polymeric aggregate = melamine-cyanuraat [5]). Ten opzichte van individueel melamine en cyaanuurzuur is dit complex (zeer) slecht oplosbaar in water en water/acetonitril mengsels. In diethylamine en dimethylformamide lost melamine-cyanuraat wel op. In een mengsel van diethylamine/water/acetonitril (1/4/5) kan melamine-cyanuraat opgelost worden tot 1 g/l. Dit kan tot op zekere hoogte worden doorverdund in water/acetonitril zonder dat opnieuw complexvorming optreedt [5]. Uit een andere studie [6] blijkt dat verdunning van oplossingen van melamine en cyaanuurzuur (in water/mierezuur) na sterke doorverdunning in acetonitril (95% acetonitril) kan leiden tot vorming van melamine-cyanuraat. Dit treedt op bij concentraties > 0,5 mg/l. Dit is van belang omdat bij LC-MS/MS analyse vaak gebruik wordt gemaakt van zogenaamde HILIC kolommen waarbij het gebruikelijk is extracten voor analyse door te verdunnen in acetonitril.

De hierboven beschreven literatuur biedt duidelijk aanknopingspunten voor een verklaring voor de gevonden verschillen tussen de laboratoria, zeker als de melamine verontreiniging in de vorm van melamine-cyanuraat aanwezig was. Uit de analyse door RIKILT blijkt dat naast melamine ook cyaanuurzuur aanwezig was. De gehalten lagen in de range van 46-65% van die van melamine. Daarnaast waren ook de andere twee hydrolyseproducten (ammiline en ammilide) aanwezig. Duidelijk is dus dat de monsters verontreinigd waren met een mengsel van melamine en hydrolyseproducten en wellicht melamine-cyanuraat, en niet met een meer zuivere vorm van melamine.

Het feit dat RIKILT met het mengsel diethylamine/water/acetonitril hogere waarden vindt dan laboratorium A en B met acetonitril/water mengsels klopt met hetgeen beschreven is in de literatuur. Om dit experimenteel te bevestigen voor het betreffende monster, is het monster op verschillende manieren geëxtraheerd. De resultaten worden beschreven in 3.3.

### 3.2.3 *Instrumentele analyse*

Voor de analyse van melamine kunnen verschillende instrumentele analysetechnieken worden toegepast, waarbij GC-MS(/MS) en met name LC-MS/MS de meest gebruikte zijn [7]. Bij de LC-MS/MS analyse hebben zowel laboratorium A als B gebruik gemaakt van HILIC chromatografie. In tegenstelling tot wat vaak in de literatuur wordt beschreven zijn de extracten niet doorverdund in

---

producteigen kristallen van bijvoorbeeld Calcium-oxalaat; deze amorfe kristallen hebben een zelfde uiterlijk als de kristallen in een referentiemonster melamine. De enkele aangetroffen vezels zijn goed onderscheidbaar van haren van granen, maar niet-identificeerbaar als touw".

acetonitril maar in acetonitril/water waardoor de kans op oplosbaarheids problemen na doorverdunnen gering is. Bij LC-MS/MS analyse kan de matrix van invloed zijn op de kwantificering (zogenaamde ion suppressie). Door laboratorium B is hier rekening mee gehouden door gebruik te maken van zogenaamde matrix-matched standaarden. De GC-MS analyse zoals door de FDA beschreven [4] is in beginsel minder robuust dan LC-MS/MS, maar dit is door RIKILT ondervangen door gebruik te maken van isotooplabels voor melamine en cyanuurzuur. Voor zover data zijn aangeleverd, geven addities van melamine aan blanco monsters een acceptabele terugvinding. Een eventueel oplosbaarheidsprobleem van melamine-cyanuraat komt met een dergelijke kwaliteitsborging echter niet aan het licht.

Hoewel een deel van de verschillen in analyseresultaten veroorzaakt zou kunnen zijn door de verschillende procedures en technieken gebruikt bij de instrumentele analyse, is het onwaarschijnlijk dat dit de hoofdoorzaak is.

