



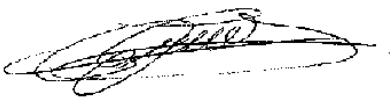
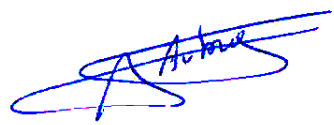

Agence fédérale
pour la sécurité de
la chaîne alimentaire

Laboratoire fédéral pour la sécurité alimentaire- Liège

Dossier de validation de l'I-MET063

Validation de l'analyse de la mélamine par GC-MS dans les poudres de lait (2,5 ppm), les bonbons (1 ppm) et les biscuits (1 ppm).

Date d'application: 06-10-2008

	Nom – fonction / service	Date	Signature
Rédigée par:	Ing. Fabian Etienne-Thewissen Responsable technique	06-10-08	
Vérifié par:	Marianne Aubry Responsable qualité	09-10-08	
Approuvée par:	Ir. Alain DUBOIS Manager du Laboratoire	09-10-08	

Relevé des révisions du document

Révision par/date*	Validation par / date**	Motif de la révision	Partie de texte / portée de la révision
Etienne-Thewissen F. 06/10/2008		Précisions apportées dans le dossier	

* La différence entre la date du jour et la dernière révision ne peut dépasser 5 ans.

** Adapter le numéro de la révision et le cas échéant, l'année. Après approbation, adapter la date d'application compte tenu du temps nécessaire pour informer les collaborateurs concernés.

Destinataires

Collaborateurs du Laboratoire de Liège :

Laborantins en charge de l'analyse :

- Olivier Pallares
- Thierry De Tandt
- Isabelle Monisse
- Marie-Christine Offermanne
- Stany Delbrouck
- Muriel Mertens

Responsable de section : Fabian Etienne-Thewissen

Validation de l'analyse de la mélamine par GC-MS dans les poudres de lait (2,5 ppm), les bonbons (1 ppm) et les biscuits (1 ppm).

- 1. Introduction**
- 2. Comparaison des spectres des échantillons dopés avec des spectres de référence publiés.**
- 3. Réponse des détecteurs : courbe de calibration**
 - 3.1. Ion Trap Detector
 - 3.2. Single Quad Detector
- 4. Déviation entre concentrations théoriques et concentrations mesurées**
 - 4.1. Ion Trap Detector
 - 4.2. Single Quad Detector
- 5. Bonbons et biscuits dopés à 1 mg/kg**
 - 5.1. Fidélité intermédiaire
 - 5.2. Rendement
 - 5.3. Justesse
 - 5.4. Temps de rétention
 - 5.5. Spectre : rapport des masses
 - 5.6. Limites de détection et de quantification
- 6. Poudres de lait dopées à 2,5 mg/kg**
 - 6.1. Fidélité intermédiaire
 - 6.2. Rendement
 - 6.3. Justesse
 - 6.4. Limites de détection et de quantification
- 7. Conclusion**
- 8. Références bibliographiques**

1. Introduction

Les essais réalisés dans le cadre de la validation de la méthode ont pour objectif de vérifier que l'application de la méthode développée permet de conduire à la détermination sans ambiguïté de la mélamine à une concentration supérieure à 1 ppm dans les bonbons et les biscuits et à une concentration supérieure à 2,5 ppm dans la poudre de lait.

La méthode proposée fait l'objet d'une validation interne au sein du laboratoire et dérive de « GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration ».

La validation de la méthode couvre les sujets suivants :

❖ **Comparaison des spectres des échantillons dopés avec des spectres de solutions standards.**

La méthode doit mettre en évidence les fragments caractéristiques silylés de la mélamine dans des solutions standards et dans des échantillons dopés à 1 ppm.

❖ **Justesse et fidélité intermédiaire : essais à 1 ppm (bonbons-biscuits) et 2,5 ppm (lait en poudre).**

Des essais de répétabilité et de reproductibilité sur des matériaux dopés à la limite de 1 ou 2,5 mg/kg ont été réalisés afin d'estimer la variabilité de la concentration mesurée.

❖ **Spécificité :**

Le rapport entre 3 masses caractéristiques pour la mélamine sera évalué. Les pourcentages de déviation ont été fixés par les valeurs limites mesurées lors des essais. La confirmation est réalisée en mode TIC.

Le temps de rétention du pic détecté dans l'échantillon doit être compris dans la fenêtre de la moyenne des temps de rétention des références de la séquence +/- 0,05 mn.

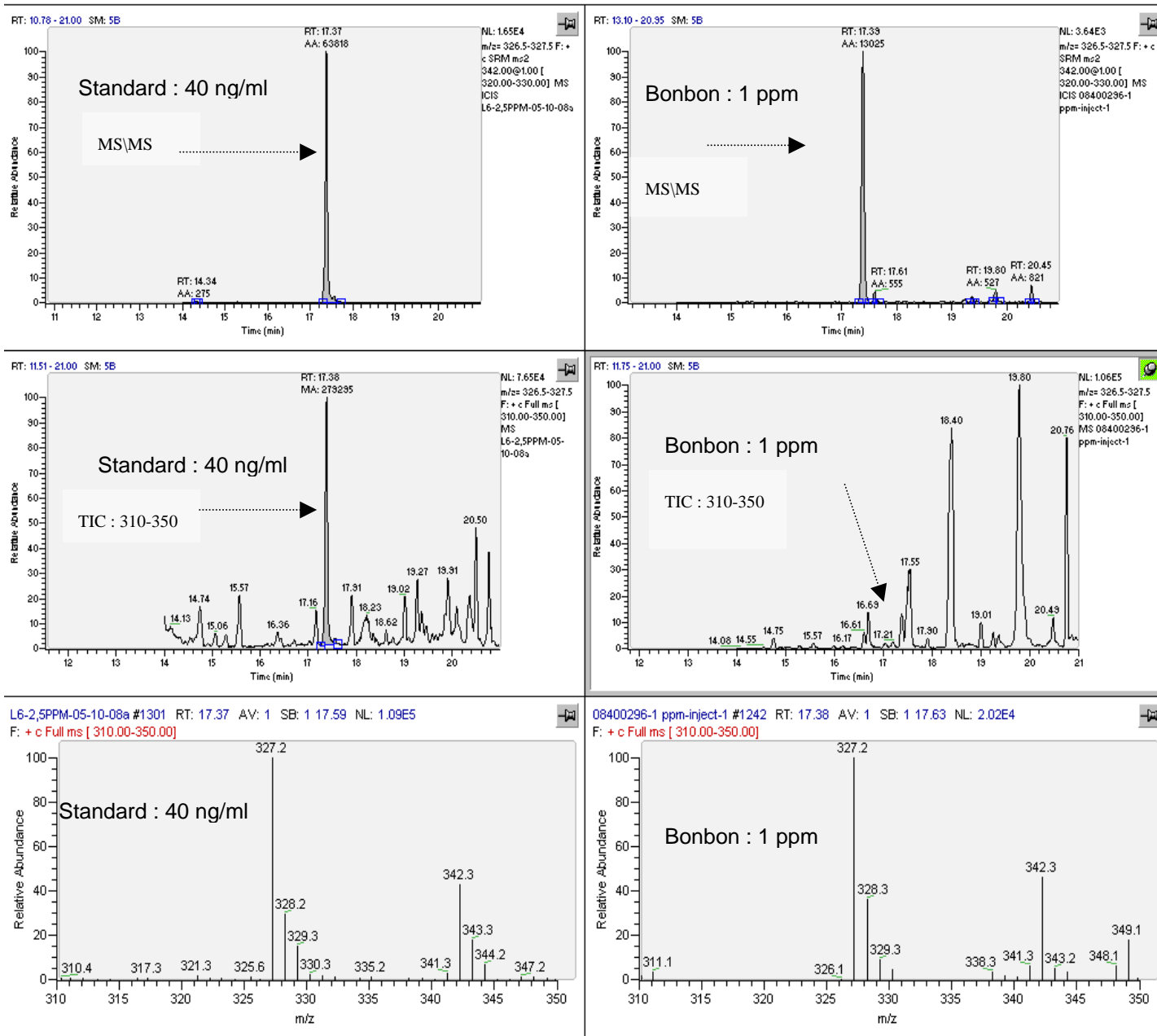
❖ **Blanc matrice :**

Les essais doivent évaluer les signaux de matrices indemnes des composés recherchés au temps de rétention caractéristique de la mélamine.

En l'absence de matériaux de référence, des échantillons indemnes de toute présence des analytes recherchés seront dopés aux concentrations de 1 et 2,5 ppm.

