

Baby Gourmet

Teilprojekt Analytik

Dr.-Ing. Thomas Lettmann



Ziele des Teilprojekts Analytik



- 1.) Schnittstelle zum AP Produktentwicklung bezüglich regulatorischer bzw. analytischer Anforderungen an TK-Babynahrung
 - Auswahl und Bewertung von:
 - qualitätsbestimmenden Eigenschaften (z.B. Abbau von Leitsubstanzen)
 - sicherheitsrelevanten Fragestellungen (z.B. Analytik von Rückständen) ✓
- 2.) Erarbeitung und Optimierung bzw. Validierung von Analyseverfahren für TK-Babynahrung
 - Output der Arbeitspakete Analytik:
 - A 1.1 -> validierte Prüfmethode und SOPen ; Vergleich TK vs. Gläschen
 - A 1.2 -> Einfluss der „Stabilität“ der Prototypen und Überprüfung der Robustheit der erstellten Methoden ✓
- 3.) A 1.3 Ausbau der entwickelten Methoden zu Routinemethoden (z.B. Akkreditierung) -> Transfer ✓



Vorgehen Parameter- und Methodenauswahl



- Die Auswahl der **Parameter-/Methodenkombination** ist von folgenden Punkten abhängig:
 - (Pre-) Processing der Roh-, Zwischen- und Endprodukte
 - Auswahl der Rohstoffe (z.B. Leitparameter)
 - Beschaffenheit der Produkts (z.B. Matrixeffekte)
 - Regulatorische Vorgaben (z.B. Methodensammlung, Normen, VO... -> s. Anhang)



1

Festlegung der Parameter bzw. Qualitätskriterien (v.a. Grenzwerte)



2

Erarbeitung/Optimierung geeigneter Methoden



3

Produktspezifische Validierung der Messmethoden und der Probenahme



Übersicht Vorgehen Lagerungsversuche

Methoden- und Parameterauswahl



Matrixspezifische Validierung



Einlagerung

t_0

t_1

t_2

t_3

t_4

Q IV 2013

Q I 2014

Q II 2014

Q III 2014

Q IV 2014

AP 1.1

AP 1.2

Untersuchte Parameter der Baby Breie und Glaskost



Parameter	Methode	Sicherheitspara.	Qual.p.	Quelle
Eiweiß/Proteingehalt	§ 64 LFGB L 06.00-7 mod.		X	LIMV
Kohlenhydrate	berechnet		X	LIMV
Ballaststoffe	§ 64 LFGB L 00.00-18 mod.		X	LIMV
Zucker	§ 64 LFGB L 31.00-11 mod.		X	LIMV
Brennwert (kJ)	berechnet		X	LIMV
Brennwert (kcal)	berechnet		X	LIMV
Fettgehalt	§ 64 LFGB L 17.00-4 mod.		X	LIMV
ges. Fettsäuren und trans-FS	§ 64 LFGB L 13.03/04-2 mod.	X	X	LIMV
Schwermetalle	AAS - § 64 LFGB mod.	X		Kontaminanten-VO
Kochsalz	§ 64 LFGB L 17.00-6 mod.	X	X	LIMV
Trockenmasse	§ 64 LFGB L 06.00-3 mod.			für Berechnung
Asche	§ 64 LFGB L 06.00-4 mod.			für Berechnung
Pestizide/Aflatoxine	QHP Hausmethode(n), Quechers	X		VO (EG) Nr. 396/2005 Kontaminanten-VO (EG) Nr. 1881/2006 ; Diät- VO
Vitamine (fettl./wasserl.)	Weiterentwickelte Hausmethode		X	keine
Nitrat	AAS - § 64 LFGB mod.	X		Mineral- und Tafelwasser-VO
Casein	ELISA – Ridascreen mod.	X		LIMV

17.11.2014

Gefördert durch:

Die Landesregierung
Nordrhein-Westfalen




 EUROPÄISCHE UNION
 Investition in unsere Zukunft
 Europäischer Fonds
 für regionale Entwicklung

Elemente der Validierung

- Eine Validierung ist der dokumentierte Beweis, dass die PM innerhalb des festgelegten Gültigkeitsbereichs präzise, richtig, reproduzierbar und robust ist und somit verlässliche Ergebnisse liefert (Akkreditierung).

