

Fraktionierung als effiziente, kostengünstige und nachhaltige
Methode zur Probenaufbereitung von Milch im Labor -
Eine Alternative zu QuEChERS und QuPpe

von Jan-Michael Hubert Alfred Steils

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Fraktionierung als effiziente, kostengünstige und nachhaltige
Methode zur Probenaufbereitung von Milch im Labor -
Eine Alternative zu QuEChERS und QuPPE

von Jan-Michael Hubert Alfred Steils

aus Wolnzach

München 2025

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.- Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer

Angefertigt am: Milchprüfing Baden-Württemberg e.V.

Mentor: Dr. Markus Albrecht

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin P. Märtlbauer
Korreferent: Univ. Prof. Dr. Holm Zerbe

Tag der Promotion: 8. Februar 2025

Meiner Familie

Danke, dass Ihr da seid.

Familie ist ein Ort an dem Köpfe zusammenkommen.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	4
1.	Probenvorbereitungen im Labor	4
2.	QuEChERS-Verfahren.....	5
3.	QuPPE-Verfahren.....	8
4.	Fraktionierungsverfahren	10
5.	Green Chemistry	11
III.	PUBLIKATIONEN	13
1.	Publikation I	13
2.	Publikation II.....	18
IV.	BISHER UNVERÖFFENTLICHTE DATEN.....	33
1.	Life Cycle Assessment.....	33
2.	Life Cycle Inventory.....	35
3.	LCA - Impact Assessment	37
4.	Ökonomisches Assessment	39
V.	DISKUSSION	41
1.	Fraktionierung als Prozess	41
2.	Fraktionierung als Laborprobenvorbereitung.....	42
3.	Fraktionierung ökonomisch betrachtet.....	44
4.	Fraktionierung ökologisch betrachtet	46
5.	Fraktionierung zur Verbesserung der Prozessüberwachung	47
6.	Zusammenfassende Bewertung und offene Fragestellungen	49
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	52
VII.	SUMMARY.....	53
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	54

IX. DANKSAGUNG60

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CRL	Community Reference Laboratories
CVUA	Chemisches-Veterinäruntersuchungsamt
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
EURL-SRM	Europäisches Referenzlabor für Pestizide, die eine Einzelmethode benötigen
dSPE	Dispersive Solid Phase Extraction
FraMiTrACR	Fractionation of Milk for Trace Analysis of Contaminants and Residues
GC	Gas Chromatography
LC	Liquid Chromatography
LCA	Life Cycle Assessment
LCI	Life Cycle Inventory
LCIA	Life Cycle Impact Assessment
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LLE	Liquid Liquid Extraction
LLME	Liquid Liquid Microextraction
LVI	Large Volume Injection
LOD	Limit of Determination
LOQ	Limit of Quantification
MIV	Milchindustrie-Verband
MRI	Max-Rubner-Institut
MRM	Multirückstandsmethode
MRL	Maximum Residue Level
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
N ₂	Stickstoff
PSA	Primary Secondary Amine
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
QuPPe	Quick Polar Pesticides
RCF	Relative Zentrifugen Kraft
SPE	Solid Phase Extraction

Abkürzungsverzeichnis

SPME	Solid Phase Microextraction
TPP	Triphenylphosphate Solution
VO	Verordnung

I. EINLEITUNG

Milch und Milchprodukte sind ein wichtiger Bestandteil der täglichen Ernährung von Kindern und Erwachsenen in Deutschland. Pro Tag und Person werden durchschnittlich 2-3 Portionen davon verzehrt (MRI, 2014). Aktuelle Daten zeigen, dass der pro Kopf Verbrauch von Milchprodukten bei 94,1kg pro Jahr liegt. Diese Menge setzt sich zusammen aus 82,5kg Frischmilcherzeugnissen und 11,6kg Käseerzeugnissen (MIV, 2024). Qualität und Sicherheit dieser Lebensmittel werden regelmäßig kontrolliert, sowohl im Rahmen von Eigenkontrollen der Lebensmittelunternehmer als auch behördlicher Überwachungsmaßnahmen. Diese Lebensmittelkontrollen sind durch europäisches Recht umfassend geregelt und werden bei Bedarf durch nationale Gesetzgebung ergänzt. So bildet die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit die rechtliche Grundlage für die Lebensmittelüberwachung (VO (EG) Nr. 178/2002). Die betrieblichen Eigenkontrollen des Lebensmittelunternehmers sind durch den Artikel 5 der europäischen Verordnung 852/2004 näher geregelt (VO (EG) Nr. 852/2004). Er legt fest, dass der Lebensmittelunternehmer eigene Kontrollen zur Überprüfung der Lebensmittelsicherheit durchführen muss. Kontrollen der amtlichen Lebensmittelüberwachung werden in Deutschland regional durch die Bundesländer durchgeführt, sind aber ebenfalls einheitlich für die EU durch die europäische Verordnung 882/2004 vorgegeben (VO (EG) Nr. 882/2004). Zusätzlich ist der Rahmen für die nationalen Rückstandskontrollpläne durch die Verordnung (EU) 2017/625 festgelegt (VO (EU) 2017/625). Eine ergänzende nationale Regelung ist die Verordnung zur Förderung der Güte von Rohmilch, die Details für die Gütebewertung der Rohmilch enthält und für die Verzahnung der damit verbundenen Untersuchungen mit den Anforderungen des EU-Rechts sorgt. Sie beschreibt beispielsweise die Vorgehensweise bei der Probennahme und die Anforderungen an die Analyse von Rohmilchproben. Zusätzlich legt diese Verordnung das Vorgehen bei positiven Kontrollbefunden und die damit verbundenen finanziellen Konsequenzen für den Landwirt fest (RohmilchGütV, 2021). Im Rahmen der Kontrolluntersuchungen über die gesamte Lebensmittelkette

der Milch werden eine Vielzahl an Untersuchungsverfahren eingesetzt. In Deutschland schreibt das Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch in §64 eine Sammlung aller amtlichen anerkannten Probenaufbereitungs- und Analyseverfahren vor, die durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit geführt wird (LFGB, 2005). Dabei können je nach den jeweiligen Anforderungen in Bezug auf die Zielstellung der Untersuchungen unterschiedliche Verfahren zum Einsatz kommen. Nachweise von antibiotischen Rückständen in der Rohmilch zum Beispiel werden in Lieferantenproben und in Proben aus Stapeltanks vor der Verarbeitung in den Molkereien oftmals mittels eines unspezifischen, mikrobiellen Hemmstofftests geführt. Wenn dieser Hemmstofftest einen positiven Befund anzeigt, muss das Ergebnis aus dem unspezifischen Verfahren durch spezifische Verfahren verifiziert werden, um die Art des Rückstands und dessen Konzentration festzustellen. Diese meist chromatografisch basierten Analyseverfahren, die eine qualitative und quantitative Bestimmung ermöglichen, erfordern in der Regel eine rückstandsspezifische Probenaufbereitung (RohmilchGütV, 2021; Steils et al., 2024). In diesem Zusammenhang haben sich vor allem zwei Probenvorbereitungsverfahren durchgesetzt und haben heute weltweite Relevanz: das „Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe“-Verfahren (QuEChERS-Verfahren) und das „Quick Polar Pesticides“-Verfahren (QuPPE-Verfahren) (CVUA, 2024).

Das QuEChERS-Verfahren wurde als Multimethode zur Bestimmung von Pestiziden in Obst und Gemüse im Jahr 2003 vorgestellt (Anastassiades et. al., 2003). Das von Anastassiades et al. beschriebene Verfahren hat sich seitdem durch einige Modifikationen zu einer Probenvorbereitungsmethode für viele Analyten und vielfältige Probenmatrices weiterentwickelt (Azad et. al., 2020). Die Methode ist sehr gut geeignet, um Stoffe mit unpolaren oder mäßig polaren Eigenschaften aufzubereiten. Um die dabei vorhandene Lücke zu den hoch polaren Pestiziden zu schließen, wurde daraufhin das QuPPE-Verfahren entwickelt. Das europäische Referenzlabor für Pestizide (EURL-SRM), hat diese Methode im Jahr 2008 publiziert (Anastassiades et. al., 2008). Die QuPPE-Methode ist seit dem Jahr 2013 sowohl für Proben pflanzlichen Ursprungs als auch tierischen Ursprungs verfügbar (EURL-SRM, 2024).

Beide Methoden sind sehr zeitaufwendig und können nicht in einem just-in-time

Verfahren angewendet werden. In meiner Tätigkeit als Mitarbeiter der HiPP Werk Georg Hipp OHG habe ich zusammen mit Kollegen einen Prozess zur Stoffabtrennung in Rohwarenverarbeitung in einem Werk zur Säuglingsmilchnahrungsproduktion entwickelt (WO2021048427, 2021). Dieser Prozess ermöglicht eine Reduktion von Rückständen und Kontaminanten aus Rohwaren, wie Magermilch oder Molke. Da der entwickelte Prozess zeitabhängig und von der Ursprungskonzentration abhängig ist, hat sich die Fragestellung einer just-in-time Probenaufbereitung und Analyse bei Rohwarenanlieferung ergeben. Bei Kenntnis der Ausgangskonzentration kann das patentierte Verfahren zeitoptimiert angewendet werden. Das physikalische Prinzip des Prozesses wird als Fraktionierung bezeichnet.

Die vorliegende Arbeit geht daher der Frage nach, ob ein derartiges Fraktionierungsverfahren zur „just-in-time“-Probenvorbereitung von Rohmilchproben für die Rückstandsanalytik eingesetzt werden kann. Um das Fraktionierungsverfahren in eine Laboranwendung umzusetzen, ist eine Fraktionierungseinheit in Zusammenarbeit mit der Sartorius Lab Instruments GmbH konzipiert worden, die als FraMiTrACR (Fractionation of Milk for Trace Analysis of Contaminants and Residues) bezeichnet wird. Der FraMiTrACR ermöglicht eine passive und extraktionsmittelfreie Trennung von komplexen Probenmatrices in einem ein-Schritt-Verfahren mittels Zentrifugation. Eine der beiden Fraktionen kann nach der Zentrifugation direkt zur weiteren Analyse zum Beispiel mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) genutzt werden.

Neben der grundsätzlichen Fragestellung der Machbarkeit sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch geprüft werden, ob die Fraktionierung gleichwertige Analyseergebnisse wie das QuEChERS- oder QuPPE-Verfahren ermöglicht. Zusätzlich sollte betrachtet werden, welche Unterschiede diese drei Methoden hinsichtlich der Arbeitsabläufe und der Arbeitskosten eines Labors aufweisen. Neben diesen rein wirtschaftlichen Aspekten sollten wegen der völlig neuen Prozesscharakteristika, nämlich der Eliminierung aller Chemikalienzusätze im Verlauf der Probenaufarbeitung wie auch der drastischen Verkürzung der Prozesszeiten, auch Fragen der Auswirkungen auf die Umwelt geklärt und nach neuen Möglichkeiten für just-in-time Monitoringkonzepte gesucht werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Probenvorbereitungen im Labor

Um Lebensmittel auf ihre Bestandteile oder Rückstände untersuchen zu können, benötigt das durchführende Labor nicht nur eine geeignete Analysetechnik, sondern auch ein geeignetes Verfahren zur Vorbereitung der Probe vor der Analyse für die jeweilige Methode. Diese Probenvorbereitung ist notwendig, da die Probe im Originalzustand in der Regel nicht analysiert werden kann (Kanu, 2021). Während der Probenvorbereitung soll die Probe durch einzelne, mehrere oder sich wiederholende Arbeitsschritte so verändert werden, dass störende oder hinderliche Faktoren beseitigt werden und so die Analyse ohne Beeinflussung des Zielparameters möglich wird. Jedes Verfahren zur Probenvorbereitung ist aufgrund der enormen Variabilität der Matrices und Zielparameter jeweils spezifisch für einzelne Analyten oder Stoffgruppen zu betrachten. Mögliche Arbeitsschritte bei der Vorbereitung können beispielsweise Verdünnung, Filtration, Deproteinisierung, Derivatisierung, Zentrifugation, Reinigung, Stoffisolierung und -trennung, Extraktion oder Vorkonzentration sein (Kaykhali, 2021).

Zu den ältesten und am häufigsten verwendeten Probenvorbereitungsschritten zählen die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und die Festphasenextraktion (SPE), die seit den 1950er Jahren angewendet werden. Die LLE bezeichnet ein Verfahren, bei dem zwei Flüssigkeiten miteinander vermischt werden, um Analyten aus einer der beiden Flüssigkeiten herauszulösen und in die andere zu überführen. Bei der SPE werden die Analyten nach Adsorption an eine feste Phase durch ein Extraktionsmittel in eine flüssige Phase überführt (Kanu, 2021). Diese Methoden sind seit Ihrer Entstehung stetig weiterentwickelt worden, um neuen Anforderungen in der Analytik von Stoffen gerecht zu werden.

Zu nennen ist beispielhaft das im Folgenden detaillierter beschriebene QuEChERS-Verfahren; dieses steht stellvertretend für eine dispersive Festphasenextraktion (dSPE), eine Weiterentwicklung der SPE. Die Weiterentwicklung besteht bei der dSPE darin, dass nicht nur der Analyt in eine flüssige Phase überführt wird, sondern dass durch Zugabe von kleinen Mengen Feststoffen unerwünschte Probenmatrixbestandteile gebunden werden, womit die Selektivität des Verfahrens erhöht wird (Chisvert et. al., 2019). Neben laborintrinsischen Ansätzen zur

Verbesserung der Analytik sind die Verfahren auch deshalb weiterentwickelt worden, um umweltschonender und nachhaltiger zu sein. So ist die Flüssigphase-Microextraktion (LPME) ein Beispiel für eine nachhaltige Weiterentwicklung der LLE-Methode, da weniger Lösungsmittel eingesetzt werden (Alahmad et al., 2023). Weitere nachhaltigere Probenvorbereitungsansätze werden später im Abschnitt „Green Chemistry“ beschrieben.