2. Comparaison des spectres des échantillons dopés avec des spectres de solutions standards.

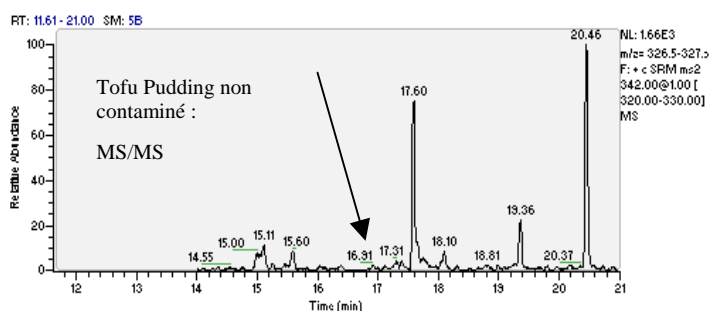
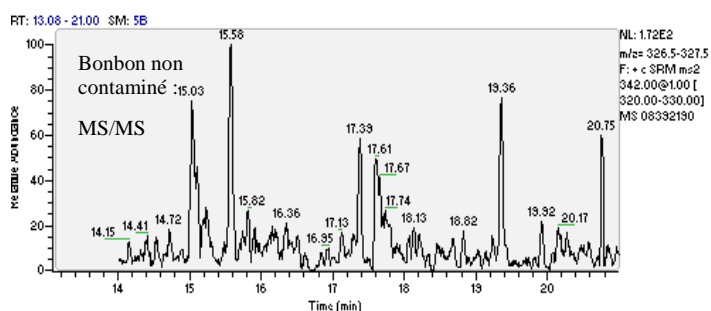
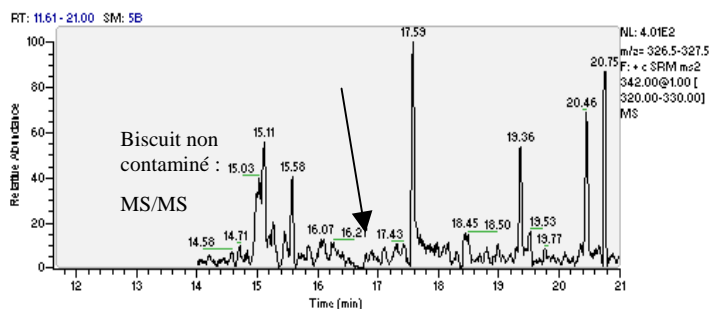
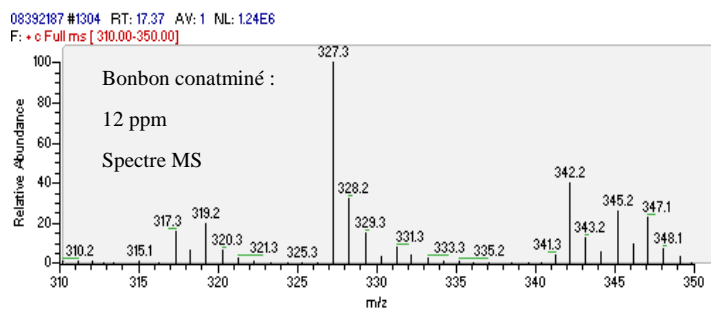
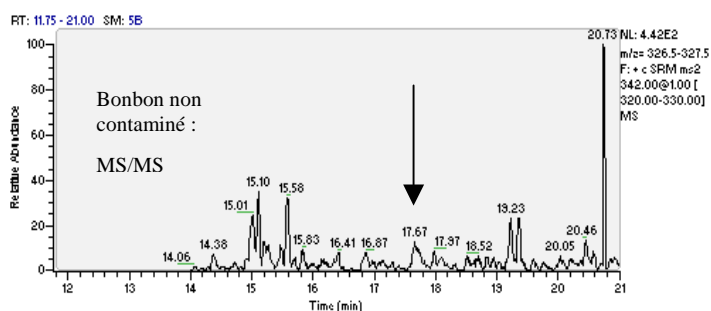
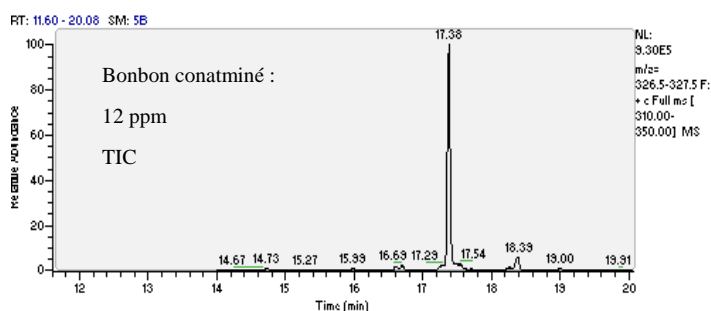
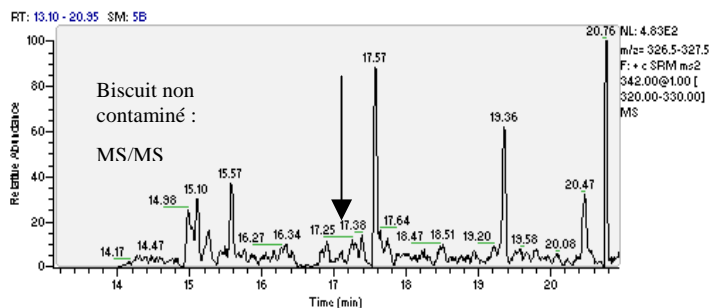
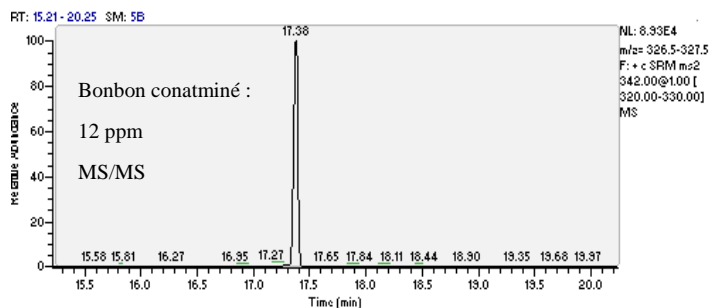
Les figures suivantes mettent en évidence les fragments caractéristiques (342 et 327) de la mélamine dans une solution standard diluée et dans une solution d'échantillon (bonbon) dopé à 1 ppm. On remarque également la différence de signal obtenu entre l'acquisition TIC et MS/MS.



GC-MS-ITD : Chromatogrammes TIC (m/z : 310 – 350) et MS/MS (M/Z : 342 → 327) d'un échantillon dopé à la concentration de 1 ppm

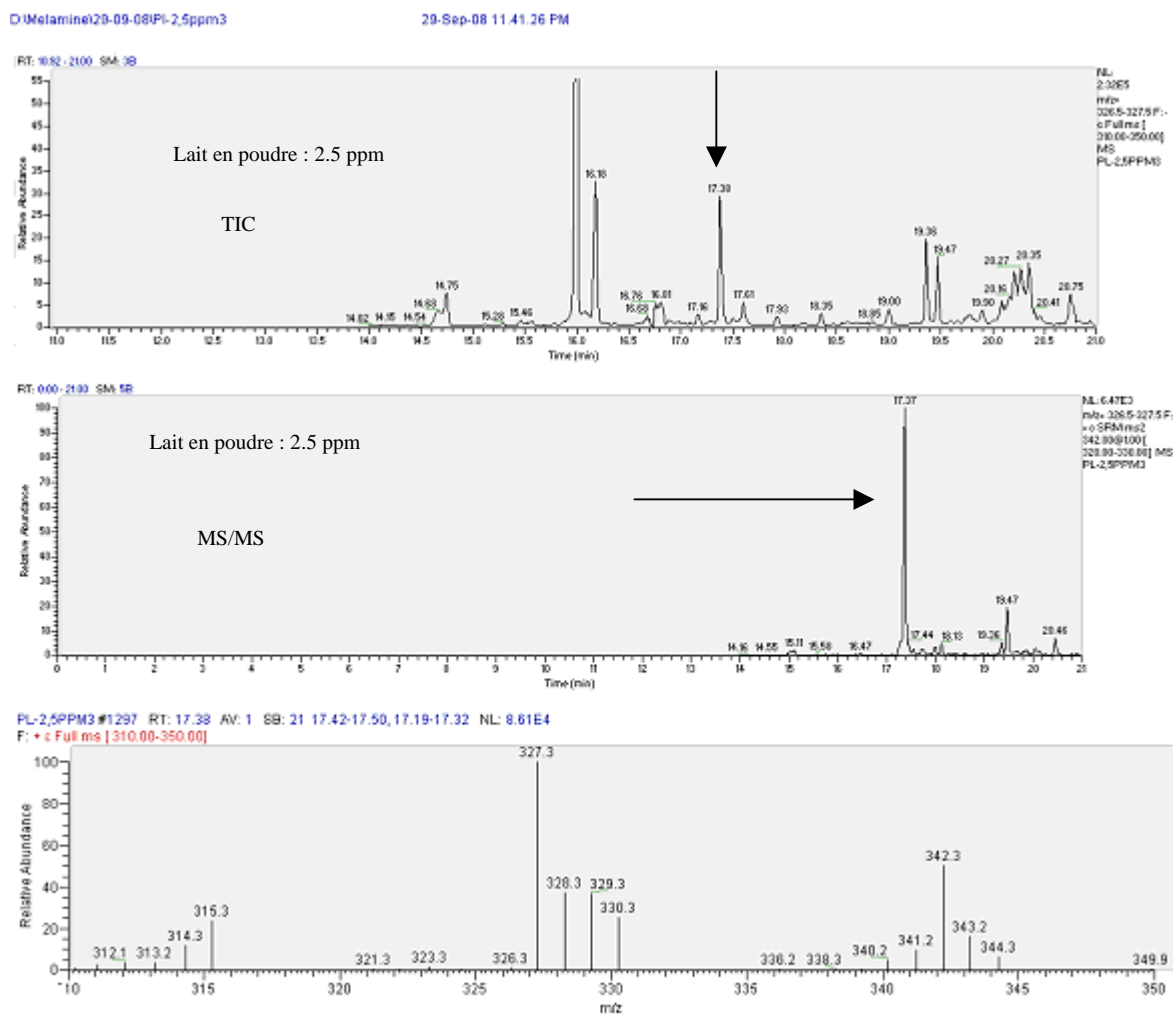
Les figures suivantes mettent en évidence les fragments caractéristiques (342 et 327) de la mélamine d'un échantillon (bonbon) contaminé à 12 ppm. On remarque également la différence de signal obtenu entre l'acquisition TIC et MS/MS.

Elles mettent également en évidence l'absence de pic dans des matrices blanches.



GC-MS-ITD : Chromatogrammes TIC et MS/MS d'un bonbon contaminé à la concentration de 12 ppm. Chromatogrammes MS/MS (M/Z : 342 → 327) d'échantillons non contaminés.

Les figures suivantes mettent en évidence les fragments caractéristiques (342 et 327) de la mélamine d'un échantillon (lait en poudre) contaminé à 2,5 ppm.



GC-MS-ITD : Chromatogrammes TIC et MS/MS de lait en poudre dopé à 2,5 ppm.

A titre informatif, les spectres de référence publiés de la mélamine et de ses 3 molécules dérivées (acide cyanurique, ammélide et amméline) sont présentés ci-dessous.

