



**Dossier de validation de l'analyse quantitative
de la mélamine dans le lait, les produits
alimentaire contenant du lait, le chocolat et les
aliments pour bétail**

DOC 22/F/1245

V3

Niveau : 3


Annexe: /

Date d'application :

P. : 1/6

Table des matières

1.	Linéarité	2
2.	Effet matrice.....	2
3.	Exactitude : justesse et reproductibilité intralaboratoire	3
4.	Limite de quantification et limite de détection.....	4
5.	Justesse.....	5
6.	Sélectivité et spécificité de la méthode	6
7.	Incertitude de mesure.....	6

	Dossier de validation de l'analyse quantitative de la mélamine dans le lait, les produits alimentaire contenant du lait, le chocolat et les aliments pour bétail	DOC 22/F/1245	
		V3	Niveau : 3
		Annexe: /	
		Date d'application :	
		P. : 2/6	

Ce document reprend toutes les données obtenues lors de la validation de l'analyse pour la détermination quantitative de la mélamine dans différentes matrices contenant du lait (lait, lait en poudre, chocolat au lait et autres aliments contenant du lait) et dans les aliments pour bétail, décrite dans la SOP 22/F/1245

1. *Linéarité*

Les réponses du détecteur ont été mesurées pour des concentrations différentes selon les matrices en injectant trois fois les solutions.


Pour le lait (1 g), les produits à base de lait (0,5 g), les aliments pour bétail (0,5g) et pour le chocolat dans la gamme de concentration respective de 0,5 à 50 mg/kg, de 0,5 à 40 mg/kg, 0,5 à 20 mg/kg et 25 à 600 µg/kg, le test de Mandel montre qu'un modèle linéaire est préférable (voir tableau ci-dessous)

Matrice	TV	Fcritique	Modèle
Lait	3,63	8	Linéaire
Produits alimentaire contenant du lait	1,22	8	Linéaire
Chocolat au lait	0,77	9	Linéaire
Aliments pour bétail	5,94	8	Linéaire

2. *Effet matrice*

L'effet matrice est vérifié en dopant un blanc négatif aux mêmes concentrations que les points de la linéarité. La courbe obtenue est comparée grâce à un t-test ($t(95\%) = 2,04$) avec la courbe de linéarité explicitée ci-dessus (point 1). Les valeurs obtenues sont reprises dans le tableau ci-après. Aucun effet de matrice n'a été observé dans la gamme de mesure correspondante à chaque matrice.

Matrice	T	Effet de matrice
Lait	0,59	non
Produits alimentaire contenant du lait	0,08	non
Chocolat au lait	0,56	non
Aliments pour bétail	0,38	non

	Dossier de validation de l'analyse quantitative de la mélamine dans le lait, les produits alimentaire contenant du lait, le chocolat et les aliments pour bétail	DOC 22/F/1245	
		V3	Niveau : 3
		Annexe: /	
		Date d'application :	
		P. : 3/6	

3. Exactitude : justesse et reproductibilité intralaboratoire

La justesse et la reproductibilité intralaboratoire ont été mesurées pour le lait et les produits à base de lait suivant le plan : 3 concentrations 3 fois pendant 3 jours différents. Tandis que pour les aliments pour bétail et le chocolat, la justesse et la reproductibilité intra-laboratoire ont été mesurées sur 2 concentrations 3 fois pendant 3 jours.

Pour le lait et les produits à base de lait, des échantillons blancs sont enrichis à 1 ppm, 10 ppm et 30 ppm de la manière suivante :


- pour le lait : 10 g de lait blanc plus 10 µl, 100 µl et 300 µl de la solution à 1 mg/ml.
- pour les produits à base de lait : 0,5 g de gaufre est dopé avec 50 µl de la solution 10 µg/ml, avec 50 µl ou 150 µl de la solution 100 µg/ml.

Pour le chocolat, les échantillons blancs sont enrichis à 50 et 500 ppb de la manière suivante : 0,5 g de chocolat plus 250 µl de la solution à 100 ng/ml et 250 µl de la solution à 1 µg/ml.

Pour les aliments pour bétail, les échantillons blancs sont enrichis à 2,5 ppm et à 10 ppm respectivement avec 125 µl et 500 µl de la solution à 10 µg/ml. La reproductibilité a été mesurée par trois manipulateurs différents.

Comme le montre le tableau ci-dessous, les déviations standard de répétabilité sont largement inférieures à la limite maximale de Horwitz dénotant une très bonne précision.

CV répétabilité (%) Matrice	Point bas	Horwitz point bas	Point moyen	Horwitz point moyen	Point haut	Horwitz point haut
Lait	3,36	10,7	2,30	7,6	1,96	6,5
Produit alimentaire contenant du lait	3,42	10,7	5,11	7,6	0,88	6,5
Chocolat au lait	4,56	14,7	/	/	7,40	12,3
Aliment pour bétail	5,37	9,7	/	/	2,75	7,9

	Dossier de validation de l'analyse quantitative de la mélamine dans le lait, les produits alimentaires contenant du lait, le chocolat et les aliments pour bétail	DOC 22/F/1245	
		V3	Niveau : 3
		Annexe: /	
		Date d'application :	
		P. : 4/6	

Les déviations standard de reproductibilité intra-laboratoire sont également largement inférieures à la limite maximale de Horwitz.