2. QuEChERS-Verfahren

Das QuEChERS-Verfahren ist eine Probenaufbereitungsmethode für pflanzliche Lebensmittelproben zur nachfolgenden Pestizidanalyse. Dieses Verfahren ist im Jahr 2003 von Michelangelo Anastassiades und Koautoren erstmals publiziert worden. Das Verfahren beschreibt eine Multirückstandsmethode (MRM), die einen Extraktionsschritt mit Acetonitril und einen Aufreinigungsschritt mittels dispersiver Festphasenextraktion (dSPE) enthält (Anastassiades, 2003). Das Verfahren ist durch eine kollaborative Studie im Jahr 2007 weltweit evaluiert und im selben Jahr als offizielle Methode 2007.01 in das Methodenbuch der AOAC (Association of Official Analytical Chemists) aufgenommen worden. Die ursprüngliche Methode gliederte sich in bis zu 21 Arbeitsschritte, die als Tabelle 1 dargestellt sind (Lehotay et. al., 2007; AOAC-Methode 2007.01, 2007).

Tabelle 1: Arbeitsschritte der QuEChERS-Methode (entnommen aus AOAC-Methode 2007.01, 2007)

Arbeitsschritt	Vorgang
0	Zerkleinern von >1 kg Probe mit einem vertikalen Schneider. Homogenisieren einer ca. 200 g Unterprobe mit einem Probenmischer.
1, 2	Überführen von 15 g Unterprobe in ein 50 mL Teflonröhrchen.
3-5	Hinzufügen von 15 mL 1% Essigsäure in Acetonitril, 1,5 g wasserfreies Natriumacetat, 6 g wasserfreies Magnesiumsulfat und 75 µL interne Standardlösung.
6, 7	1 Minute kräftig schütteln. Zentrifugieren bei >1500 rcf für 1 Minute.
8, 9	Überführen von 1-8 mL in ein Röhrchen mit 150 mg wasserfreiem Magnesiumsulfat und 50 mg PSA pro mL Extrakt und 30 Sekunden schütteln.
10	Zentrifugieren bei >1500 rcf für 1 Minute.
11-15A	Überführen von 0,5-1 mL Extrakt in ein GC-Fläschchen und Hinzufügen von TPP. Überführen von 0,15-0,3 mL in ein LC-Fläschchen und Hinzufügen von z.B. 0,45-0,9 mL 6,7 mM Ameisensäure.

11-14B	Überführen von 0,25 mL aus Schritt 10 in ein LC-Fläschchen. Hinzufügen von TPP und z.B. 0,86 mL 6,7 mM Ameisensäure.
15-16B	Überführen von 4 mL aus Schritt 10 in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen. Hinzufügen von 0,4 mL TPP-Lösung und 1 mL Toluol.
17-19B	Verdampfen bei 50°C mit N ₂ auf 0,3-0,5 mL. Hinzufügen von Toluol, um 1 mL zu erhalten. Hinzufügen von 0,2 mL wasserfreies Magnesiumsulfat und Schwenken bis zur 6 mL-Markierung.
20B	Zentrifugieren bei >1500 rcf für 1 Minute. Überführen von ca. 0,6 mL in ein GC-Fläschchen.
16A/21B	Analyse mittels (LVI)GC/MS und LC/MS-MS

Ursprünglich entwickelt für die Pestizidanalyse in pflanzlichen Lebensmittelproben, ist die Methode seit ihrer Veröffentlichung vielfältigen Änderungen unterzogen worden. Zum einen wurde durch verschiedene Anpassungen ein größeres Detektionsspektrum der Pestizide erreicht, zum anderen ist die Methode um andere Stoffklassen und Probenarten ergänzt worden. Es gibt zahlreiche Übersichtsartikel, die die Entwicklungen der QuEChERS-Methode zusammenfassen. In ihrem Review nennen Rejczak et. al. eine Vielzahl an Analyten und Probenarten. Dabei gehen sie beispielsweise auch auf Antibiotika, Antiparasitika oder Hormone in tierischen Lebensmitteln ein. Sie dokumentieren jeweils die spezifischen Extraktionsarten und deren Reagenzien für die Aufbereitung von pflanzlichen Proben, von Ölen, von Wein und Fisch. In ihrem Artikel geben sie zwar einen weiten Überblick, jedoch beschreiben sie nicht alle Probenarten, die mittels des QuEChERS-Verfahrens aufbereitet werden können (Rejczak et. al., 2015). So wird beispielsweise in dem Artikel „QuEChERS - fundamentals, relevant improvements, applications and future trends“ aus dem Jahr 2019 auch die Anwendung der QuEChERS-Methode für Umweltproben oder Blutplasma publiziert (Perestrelo et. al., 2019). Zusätzlich sind viele Einzelmethoden für eine Probenart beschrieben, so auch für Milch und Milchprodukte. Özdemir et. al. haben im Jahr 2019 über die Bestimmung von Organochlor-Pestizidrückständen mittels QuEChERS-Verfahren in pasteurisierter und sterilisierter Milch berichtet (Özdemir et. al., 2019). Das Verfahren der Aufbereitung nach QuEChERS für Milch zur nachfolgenden Antibiotikabestimmung ist von O. Shimelis und J. Claus beschrieben worden. Die

in dieser Publikation dargestellte Aufbereitung ist jedoch wesentlich kürzer als die ursprüngliche Methode und daher sei sie hier als Tabelle 2 explizit aufgeführt (Shimelis et Claus, 2023).

Tabelle 2: Arbeitsschritte der QuEChERS-Methode für Milch (entnommen aus Shimelis et Claus, 2023).

Arbeitsschritt	Vorgang
1	Milchproben werden eingewogen und mit analytischen Standards versetzt und 10–30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
2	10 mL ACN zu jeder Probe hinzufügen, 10 Sekunden auf dem Vortex-Mischer mischen, 5 Minuten auf dem mechanischen Schüttler mischen.
3	Proben 10 Minuten zentrifugieren, Überstand sammeln.
4	500 mg C18CE zum Überstand hinzufügen, 10 Sekunden auf dem Vortex-Mischer mischen, 1 Minute auf dem mechanischen Schüttler schütteln.
5	Proben erneut 5 Minuten zentrifugieren, Überstand in ein vorgewogenes Glasröhrchen überführen.
6	Überstand 2–3 Stunden bei 40°C unter Vakuum auf ein Endgewicht von 1 g eindampfen.
7	750 µL Wasser und 250 µL ACN zur konzentrierten Probe hinzufügen.
8	Extrakt durch einen 0.45 µm Spritzenfilter filtrieren.
9	Der gefilterte Extrakt ist bereit für die LC–MS/MS-Analyse.

Für höher verarbeitete Milchprodukte, wie Butter, Joghurt, Weich- und Hartkäse sind ebenfalls Aufbereitungsverfahren nach QuEChERS beschrieben. Die Autoren kombinieren darin das Sorbentverfahren nach QuEChERS mit einer reverse phase dSPE, um eine gleichzeitige Analyse von mehreren Antibiotikagruppen zu ermöglichen und die Matrixeffekte zu verringern (Schwaiger et. al., 2017). Ebenso ist beschrieben, dass milchbasierte Säuglingsmilchnahrungen mittels QuEChERS-Verfahren zur weiteren Analyse aufbereitet werden können (Izzo et. al., 2021). Somit ist heute die Methode, die Michelangelo Anastassiades und Koautoren erstmals 2003 beschrieben haben, auch bei der Aufbereitung von Milch und Milchprodukten ein anerkanntes Verfahren.

3. QuPPE-Verfahren

Das QuPPE-Verfahren ist entwickelt worden, weil die Aufbereitung stark polarer Pestizide mit dem QuEChERS-Verfahren nur eingeschränkt möglich ist (CVUA Stuttgart, 2024; Anastassiades et. al., 2008). Daher ist das QuPPE-Verfahren für Proben vorgesehen, aus denen Pestizide analysiert werden sollen, die stark polar und stark wasserlöslich, aber kaum lipophil sind. In der ersten Veröffentlichung lag der Fokus der Methode auf der Analyse von Pestiziden wie Glyphosat und Chlormequat in pflanzlichen Proben (Anastassiades et. al., 2008). Diese Methode wurde im Jahr 2009 als 1. Version der QuPPE-Methode unter dem Titel „Quick Method for the LC-MS/MS Analysis of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving a Common Extraction Step with Methanol“ durch die Community Reference Laboratories for Residues of Pesticides - Single Residue Methods im Internet veröffentlicht (CRL, 2009). Mit Einführung der Version 10.1 ist erstmals die Zugabe von EDTA als Komplexbildner für zweiwertige positive Ionen, wie Calcium und Magnesium beschrieben sowie der Einsatz von Sorbentien zur dSPE bei pflanzlichen Proben (EURL-SRM, 2020). Im Jahr 2013 wurde die Methode ausgeweitet auf Proben tierischen Ursprungs; die 1. Version davon wurde ebenfalls im Jahr 2013 im Internet veröffentlicht (EURL-SRM, 2013). Diese ursprüngliche Version für Proben tierischen Ursprungs enthielt im Gegensatz zu der oben beschriebenen 1. Version für pflanzliche Proben bereits den Schritt der dSPE mit einem Sorbent. Mit Einführung der nunmehr 3. Version der Methode für Proben tierischen Ursprungs enthält dieses aktualisierte Verfahren auch den Schritt der EDTA-Zugabe (EURL-SRM, 2019). Zusammenfassend lässt sich daher annehmen, dass sich die zusätzlichen Aufbereitungsschritte als sinnvoll für den Analyseerfolg herausgestellt haben. Nachfolgend wird die Methode für Proben tierischen Ursprungs mit den jeweiligen Arbeitsschritten tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 3: Arbeitsschritte der AO QuPPE Methode (entnommen aus EURL-SRM, 2019).

Arbeitsschritt	Vorgang
1	Probenhomogenisat in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen wiegen: Milch, Niere, Muskel und Leber: 10 g ± 0,1 g
2	(nicht erforderlich, wenn IL-IS verwendet wird): Leber: +2 mL, Muskel: +1,5 mL, Niere: +1 mL, Vollmilch: +0,5 mL, Magermilch: keine Zugabe
3	100 µL isotopenmarkierten internen Standard (IL-IS) hinzufügen

4	10 mL MeOH mit 1 % Ameisensäure und zusätzlich 100 µL Ameisensäure hinzufügen, Röhrchen schließen und schütteln
5	1 mL 10% wässrige EDTA-Lösung hinzufügen
6	Gründlich 5-15 Minuten mit einem mechanischen Schüttler schütteln
7	Probe vollständig einfrieren (z.B. 30 Minuten bei -80 °C oder >90 Minuten bei -20 °C), sofort zentrifugieren (>3.000 g für 5 Minuten, bevorzugt ~10.000 g, bevorzugt gekühlte Zentrifugation) oder Arbeitsschritt 8
8	Gekühlte Hochgeschwindigkeitszentrifugation (z.B. >10.000 g bei -10 °C für ≥20 Minuten)
9	2 mL des Rohextrakts in ein Röhrchen mit 100 mg C18-Sorbens und 2 mL Acetonitril überführen, 1 Minute schütteln und bei >3.000 g für 5 Minuten zentrifugieren
10	Zentrifugationsunterstützte Ultrafiltration durch einen 5 kDa-Cut-off-Filter (z.B. Polyethersulfonmembran)
11	Analyse mittels LC-MS/MS

Die QuPPE-Methode wird neben der Bestimmung von polaren Pestiziden in pflanzlichen Proben auch in der Analyse von Chlorat und Perchlorat in Milchproben genutzt. Chlorat und Perchlorat können durch den Einsatz von chlorhaltigen Reinigungsmitteln die Milchlieferkette als Kontaminanten verunreinigen (IDF, 2023; Steils et. al, 2023).

4. Fraktionierungsverfahren

Fraktionierungsverfahren sind in der Lebensmittelindustrie weitverbreitet. Fraktionierung beschreibt in diesem Kontext das Aufteilen einer Ausgangsmenge in mindestens zwei Teilmengen unterschiedlicher Zusammensetzung. Zeitgleich findet der Begriff auch Anwendung auf die Aufteilung eines Stoffgemisches in Untergruppen (Gold Book, 2024).

Fraktionierungsverfahren können stufenweise erfolgen und unterschiedliche Arbeitsschritte oder Verfahrenstechniken beinhalten. So werden beispielsweise Zentrifugen in der Milchindustrie einzeln oder in Reihe eingesetzt, um eine Trennung von Fraktionen zu erreichen; zu nennen wären hier normale Milchzentrifugen zur Entrahmung, aber auch Entkeimungsseparatoren. Neben Trennverfahren mittels Zentrifugalkraft gibt es in der Molkereiwirtschaft auch membranbasierte physikalische Verfahren. Mikrofiltration wird beispielsweise eingesetzt zur mikrobiellen Entkeimung, Ultrafiltration zur Proteinabtrennung und Nanofiltration zur Entsalzung und Aufkonzentrierung. Zu beachten ist, dass in den Membranverfahren nur fettfreie Magermilch verwendet werden kann und somit die Entrahmung als ein vorgelagerter Arbeitsschritt unerlässlich ist (Bylund und Tetra Pak, 2015).

Diese Molkereiverfahren, bestehend aus der Entfettung der Milch durch Zentrifugation und nachfolgender zentrifugationsgestützter Ultrafiltration, haben Dyke et al. auch als Teil eines Milchprobenaufbereitungsverfahrens im Labor beschrieben. Die Autoren benutzen aber eine Aufarbeitung des Extraktes mit starken Säuren und Kationenaustauscherharzen vor der finalen Untersuchung auf Perchlorat (Dyke et al., 2005). Frenzel et al. beschreiben in ihrem Übersichtsartikel „Membrane-based sample preparation for ion chromatography“ verschiedene Verfahren zur Trennung oder Extrahierung von Analyten mittels Membrantrennung, Dialyse oder mikrowellengestützter Extrahierung. Sie beschreiben aber nicht die Anwendung der genannten Möglichkeiten detailliert für Milchprodukte (Frenzel et al., 2016). In der Publikation von Ortelli et al. wird die Probe mittels Ultrafiltration aufgereinigt, jedoch wird zuvor eine Fällung mit Acetonitril durchgeführt; außerdem wird darauf hingewiesen, dass die Milchprobe homogenisiert sein muss (Ortelli et al., 2009).