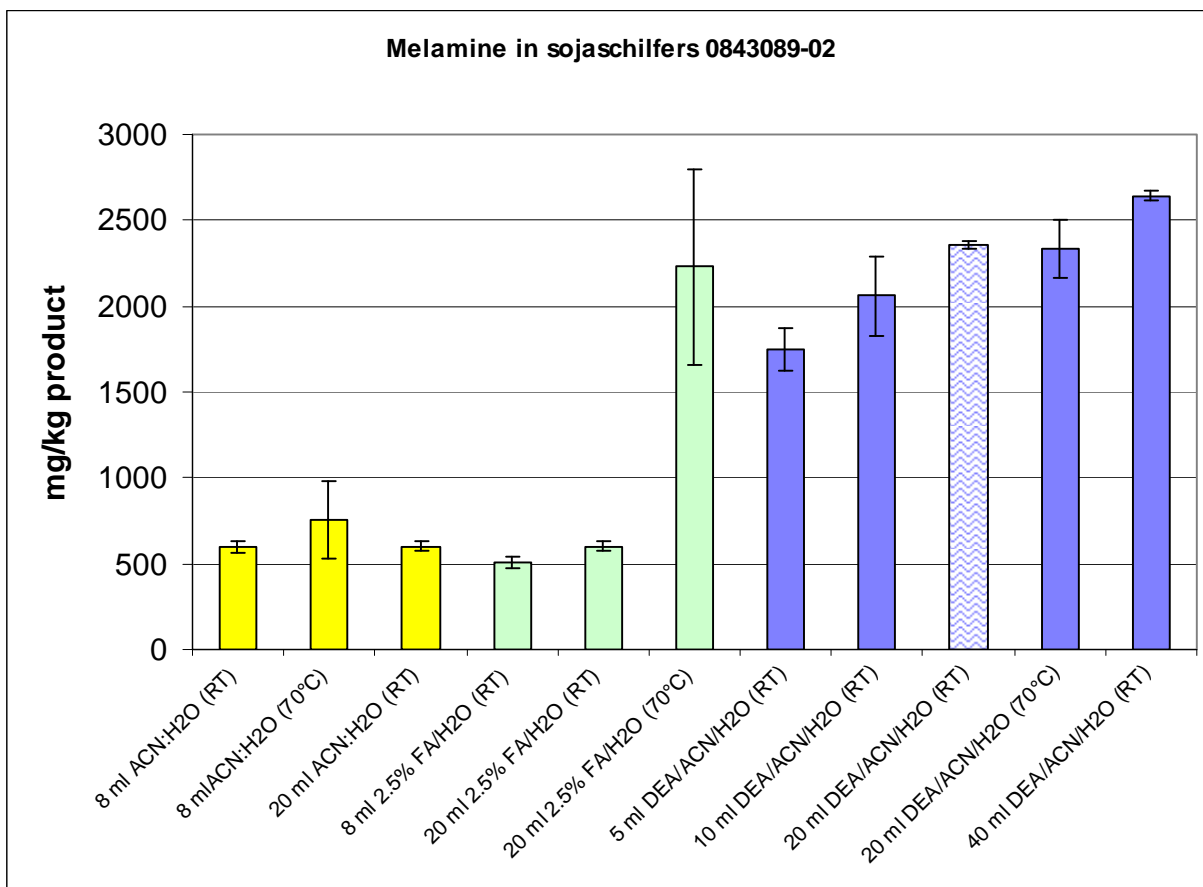
### 3.3 Experimentele verificatie van mogelijke oorzaken door RIKILT

Uit 3.2 kan geconcludeerd worden dat verschillen in extractieprocedures de meest waarschijnlijke oorzaak zijn van de discrepantie in analyseresultaten tussen de laboratoria. Om dit te verifiëren is het hoog gecontamineerde monster door RIKILT op verschillende manieren geëxtraheerd, waarbij werd gevarieerd in extractiemiddel, de ratio monster vs volume extractiemiddel en de temperaturen. De experimenten zijn in duplo of triplo uitgevoerd.

De resultaten voor melamine zijn samengevat in Figuur 1. Er worden inderdaad grote verschillen gevonden tussen de verschillende extractiemethoden.

Extractie met water/acetonitril (1:1) zoals gebruikt door laboratorium A en B leidt tot duidelijk lagere gehalten voor melamine. De resultaten zoals met deze methode gevonden door RIKILT komen overeen met die gerapporteerd door laboratorium B. De verhouding monster hoeveelheid vs volume extractievloeistof lijkt weinig invloed te hebben, de extractie-temperatuur mogelijk enigszins. De resultaten verklaren niet waarom laboratorium A slechts 60 mg/kg vond in hun eerste analyse (eveneens op basis van extractie met water/acetonitril).