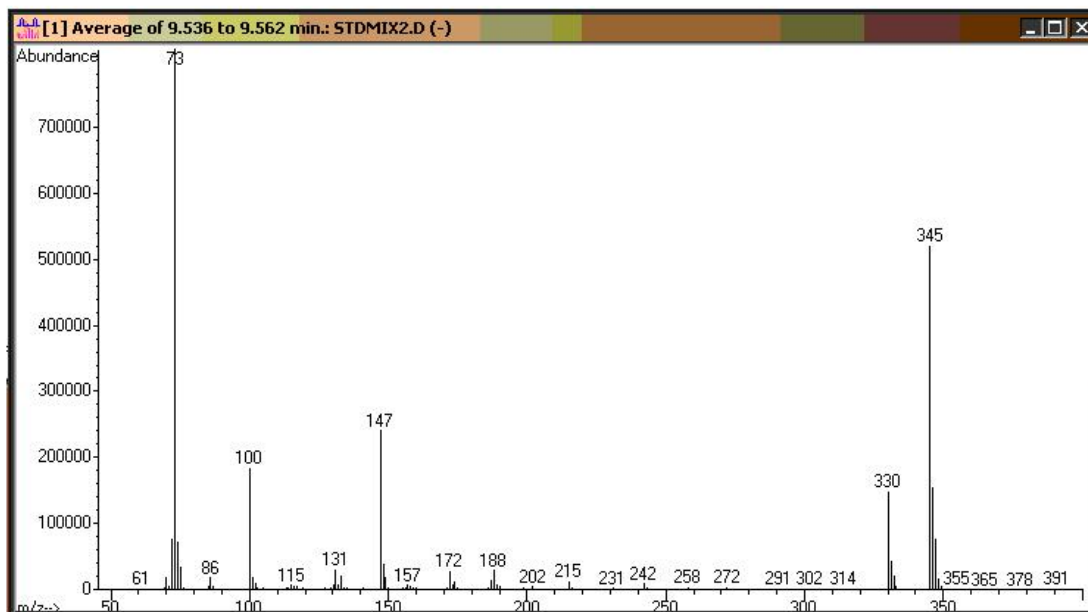


Figure 1 a : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration – **acide cyanurique**.

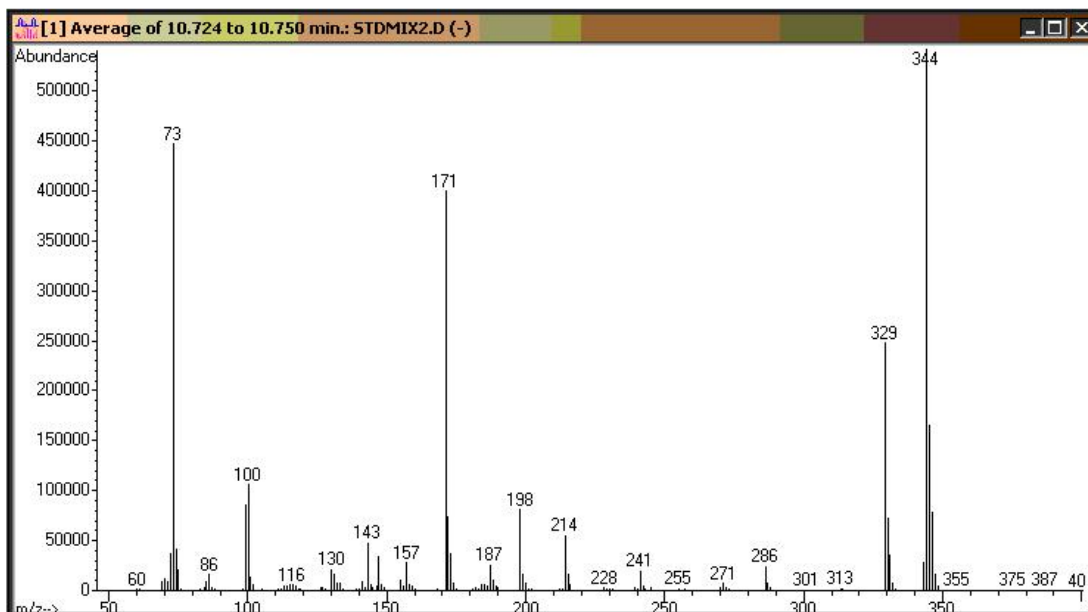


Figure 2 a : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration - **ammélide**.

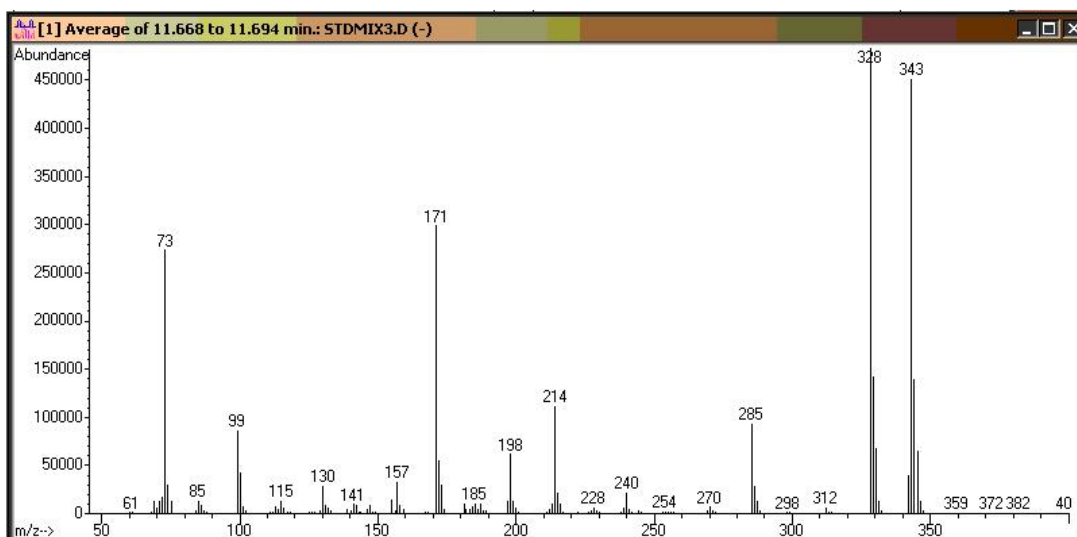


Figure 3 a : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration - **amméline**.

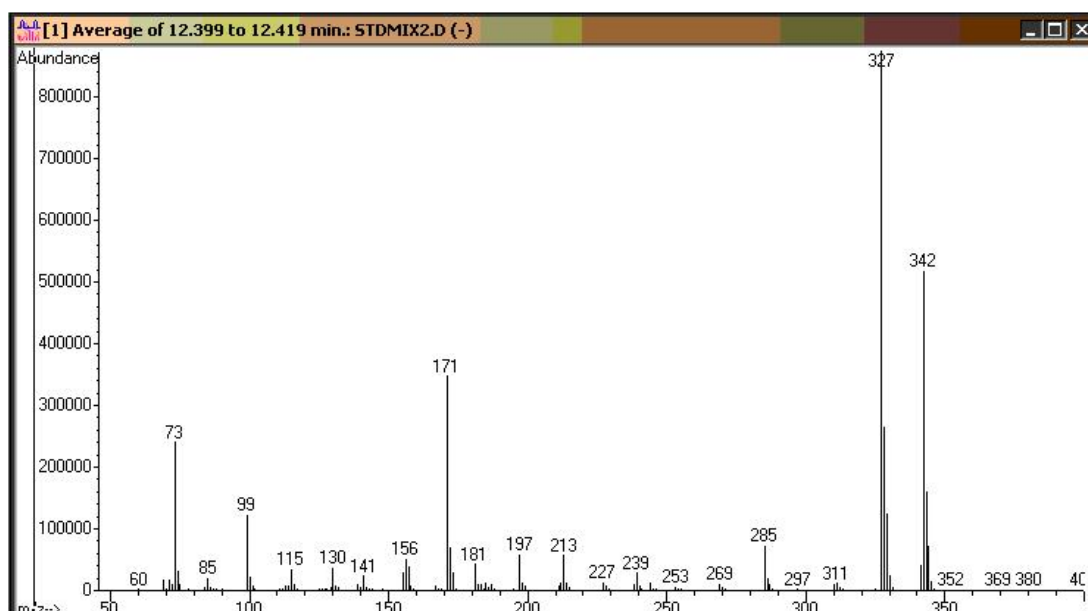


Figure 4 a : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration - **mélamine**.

Le tableau suivant reprend le rapport entre les masses caractéristiques pour les 4 molécules :

MS Conditions (SIM Mode): Select three or four ions to track: M, M+2, M-15 and another

Group	Start Time ^a (min)	Ions ^b					
		M ^c	M + 1	M + 2	M - 15	Other	Other
Urea / Biuret from di- and tri-TMS derivatives of urea ^d	6	276 (tri-tms)			189 (di-tms) 261 (tri-tms)		
Cyanuric Acid	9	345 (100) ^e	346 (30)	347 (14)	330 (33)	188 (11)	
Ammelide	9.7	344 (100)	345 (30)	347 (14)	329 (50)	286 (7)	198 (28)
Ammeline	10.4	343 (100)	344 (30)	345 (14)	328 (115)	285 (30)	198 (27)
Melamine	11	342 (54)	343 (16)	344 (8)	327 (100)	285 (12)	197 (13)
Benzoguanamine	12	331	332	333	316	171	

^a Start Times may need to be adjusted based upon the retention time of standards on your system.
^b Dwell times should be adjusted to produce a cycle time of about 4 scans/sec
^c M is the Molecular Ion for the tri - TMS derivative of the compound.
^d Urea and Biuret are not formally part of the screen but they are related to the compounds of interest and may be detected
^e Percent relative abundance with respect to the molecular ion from directly silylated standards under Standard Spectrum Autotune. The relative abundances should be confirmed under the conditions of use by evaluating standards.