Im Rahmen der Validierung sind mindestens die folgenden Parameter zu prüfen:

Validierungsparameter	
Spezifität	Bestimmungsgrenze (LOQ)
Wiederholpräzision	Nachweisgrenze (LOD)
Vergleichspräzision	Stabilität der Referenz und Prüflösungen
Linearität	Systempräzision
Richtigkeit	Robustheit

- **(Pre-) Processing der Rohstoffe, Zwischen- und Endprodukte**
 - hoher Verlust der Analyten zu erwarten
- **Konzentrationsproblem**
 - Extrem kleine Gehalte
 - Weiter Konzentrationsbereich
- **Multikomponentenproblem**
 - Vielzahl von Verbindungen (Analyte, Begleitsubstanzen) mit sehr unterschiedlichen und/oder sehr ähnlichen Eigenschaften in z.T. sehr unterschiedlichen Mengen
 - evtl. Anreicherung notwendig
- **Multimatrixproblem (Objektvielfalt)**
 - Sehr verschiedenartige Matrices:
Luft, Wasser, Boden, Staub, Klärschlamm, Altöl, Blut, Milch, Urin, Lebensmittel, sonstiges biologisches Material
z.T. starke Matrix-Analyt-Wechselwirkungen
 - spezifische Trennung und Detektion
- **Kalibrierproblem**
 - Methoden der instrumentellen Analytik sind Relativmethoden
 - Vortrennung
 - Kalibrierung, Standards

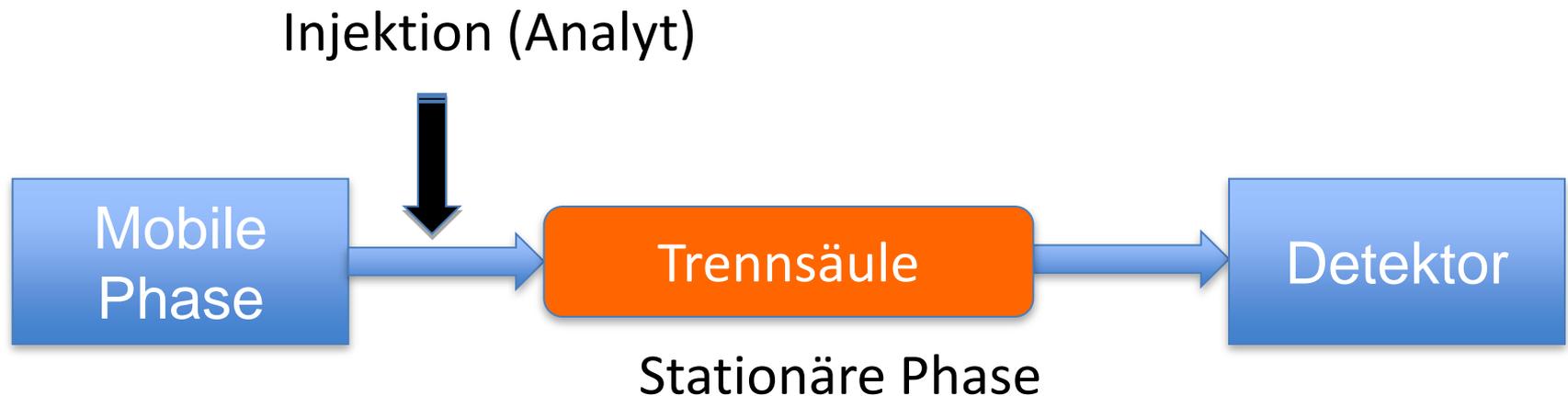
Messprinzip

1	LC-MSMS – Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie Bestimmung von Rückständen (Pestizide/Aflatoxine) sowie Vitaminen	4	Nasschemische Methoden – Bestimmung der Nährwerte, Alternativmethode Vitamin C
2	GC-FID – Gaschromatographie Messung der Fettsäureverteilung der Babybreie	5	HPLC-DAD – Flüssigkeitschromatographie Bestimmung der v.a. fettl. Vitamine und Vitamin C
3	AAS – Atomabsorptionsspektroskopie Bestimmung der Metalle / Spurenelemente	6	ELISA – Antikörperbasiertes Verfahren Bestimmung von allergenen Substanzen (z.B. Casein)

Messprinzip Chromatographie



Die **Chromatographie** ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die zu trennenden Substanzen zwischen zwei Phasen verteilt werden. Die stationäre Phase liegt fest, während die andere, die mobile Phase, sich in einer bestimmten Richtung bewegt.