5. Green Chemistry

Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit sind neue Wettbewerbsfaktoren und damit auch zunehmend Leistungsindikatoren für Labordienstleister. Damit werden neben der Analytik auch die Probenvorbereitungsmethoden immer intensiver einem "Nachhaltigkeits- und Umwelt-Check" unterzogen. In der Folge werden bestehende Verfahren wo möglich so adaptiert, dass diese bezüglich ihres Einsatzes von Einweg-Verbrauchsmaterial oder dem Einsatz von Extraktions- oder Lösungsmitteln vorteilhafter sind als die zuvor bekannten bzw. benutzten Methoden. Dieser Prozess der ständigen Verbesserung von Labormethoden und von Arbeitsabläufen in Laboren mit Blick auf deren Umweltverträglichkeit und Nachhaltigkeit wird als „Green Chemistry“ bezeichnet.

Ein Beispiel für eine nachhaltige Adaptation einer Methode ist die Liquid Phase Microextraction (LPME), die eine Verbesserung der bisher genutzten Liquid Liquid Extraktion (LLE) ist, weil sie wesentlich geringere Lösungsmittelvolumina benötigt. Gleiches trifft auch auf die Solid Phase Microextraction (SPME) zu, die von der klassischen Solid Phase Extraction (SPE) abgeleitet ist. (Alahmad et al., 2023). Die Autoren Aly und Gorecki benennen auch Membrane Extraction (ME) als Green-Chemistry-Methode, wobei sie zwischen einer Vielzahl an Methodenvarianten unterscheiden. Die beschriebenen Methoden basieren zum großen Teil auf einem Phasen- oder Konzentrationsausgleich zwischen zwei Medien. Die Membran trennt in diesen Prozessen eine Phase von der anderen Phase. Eine lösungsmittelfreie Fraktionierung mittels Membran wird nicht beschrieben. Jedoch wird zu Beginn der Publikation von Aly und Gorecki unterschieden zwischen möglichst keiner Vorbehandlung der Proben durch Lösungsmittel, also einer Direktanalyse, und den Green-Chemistry-Methoden, die versuchen den Einsatz von Lösungsmitteln möglichst gering zu halten (Aly et Gorecki., 2020).

Neben der Adaptation von bestehenden Methoden ist es auch ein Ziel der Green Chemistry, neuartige und gleichzeitig nachhaltige Methoden zu entwickeln. Lopez-Lorente et al. haben dazu in ihrem Artikel „10 Prinzipien der grünen Probenvorbereitungen“ beschrieben. Diese 10 Prinzipien besagen, dass Lösungsmittel, Reagenzien und Materialien sicher, erneuerbar, recycelbar und wiederverwendbar sein sollen. So werden die Abfallmengen und der Energiebedarf

minimiert, ein hoher Probendurchsatz und die Miniaturisierung von Proben ermöglicht und auch die Vereinfachung sowie die Möglichkeit zur Automatisierung der Verfahren und deren Sicherheit gewährleistet (Lopez-Lorente et al., 2022). Neben diesen generellen nachhaltigen Anforderungen an neue Methoden gehen mehrere Autoren auch darauf ein, dass neben der Verbesserung der Nachhaltigkeit der Analysemethoden selbst auch der Prozess der Probenvorbereitung für komplexe Matrices zu vereinfachen oder zu verkürzen und damit nachhaltiger zu gestalten sei (Cardenas, 2021; Ridgway et al, 2007).

Neben diesen Ansätzen zur Verbesserung der Nachhaltigkeit in der Laborindustrie finden sich auch mehrere Publikationen, die Nachhaltigkeitsbewertungsverfahren von Methoden grundsätzlich diskutieren. Raccary et al. veröffentlichen komplexe Lebenszyklusanalysen, um die Nachhaltigkeit von verschiedenen Methoden zu bewerten. Dabei erheben sie umfangreiche Daten über die Mengen an Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Energie, die für die Vorbereitung einer Probe benötigt werden. Sie stützen ihr Verfahren auf Literaturdaten, die auch anderen Autoren die Möglichkeit geben, diese Daten als Vorlage für Lebenszyklusanalysen von Labormethoden zu nutzen (Raccary et al, 2022). Gonzales-Martin et al. bringen grafische Darstellungen als Alternative zu komplexen Berechnungen zur Bewertung der Nachhaltigkeit von Probenvorbereitungsmethoden in die Diskussion ein (Gonzales-Martin et al., 2023). Insofern stehen für diesen sich neu entwickelnden Zweig der Green Chemistry je nach Anspruch flexible Lösungen für die Bewertung von Methoden und Prozessen zur Verfügung.

III. PUBLIKATIONEN

1. Publikation I

Titel

Single step fractionation of raw milk with FraMiTrACR® prior to detection of the residual contaminants chlorate and perchlorate

Autoren

Jan-Michael Steils, Christian Baumgartner, Klaus Schöne, Maren Lang, Melina Kraus, Harald Thenmaier, John Cashman

Journal

Milk Science International (IF 0.416)

Status

Publiziert 17.04.2023

Milk Science International (76) 2023 P. 24-27

ISSN 2567-9538; <https://doi.org/10.48435/MSI.2023.4>

Single step fractionation of raw milk with FraMiTrACR[®] prior to detection of the residual contaminants chlorate and perchlorate

Jan-Michael Steils^{1*}, Christian Baumgartner^{2,*}, Klaus Schöne³, Maren Lang⁴, Melina Kraus⁴, Harald Thenmaier⁵, John Cashman⁶

¹pureMilk analytical GmbH, Freyunger Str. 15, D-94065 Waldkirchen; office@puremilk.eu, ORCID:0000-0001-8782-6275

²pureMilk analytical GmbH, Freyunger Str. 15, D-94065 Waldkirchen; office@puremilk.eu, ORCID:0000-0002-3725-8414

³Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Otto-Brenner-Straße 20, D-37079 Göttingen; klaus.schoene@sartorius.com, ORCID:0000-0002-9160-9211

⁴Milchprüfing Baden-Württemberg e.V., Marie-Curie-Str. 19, D- 73230 Kirchheim/Teck; rueckstand@milchpruefring.de

⁵Sartorius Austria GmbH, Modecenterstraße 22/Top Nr. D20-D24, AT-1030 Wien; harald.thenmaier@sartorius.com

⁶Sartorius UK Ltd., Longmead Business Centre, Blenheim Rd, UK-Epsom KT19 9QQ; john.cashman@sartorius.com, ORCID:000-0002-7781-8690

* Correspondence Email: office@puremilk.eu

Date submitted: 24/10/2022

Date accepted: 17/04/2023

Volume/Page(s): 24-27

Abstract

Residues of chlorate and perchlorate in dairy products pose a challenge in the dairy industry. Both residues almost exclusively enter dairy food production as a disinfection or cleaning by-product. Since these substances can jeopardize food safety, we developed a cost-effective, passive and rapid workflow for raw milk sample preparation prior to determination of chlorate and perchlorate content. By means of centrifugal ultrafiltration, unprocessed raw milk was fractionated into its constituent phases (water and fat/protein), using a FraMiTrACR[®] unit. When the water phase was analyzed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), we were able to demonstrate quantification and detection levels of 0.001 mg/kg and 0.0005 mg/kg, respectively, for perchlorate, and 0.01 mg/kg and 0.005 mg/kg, respectively, for chlorate.

Keywords: Milk, Raw Milk, Chlorate, Perchlorate, Sample Preparation, Fractionation, LC-MS/MS

Introduction

Chlorate and perchlorate are oxyanions of chlorine and are highly soluble in water. Both residues, when found in dairy products, almost exclusively originate from processing water treated with chlorine-containing disinfectants and chlorine-containing cleaning agents. The use of chlorine-free lye can also be an unexpected source of chlorate and perchlorate, since these substances can be carried over during lye manufacturing, leading to contamination in products which are labelled chlorine-free [1]. Animal feed and water can also be a natural, not insignificant source of perchlorate in milk. Public awareness of the risks these substances pose was raised when it was shown that chlorate and perchlorate can enter the thyroid gland and inhibit the synthesis of thyroid hormones [2, 3]. This is a particular concern for

infants and young children because, unlike adults, their lower levels of stored thyroid hormones may fail to inhibit the uptake of chlorate and perchlorate into the thyroid [2, 3]. Therefore, new limits for food have been established with the help of the European regulations 2020/749 for chlorate and 2020/685 for perchlorate [4, 5]. In addition, the European Food Safety Authority (EFSA) has set a tolerable daily intake (TDI) of 0.003 mg/kg or 0.0003 mg/kg for chlorate or perchlorate, respectively [6]. Since infants typically consume higher volumes of milk, especially through milk-based formulae, the TDI is easily exceeded for this group [6,7]. The levels of both residues are often determined using the well-established quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides (QuPPE) [8]. This method requires multiple sample preparation steps. First, the fat in the raw milk is removed, e.g., by centrifugation, or the whole milk is diluted by adjusting the water content. The resulting sample is treated with acidified methanol and formic acid, and then ethylenediaminetetraacetate (EDTA) is added to break down the protein phase and extract the residues. After a second centrifugation step, the supernatant is treated with acetonitrile and an adsorbent, and centrifuged again. The supernatant is then transferred to a centrifugal filter for a final clarification step prior to sample analysis [8]. Each of these steps must be actively performed by a laboratory worker, and require the availability of multiple consumables and reagents to be maintained via a stock management system. The frequent handling and manipulation of samples increases the risk of contamination. In addition, this process is a single sample method, meaning that each sample must be prepared individually. Some test laboratories have already attempted to simplify this raw milk sample preparation process. For example, Dyke et al. describe a method that consists of a degreasing step by centrifugation and filtration of the resulting skimmed milk using centrifugal ultrafiltration [9]. After 90 minutes of centrifugal ultrafiltration, the filtrate is further treated with

acid and other reagents in multiple steps until the final test material is produced, with a total process time of more than two hours [9].

In this study, we aimed to develop a rapid, passive, single-step sample preparation process, without the need for additives, while still enabling the detection of residues to the prescribed regulatory limits. We used FraMiTrACR[®]/PC filters, which have been certified for the preparation of dairy products prior to residue analyses, and can be handled in a standard benchtop centrifuge. Our approach assumed that the target analytes - chlorate and perchlorate - were completely dissolved in the water phase of milk, without interaction with the protein or fat phases. Therefore, after fractionation of the milk, chlorate and perchlorate were detected directly from the water phase.

Materials and Methods

Sample preparation by fractionation: The raw milk for this study was excess material from Milchprüfing Baden-Württemberg e.V., collected as part of their routine milk quality monitoring processes. The study period was 12 weeks in order to obtain a sufficient data set. One raw milk used to determine the centrifugation time and relative centrifugal force for fractionation by FraMiTrACR[®] units was collected directly from the milk tank of a farm local to the laboratory. All staff involved in the study are experienced laboratory personnel with a degree in biotechnology or chemistry. FraMiTrACR[®]/PC units were filled with 5 mL of raw milk and centrifuged for 120 minutes at 4,000 g (swing out rotor) to effect fractionation into the constituent water, fat and protein phases. To determine filtration time, we quantified the filtrate volume every 15 minutes, in duplicate, using a precision balance. Fractionation of each milk sample into its three phases was observed by eye.

Analysis of the sample filtrate for chlorate and perchlorate: For the analysis of the filtrate (water phase), chromatographic separation

Table 1: Elution gradient for LC prior to injection into the mass spectrometer. Solvent A: 0.5 % formic acid in water; solvent B: 0.5 % formic acid in acetonitrile.

Step	Time (min)	Flow rate (mL/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
1	0.0	0.5	35	65
2	5	0.5	90	10
3	6.5	0.5	90	10
4	6.51	0.5	35	65
5	8	0.5	35	65

and subsequent detection were carried out using a PerkinElmer LX50 UHPLC and QSight[®] 220 triple quadrupole tandem mass spectrometer. All instrument control, analysis, and data processing were performed using Simplicity[™] 3Q software. For each dataset, 1 µL of filtrate was injected into the analyzer. The chlorate and perchlorate content were determined by comparing test sample filtrates against positive control standard samples (water spiked with chlorate and perchlorate). LC-MS grade acetonitrile, water and formic acid used during sample analysis were obtained from reputable reagent suppliers. Chlorate and perchlorate standards were purchased from LGC Standards or Carl Roth. Sodium perchlorate-18O₄ solution used as an internal standard was purchased from HPC Standards. Analyte separation was effected with the elution gradient summarized in Table 1, at a flow rate of and column temperature of 35 °C. Solvent A was 0.5 % formic acid in water, and solvent B was 0.5 % formic acid in acetonitrile.

Elution gradient for liquid chromatography: To confirm comparability with the conventional sample preparation method, 16 samples were simultaneously prepared by QuPPE and analyzed by LC-MS/MS in a contracted third-party laboratory (Table 2).

Results and Discussion

FraMiTrACR[®]/PC fractionates milk samples quickly, in a single step: The aim of this study was to reduce process time to a minimum and avoid all unnecessary steps for the preparation of milk samples prior to detection of chlorate and perchlorate residues. By using the FraMiTrACR[®]/PC we could obtain a filtrate sample for analysis, without the need for degreasing or homogenization steps, in a maximum process time of 30 minutes. For a 5 mL sample, average filtrate volumes of 1.4 and 3.9 mL were obtained after centrifugation for 15 and 60 minutes, respectively (Figure 1 A). Fractionation of the sample into phases was observed in the FraMiTrACR[®]/PC units (Figure 1 C), with a yellow-white fatty phase and turbid aqueous phase in the retentate, and a clear aqueous phase in the filtrate. Due to the small pore sizes of the ultrafiltration membrane, it could be assumed that the aqueous phase in the filtrate contained substantially less protein than the aqueous phase in the retentate.