Figure 5 : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration. **Rapport entre les masses caractéristiques.**

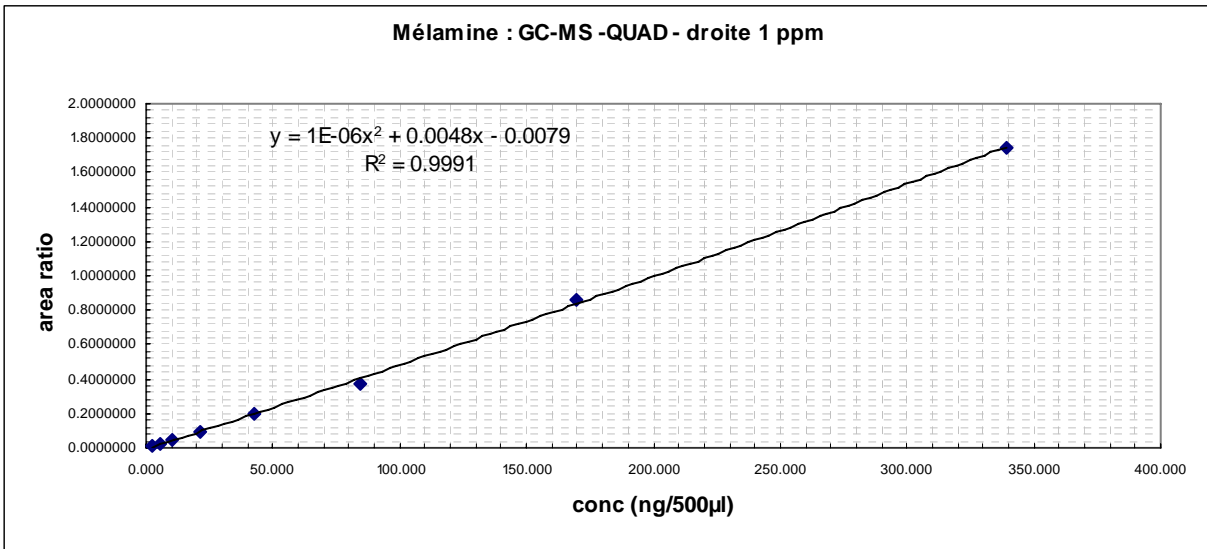
3. Réponse des détecteurs : courbe de calibration

Pour les 2 détecteurs, les résultats suivants démontrent qu'une relation linéaire peut être établie entre les facteurs de réponse et la gamme de concentration utilisée lors de l'étude. Le critère de R² de 0,99 a été respecté lors de chacune des calibrations.

3.1 Ion Trap Detector

Mélamine – 1 ppm	
Conc - ng/500 µl	Area ratio
2.648	0.0109
5.297	0.0233
10.593	0.0513
21.186	0.0949
42.372	0.2012
84.744	0.4525
169.488	0.9060
338.976	1.8390

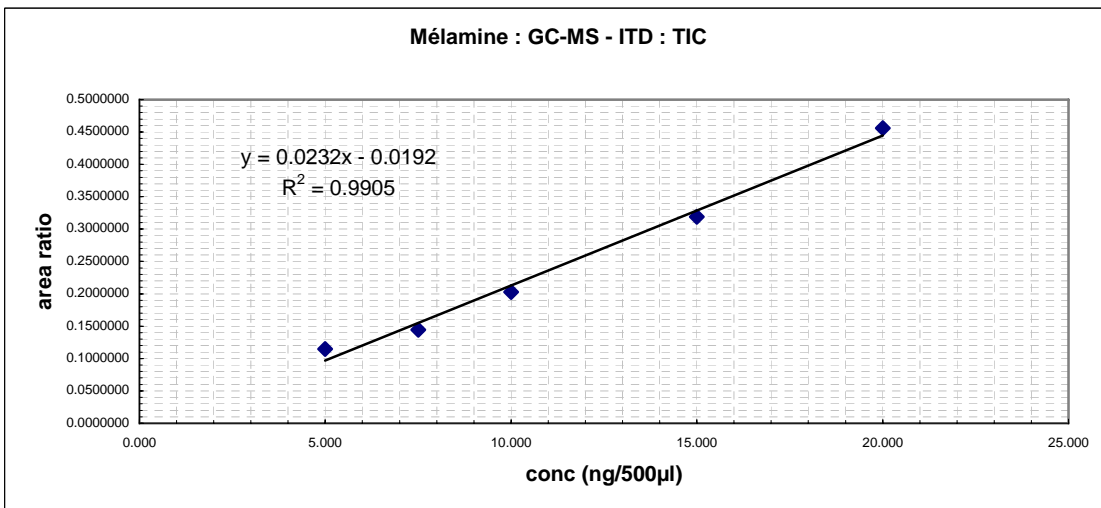
Tableau 1 : Facteur de réponse du QUAD au départ de solutions standards de mélamine.

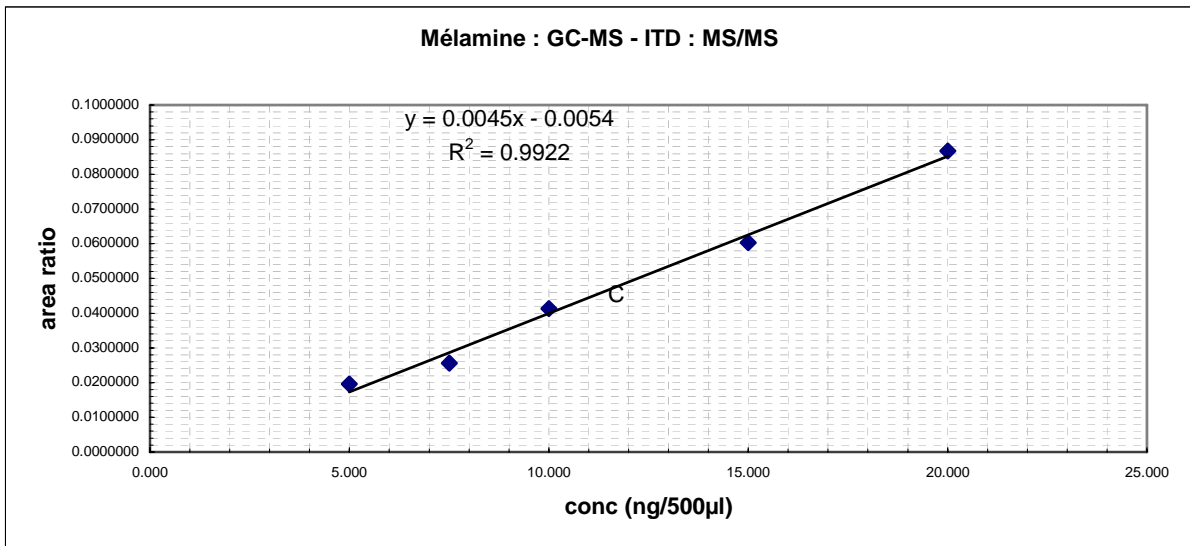


3.2 Single Quad Detector

Mélatamine - MS/MS		Mélatamine - TIC	
Conc - ng/500 µl	Area ratio	Conc - ng/500 µl	Area ratio
50.000	0.020	50.000	0.115
75.000	0.026	75.000	0.144
100.000	0.041	100.000	0.203
150.000	0.060	150.000	0.319
200.000	0.087	200.000	0.456

Tableau 2 : Facteur de réponse (MS/MS et TIC) de l'ITD au départ de solutions standards de la mélatamine.





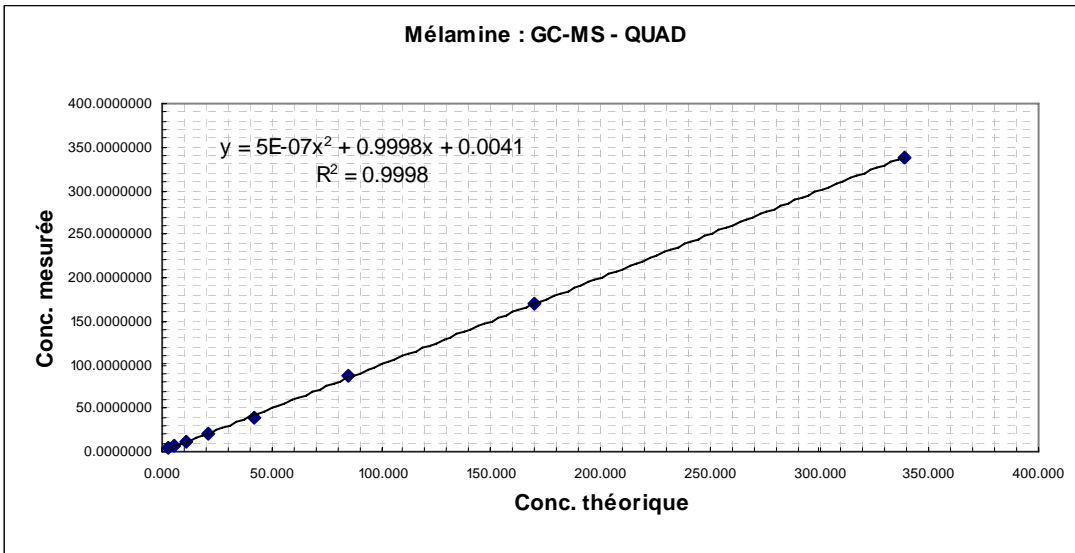
4. Déviation entre concentrations théoriques et concentrations mesurées

Pour ces 2 détecteurs, les graphiques suivants montrent qu'une relation linéaire est établie entre les concentrations théoriques et les concentrations mesurées.

4.1 Ion Trap Detector

Mélatamine – 1 ppm	
Conc - ng/500 µl	Conc - ng/500 µl
2.648	3.827
5.297	6.152
10.593	11.4
21.186	19.568
42.372	39.446
84.744	86.22
169.488	169.839
338.976	338.85

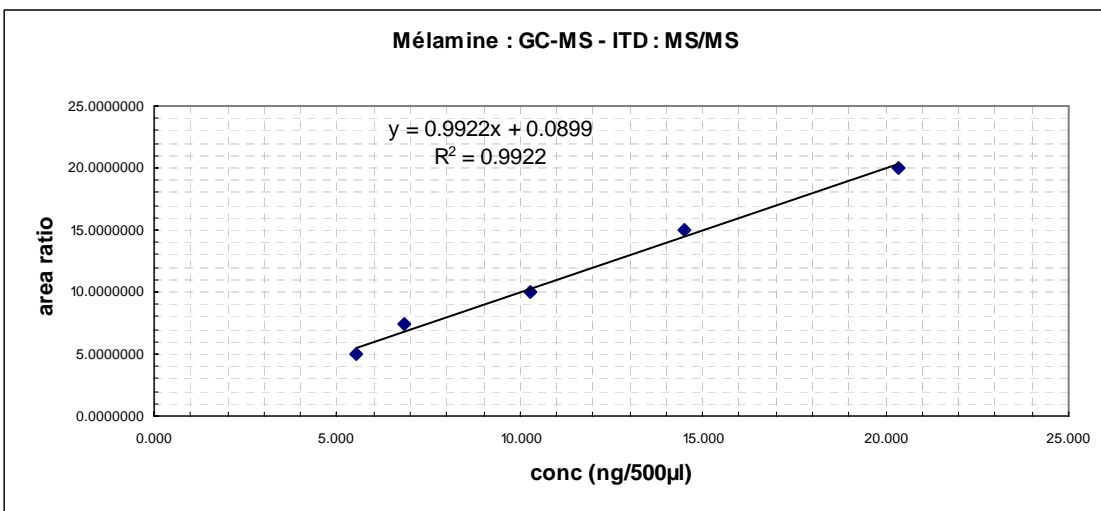
Tableau 3 : concentration théorique et concentration mesurée pour la mélatamine pour le détecteur QUAD.