CV (%) reproductibilité intralaboratoire Matrice	Point bas	Horwitz point bas	Point moyen	Horwitz point moyen	Point haut	Horwitz point haut
Lait	3,6	16,1	3,5	10,5	6,1	9,8
Produit alimentaire contenant du lait	3,4	16,1	5,1	11,4	1,17	9,6
Chocolat au lait	9,9	22,0	/	/	12,1	18,5
Aliment pour bétail	13,4	14,6	/	/	11,2	11,8

Comme indiqué ci-dessous, les rendements (Apparent Recovery) obtenus sont tous compris entre 74 et 99%.

Rendement Matrice	Point bas	Point moyen	Point haut
Lait	96	92	87
Produit alimentaire contenant du lait	97	97	99
Chocolat au lait	85	/	76
Aliment pour bétail	74	/	74

4. Limite de quantification et limite de détection

Pour le lait, les produits à base de lait et les aliments pour bétail la limite de détection est estimée à partir de l'échantillon enrichi à 0,5 ppm. La concentration ajoutée multipliée par 3 et divisée par le rapport signal/bruit obtenu donne la valeur estimée de la LOD. Les LODs calculées sont inférieures à 0,2 ppm. La limite de détection a donc été fixée à 0,25 ppm. La LOQ est fixée à 0.5 ppm. Celle-ci a été vérifiée expérimentalement, le tableau ci-après montre que le critère du rapport signal/bruit de 6 est respecté.

	Dossier de validation de l'analyse quantitative de la mélamine dans le lait, les produits alimentaire contenant du lait, le chocolat et les aliments pour bétail	DOC 22/F/1245	
		V3	Niveau : 3
		Annexe: /	
		Date d'application :	
		P. : 5/6	

Matrice	S/N
Lait (0,5 ppm)	8,2
Produit alimentaire contenant du lait (0,5 ppm)	6,2
Chocolat au lait (25 ppb)	16,4
Aliment pour bétail (0,5 ppm)	12,6

Pour le chocolat, la limite de détection est estimée à partir de la solution enrichie à 25 ppb. Le même calcul explicité ci-dessus permet de fixer la LOD à 12.5 ppb. La limite de quantification fixée à 25 ppb a été vérifiée expérimentalement.

Ces limites de quantification respectent les exigences de la directive Européenne 2008/921/EC (2.5 ppm pour les matrices validées)


5. Justesse

Ne possédant pas de matériel de référence certifié (CRM), la justesse est estimée en soumettant la méthode d'analyse à deux tests d'inter-calibration :

- 1) Lait en poudre du test de DLA (Dienstleistung Lebensmittel Analytik GbR)
- 2) Lait en poudre et un mélange pour préparation alimentaire du test de l'IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements)

Les résultats de ces tests sont synthétisés dans le tableau ci-dessous.

	Z score		
	Lait en poudre DLA	Lait en poudre IRMM	Mélange pour préparation alimentaire IRMM
Mélamine	1.1	0.5	0.2
	Justesse (valeur mesurée/valeur assignée x 100)		
	Lait en poudre DLA	Lait en poudre IRMM	Mélange pour préparation alimentaire IRMM
Mélamine	90 %	102 %	98 %

	Dossier de validation de l'analyse quantitative de la mélamine dans le lait, les produits alimentaire contenant du lait, le chocolat et les aliments pour bétail	DOC 22/F/1245	
		V3	Niveau : 3
		Annexe: /	
		Date d'application :	
		P. : 6/6	

6. *Sélectivité et spécificité de la méthode*

La procédure d'analyse et la détection par chromatographie liquide ultra performante couplé à la MS/MS déterminent la spécificité de la méthode.

La sélectivité est basée sur :

- Extraction des échantillons par un mélange acétonitrile/eau et purification avec le dichlorométhane.
- Le temps de rétention du pic dans l'échantillon comparé par rapport à celui du standard.
- La détection en spectrométrie de masse
- Le mode du spectromètre de masse: mode MS/MS qui est plus spécifique
- Le rapport d'ions entre 2 ions fils qui sont comparés par rapport au standard

7. *Incertitude de mesure*

Les indications utilisées pour la détermination de l'incertitude de mesure (U) ainsi que les modalités de communication au client sont décrits dans la SOP 22/F/25. L'incertitude de mesure est basée sur les données de reproductibilité intra-laboratoire et la justesse obtenu pour l'ajout à plus basse concentration.

Matrice	Niveau Spike	Incertitude concentration basse (%)
Lait	1 ppm	10,8
Produit alimentaire contenant du lait	1 ppm	10.0
Chocolat au lait	0,05 ppm	19.1
Aliment pour bétail	2,5 ppm	26.87