Overall, we reduced sample preparation to one step. For comparison, the QuPPE method requires 7 sample preparation steps. The QuPPE method requires approximately 28 minutes active working time to prepare 16 samples for analysis. In addition, there are 55 minutes of passive working time attributed to centrifugation and incubation times, resulting in a total process time of 83 minutes. In contrast, the method we present here enables passive sample preparation by centrifugation in 30 minutes. For routine analyses, there is also the possibility to reduce this time further, since centrifugation for 15 minutes already yields sufficient material (approx. 1.5 mL) (Figure 1 A). Another 9 minutes are added in active working time, making the total process

Table 2: LC-MS/MS data from the comparability test for samples prepared by the FraMiTrACR[®] and QuPPE methods. Samples were spiked with chlorate and perchlorate. Analysis of samples prepared by the QuPPE method was performed in a third-party laboratory.

Sample no.	Chlorate (mg/kg)		Perchlorate (mg/kg)	
	FraMiTrACR [®] method	QuPPE method	FraMiTrACR [®] method	QuPPE method
1	0.01	0.011		
2	0.011	0.01		
3	0.01	0.009		
4	0.22	0.167		
5	0	0		
6	0	0		
7	0.036	0.033		
8	0.029	0.032		
9			0.039	0.033
10			0.032	0.028
11			0.007	0.007
12			0.003	0.004
13			0.024	0.02
14			0.017	0.011
15			0.009	0.004
16			0.004	0.002

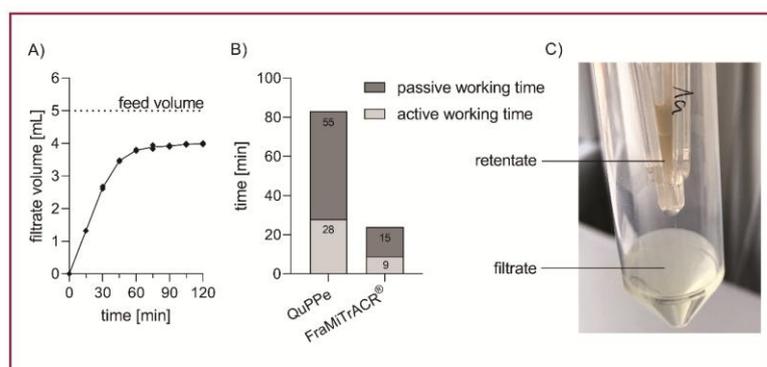


Figure 1: 5 mL of raw milk sample was fractionated using a FraMiTrACR[®]C/PC unit, by centrifugation at 4,000 g (swing-out rotor, n = 2). The filtrate volume was monitored over time, gravimetrically (A). Fractionation of 16 samples by FraMiTrACR[®]C/PC was compared against the established QuPpe method in terms of active and passive time (B). Sample preparation by FraMiTrACR[®]C/PC enabled fractionation of milk samples into three phases. Fat and protein phases formed predominantly in the retentate, while the aqueous water phase, including chlorate and perchlorate analytes, passed into the filtrate (C).

with FraMiTrACR[®]C/PC units as little as 24 minutes (Figure 1 B). FraMiTrACR[®]C/PC facilitates accurate results and low limit of detection: To validate our method, and as a basis for accreditation by the Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH, we tested 10 samples prepared from raw milk, or whole or skimmed milk reconstituted from powder. Each sample was analyzed at five different concentrations. All standards used in testing were certified and traceable reference materials, according to the National Institute for Standards and Technology. Each analyzed sample was tested twice to confirm accuracy and reproducibility. The limit of quantification (LoQ) and detection (LoD) and measurement uncertainty (MU) were established according to DIN ISO 11352:2013 and the guidelines for determining LoQ and LoD according to G. Lieck [10,11]. In the water phase following fractionation by FraMiTrACR[®]C/PC units, a LoQ of 0.001 mg/kg with an expanded MU of 39.3% and LoD of 0.0005 mg/kg for perchlorate could be achieved. For chlorate, a LoQ of 0.010 mg/kg with an expanded MU of 62.8% and LoD of 0.005 mg/kg could be achieved. Since the MU is laboratory-specific, no general comparisons to the QuPpe method can be made. However, according to the guidelines "Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed - SANTE/2021/11312" the measurement uncertainty should not be higher than 50% if the maximum residue value is exceeded [12]. Therefore, we evaluated the MU for chlorate and perchlorate at the maximum residue limit (MRL) for chlorate (0.1 mg/kg in raw milk). Since there is no MRL defined for perchlorate, we also chose 0.1 mg/kg as the MRL for our study. We found that the MU for chlorate and perchlorate at 0.1 mg/kg was 19.1% and 8%, respectively, confirming that our process could meet the aforementioned guidelines for these residues. The difference in measurement uncertainties between the target substances can possibly be explained by the assumption that chlorate is a very small polar molecule that is more difficult to analyze, ideally requiring a highly sensitive column. In comparison, perchlorate is larger than chlorate and is more stable, due to the higher degree of oxidation. With our method, it is possible, depending on the analytical equipment available, to fractionate raw milk just-in-time for analysis. It should be noted that results following LC-MS/MS analyses were comparable, regardless of the sample preparation method used (FraMiTrACR[®]C/PC or QuPpe). Following both methods, the limit of quantification was 0.01 mg/kg for chlorate and 0.001 mg/kg for perchlorate. The 16 analyzed samples, which prepared by the FraMiTrACR[®] and QuPpe methods, showed comparable results in relation to the above discussed MU (Table 2).

In additional experiments, samples prepared by our method were also successfully tested using ion chromatography, using conductivity mea-

surements for the quantification of chlorate and perchlorate. The limits of quantification and detection from this technique were comparable to those achieved by LC-MS/MS (data not shown).

Conclusion

The method for analytical sample preparation by FraMiTrACR[®]C/PC units described here shows that it is possible to quantify defined analytes directly from the water phase of milk in a single step. The advantages of this method are that milk samples can be prepared quickly, passively and without the use of additives. This leads not only to a reduction in personnel costs by minimizing active working time of laboratory staff, but also to savings in operating resources and stock management. The risk of contamination is also mitigated, since each sample is contained within a sealed FraMiTrACR unit for the majority of the processing time, and treatment with additives is avoided.

FraMiTrACR[®] units open up new possibilities for residue and contaminant quantification in dairy products, and we will continue to investigate additional analytes with our method.

Compliance with Ethical Standards

The authors declare the following interests which may be considered as potential competing interests: Jan-Michael Steils and Christian Baumgartner are employed by pureMilk analytical, Klaus Schoene, Harald Thenmaier and John Cashman are employed by Sartorius, and Maren Lang and Melina Kraus are employed by Milchprüfing Baden-Württemberg. However, these affiliations do not alter the authors' adherence to the scientific policies on sharing study results, data and materials.

References

1. Metrohm Application Note AN-PAN-1046: Online determination of anionic impurities in 50% NaOH and KOH. Process ion chromatography according to ASTM E1787, 1-3
2. McCarthy WP, O'Callaghan TF, Danahar M, Gleeson D, O'Connor, C, Fenelon MA, Tobin JT: Chlorate and Other Oxychlorine Contaminants Within the Dairy Supply Chain. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol.17,2018, 1561-1575
3. Kirk AB, Smith EE, Tian K, Anderson TA, Dasgupta PK: Perchlorate in Milk. *Environmental Science Technology* 2003, 37, 21, 4979-4981.
4. COMMISSION REGULATION (EU) 2020/749 of 4 June 2020 amending Annex III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorate in or on certain products
5. COMMISSION REGULATION (EU) 2020/685 of 20 May 2020

- amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of perchlorate in certain foods
6. European Food Safety Authority: Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of perchlorate in food, in particular fruits and vegetables. *EFSA Journal* 2014;12(10):3869, 117 pp.
 7. German Federal Institute for Risk Assessment: Frequently asked questions about perchlorate in food. Frequently asked questions about chlorate in food. *BfR FAQ* of 15 February 2018,1-3
 8. Anastassiades M, Wachtler A-K, Kolberg DI, Eichhorn E, Benkenstein A, Zechmann S, Mack D, Barth A, Wildgrube C, Sigalov I, Görlich S, Dörk D, Cerchia G: Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC MS/MS Measurement II. Food of Animal Origin (QuPpe AO Method). EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM), 1-24
 9. Dyke JV, Kirk AB, Martinelango PK, Dasgupta PK: Sample processing method for the determination of perchlorate in milk. *Analytica Chimica Acta* 567 (2006), 73–78
 10. DIN ISO 11352:2013: Wasserbeschaffenheit - Abschätzung der Messunsicherheit beruhend auf Validierungs- und Kontrolldaten
 11. Lieck G: Nachweisgrenze und Rauschen. *LaborPraxis*, Juni 1998, 62-67
 12. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides: Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed - SANTE/2021/11312, 1-57 https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf

Copyright © 2023 Milk Science International. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY) 4.0. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. Publikation II

Titel

A Novel Approach for Single-Step Analyte Fractionation of Raw Milk Prior to Antibiotic Residue Trace Analysis as an Alternative to QuEChERS-Based Extraction

Autoren

Jan-Michael Steils, Maren Lang, Melina Kraus, Klaus Schöne, John Cashman,
Christian Baumgartner

Journal

Journal of AOAC INTERNATIONAL (IF 2023:1,7)

Status

Akzeptiert 06.03.2024

Publiziert 11.03.2024

Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2024, 1–14

<https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsae022>



Food Chemical Contaminants

A Novel Approach for Single-Step Analyte Fractionation of Raw Milk Prior to Antibiotic Residue Trace Analysis as an Alternative to QuEChERS-Based Extraction

Jan-Michael Steils ¹, * Maren Lang ², Melina Kraus ², Klaus Schöne ³, John Cashman ⁴, and Christian Baumgartner ¹

¹pureMilk analytical GmbH, Freyunger Str. 15, D-94065 Waldkirchen

²Milchprüfing Baden-Württemberg e. V., Marie-Curie-Str. 19, D-73230 Kirchheim/Teck

³Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Otto-Brenner-Straße 20, D-37079 Göttingen

⁴Sartorius UK Ltd, Longmead Business Centre, Blenheim Road, Epsom KT19 9QQ

*Corresponding author's e-mail: office@puremilk.eu

Abstract

Background: Antibiotic residues in milk are a well-known hazard in the dairy food chain. Detection methods for these residues, such as nonspecific microbiological inhibitor tests or group-specific receptor tests, are relatively inexpensive, easy to use, and widely applied to ensure food safety. In contrast, specific detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)—although a critical, complementary method to confirm the results of nonspecific testing—is relatively costly, time-consuming, and laborious. Furthermore, sample processing before LC–MS/MS analysis requires unique preparation procedures for different groups of antibiotic compounds.

Objective: To simplify and speed up specific antibiotic residue detection, a low-cost, passive, and single-step method to fractionate analytes in raw milk was developed.

Methods: Untreated raw milk was fractionated into its water and fat/protein phases using a Fractionation of Milk for Trace Analysis of Contaminants and Residues for Antibiotics (FraMiTrACR[®] AB) fractionation unit. The water fraction was then analyzed by LC–MS/MS. The analyte fractionation method was evaluated against a Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS)-based method for sample preparation.

Results: Our method allows qualitative and quantitative detection of substances from the penicillin, cephalosporin, macrolide, lincosamide, sulfonamide, tetracycline, and fluoroquinolone groups of antibiotics. Detection limits are below the legally prescribed maximum residue levels, allowing reliable, specific, and rapid validation of a positive result in nonspecific microbiological inhibitor tests.

Conclusion: Analyte fractionation by FraMiTrACR AB is a faster alternative to QuEChERS-based sample preparation for the detection of antibiotic substances in milk.

Highlight: This method describes a low-cost, environmentally friendly, passive, and single-step milk analyte fractionation. As an alternative to QuEChERS-based preparation, this fractionation method simplifies and speeds up the process for specific antibiotic residue detection.

Antibiotics play a critical role in ensuring human and animal health. However, since animals used in food production must be treated in the event of illness, for animal welfare and economic reasons, there is a latent risk of transferring antibiotic residues into food produced by these animals (1). This can lead to an increase in strains of antibiotic-resistant microorganisms, making the treatment of infections challenging. Therefore, in Europe, there are strict regulations and many requirements that must be met when animals are treated with antibiotics (1–5). As a result of these regulations and the cautious use of antibiotics by farmers and their veterinarians, there is a relatively low rate of antibiotic-contaminated raw milk leaving farms. In Germany, for example, 99.98% of bulk raw milk subjected to compulsory ex-

farm QC testing by neutral laboratories is either free of antibiotic residues, or below the European maximum residue limits (MRL) according to Commission Regulation (EU) No. 37/2010 (6, 7).

Nevertheless, it is an inherent and essential part of dairy food chain QC procedures to check for antibiotic residues at several critical points. Farmers are encouraged to check milk for residues after antibiotic treatment of their cows, when the withdrawal period has been passed and before the milk from these cows is transferred into trucks for delivery to dairies. Bulk milk tanks are also tested for antibiotic residues on a regular basis, either within the quality assurance procedures of the respective dairy, or on a legal basis by internal and/or external laboratories (8). Such testing follows a regulatory procedure based on regional or national

Received: 5 July 2023. Revised: 16 February 2024. Accepted: 6 March 2024

© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of AOAC INTERNATIONAL. All rights reserved.

For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

legislation. For example, in Germany each bulk milk truck must be tested for penicillins and cephalosporines before unloading the contents to a stack tank in the dairy. Any positive results above the MRL are traced back to the source and there are substantial penalties to the farmer for delivering milk unfit for human consumption (5–8). When ex-farm milk is picked up by a milk truck, each delivery is sampled and either a random selection or all these samples are checked for antibiotic substances by a neutral laboratory. In nonspecific microbiological tests and/or group-specific receptor tests, positive results always represent detection of a range or whole group of antibiotic compounds. Therefore, specific test methods such as LC-MS/MS are also required to identify and quantify any antibiotic substance that causes noncompliance of a tested milk sample. These checks must test for the antibiotic substance classes of penicillins, cephalosporins, macrolides, lincosamides, sulfonamides, tetracyclines, fluoroquinolones, and aminoglycosides (8).