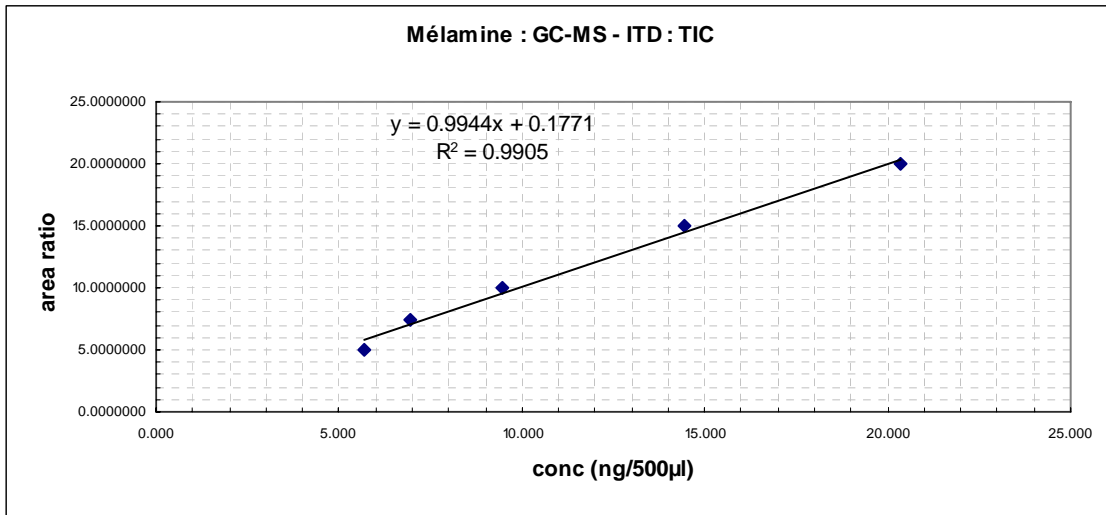


4.2 Single Quad Detector

Mélamine - MS/MS		Mélamine - TIC	
Conc - ng/500 µl	Conc - ng/500 µl	Conc - ng/500 µl	Conc - ng/500 µl
5	5.505	5	5.694
7.5	6.848	7.5	6.963
10	10.308	10	9.475
15	14.499	15	14.465
20	20.340	20	20.339

Tableau 4 : concentration théorique et concentration mesurée pour la mélamine pour le détecteur ITD. Signal TIC et MS/MS





5. Bonbons et biscuits dopés à 1 mg/kg

5.1 Fidélité intermédiaire

Les tableaux ci-dessous présentent les résultats et les calculs qui ont permis de déterminer la fidélité intermédiaire de la méthode pour les matrices bonbons et biscuits dopés à 1 mg/kg.

Les valeurs de fidélité intermédiaire obtenues pour ces 2 matrices à la concentration de 1 ppm sont inférieures au 2/3 de la reproductibilité calculée selon l'équation d'Horwitz, ce qui démontre que la méthode est reproductible.

		Mélamine (mg/kg)		
		essai	Bonbon Lucky Candy	Centwafers fraise
Jour 1	Opérateur 1	1	1.27	0.93
		2	0.95	0.90
		3	0.96	0.91
		4	0.96	0.90
		5	1.00	0.90
		6	0.99	0.87
Jour 2	Opérateur 2	1	1.18	0.76
		2	1.03	0.90
		3	1.00	0.88
	Opérateur 3	1	0.89	0.80
		2	0.81	0.89
		3	0.87	0.84
Jour 3	Opérateur 2	1	1.27	0.80
		2	0.90	0.82
		3	0.92	0.77
	Moyenne	mg/kg	1.00	0.86
	Fidélité intermédiaire	%	13.92	6.78

Tableau 5 : concentration mesurée en mg/kg sur des échantillons (bonbons et biscuits) dopés à 1 mg/kg.

Bonbons : Unités des données encodées :			ppm			
Série	Nb de résultats (n)	n ²	total résultats (u)	Moyenne	(moy _{sér} - moy _{tot}) ²	somme des (u-moyenne) ²
Série 1	6	36	6.127	1.021	0.0004	0.07579
Série 2	3	9	3.212	1.071	0.0049	0.01856
Série 3	3	9	2.576	0.859	0.0201	0.00324
Série 4	3	9	3.092	1.031	0.0009	0.08628

nb de série (p)	4
-----------------	---

somme des sommes des (u-moyenne) ² =	0.1839
nombre total de résultats =	15
somme totale des résultats:	15.0065
moyenne totale =	1.0004
somme (n _i) - p	11
var. de répétabilité: s ² _j (r) =	1.67E-02
coeff. de variation de répétabilité (%) =	12.92
nombre moyen par séries:	3.75
somme des carrés (moy série - moy totale) :	0.0264
variance inter séries s ² _j (g) =	2.69E-03 (= 0 si < 0)
variance de fidélité intermédiaire s ² _j (FI) ou de reproductibilité:	1.94E-02
Coeff. De variation de fidélité intermédiaire CV _j (FI) ou de reproductibilité en % =	13.92
Répétabilité r [2,8*S _j (r)]	0.36
Reproductibilité R [2,8*S _j (FI)]	0.39

Tableau 6 : calcul de la fidélité intermédiaire pour les essais sur les bonbons.

Biscuits : Unités des données encodées :			ppm			
Série	Nb de résultats (n)	n ²	total résultats (u)	Moyenne	(moy _{sér} - moy _{tot}) ²	somme des (u-moyenne) ²
Série 1	6	36	5.396	0.899	0.00175	0.00180
Série 2	3	9	2.546	0.849	0.00008	0.01276
Série 3	3	9	2.534	0.845	0.00017	0.00485
Série 4	3	9	2.388	0.796	0.00381	0.00108

nb de série (p)	4
-----------------	---

somme des sommes des (u-moyenne) ² =	0.0205
nombre total de résultats =	15
somme totale des résultats:	12.8629
moyenne totale =	0.8575
somme (n _i) - p	11
var. de répétabilité: s ² _j (r) =	1.86E-03
coeff. de variation de répétabilité (%) =	5.03
nombre moyen par séries:	3.75
somme des carrés (moy série - moy totale) :	0.0058
variance inter séries s ² _j (g) =	1.52E-03 (= 0 si < 0)
variance de fidélité intermédiaire s ² _j (FI) ou de reproductibilité:	3.38E-03
Coeff. De variation de fidélité intermédiaire CV _j (FI) ou de reproductibilité en % =	6.78
Répétabilité r [2,8*S _j (r)]	0.12
Reproductibilité R [2,8*S _j (FI)]	0.16

Tableau 7 : calcul de la fidélité intermédiaire pour les essais sur les biscuits

5.2 Rendement (%)

Les moyennes des résultats suivants montrent que le critère de rendement de 70 à 120 % a été respecté lors des essais pour ces 2 matrices à 1 ppm.

		Mélamine - Rendement - %		
		essai	Bonbon Lucky Candy	Centwafers fraise
Jour 1	Opérateur 1	1	126.9	92.6
		2	95.0	90.0
		3	96.2	90.6
		4	95.6	90.0
		5	100.2	89.7
		6	98.7	86.7
Jour 2	Opérateur 2	1	118.0	75.7
		2	103.4	90.4
		3	99.8	88.5
	Opérateur 3	1	89.4	79.6
		2	81.5	89.4
		3	86.7	84.3
Jour 3	Opérateur 2	1	127.0	80.0
		2	90.3	81.7
		3	91.9	77.1
Moyenne		mg/kg	100.04 %	85.75 %

Tableau 8 : rendement (%) des essais réalisés sur les bonbons et les biscuits à la concentration de 1 ppm.

5.3 Justesse

	ppm			%	
	Conc. introduite	Moy. totale	Biais absolu	Biais relatif	Rendement
Mélatamine- Bonbons	1.0	1.0	0.0	0.0	100.0
Mélatamine- Biscuits	1.0	0.86	0.14	14.0	86.0

Tableau 9 : biais absolu et relatif – rendement des essais réalisés sur les bonbons et les biscuits dopés à la concentration de 1 ppm.

Incertitude de mesure élargie (composante biais, fidélité intermédiaire) pour les essais à 1 ppm :

Bonbons : 0,4 mg/kg

Biscuits : 0,33 mg/kg

5.4 Temps de rétention

Le tableau ci-dessous reprend les temps de rétention observés lors des essais de validation à 1ppm. Le critère d'acceptation de déviation entre le temps de rétention moyen des niveaux de calibration +/- 0,05 mn et le temps de rétention mesuré a été respecté pour chacun des essais.