*Figuur 1. Effect van extractiemiddel, volume extractiemiddel en temperatuur op gehalte melamine in sojaschilfers. Inweeg = 1 gram. Analyse GC-MS na derivatisering. Kwantificering op basis van isotoop label melamine. Standaard methode RIKILT = 20 ml DEA/ACN/H2O (RT), ACN = acetonitril, H2O = water, FA = mierzuur, DEA = diethylamine, RT = kamertemperatuur.*

In de literatuur is naast extractie met acetonitril/water en diethylamine/water/acetonitril nog een derde extractiemiddel beschreven namelijk 2,5% mierzuur in water [6,8]. Bij kamertemperatuur werd ook voor dit extractiemiddel een relatief laag gehalte aan melamine gevonden. Bij verwarmen tot 70°C werd een hoog gehalte gevonden, maar met een grote variatie in de triplo.

Gezien het zeer hoge niveau van de contaminatie, rees de vraag of er wellicht zelfs met het diethylamine/water/acetonitril mengsel nog een sprake zou kunnen zijn van een onderschatting van het gehalte melamine. Om deze reden is ook voor dit oplosmiddel gevarieerd in ratio monster vs volume extractievloeistof en temperatuur. Verder verhogen van volume oplosmiddel en verhoogde temperatuur bleken weinig invloed te hebben en niet te leiden tot een nog hoger gehalte melamine. Omgekeerd gaf verkleining van het volume extractievloeistof wel een dalende trend te zien.

Tijdens deze experimenten zijn steeds naast melamine ook de hydrolyse producten gemeten. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Annex III en geven een zelfde trend aan. Wel blijkt dat voor de ammeline, ammelide en cyaanuurzuur het effect nog sterker is. Dit zou ook kunnen komen omdat de verontreiniging voor een deel uit vrij melamine bestond dat wel goed oplost in alle geteste oplosmiddelen.

### 3.4 Heranalyse van hooggecontamineerde monster door andere laboratoria

Naar aanleiding van de terugkoppeling van de initiële resultaten van het RIKILT aan de andere laboratoria zijn deze, parallel aan de experimenten van RIKILT, ook zelf hun extractieprocedures gaan aanpassen. De resultaten van de heranalyse van het hoog gecontamineerde monster met aangepaste procedures is weergegeven in Tabel 2, samen informatie met betrekking tot de extractieprocedure. Voor de volledigheid zijn ook de initiële bevindingen weer vermeld.

Tabel 2 Overzicht analysesresultaten voor melamine in sojaschilfers voor en na aanpassing extractiemethode

	Laboratorium A		Laboratorium B		RIKILT
	initiële methode	aangepast methode	initiële methode	aangepast methode	
	melamine in sojaschilfers (0843089-02) mg/kg				
	61	1100	797	2220	2400
Inweeg	10 gram	1 gram	2.5 gram	2.5 gram	1 gram
Extractiemiddel	acetonitrile/water/1 N HCl (12:12:1)	acetonitril/water/mierezuur 50:50:1	acetonitrile/water (1:1)	2.5% mierzuur in water	water/acetonitril/diethylamine (4:5:1)
volume	25 ml	100 ml	20 ml	20 ml	20 ml
ratio inweeg/volume	2,5	100	8	8	20
Extractie procedure	10 min schudbank, 5 min ultrasoon,	30 min ultrasoon, 50°C	10 min schudbank, 5 min ultrasoon, laten uitzakken, aliquot in epje	10 min schudbank, 5 min ultrasoon, laten uitzakken, aliquot in epje	schudden; 30 min ultrasoonbad
Verdere procedure	centrifugeren	centrifugeren	centrifugeren	centrifugeren	centrifugeren
	10x verdunnen in ACN/water (1:1)	10x verdunnen in ACN/water (1:1)	10x verdunnen in ACN/water (1:1)	tussenverdunding 2.5% mierzuur, dan doorverdunding in ACN/water 1:1	
					aliquot (20-200 µl) extract + isotoop-label MEL en CYA; droog dampen derivatisering met BSTFA/TMS
Instrumentele analyse	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	GC-MS

Met de aangepaste methode vinden beide laboratoria melamine gehalten die redelijk tot goed overeen komen met het eerder door RIKILT gerapporteerde gehalte. Laboratorium A komt, met nog weer een andere variant dan beschreven in de literatuur of getest in de aanvullende experimenten door RIKILT, op gehalten van 1100-3700 mg/kg. Laboratorium B komt met een 2,5% mierzuur als extractiemiddel op vrijwel hetzelfde gehalte als bij de diethylamine/water/acetonitril methode van RIKILT. Dit is enigszins opmerkelijk omdat bij de experimentele verificatie van de mierzuur methode door RIKILT bleek dat, zonder verwarmen, nog steeds een te laag gehalte werd teruggevonden. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat de temperatuur tijdens het ultrasooneren verhoogd was.

De resultaten in Tabel 2 bevestigen dat monsterinhomogeniteit niet de (hoofd)oorzaak was voor de gevonden verschillen in analysesresultaten tussen de laboratoria.