Specific test methods typically require the active preparation of individual samples. Existing sample preparation methods include, for example, the QuEChERS or the Quick Polar Pesticides (QuPPE) method for food products. Both of these methods involve several sample preparation steps to obtain a final extract for analysis of pesticides or veterinary drugs (9–11). Ridgway et al. have compared different preparation and test methods for complex matrixes such as milk. The authors highlighted that the sample preparation process is a common bottleneck in these analytical workflows, especially in terms of time requirements. They also explained that the methods have a high ecological impact and would be more environmentally friendly if solvent use could be reduced (12).

Most laboratory milk sample preparation workflows consist of precipitation of the milk, purification and concentration of the extract, and a final filtration step (10, 12–14). The antibiotic groups penicillins, cephalosporins, macrolides, lincosamides, sulfonamides, tetracyclines, fluoroquinolones, and aminoglycosides can be prepared for analysis according to solvent extraction techniques (12, 13). The official recognized methods to prepare samples for antibiotic detection in Germany are QuEChERS-based preparation methods (10, 14). Aguilera-Luiz et al. have described a QuEChERS-based extraction method for the determination of anthelmintics and antibiotics (10). Shimelis and Claus also published a QuEChERS-based milk sample procedure for the analysis of different veterinary drugs like antibiotics or growth promoters (14).

In general, there is a need for faster methods to prepare milk samples for many other analyses besides antibiotics and there have already been attempts to shorten the process. One method described by Dyke et al. consists of a degreasing step by centrifugation, followed by centrifugal ultrafiltration of the resulting skimmed milk. The ultrafiltration step requires 90 min of centrifugation, followed by treatment of the filtrate with acid and other reagents in multiple steps until the final test material is produced, with a total process time of more than 2 h (15). Tokay et al. described a single-step solubility difference and precipitation method for fractionation of milk, requiring the use of an ethyl ether-n-hexane-isopropyl alcohol (3 + 3 + 4) mixture (16). In a previous study, the authors found that fractionation of dairy raw materials and products with FraMiTrACR® C/PC and subsequent analysis of the water fraction of the samples allows the determination of chlorate and perchlorate (17). The analysis results were comparable with other known methods, with the advantage of saving labor and time. Due to the absence of extraction solvents and the use of only one FraMiTrACR for analyte

fractionation, our method could be more sustainable than the previously mentioned methods (12).

To assess the potential of analyte fractionation for sample preparation before antibiotic residue detection, the FraMiTrACR AB was developed. Our method using FraMiTrACR AB was evaluated against a QuEChERS-based method. In the present study, we used a standard benchtop centrifuge and FraMiTrACR AB units, which have been developed and certified for analyte fractionation of raw milk and dairy product samples. The specific aim of our study was to simplify raw milk preparation for single substance detection by LC-MS/MS following a positive nonspecific microbial or receptor test result, as is required by the German Raw Milk Quality Regulation (8). It is important to note that the focus of the potential analysis is on the analyte fractionation method compared to a QuEChERS-based method and does not claim to give a complete overview of all possible laboratory methods. Our results show it is possible to reduce laboratory sample preparation time and to accelerate, and at the same time, simplify the quantification and qualification of antibiotic residues in milk.

Experimental

Determination of the Analyte Fractionation Speed by FraMiTrACR AB

To determine the filtration speed, FraMiTrACR AB units were filled in duplicate with 5 mL raw milk (organic with at least 3.5% fat, sourced from a farm in Gleichen-Dimarden, Germany). For separation into water and fat/protein phases, the units were centrifuged in a swing-out rotor for 120 min at 4000g. Filtrate volume was determined gravimetrically every 15 min (Figure 1).

Reagents

LC-MS grade acetonitrile (ACN), water, and formic acid were used for the analysis and were obtained from Carl Roth (ACN, water) and Th. Geyer (formic acid). Antibiotic standards were purchased from HPC standards and LGC standards. D7 penicillin G was used as an internal standard and was purchased from HPC standards. All standards used for our analysis were certified and traceable reference materials. Each analyzed sample was tested twice during the accuracy check.

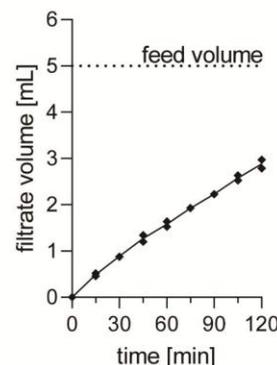


Figure 1. Five milliliter raw milk sample was fractionated using a FraMiTrACR AB unit, by centrifugation at 4000g (swing-out rotor, $n = 2$). The filtrate volume was monitored over time, gravimetrically.

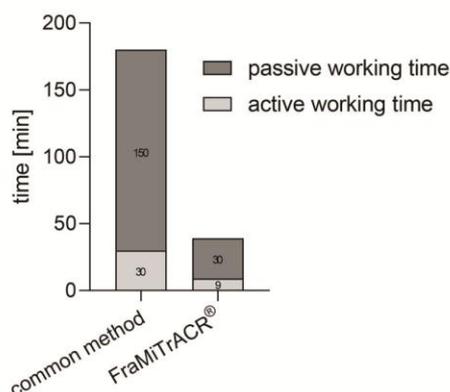


Figure 2. Fractionation of 16 samples by FraMiTrACR AB compared to the established sample preparation method in terms of active and passive working time.

Sample Preparation for the Detection of Antibiotic Residues

We prepared two samples for detection of each analyte—one by the QuEChERS-based method and the other by our novel fractionation method with FraMiTrACR AB. The methods were also compared in terms of active and passive working time (Figure 2).

QuEChERS-Based Method

Milk samples were spiked with analytical standards. Following incubation for 10–30 min at room temperature, 10 mL ACN was added to each sample, which was then mixed on a vortex mixer for 10 s and in a mechanical shaker for a further 5 min. The samples were centrifuged for 10 min, the supernatant collected, and 500 mg Octadecyl sorbent (C18CE) added. The milk samples were mixed on a vortex mixer for 10 s, agitated by a mechanical shaker for a further 1 min and centrifuged again for 5 min. The supernatant was transferred to a pre-weighed glass tube and concentrated to a final weight of 1 g by evaporation under vacuum for 2–3 h at 40°C. Finally, 750 µL water and 250 µL ACN were added and the extract was filtered through a 0.45 µm syringe filter, prior to LC–MS/MS analysis.

FraMiTrACR Units

FraMiTrACR is an acronym for the phrase “Fractionation of milk for trace analysis of contaminants and residues” and describes a centrifugal ultrafilter made of polycarbonate. These ultrafilters have a capacity for up to 15 mL of milk or milk-based samples. The sample chamber is filled with the sample before placing the ultrafilter in a benchtop centrifuge. An ultrafiltration membrane fitted inside the sample chamber fractionates the sample when a centrifugal force is applied. FraMiTrACR AB has been co-developed by pureMilk analytical GmbH and Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG.

Fractionation Method

FraMiTrACR AB units were filled with 5 mL of spiked raw milk samples and centrifuged for 30–120 min at 4000g (swing-out rotor) to effect fractionation into the constituent water and fat/protein phases. The filtrate (water phase) was retained for direct analysis by LC–MS/MS.

Table 1. Parameters used in the current study for the LC system and MS system

LC System	Perkin Elmer LX50 UHPLC
Mobile phase solvent A	0.1% formic acid in water
Mobile phase solvent B	0.1% formic acid in acetonitrile
Flow rate	0.6 mL/min
Oven temperature	35°C
Injection volume	1 µL
MS System	QSight® 220 triple quadrupole tandem mass spectrometer
Ionization mode	ESI—positive
Drying gas	100 arbitrary units
HSID™ temperature	200°C
Electrospray voltage	5500 V
Source temperature	350°C
Nebulizer gas	250 arbitrary units
Detection mode	MRM Mode

Table 2. Elution gradient for Perkin Elmer LX50 UHPLC

Step	Time, min	Flow, mL/min	Solvent A, % ^a	Solvent B, % ^b
1	0.0	0.6	95	5
2	0.5	0.6	95	5
3	7.0	0.6	50	50
4	7.2	0.6	5	95
5	9.0	0.6	5	95
6	9.5	0.6	95	5

^a Solvent A: 0.1% formic acid in water.

^b Solvent B: 0.1% formic acid in acetonitrile.

Sample Analysis by LC–MS/MS

Chromatographic separation and subsequent analysis of raw milk solvent extract or filtrate samples were carried out using a PerkinElmer LX50 Ultra High Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) and QSight® 220 triple quadrupole tandem mass spectrometer. The LC and MS parameters are shown in Table 1. All instrument control, analysis, and data processing were performed using Simplicity™ 3Q software. UHPLC was performed at a flow rate of 0.6 mL/min with the elution gradient summarized in Table 2. Solvent A was 0.1% formic acid in water, and solvent B was 0.1% formic acid in ACN. During separation, the column oven temperature was set to 30°C. For each data set, 40 µL sample was injected into the analyzer. The antibiotic content was determined by comparison of native samples to samples spiked with standards.

Results

Our aim was to evaluate the potential of analytical fractionation as a method to prepare samples for antibiotic residue analysis with minimal processing time, while avoiding all unnecessary sample manipulation and process steps. With FraMiTrACR AB we could obtain a clear filtrate sample for LC–MS/MS analysis (Figure 3), without the need for additional precipitation or concentration steps. For a 5 mL sample, average filtrate volumes of 0.5 mL and 1.6 mL were obtained after centrifugation for 15 and 60 min, respectively (Figure 3).

From the filtrate obtained by our fractionation method, we were able to determine antibiotic substances used in veterinary medicine from the groups of penicillins, cephalosporins, macrolides, lincosamides, sulphonamides, tetracyclines, and fluoroquinolones. When comparing the performance of our fractionation

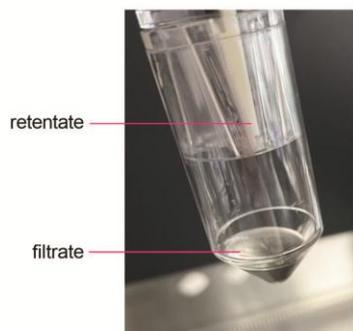


Figure 3. After fractionation using FraMiTrACR AB, the water phase is collected from the filtrate.

method, these substances were also determined from samples prepared by a QuEChERS-based method.

To validate our new method, and as a basis for accreditation by the Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH, we prepared 10 samples from raw milk and tested each filtrate at five different concentrations. For each measurement, unspiked samples as blank samples were also analyzed. Exemplary chromatograms and calibration curves for the substances penicillin G, sulfamethoxypyridazine, enrofloxacin, ciprofloxacin are shown in Figures 4 and 5. Table 3 shows a comparison of the LOD and LOQ between the described QuEChERS-based extraction method and analyte fractionation method, in relation to the European MRL. Both methods had a LOQ and LOD under the prescribed MRL. For each antibiotic target substance, the recovery rate, the SD, and the extended measurement uncertainty (eMU) were determined, at five different concentrations. The data are shown in Table 4. The method validation data were established according to DIN ISO 11352:2013, the guidelines for determining LOD and LOQ according to G. Lieck, and according to the guidelines “Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed—SANTE/2021/11312” (18–20). It should be noted that lower LOD and LOQ could have been established for our analyte fractionation method, but this was not necessary in the context of method development and accreditation, as the residues were already detected at levels well below the MRLs and the results were comparable to the QuEChERS-based method.

Discussion

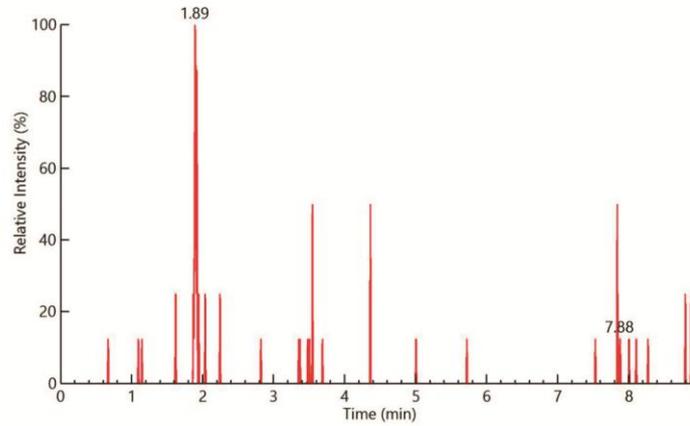
Antibiotic residue detection requires specific and proven laboratory sample preparation methods. There are several such methods that are known and accepted worldwide (9–11, 14). In particular, for the detection of residues in food, the QuEChERS and QuPPe based methods are used in Europe. However, these methods require several processing steps for food or milk samples (9, 11). In addition, they require the use of chemical additives and considerable laboratory working time, as well as the procurement and stock management of many laboratory consumables. According to some authors, the challenges with sample preparation from difficult matrixes like raw milk are the time required and the environmental impact (12). Others have attempted to reduce sample preparation time for milk-based samples by using a degreasing step followed by centrifugation, ultracentrifugation, or by using additives to decrease the solubility of substances and precipitate substances of analytical interest (15, 16). However,

these attempts are still very time-consuming or require chemical additives.

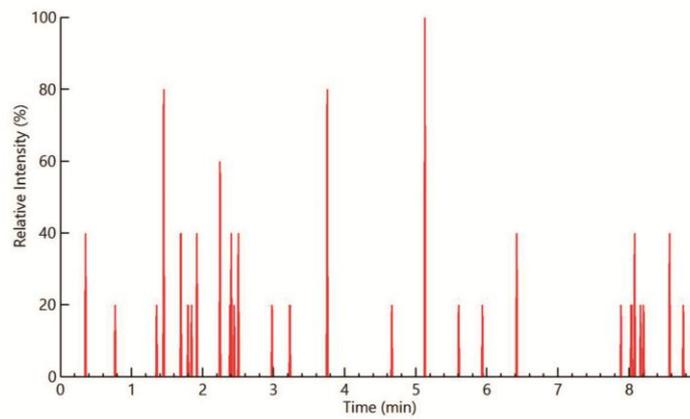
We aimed to develop a method to remove fat and fractionate milk samples in one step, passively and inexpensively. To this end, we first looked at existing processes from the dairy and research industries. For example, centrifugation of raw milk is a very common process in the dairy industry. It is used to separate the milk fat from the skim milk. Then, the skim milk is concentrated by membrane filtration or evaporation to recover the water fraction before spray drying (21). The use of membrane filtration without removing fat from the milk is not a common process in dairies. The combination of defatting and fractionation of raw milk had not been described before. In addition, fractionation of raw milk in the laboratory was previously not possible by centrifugation without the use of additives. In a previous study we were able to show that the FraMiTrACR C/PC can be used for analyte fractionation of raw milk before analyzing the water fraction for chlorate and perchlorate residues, which are relatively small and very soluble in water. We also demonstrated that fractionation of milk samples could have a high potential for analysis of other residues (17). This has led us to the development of FraMiTrACR AB and our evaluation of its suitability for analyte fractionation from raw milk before analysis for antibiotic residues.