Filename	Sample Name	RT	RT moyen	Fenêtre RT
L1		13.95	13.96	de 13.91 à 14.01
L2		13.95		
L3		13.96		
L4		13.96		
L5		13.96		
L6		13.96		
L7		13.96		
L8		13.96		
08392239-DOPa	centwafers fraise	13.95		ok
08392239-DOPb	centwafers fraise	13.95		ok
08392239-DOPc	centwafers fraise	13.95		ok
08400296-DOPa	chique Lucky Candy	13.97		ok
08400296-DOPb	chique Lucky Candy	13.97		ok
08400296-DOPc	chique Lucky Candy	13.96		ok
Tableau récapitulatif des temps de rétention				
Filename	Sample Name	RT	RT moyen	Fenêtre RT
L1		13.95	13.96	de 13.91 à 14.01
L2		13.95		
L3		13.96		
L4		13.96		
L5		13.96		
L6		13.96		
L7		13.96		
L8		13.96		

08392239-DOPa-IM	centwafers fraise	13.95		ok
08392239-DOPb-IM	centwafers fraise	13.95		ok
08392239-DOPc-IM	centwafers fraise	13.95		ok
08392239-DOPa-MCO	centwafers fraise	13.96		ok
08392239-DOPb-MCO	centwafers fraise	13.95		ok
08392239-DOPc-MCO	centwafers fraise	13.95		ok
08400296-DOPa-IM	chique Lucky Candy	13.96		ok
08400296-DOPb-IM	chique Lucky Candy	13.96		ok
08400296-DOPc-IM	chique Lucky Candy	13.96		ok
08400296-DOPa-MCO	chique Lucky Candy	13.97		ok
08400296-DOPb-MCO	chique Lucky Candy	13.96		ok
08400296-DOPc-MCO	chique Lucky Candy	13.96		ok
Filename	Sample Name	RT	RT moyen	Fenêtre RT
L1		13.97	13.98	de 13.93 à 14.03
L2		13.98		
L3		13.98		
L4		13.98		
L5		13.98		
L6		13.98		
L7		13.98		
L8		13.98		
08392239-DOPa-OLI	centwafers fraise	13.98		ok
08392239-DOPb-OLI	centwafers fraise	13.98		ok
08392239-DOPc-OLI	centwafers fraise	13.98		ok
08392239-DOPd-OLI	centwafers fraise	13.99		ok
08392239-DOPe-OLI	centwafers fraise	13.98		ok
08392239-DOPf-OLI	centwafers fraise	13.98		ok
08400296-DOPa-OLI	chique Lucky Candy	13.99		ok
08400296-DOPb-OLI	chique Lucky Candy	13.99		ok
08400296-DOPc-OLI	chique Lucky Candy	13.99		ok
08400296-DOPd-OLI	chique Lucky Candy	13.99		ok
08400296-DOPe-OLI	chique Lucky Candy	13.99		ok
08400296-DOPf-OLI	chique Lucky Candy	13.99		ok

Tableau 10 : temps de rétention en minutes de la mélamine

5.5 Spectres : rapport de masses

La déviation du rapport de masse entre les fragments 171, 327, 342 est présentée ci dessous. L'écart-type de déviation standard a été calculé. Lors de ces essais, les résultats sont compris entre la moyenne +/- 2,8 x l'écart-type.

Filename	% de 171	% de 327	% de 342
L1	34.8	34.2	31.0
L2	34.7	35.6	29.7
L3	35.5	37.4	27.1
L4	35.1	39.3	25.6
L5	36.6	40.8	22.6
L6	36.8	41.9	21.3
L7	39.3	41.6	19.1
L8	39.1	41.3	19.5
08392239-DOPa	34.9	35.1	30.1
08392239-DOPb	35.0	35.4	29.6
08392239-DOPc	34.7	35.2	30.2
08400296-DOPa	40.5	34.0	25.4
08400296-DOPb	35.0	35.8	29.1
08400296-DOPc	33.3	36.5	30.2

Filename	% de 171	% de 327	% de 342
L1	35.5	33.3	31.2
L2	34.7	35.6	29.7
L3	35.5	37.4	27.1
L4	35.1	39.3	25.6
L5	36.6	40.8	22.6
L6	36.8	41.9	21.3
L7	39.3	41.6	19.1
L8	39.1	41.3	19.5
08392239-DOPa-IM	35.8	34.1	30.1
08392239-DOPb-IM	38.4	33.4	28.2
08392239-DOPc-IM	37.0	33.7	29.3
08392239-DOPa-MCO	35.3	34.5	30.2
08392239-DOPb-MCO	36.3	34.1	29.6
08392239-DOPc-MCO	36.8	33.5	29.6
08400296-DOPa-IM	33.8	35.2	31.0
08400296-DOPb-IM	34.0	35.1	30.9
08400296-DOPc-IM	34.4	34.9	30.7

08400296-DOPa-MCO	39.9	34.1	26.0
08400296-DOPb-MCO	34.6	35.0	30.4
08400296-DOPc-MCO	34.4	35.0	30.6
Filename			
	% de 171	% de 327	% de 342
L1	34.8	34.2	31.0
L2	35.3	35.0	29.7
L3	35.1	37.4	27.6
L4	35.8	39.9	24.3
L5	36.2	41.9	21.9
L6	35.2	43.1	21.7
L7	36.9	42.9	20.2
L8	37.8	42.9	19.3
08392239-DOPa-OLI	34.7	35.5	29.9
08392239-DOPb-OLI	35.4	35.0	29.5
08392239-DOPc-OLI	35.9	34.6	29.5
08392239-DOPd-OLI	37.1	34.0	28.9
08392239-DOPe-OLI	36.0	34.5	29.4
08392239-DOPf-OLI	36.7	34.2	29.1
08400296-DOPa-OLI	38.2	34.1	27.7
08400296-DOPb-OLI	35.5	35.5	29.0
08400296-DOPc-OLI	34.6	35.5	29.9
08400296-DOPd-OLI	33.9	36.2	29.9
08400296-DOPe-OLI	33.6	35.9	30.5
08400296-DOPf-OLI	33.8	35.7	30.5

Moyenne	35.9	36.8	27.3
Ecart-type	1.7	3.1	3.9
2.8 x Ecart-type	4.81	8.59	10.96
Moyenne - 2.8 x SD	31.14	28.19	16.31
Moyenne + 2.8 x SD	40.75	45.37	38.24

Tableau 11 : rapport de masses (%) entre les fragments caractéristiques de la mélamine (171, 327, 342).

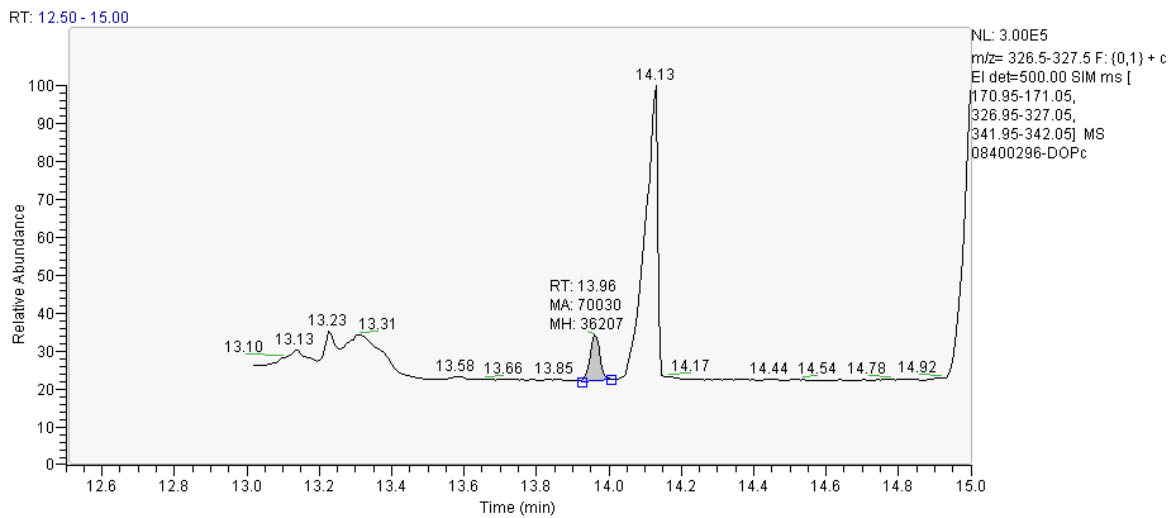
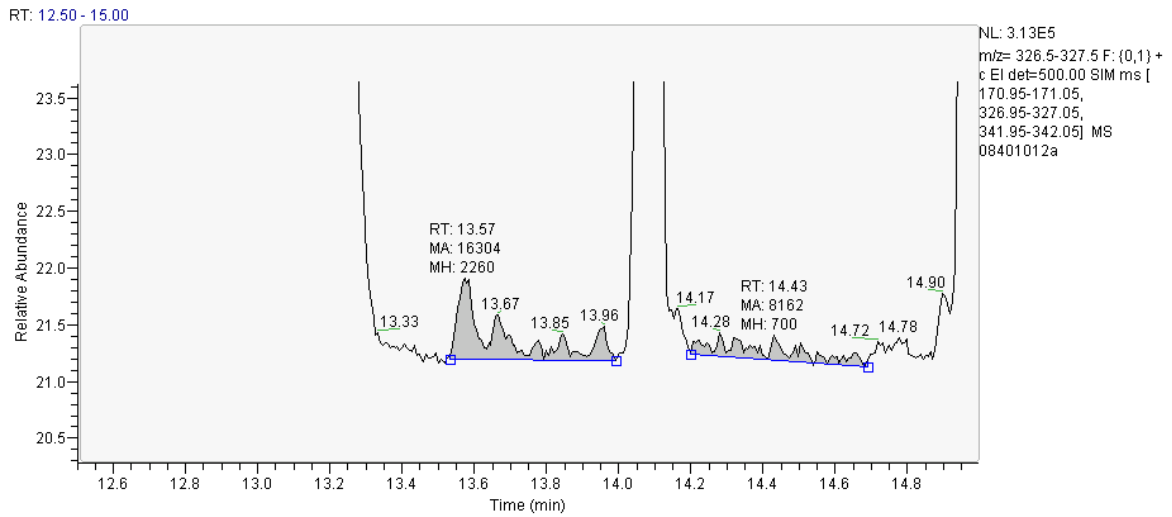
5.6 Limite de détection et de quantification

Les valeurs de ses limites sont estimées car elles se trouvent en dessous de notre premier point de calibration. Elles sont calculées sur base du rapport entre le signal (hauteur) dans la fenêtre du temps de rétention de la mélamine dans un échantillon de la matrice blanche et le signal de l'échantillon dopé. La limite de détection correspond à 3 fois la valeur de ce signal et la limite de quantification correspond à 5 fois la valeur du signal.