Mobile Phase:

Flüssig = HPLC

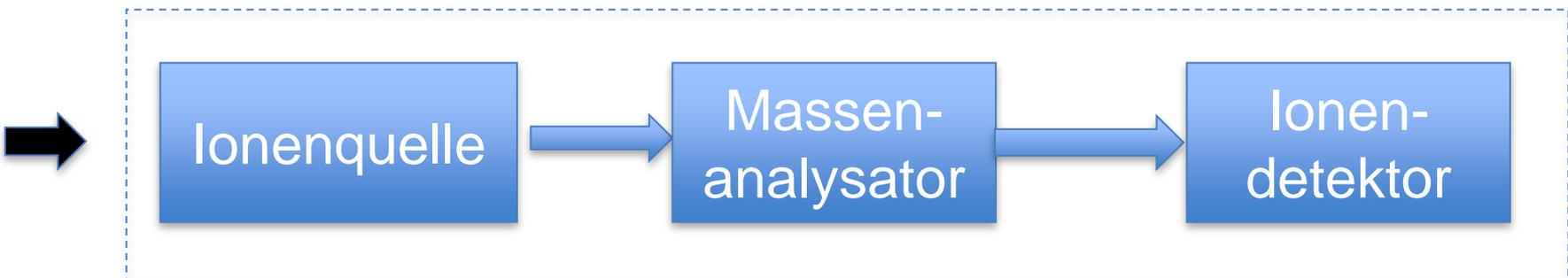
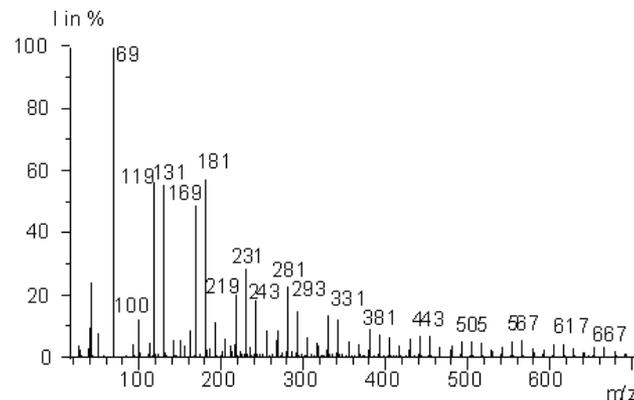
Gasförmig = Gaschromatographie



Messprinzip Kopplung mit Massenspektrometrie



Massenspektrometrie: Erzeugung von Ionen aus der Probe mit anschließender Trennung dieser Ionen entsprechend ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung m/z . Die Detektion erfolgt im Hochvakuum. Das gemessene Massenspektrum ist die Darstellung der (relativen) Intensität der getrennten Ionen als Funktion des m/z -Verhältnisses.



Messungen fett- und wasserlösliche Vitamine



Parameter	LOQ (mg/kg)
Vitamin A - Retinol	< 0,02
Vitamin B1 - Thiamin	< 0,06
Vitamin B2 - Riboflavin	< 0,06
Vitamin B6 – Pyridoxin	< 0,03
Vitamin B9 - Folsäure	< 0,04

Verwendete Messgeräte:

-HPLC

-LC-MSMS (Multimethode)

Fazit:

- Methoden wurden erfolgreich für Babykost validiert -> abgesichert durch „Aufstockung“ (s. Anhang)
- Es konnten jedoch keine der o.g. Vitamine oberhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) nachgewiesen werden.



Messungen Rückstände (Pestizide, Aflatoxine..)



- Es gilt die Verordnung (EG) Nr. 396/2005 (EU-Pestizidhöchstmengenverordnung) in der auch die Höchstmengen für Pestizide in Babynahrung geregelt sind. Für Aflatoxine gilt die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006.
- Grenzwert max. 0,01 mg/kg pro gefundenem Pestizid (für Babynahrung)
- Grenzwerte in der VO: Aflatoxin B1: 0,10 µg/kg, Aflatoxin M1: 0,025 µg/kg
- Grenzwerte von Pb, Cd, Ar und Hg wurden eingehalten