A key challenge was that antibiotic agents are relatively large molecules in comparison to chlorate and perchlorate. In addition, substances with different chemical properties had to be analyzed, with intermediate water solubility and an estimated high rate of retention in membrane-based processes. More specifically, the range of molecule sizes, polar properties, and the complexity of the molecules we wanted to detect was very large. The molecular weight of the substances ranged from approximately 300 to 1000 g/mol and the polar surface potential ranged from approximately 50 to 300 Å². The complexity values of the molecules were also very widely scattered from approximately 400 to over 1500 (22). These properties are summarized for some exemplary analytes in Table 5. In our development, we disregarded a variety of other preparation process options and only attempted a comparison between the analyte fractionation method and a QuEChERS-based extraction method (9, 10, 14). The QuEChERS-based extraction method is representative of sample preparation that requires a large number of steps, working time, and tools. A detailed direct comparison between the two methods in the preparation steps is not possible because the QuEChERS method requires precipitation of the milk, purification, and concentration of the extract. These steps are not necessary with our method. Furthermore, the addition of substances in the QuEChERS method alters the overall sample matrix of the milk and affects the solubility and retention of substances on a membrane for residues and milk constituents. The substances used can also be a source of sample contamination by unknown residues. With the FraMiTrACR AB method, additives are not required, so the unintentional introduction of contaminants can be prevented, and the influences on the original laboratory sample matrix are also lower. For our comparison between the two methods, we looked at the process time in terms of active and passive working for processing 16 samples. We were able to show that analyte fractionation provides a time advantage (Figure 2). With 15 min of passive working time and 9 min of active working time, it is possible to obtain 0.5 mL of filtrate sample for each of 16 laboratory samples (Figure 1). This volume is sufficient to carry out a determination for multiple residues in the subsequent analysis. Calculated on 16 samples, the analytical fractionation takes

EIC +MRM 335.20/160.10 (54 pairs) EV: 11 V CC: -34 V Exp "Experiment 1" Penicillin G-1
Number of Scans: 1080 Max: 1.88E+3 cps



EIC +MRM 335.20/176.00 (54 pairs) EV: 16 V CC: -32 V Exp "Experiment 1" Penicillin G-2
Number of Scans: 1080 Max: 1.17E+3 cps



EIC +MRM 342.00/159.90 (54 pairs) EV: 1 V CC: -35 V Exp "Experiment 1" Penicillin G-D7-1
Number of Scans: 1080 Max: 4.60E+4 cps

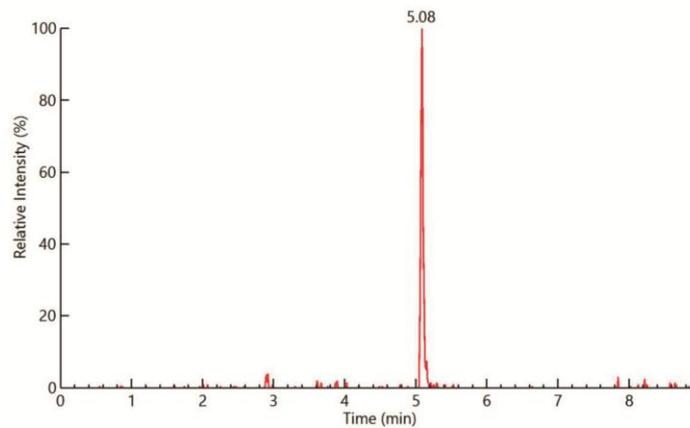
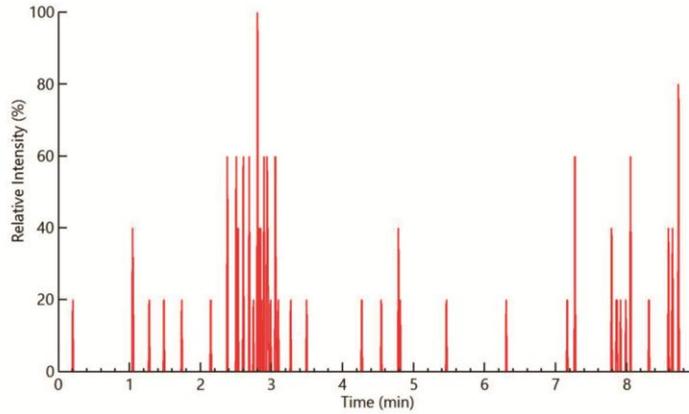
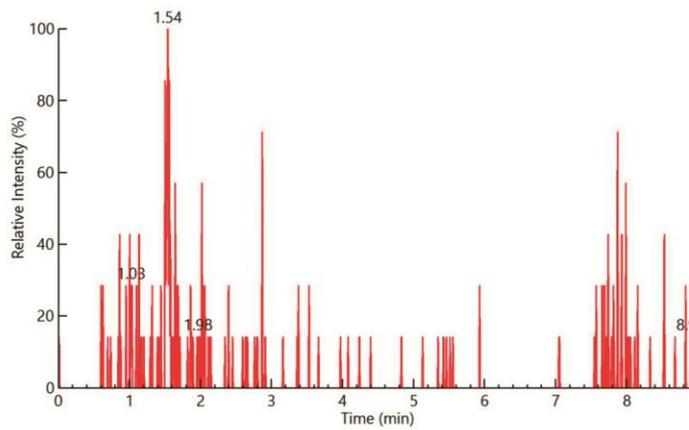


Figure 4. Exemplary chromatograms for native samples and spiked samples for the substances penicillin G, sulfamethoxyipyridazine, enrofloxacin, and ciprofloxacin.

EIC +MRM 281.10/156.00 (54 pairs) EV: 28 V CC: -25 V Exp "Experiment 1"
 Sulfamethoxy-pyridazin-1 Number of Scans: 1080 Max: 1.17E+3 cps



EIC +MRM 281.10/108.10 (54 pairs) EV: 25 V CC: -39 V Exp "Experiment 1"
 Sulfamethoxy-pyridazin-2 Number of Scans: 1080 Max: 1.64E+3 cps



EIC +MRM 284.00/156.10 (54 pairs) EV: 28 V CC: -25 V Exp "Experiment 1" D3-
 Sulfamethoxy-pyridazin Number of Scans: 1080 Max: 6.01E+5 cps

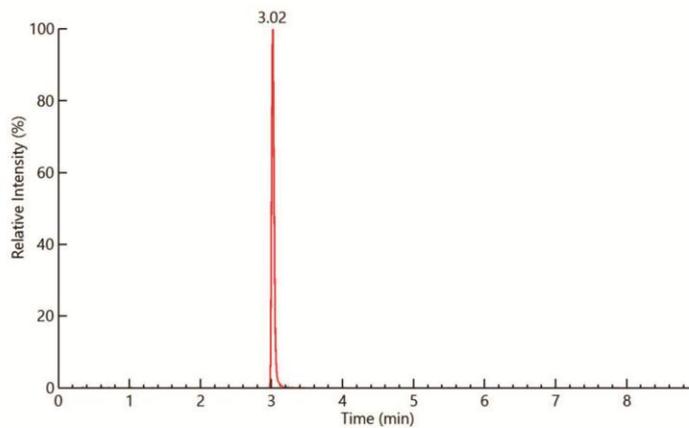
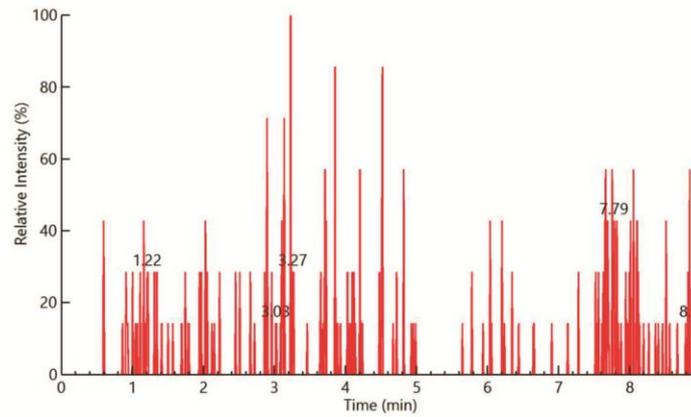
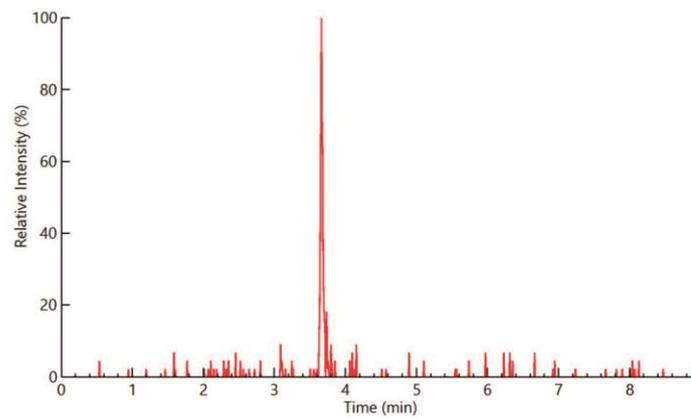


Figure 4. Continued.

EIC +MRM 360.30/342.10 (54 pairs) EV: 29 V CC: -30 V Exp "Experiment 1" Enrofloxacin-1
Number of Scans: 1080 Max: 1.64E+3 cps



EIC +MRM 360.30/316.10 (54 pairs) EV: 31 V CC: -27 V Exp "Experiment 1" Enrofloxacin-2
Number of Scans: 1080 Max: 1.03E+4 cps



EIC +MRM 365.20/321.20 (54 pairs) EV: 30 V CC: -27 V Exp "Experiment 1" D5-
Enrofloxacin-1 Number of Scans: 1080 Max: 4.37E+5 cps

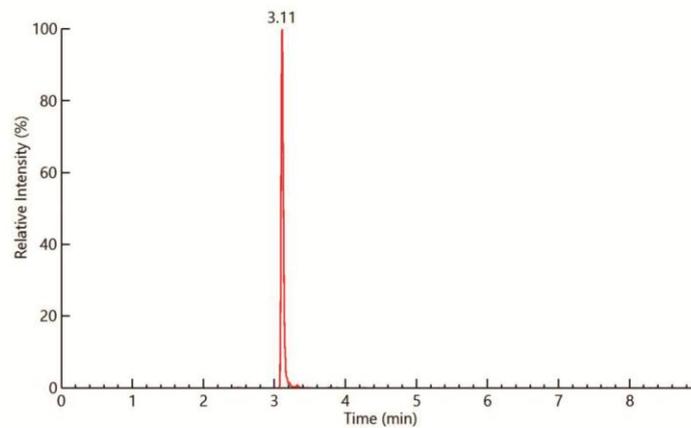
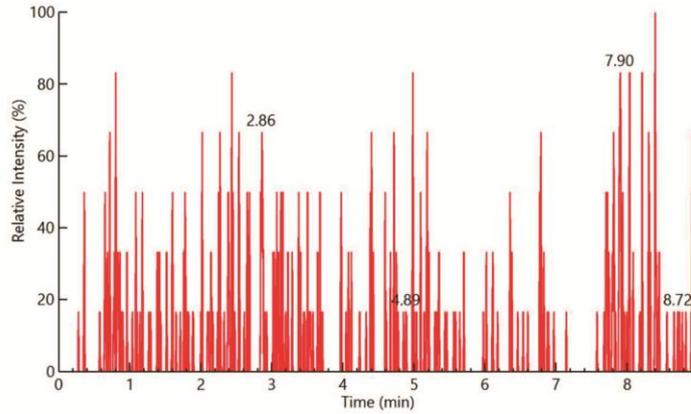
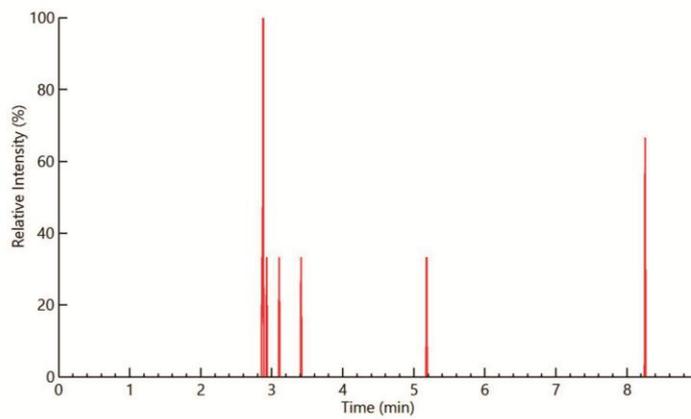


Figure 4. Continued.