5.6.1 Bonbons par GC-MS QUAD pour les essais à 1 ppm :

LOD : $2260 \times 3 / 36207 = 0,187 \text{ mg/kg}$

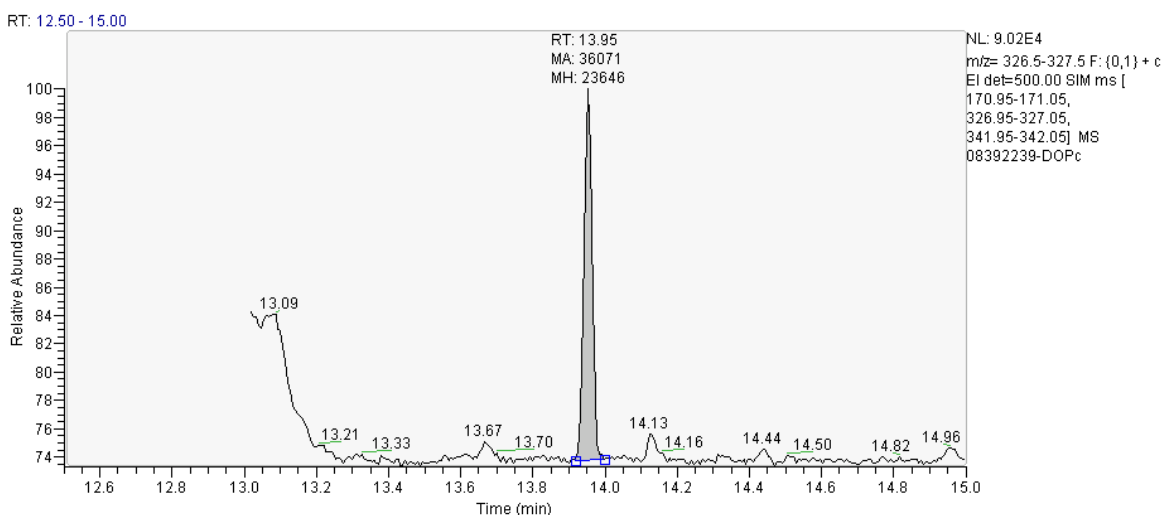
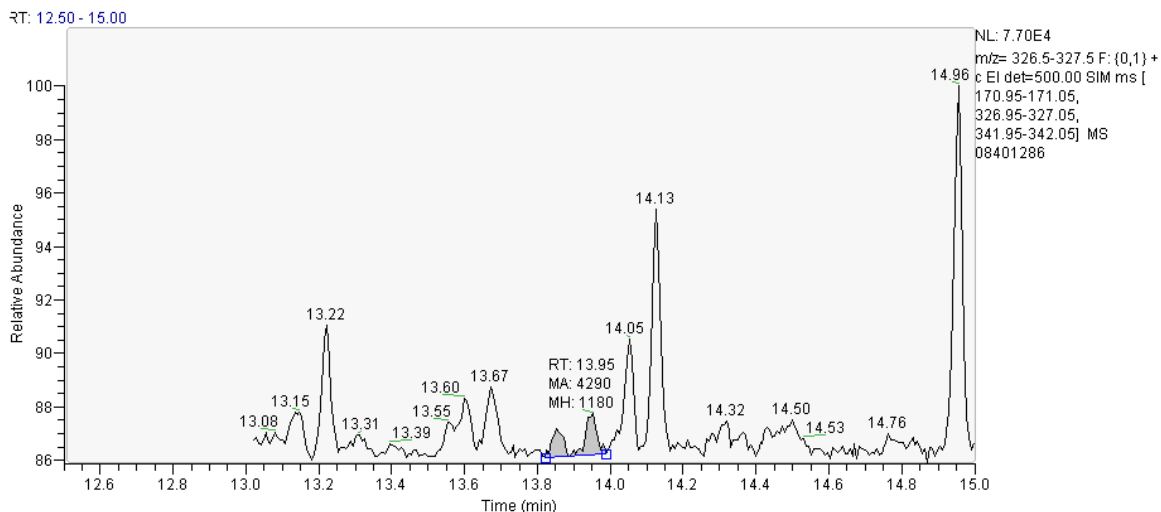
LOQ : $2260 \times 5 / 36207 = 0,312 \text{ mg/kg}$



5.6.2 Biscuits par GC-MS QUAD pour les essais à 1 ppm :

LOD : $1180 \times 3 / 23646 = 0,150$ mg/kg

LOQ : $1180 \times 5 / 23646 = 0,250$ mg/kg



6. Poudres de lait dopées à 2,5 mg/kg

La validation de la méthode a été réalisée sur de la poudre de lait dopée à 2,5 ppm. Les tableaux ci-dessous présentent la fidélité intermédiaire, le rendement et la justesse de la méthode appliquée à des poudres de lait.

6.1 Fidélité intermédiaire

Les valeurs de fidélité intermédiaire obtenues pour cette matrice à la concentration de 2,5 ppm est inférieure au 2/3 de la reproductibilité calculée selon l'équation d'Horwitz, ce qui démontre que la méthode est reproductible à cette valeur de concentration lorsqu'elle appliquée à la poudre de lait.

Série 1		Série2		Série 3		
GC-MS-QUAD		GC-MS-QUAD		GC-MS-ITD		
Filename	ppm	Filename	ppm	Filename	ppm	ppm
					TIC	MS/MS
PLB1-2.5PPM	2.33	PLC1-2.5PPM	2.35	PL-2,5PPM1	2.56	1.41
PLB2-2.5PPM	2.65	PLC2-2.5PPM	2.05	PL-2,5PPM2	2.61	1.48
PLB3-2.5PPM	1.84	PLC3-2.5PPM	2.01	PL-2,5PPM3	2.10	1.22
PLB4-2.5PPM	1.91	PLC4-2.5PPM	1.88	PL-2,5PPM4	2.46	1.44
PLB5-2.5PPM	1.82	PLC5-2.5PPM	1.52	PL-2,5PPM5	2.35	1.16
PLB6-2.5PPM	1.53	PLC6-2.5PPM	2.32	PL-2,5PPM6	2.83	1.54
	2.01		2.02		2.49	1.38
RSD - %	20.0		15.0		9.9	11.0

Tableau 12 : concentration mesurée en ppm sur des échantillons (lait en poudre) dopés à 2,5 ppm.

Fidélité intermédiaire : 18,5%

Incertitude de mesure élargie (composante biais, fidélité intermédiaire) pour les essais à 2,5 ppm :

Poudre de lait : 1,35 mg/kg

6.2 Rendement

Les moyennes des résultats suivants vérifient que le critère de rendement 70 à 120 % a été respecté lors des essais pour à 2,5 ppm pour la poudre de lait en SIM en TIC. Cependant, lorsque le signal est traité en mode MS/MS, un « rendement » de 55 % est observé. Il s'agit d'une acquisition alternative MS/MS – TIC. Par conséquent, le traitement en MS/MS sous estime la concentration attendue bien que la déviation standard relative soit acceptable (11%). Dans ce cadre des essais complémentaires devront être réalisés en mode MS/MS et notamment sur des matrices différentes afin de savoir si le problème est dû à la matrice poudre de lait. Lors de la validation la quantification a été réalisée en mode TIC pour l'ion trap.

Série 1		Série2		Série 3		
GC-MS-QUAD		GC-MS-QUAD		GC-MS-ITD		
Filename	ppm	Filename	ppm	Filename	ppm	ppm
					TIC	MS/MS
PLB1-2.5PPM	93.25	PLC1-2.5PPM	94.03	PL-2,5PPM1	102.28	56.32
PLB2-2.5PPM	106.11	PLC2-2.5PPM	82.11	PL-2,5PPM2	104.49	59.32
PLB3-2.5PPM	73.75	PLC3-2.5PPM	80.45	PL-2,5PPM3	84.18	48.90
PLB4-2.5PPM	76.36	PLC4-2.5PPM	75.35	PL-2,5PPM4	98.53	57.76
PLB5-2.5PPM	72.76	PLC5-2.5PPM	60.75	PL-2,5PPM5	93.89	46.44
PLB6-2.5PPM	61.18	PLC6-2.5PPM	92.63	PL-2,5PPM6	113.13	61.60
Moyenne	80.57		80.89		99.418	55.06
RSD - %	20.0		15.0		9.9	11.0

Tableau 13 : rendement (%) des essais réalisés sur du lait en poudre dopé à la concentration de 2,5 ppm.

6.3 Justesse

	ppm			%	
	Conc. introduite	Moy. totale	Biais absolu	Biais relatif	Rendement
Mélatamine	2.5	2.173	0.327	13.07	86,93

Tableau 14 : biais absolu et relatif – rendement des essais réalisés du lait en poudre dopé à la concentration de 2,5 ppm.