## 4 Conclusies en Aanbevelingen

- Bij de analyse van diervoeder/grondstoffen op melamine kan de extractieprocedure sterk van invloed zijn op de gevonden gehalten van melamine
- Of dit zo is, is afhankelijk van de vorm waarin melamine aanwezig is (vrij of als melamine-cyanuraat), van de aanwezigheid van cyanuurzuur en van hun gehalten.
- Van de geteste extractiemengsels bleek diethylamine/water/acetonitril (1/4/5) de hoogste gehalten voor melamine en hydrolyseproducten te geven omdat hiermee ook melamine-cyanuraat in oplossing wordt gebracht (dissocieert in melamine en cyanuurzuur).
- Bij de kwaliteitsborging van analyse van diervoeder/grondstoffen op melamine is het sterk aan te bevelen om naast monsters met additie van melamine ook monsters met additie van zowel melamine als cyanuurzuur en monsters met additie van melamine-cyanuraat mee te nemen

## 5 Referenties

- [1] 2008/798/EG. Beschikking van 14 oktober 2008 houdende speciale voorwaarden voor de invoer van producten die melk of melkproducten bevatten, van oorsprong uit of verzonden uit China, en tot intrekking van Beschikking 2008/757/EG van de Commissie
- [2] <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4396.html> " Determination of Melamine Residues in Catfish Tissue by Triple Quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography", May 2007.
- [3] <http://www.fda.gov/cvm/gcsmmelamine.htm> " GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid" version 2.1, May 2007.
- [4] <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4423.html> " GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide, and Cyanuric Acid" Oct. 2008.
- [5] M.S. Filigenzi, B. Puschner, L.S. Aston, R.H. Poppenga, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 7593-7599
- [6] D.N. Heller, C.B. Nochetto, Rapid Commun. Mass Spectrom. 22 (2008) 3624-3632.
- [7] [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/Melamine\\_methods.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine_methods.pdf)
- [8] <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4421.html>, " Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS", Oct. 2008.



## Annex I      Beknopte beschrijving analysemethode voor de bepaling van melamine in sojaschilfers

Methode	Lab A (oorspronkelijke methode)	Lab B (oorspronkelijke methode)	RIKILT
Techniek	LC-MS/MS	LC-MS/MS	GC-MS
Gemeten analyten	melamine	melamine	melamine, ammeline, ammelide, cyaanuurzuur
Monstervoorbewerking	malen over zeef 0,75 mm	malen over zeef 0,75 mm	malen over zeef 1 mm
Inweeg	10 gram	2.5 gram	1 gram
Extractiemiddel	acetonitrile/water/1 N HCl (12:12:1)	acetonitrile/water (1:1)	water/acetonitril/di-ethylamine (4:5:1)
volume	25 ml	20 ml	20 ml
Extractie procedure	10 min schudbank, 5 min ultrasoon	10 min schudbank, 5 min ultrasoon, laten uitzakken, aliquot in epje	schudden; 30 min ultrasoonbad
Verdere procedure	centrifugeren 10x verdunnen in ACN/water (1:1)	centrifugeren 10x verdunnen in ACN/water (1:1)	centrifugeren  aliquot (20-200 µl) extract + isotoop-label MEL en CYA; droog dampen  derivatisering met BSTFA/TMS
Instrumentele analyse	LC-MS/MS	LC-MS/MS	GC-MS
injectie	?	5 µl	1 µl solvent vent/splitless
kolom	HILIC	HILIC	30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm DB5MS
kwantificering	kalibratielijijn op 4 niveaus	externe standaardmethode adhv calibratiecurve standaard in matrix (geaddeerd voor de extractie)	calibratiecurve standaard in derivatiseringsreagens; correctie voor interne standaard
opgegeven LOQ	0,05 mg/kg	?	1 mg/kg
kwaliteitscontrole	additie van vrij melamine aan ? op 10 mg/kg	additie aan ? op 2,5 mg/kg	additie aan wisselende blanco monsters op 2,5 en 25 mg/kg (diervoer/ingredienten)
terugvinding	92%+/-10%	doorgaans tussen 80-110%	melamine: 74-122% (gemid. 99%; RSD 23%)

\* Afwijkingen methode RIKILT tov FDA 4423: gebruik van isotoop labels voor melamine en cyaanuurzuur; inweeg van 1 g ipv 0,5 g; aangepaste GC condities.