EIC +MRM 332.10/314.10 (54 pairs) EV: 17 V CC: -30 V Exp "Experiment 1" Ciprofloxacin-1
Number of Scans: 1080 Max: 1.41E+3 cps



EIC +MRM 332.10/231.10 (54 pairs) EV: 22 V CC: -51 V Exp "Experiment 1" Ciprofloxacin-2
Number of Scans: 1080 Max: 7.04E+2 cps



EIC +MRM 340.10/322.20 (54 pairs) EV: 30 V CC: -27 V Exp "Experiment 1" D8-
Ciprofloxacin-1 Number of Scans: 1080 Max: 1.40E+5 cps

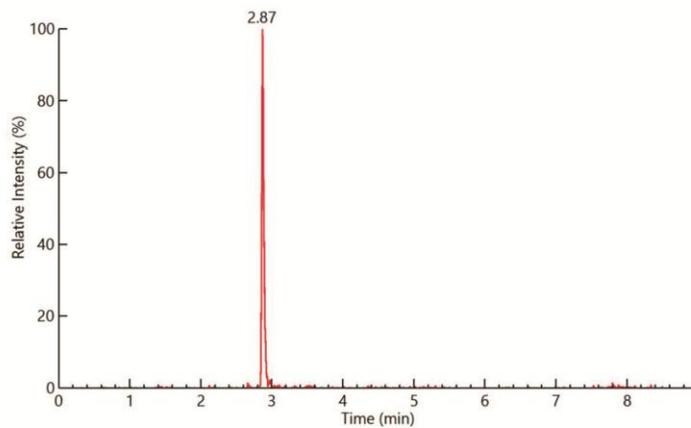


Figure 4. Continued.

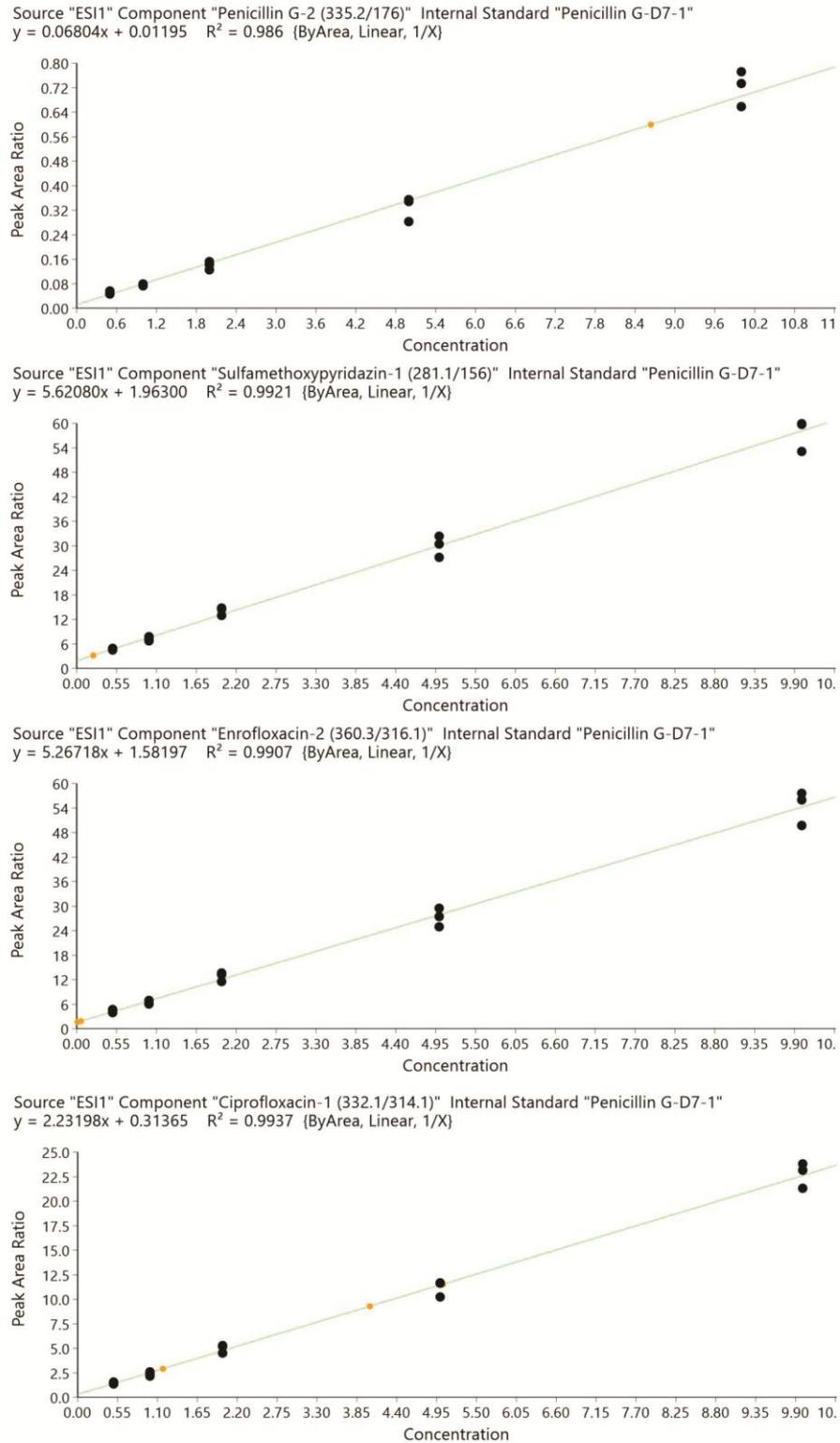


Figure 5. Exemplary calibration curves over the concentration range from 0.1 to 10.0 for $n = 5$ at each level in milk extract for the substances penicillin G, sulfamethoxyipyridazine, enrofloxacin, and ciprofloxacin.

Table 3. Comparison of the LOD and LOQ between the described QuEChERS-based extraction method and analyte fractionation method, in relation to the European MRL

MRL µg/kg	Amoxicillin	Ampicillin	Cloxacillin
LOD µg/kg QuEChERS-based method	4	4	30
LOQ µg/kg QuEChERS-based method	1	0.5	2
LOD µg/kg analyte fractionation method	1	1	2
LOQ µg/kg analyte fractionation method	0.5	0.5	4
	Penicillin G	Oxacillin	Cefalexin
MRL µg/kg	4	30	100
LOD µg/kg QuEChERS-based method	0.5	2	10
LOQ µg/kg QuEChERS-based method	0.5	2	10
LOD µg/kg analyte fractionation method	0.5	2	10
LOQ µg/kg analyte fractionation method	1	4	20
	Cefapirin	Cefazolin	Ceftiofur
MRL µg/kg	60	50	100
LOD µg/kg QuEChERS-based method	1	1	10
LOQ µg/kg QuEChERS-based method	1	1	10
LOD µg/kg analyte fractionation method	1	1	10
LOQ µg/kg analyte fractionation method	2	2	20
	Cefquinom	Cefalonium	Cefoperazone
MRL µg/kg	20	20	50
LOD µg/kg QuEChERS-based method	10	10	5
LOQ µg/kg QuEChERS-based method	20	10	5
LOD µg/kg analyte fractionation method	10	10	5
LOQ µg/kg analyte fractionation method	20	20	5
	Erythromycin	Tylosin	Lincomycin
MRL µg/kg	40	50	150
LOD µg/kg QuEChERS-based method	20	10	50
LOQ µg/kg QuEChERS-based method	20	20	50
LOD µg/kg analyte fractionation method	20	10	50
LOQ µg/kg analyte fractionation method	40	20	100
	Sulfamethazine	Sulfadoxine	Sulfamethoxypyridazine
MRL µg/kg	100	100	100
LOD µg/kg QuEChERS-based method	15	15	15
LOQ µg/kg QuEChERS-based method	15	15	15
LOD µg/kg analyte fractionation method	15	15	15
LOQ µg/kg analyte fractionation method	30	30	30
	Tetracycline	Chlortetracycline	Oxytetracycline
MRL µg/kg	100	100	100
LOD µg/kg QuEChERS-based method	25	25	25
LOQ µg/kg QuEChERS-based method	25	25	25
LOD µg/kg analyte fractionation method	25	25	25
LOQ µg/kg analyte fractionation method	50	25	50
	Marbofloxacin	Enrofloxacin	Ciprofloxacin
MRL µg/kg	75	100	100
LOD µg/kg QuEChERS-based method	20	20	20
LOQ µg/kg QuEChERS-based method	20	20	20
LOD µg/kg analyte fractionation method	20	20	20
LOQ µg/kg analyte fractionation method	40	40	20

1.5 min for one sample until the final extract is ready for analysis. We also considered the impact on the environment; the use of a single fractionation unit and two pipette tips is a more frugal and favourable use of materials than the three tubes, six pipette tips, a syringe filter, and 10 mL ACN that were required for the QuEChERS method. In further studies, we intend to assess the environmental impact in more detail, so that a reliable statement on environmental friendliness for our analyte fractionation method can be made.

We have determined the antibiotic content by comparison of native samples to samples spiked with standards. Exemplary chromatograms for native samples and spiked samples are shown in Figure 4. The chromatograms show two Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions for the antibiotics penicillin G, sulfamethoxypyridazine, enrofloxacin, and ciprofloxacin in native samples and there are chromatograms that show the positive control in samples spiked with standards. Figure 5 shows

exemplary calibration curves for the substances shown in Figure 4. The calibration curve was derived from a sample of $n = 5$ for each concentration of filtrate in the range from 0.1 to 10.0. We were able to show that the chromatograms and calibration curves meet the formal requirements of the test laboratories and the accreditation bodies. We were also able to show that our novel fractionation method exceeds the requirements of the new German Raw Milk Quality Regulation and the European MRLs according to the Commission Regulation (EU) No 37/2010 (7, 8). Table 3 shows that both methods had an LOQ and LOD below the MRL. In direct comparison, our fractionation method requires less working time and has no need for extraction solvents. Therefore, we can eliminate the "bottleneck" of sample preparation previously described by Ridgway et al. with our method (12). When examining Table 4, it becomes clear that the results obtained, the recovery rates, the SD and the eMU in the detection of antibiotic residues are comparable, regardless of the sample

Table 4. Comparison of the QuEChERS-based extraction method and the analyte fractionation method with regard to the recovery rate and the associated standard deviation and extended measurement uncertainty at different concentrations of the antibiotic active substances

QuEChERS-based extraction method					
Analyte/MRL, µg/kg		Amoxicillin/4			
Concentration, µg/kg	0,5	1	2	5	10
Recovery, %	73	101	100	108	89
SD, %	16	15	9	8	10
eMU, %	44	43	30	29	40
Analyte/MRL, µg/kg		Ampicillin/4			
Concentration, µg/kg	0,5	1	2	5	10
Recovery, %	65	90	57	107	91
SD, %	26	18	6	6	21
eMU, %	ns ^a	52	ns ^a	23	55
Analyte/MRL, µg/kg		Cloxacillin/30			
Concentration, µg/kg	2	4	8	20	40
Recovery, %	97	109	117	115	86
SD, %	5	7	2	7	11
eMU, %	29	30	35	37	45
Analyte/MRL, µg/kg		Penicillin G/4			
Concentration, µg/kg	0,5	1	2	5	10
Recovery, %	94	100	117	114	89
SD, %	22	17	7	9	11
eMU, %	39	32	40	44	40
Analyte/MRL, µg/kg		Oxacillin/30			
Concentration, µg/kg	2	4	8	20	40
Recovery, %	83	105	89	111	90
SD, %	8	8	3	6	11
eMU, %	28	29	24	29	40
Analyte/MRL, µg/kg		Cefalexin/100			
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	83	91	86	109	93
SD, %	5	8	5	6	11
eMU, %	27	30	32	27	41
Analyte/MRL, µg/kg		Cefapirin/60			
Concentration, µg/kg	1	2	4	10	20
Recovery, %	84	89	111	120	117
SD, %	19	8	14	10	1
eMU, %	36	32	54	52	64
Analyte/MRL, µg/kg		Cefazolin/50			
Concentration, µg/kg	1	2	4	10	20
Recovery, %	92	96	120	106	104
SD, %	7	11	4	6	1
eMU, %	28	33	43	19	43
Analyte/MRL, µg/kg		Ceftiofur/100			
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	93	95	111	102	14
SD, %	9	6	3	11	11
eMU, %	22	20	24	29	ns ^a
Analyte/MRL, µg/kg		Cefquinom/20			
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	74	90	70	108	83
SD, %	14	16	5	7	29
eMU, %	ns ^a	50	ns ^a	24	ns ^a
Analyte/MRL, µg/kg		Cefalonium/20			
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	89	86	129	109	82
SD, %	17	13	8	6	10
eMU, %	46	46	ns ^a	28	49
Analyte/MRL, µg/kg		Cefoperazone/50			
Concentration, µg/kg	5	10	20	50	100
Recovery, %	97	97	121	111	124
SD, %	5	7	3	25	9
eMU, %	22	24	42	ns ^a	56
Analyte/MRL, µg/kg		Erythromycin/40			
Concentration, µg/kg	20	40	80	200	400
Recovery, %	87	88	121	121	117
SD, %	5	7	3	12	5
eMU, %	32	34	43	56	39
Analyte/MRL, µg/kg		Tylosin/50			
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200

(continued)

Table 4. (continued)