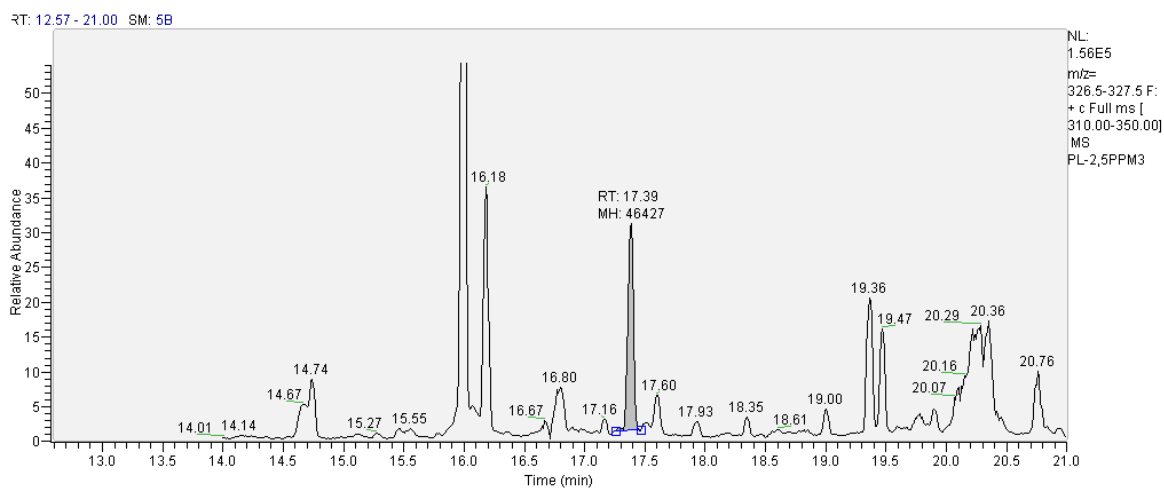
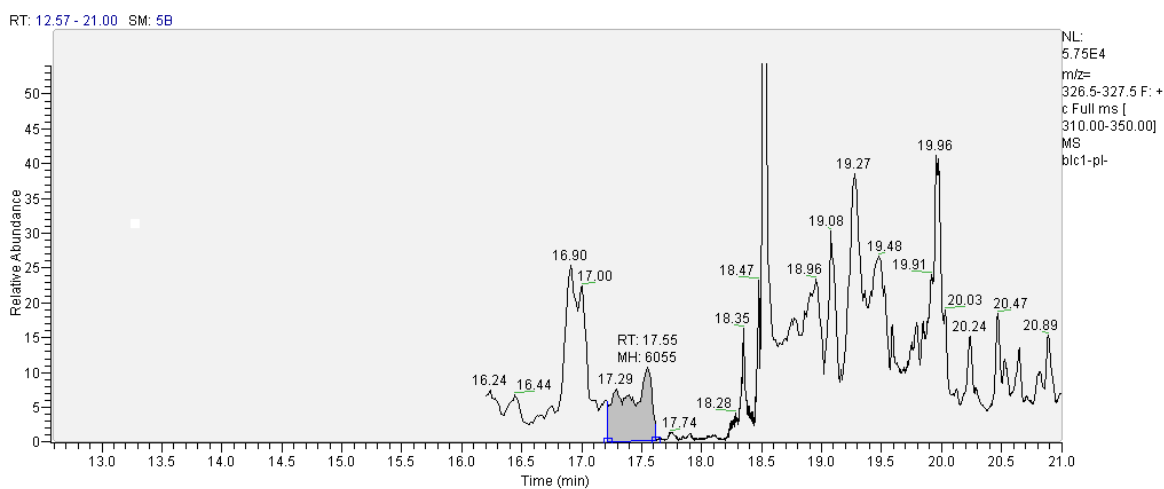
6.4 Limite de détection et de quantification

Les valeurs de ces limites sont estimées au départ car elles se trouvent en dessous de notre premier point de calibration. Elles sont calculées sur base du rapport entre le signal (hauteur) dans la fenêtre du temps de rétention de la mélatamine dans un échantillon de la matrice blanche et le signal de l'échantillon dopé. La limite de détection correspond à 3 fois la valeur de ce signal et la limite de quantification correspond à 5 fois la valeur du signal.

6.4.1 Lait en poudre par GC-MS Ion Trap en TIC pour les essais à 2,5 ppm :

LOD : $2,5 \times 3 \times 6055 / 46427 = 0,978 \text{ mg/kg}$

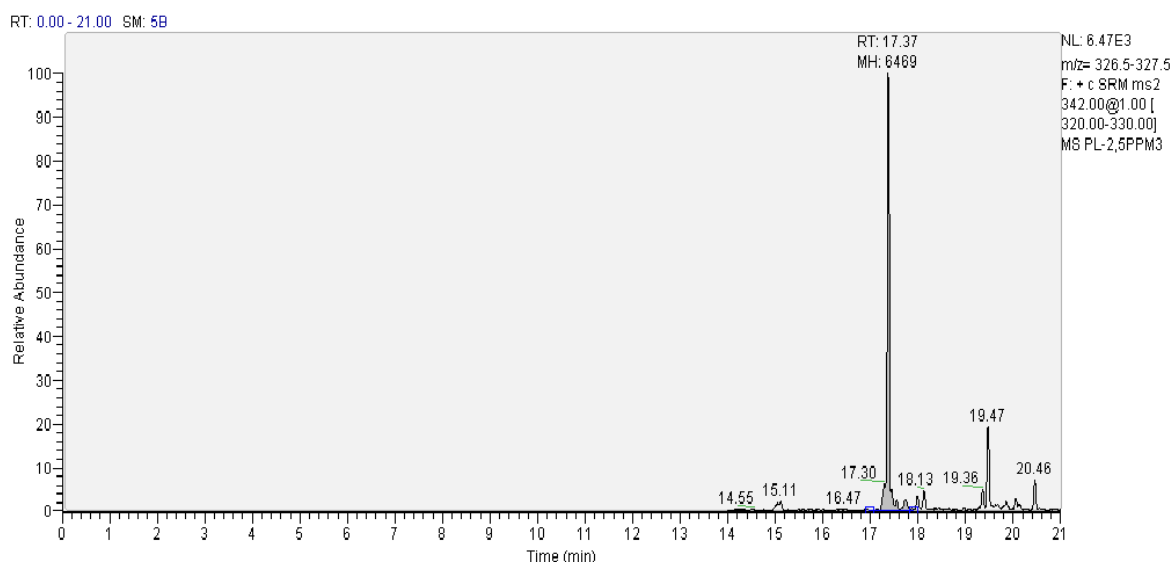
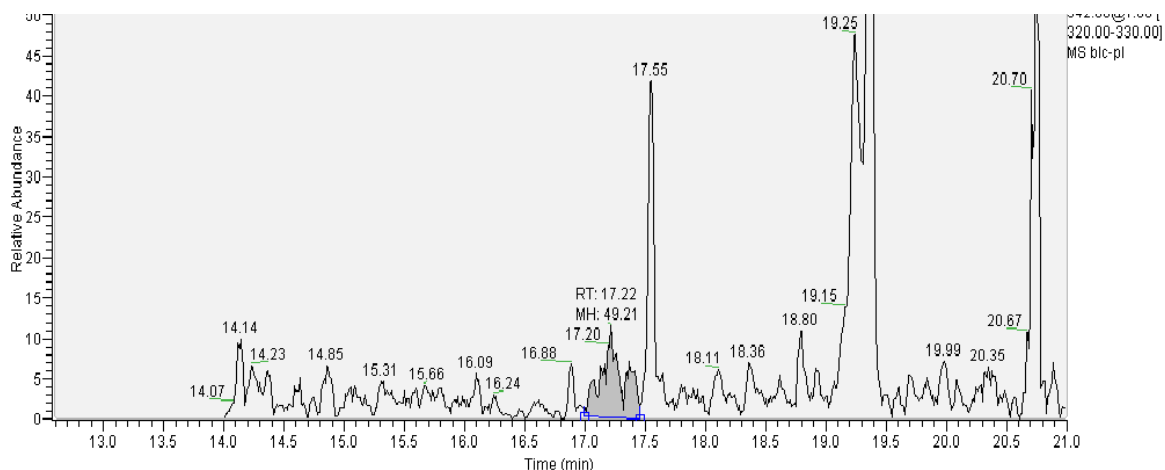
LOQ : $2,5 \times 5 \times 6055 / 46427 = 1,630 \text{ mg/kg}$



6.4.2 Lait en poudre par GC-MS Ion Trap en MS/MS pour les essais à 2,5 ppm :

LOD : $2,5 \times 3 \times 49,21 / 6469 = 0,057 \text{ mg/kg}$

LOQ : $2,5 \times 5 \times 49,21 / 6469 = 0,095 \text{ mg/kg}$



7. Conclusion

La méthode permet de quantifier la présence de mélamine pour des concentrations supérieures ou égales à 2,5 ppm dans du lait en poudre et 1 ppm dans des bonbons et des biscuits. En fonction des valeurs de fidélité intermédiaire obtenues lors des différents essais, la méthode est considérée comme reproductible.

La méthode permet de conduire à des rendements de 86% à 100%. Cependant, il a été noté lors des essais de validation que la quantification en mode MS/MS (342 → 327) sur l'ITD conduisait à des rendements plus faibles que sur le chromatogramme TIC alors qu'il s'agissait du même run d'analyse. La quantification sera réalisée, en fonction de ces observations, sur le chromatogramme TIC avec l'ITD pour le lait en poudre. Des essais complémentaires seront réalisés en mode MS/MS.

Les LOD et LOQ montrent que la méthode est adaptée pour une quantification à 1 ppm dans les biscuits et les bonbons, à 2,5 ppm dans le lait en poudre. La détection MS/MS permet d'atteindre la LOQ la plus basse estimée à 0,1ppm pour de la poudre de lait.

	1 - ppm			%	
	Conc. introduite	Moy. totale	Biais absolu	Biais relatif	Rendement
Mélamine- Bonbons	1.0	1.0	0.0	0.0	100.0
Mélamine- Biscuits	1.0	0.86	0.14	14.0	86.0
	2.5 ppm			%	
	Conc. introduite	Moy. totale	Biais absolu	Biais relatif	Rendement
Mélamine – lait en poudre	2.5	2.173	0.327	13.07	86,93

La spécificité a été établie sur base du temps de rétention et de la correspondance spectrale. Lors de la validation, pour les temps de rétention, le critère de déviation de +/- 0,05 mn a été respecté. Elle met en évidence les fragments caractéristiques de la mélamine sur des échantillons pour les matrices étudiées lors de validation. La méthode permet donc d'établir la confirmation de mélamine aux concentrations de 1 ppm pour les biscuits et les bonbons et de 2,5 ppm pour le lait en poudre. Le rapport entre les masses caractéristiques observé lors de la validation et le pourcentage de déviation sont repris dans le tableau suivant :

	m/z 171	m/z 327	m/z 342
Moyenne - %	35.9	36.8	27.3
Ecart-type	1.7	3.1	3.9
2.8 x Ecart-type	4.81	8.59	10.96
Moyenne - 2.8 x SD - %	31.14	28.19	16.31
Moyenne + 2.8 x SD - %	40.75	45.37	38.24

Le pourcentage de déviation autorisé se basent sur 2,8 x l'écart-type mesuré lors des essais de validation à 1 ppm.

8. Références bibliographiques

Figure 1 a : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration – acide cyanurique.

Figure 2 a: From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration – ammélide.

Figure 3 a : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration – amméline.

Figure 4 a : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration - mélamine.

Figure 5 : From GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs (Version 2 May 7, 2007). US Food and Drug Administration. Rapport entre les masses caractéristiques pour les analytes recherchés.