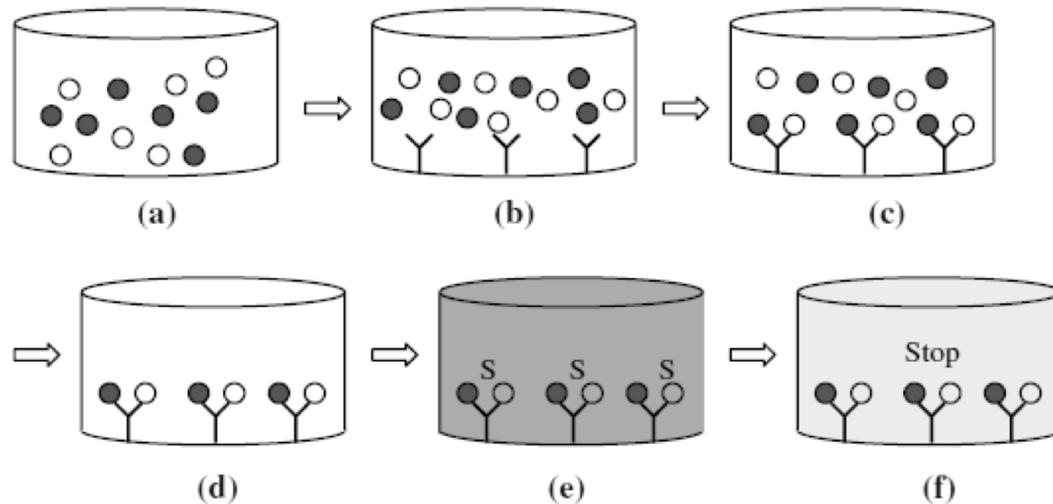
Status Quo:

- Methoden wurden erfolgreich für Babykost validiert.
- Es konnten zwar Pestizide nachgewiesen werden aber keine Pestizide über dem o.g. Grenzwert gemessen werden.
- Alle Proben waren frei von Aflatoxinen

Anm.: Eine EFSA-Studie besagt, dass bei einem Umfang von 2062 untersuchten Proben von Säuglingsnahrung aus 25 Ländern bei 76 Proben (3,7%) Pestizidrückstände nachgewiesen wurden. In vier Proben (0,2%) wurde der Rückstandshöchstgehalt überschritten



Messprinzip ELISA



S = Substrat

○ = Allergen-Enzym Konjugat

⊠ = Allergen

∨ = Anti Allergen Antikörper

Status Quo:

○ Grenzwerte bezüglich der Deklaration können mit der angepassten Methode eingehalten werden.

○ In allen vorliegenden Proben konnten keine allergenen Substanzen (hier: Casein) nachgewiesen werden. Die Werte lagen für alle Proben **< 2,5 mg/kg**.

Fazit der Untersuchungen



Methodenerstellung
(s. Folie Elemente der Validierung)

→ Validierungsphase wurde mit AP 1.1 abgeschlossen. Es liegen entsprechende Arbeitsanweisungen für die oben beschriebenen Analysenprinzipien vor.

Messungen von deklarationspflichtigen Inhaltsstoffen und Rückständen

→ Alle derzeit gültigen Grenzwerte konnten mit vorhandenen Methoden erreicht/unterschritten werden. Sicherheitsrelevante Parameter, die sich negativ auf die Verkehrsfähigkeit der Baby Nahrung auswirken könnten, wurden nicht nachgewiesen.

Auswahl des Leitparameters für Qualitätsverlust (Stabilitätsparameter)

→ Es konnte kein Parameter abgeleitet werden, der Aussagen über den angenommenen Qualitätsvorteil von TK-Baby Nahrung bestätigt.
Problem: viele Prozessschritte



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Fragen?

Zum Nachweis von Matrixeinflüssen wird die Wiederfindungsfunktion von Probenmatrices bestimmt.

Die Messproben werden durch Aufstocken mit Standardproben bekannten Gehalts hergestellt.

Die Probenmatrices enthalten die zu bestimmende Substanz vor der Aufstockung nicht.

- Welche Regelwerke sind derzeit von Bedeutung?
 - Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 (Kontaminanten-VO)
 - LFGB (Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuch -> Methodensammlung)
 - RhMV (Rückstandshöchstmengenverordnung)
 - Diätverordnung
 - Lebensmittelinformationsverordnung (LMIV)
 - ...

Probleme bei der Festlegung der Qualitätskriterien:

- Überblick behalten...
- „dynamische Entwicklung“ der EU-Gesetzgebung
- Welche Parameter sind überhaupt relevant? -> „man sieht den Wald vor lauter Bäumen nicht...“

Appendix : In welchen Dimensionen messen wir?



Problem: „Es gibt keine Konzentration NULL“

mg/kg = ppm

1 Cent von 10.000 €

Relevant für Schwermetalle



µg/kg = ppb

1 Cent von 10 Mio. €

1 Salzkorn in einem 50m Becken

7 Personen der Weltbevölkerung (7 Mrd.)

Relevant für Pharmaka, Analytik von Leistungsförderern...



ng/kg = ppt

1 Cent von 10 Mrd. €

1 Roggenkorn in 100.000 t Weizen (20 km langer Güterzug)

0,4 mm auf der Strecke Erde – Mond

Relevant z.B. für Dioxine