## Annex II      Oplosbaarheidsgegevens van melamine en cyaanuurzuur

Melamine (<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/108781.pdf>)  
Water Solubility 3.1 g/l at 20 °C

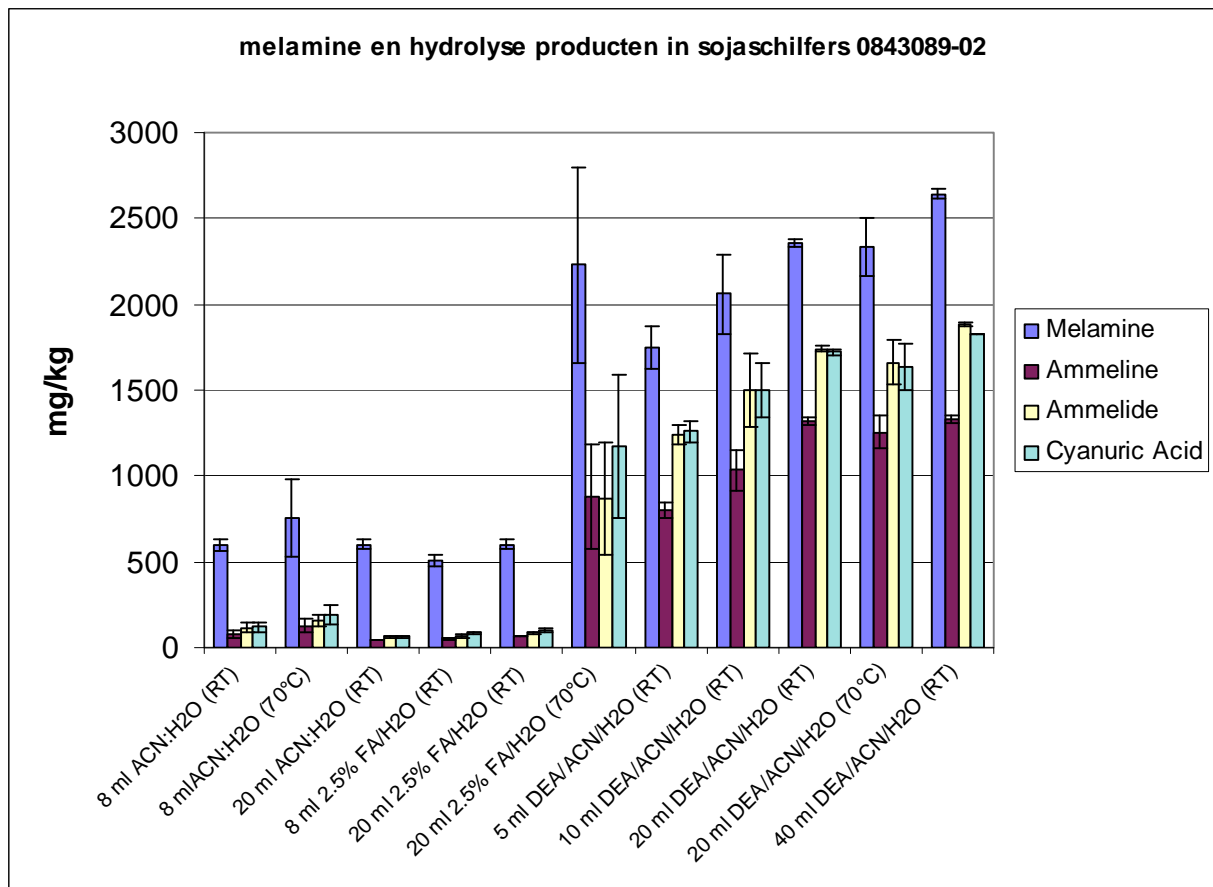
Cyanuurzuur ([http://www.sciencelab.com/xMSDS-Cyanuric\\_Acid-9923614](http://www.sciencelab.com/xMSDS-Cyanuric_Acid-9923614))  
Partially soluble in cold water.

Insoluble in methanol, diethyl ether, acetone.

Insoluble in benzene, chloroform.

Soluble in aqueous solution of potassium hydroxide, hot alcohols, pyridine, concentrated hydrochloric acid. Solubility in water: 2000 mg/l @ 25 deg. C; 1000 mg/200 ml water

## Annex III



*Effect van extractiemiddel, volume extractiemiddel en temperatuur op gehalte melamine in sojaschilfers.*

*Inweeg = 1 gram.*

*Analyse GC-MS na derivatisering.*

*Kwantificering op basis van isotoop label melamine.*

*Standaard methode RIKILT = 20 ml DEA/ACN/H2O (RT) ACN = acetonitril, H2O = water, FA = mierzuur, DEA = diethylamine, RT = kamertemperatuur.*