QuEChERS-based extraction method					
Recovery, %	69	95	81	121	102
SD, %	9	8	3	11	15
eMU, %	ns ^a	27	39	55	54
Analyte/MRL, µg/kg		Lincomycin/150			
Concentration, µg/kg	50	100	200	500	1000
Recovery, %	110	117	160	114	77
SD, %	5	9	6	7	9
eMU, %	43	46	ns ^a	36	50
Analyte/MRL, µg/kg		Sulfamethazine/100			
Concentration, µg/kg	15	30	60	150	300
Recovery, %	88	102	108	110	76
SD, %	7	3	3	7	15
eMU, %	16	11	18	30	65
Analyte/MRL, µg/kg		Sulfadoxine/100			
Concentration, µg/kg	15	30	60	150	300
Recovery, %	92	105	95	124	121
SD, %	7	3	2	21	14
eMU, %	19	14	12	67	69
Analyte/MRL, µg/kg		Sulfamethoxyypyridazine/100			
Concentration, µg/kg	15	30	60	150	300
Recovery, %	82	102	104	116	85
SD, %	7	4	3	7	9
eMU, %	17	10	14	40	40
Analyte/MRL, µg/kg		Tetracycline/100			
Concentration, µg/kg	25	50	100	250	500
Recovery, %	88	90	104%	109	83
SD, %	8	10	2	5	6
eMU, %	36	38	10	23	37
Analyte/MRL, µg/kg		Chlortetracycline/100			
Concentration, µg/kg	25	50	100	250	500
Recovery, %	89	100	115	118	154
SD, %	5	6	2	24	7
eMU, %	51	49	36	33	38
Analyte/MRL, µg/kg		Oxytetracycline/100			
Concentration, µg/kg	25	50	100	250	500
Recovery, %	95	115	11	107	87
SD, %	5	8	4	5	8
eMU, %	39	41	38	20	37
Analyte/MRL, µg/kg		Marbofloxacin/75			
Concentration, µg/kg	20	40	80	200	400
Recovery, %	77	99	107	114	90
SD, %	9	15	5	6	16
eMU, %	46	52	25	35	ns ^a
Analyte/MRL, µg/kg		Enrofloxacin/100			
Concentration, µg/kg	20	40	80	200	400
Recovery, %	102	110	138	108	96
SD, %	6	5	3	5	7
eMU, %	27	27	ns ^a	22	23
Analyte/MRL, µg/kg		Ciprofloxacin/100			
Concentration, µg/kg	20	40	80	200	400
Recovery, %	95	109	107	108	92
SD, %	7	5	6	5	8
eMU, %	25	24	25	23	30
Analyte fractionation method					
Analyte/MRL, µg/kg		Amoxicillin/4			
Concentration, µg/kg	0,5	1	2	5	10
Recovery, %	112	103	103	81	95
SD, %	13	3	10	7	4
eMU, %	29	12	38	44	18
Analyte/MRL, µg/kg		Ampicillin/4			
Concentration, µg/kg	0,5	1	2	5	10
Recovery, %	138	100	86	59	93
SD, %	39	4	13	16	5
eMU, %	ns ^a	14	54	ns ^a	23
Analyte/MRL, µg/kg		Cloxacillin/30			
Concentration, µg/kg	2	4	8	20	40
Recovery, %	203	106	94	91	95
SD, %	13	3	4	4	3
eMU, %	ns ^a	18	19	23	15
Analyte/MRL, µg/kg		Penicillin G/4			
Concentration, µg/kg	0,5	1	2	5	10

(continued)

Table 4. (continued)

QuEChERS-based extraction method					
Recovery, %	126	96	94	87	96
SD, %	21	4	9	11	7
eMU, %	ns ^a	17	33	47	27
Analyte/MRL, µg/kg			Oxacillin/30		
Concentration, µg/kg	2	4	8	20	40
Recovery, %	196	99	88	86	91
SD, %	19	4	13	9	4
eMU, %	ns ^a	15	51	42	23
Analyte/MRL, µg/kg			Cefalexin/100		
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	127	77	101	82	96
SD, %	17	8	12	7	5
eMU, %	ns ^a	54	44	44	20
Analyte/MRL, µg/kg			Cefapirin/60		
Concentration, µg/kg	1	2	4	10	20
Recovery, %	105	105	101	88	88
SD, %	22	10	8	6	7
eMU, %	56	37	30	33	33
Analyte/MRL, µg/kg			Cefazolin/50		
Concentration, µg/kg	1	2	4	10	20
Recovery, %	125	94	107	91	108
SD, %	15	11	10	6	5
eMU, %	ns ^a	41	39	29	23
Analyte/MRL, µg/kg			Ceftiofur/100		
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	106	75	106	90	99
SD, %	16	11	7	7	4
eMU, %	67	62	27	31	15
Analyte/MRL, µg/kg			Cefquinom/20		
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	137	108	98	77	84
SD, %	25	5	10	14	9
eMU, %	ns ^a	24	37	65	46
Analyte/MRL, µg/kg			Cefalonium/20		
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	74	113	104	93	95
SD, %	24	10	9	7	7
eMU, %	ns ^a	45	33	27	28
Analyte/MRL, µg/kg			Cefoperazone/50		
Concentration, µg/kg	5	10	20	50	100
Recovery, %	99	84	105	97	97
SD, %	11	3	6	4	4
eMU, %	40	34	26	17	15
Analyte/MRL, µg/kg			Erythromycin/40		
Concentration, µg/kg	20	40	80	200	400
Recovery, %	88	89	104	101	99
SD, %	19	13	9	8	9
eMU, %	58	49	33	28	31
Analyte/MRL, µg/kg			Tylosin/50		
Concentration, µg/kg	10	20	40	100	200
Recovery, %	121	91	94	83	96
SD, %	35	13	15	11	14
eMU, %	85	49	47	48	41
Analyte/MRL, µg/kg			Lincomycin/150		
Concentration, µg/kg	50	100	200	500	1000
Recovery, %	100	93	121	99	94
SD, %	17	5	10	6	5
eMU, %	41	22	56	20	22
Analyte/MRL, µg/kg			Sulfamethazine/100		
Concentration, µg/kg	15	30	60	150	300
Recovery, %	119	116	108	80	92
SD, %	24	8	11	11	5
eMU, %	63	40	41	51	24
Analyte/MRL, µg/kg			Sulfadoxine/100		
Concentration, µg/kg	15	30	60	150	300
Recovery, %	131	111	117	90	89
SD, %	32	3	13	10	6
eMU, %	ns ^a	25	52	39	28
Analyte/MRL, µg/kg			Sulfamethoxyppyridazine/100		
Concentration, µg/kg	15	30	60	150	300
Recovery, %	136	106	109	91	100

(continued)

Table 4. (continued)

QuEChERS-based extraction method					
SD, %	27	3	7	6	4
eMU, %	ns ^a	18	33	28	15
Analyte/MRL, µg/kg			Tetracycline/100		
Concentration, µg/kg	25	50	100	250	500
Recovery, %	75	98	100	93	97
SD, %	29	7	6	6	6
eMU, %	64	26	21	25	21
Analyte/MRL, µg/kg			Chlortetracycline/100		
Concentration, µg/kg	25	50	100	250	500
Recovery, %	89	84	112	106	100
SD, %	13	11	7	8	11
eMU, %	20	22	30	67	ns ^a
Analyte/MRL, µg/kg			Oxytetracycline/100		
Concentration, µg/kg	25	50	100	250	500
Recovery, %	89	84	112	106	100
SD, %	13	11	7	8	11
eMU, %	58	49	37	29	17
Analyte/MRL, µg/kg			Marbofloxacin/75		
Concentration, µg/kg	20	40	80	200	400
Recovery, %	125	77	104	84	90
SD, %	18	11	12	6	6
eMU, %	ns ^a	60	44	38	28
Analyte/MRL, µg/kg			Enrofloxacin/100		
Concentration, µg/kg	20	40	80	200	400
Recovery, %	106	109	115	100	99
SD, %	17	7	10	8	5
eMU, %	47	33	48	28	17
Analyte/MRL, µg/kg			Ciprofloxacin/100		
Concentration, µg/kg	20	40	80	200	400
Recovery, %	120	98	98	88	99
SD, %	11	7	8	7	5
eMU, %	32	26	28	34	20

^a ns = Recovery rate, SD, or eMU not sufficient.Table 5. Comparison of the properties of exemplary antibiotic compounds^a

	Molecular weight, g/mol	Topological polar surface area, Å ²	Complexity
Ciprofloxacin	331.3	73	571
Penicillin G	334.4	112	530
Lincomycin	406.5	148	499
Amoxicillin	365.4	158	590
Chlortetracycline	478.9	182	1010
Erythromycin	732.9	194	1180
Tylosin	916.9	239	1560
Cefoperazone	645.7	271	1250

^a Data copied from the database <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> February 2024.

preparation method. The authors were unable to identify any fundamental differences that would make one method preferable. It is also not possible to differentiate in the analysis results that one of the methods shows a general analytical advantage or disadvantage due to the molecular properties. The properties are shown exemplary in Table 5. Neither of the two methods show a generally poorer analytical accuracy in relation to the molecular weight, polarity, or complexity of the target substances. If, for example, the properties of the substances amoxicillin and cefoperazone are compared, it becomes clear that cefoperazone has almost twice the molecular weight, almost twice the amount of polar surface area, and almost twice the complexity of amoxicillin. However, these differences are hardly noticeable in the two methods presented with regard to the recovery rate, the SD and

the eMU. Also, by examining both methods regarding the substances tylosin and erythromycin no general differences in the method validation data have been detected by the authors. There might be a slightly advantage for the analyte fractionation method visible for the substances tylosin and erythromycin, but more research is needed to prove that. Conversely, there might be a small beneficial aspect in the QuEChERS-based method in determining very low values of analyte concentration near the LOD. As mentioned before, lower LOD and LOQ could have been established for the analyte fractionation, but this was not necessary in the context of method development. Since the eMU is laboratory- and method-specific, no general comparisons can be made between the methods. However, according to the guidelines "Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed—SANTE/2021/11312" the measurement uncertainty should not be higher than 50% if the maximum residue value is exceeded (20). Therefore, our fractionation method complies with the requirements of this directive. Variation of eMU values between the methods can possibly be explained by differences in reactions between the molecules in the different preparation methods. The extraction method may have a greater influence on the charge and binding capacity of individual substances than the fractionation method. But there were no general differences in the method validation data between methods detectable in the authors' opinion.

The process of laboratory sample preparation by our novel method meets general and legal requirements for the detection of antibiotic residues in the European dairy food industry, with results that are comparable to existing methods. The benefits of our method are the ability to fractionate raw milk quickly and easily, with less effort than before (9–16). The fractionation method by FraMiTrACR AB can be an alternative to existing methods.

Conclusions

Our method using FraMiTrACR AB units to fractionate laboratory milk samples prior to analysis for the detection of antibiotic residues shows that it is possible to detect these analytes directly from the water phase of milk without further preparative steps. The advantage of this method is that milk samples can be prepared in test laboratories in one step, passively and without the need for further additives and consumables. This leads not only to a reduction in personnel costs by reducing the active working time of laboratory staff, but also to a reduction in operational and stock management costs. The risk of sample contamination is also avoided, since the sample only needs to be transferred into the fractionation unit, which is then sealed, with no requirement for addition of solvents. Our analyte fraction method using FraMiTrACR AB opens new possibilities for residue and contaminant determination in dairy products and is a possible alternative.

CRedit Author Statement

Jan-Michael Steils conceptualized the study, performed investigation and data analysis. Wrote, reviewed and edited the manuscript.

Maren Lang conceptualized the study, performed investigation and data analysis. Wrote, reviewed and edited the manuscript.

Melina Kraus conceptualized the study, performed investigation and data analysis. Wrote, reviewed and edited the manuscript.

Klaus Schöne conceptualized the study, performed investigation and data analysis. Reviewed and edited the manuscript.

John Cashman, native English speaker, reviewed and edited the manuscript.

Christian Baumgartner reviewed and edited the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare the following interests which may be considered as potential competing interests: Jan-Michael Steils and Christian Baumgartner are employed by pureMilk analytical, Klaus Schoene and John Cashman are employed by Sartorius, and Maren Lang and Melina Kraus are employed by Milchprüfing Baden-Württemberg. However, these affiliations do not alter the authors' adherence to the scientific policies on sharing study results, data, and materials.

References

- Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M., & Hussani, S. (2019) *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **6**, 315–332. doi:10.5455/javar.2019.f350
- The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC (Regulation (EU) 2019/6), <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0006#:~:text=This%20Regulation%20aims%20to%20reduce,health%20and%20environ%20mental%20protection> (accessed February 3, 2024)
- European Medicine Agency (2022) New EU rules for safe and high-quality medicines for animals become effective, <https://www.ema.europa.eu/en/news/new-eu-rules-safe-high-quality-medicines-animals-become-effective> (accessed June 23, 2023)
- Federal Ministry of Food and Agriculture (2022) Pressemitteilung Nr. 11/2022 des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft; Neues Tierarzneimittelrecht ab 28. Januar 2022, <https://www.bmel.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/DE/2022/11-neues-tierarzneimittelrecht-2022.html> (accessed June 23, 2023)
- Bundestag with the consent of the Bundesrat. German Act on the Trade in Veterinary Medicinal Products and on the Implementation of Union Legislation on Veterinary Medicinal Products (Tierarzneimittelgesetz—TAMG), https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Tiere/Tiergesundheit/Tierarzneimittel/Tierarzneimittelgesetz-EN.pdf?__blob=publicationFile&v=5 (accessed February 3, 2024)
- Milchpur— Das Themenportal rund um die Milcherzeugung (2021), <https://www.milchpur.de/melken/zielgerichtet-vorgehen-missverstaendnisse-vermeiden>, (accessed June 23, 2023)
- European Commission (2009) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010), <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0037> (accessed February 3, 2024)
- Bundestag with the consent of the Bundesrat. German regulation to promote the quality of raw milk (Rohmilchgüteverordnung—RohmilchGüTV), <https://www.gesetze-im-internet.de/rohmilchgutv/RohmilchG%C3%BCTv.pdf> (accessed February 3, 2024)
- Anastassiades, M., & Lehotay, S.J., et al. (2002) *European Pesticide Residues Workshop*, EPRW, Rome, Book of Abstracts

14 | *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2024, Vol. 00, No. 0

10. Aguilera-Luiz, M.M., Vidal, J.L.M., Romero-González, R., & Frenich, A.G. (2008) *Technical Committee CEN/TC 275 - Food Analysis—Horizontal Methods* **1205**, 10–16. doi:10.1016/j.chroma.2008.07.066
11. Anastassiades, M., Mack, D., Tasdelen, B., Sigalova, I., Kostelac, D., & Scherbaum, E. (2008) *CRL for Pesticide Residues Using Single Residue Methods Hosted at the Chemisches Und Veterinäruntersuchungsamt, Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Stuttgart, Germany*
12. Ridgway, K., Lalljie, S.P., & Smith, R.M. (2007) *J. Chromatogr. A* **2007**, **1153**, 36–53. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.134
13. Chen, J., Ying, G., & Deng, W. (2019) *J. Agric. Food Chem.* **2019**, **67**, 7569–7586. doi:10.1021/acs.jafc.9b01334
14. Shimelis, O., & Claus, J. (2023) *Reporter 34.1 | Food and Beverage*, Order: 800-325-3010 (U.S.) 814-359-3441 (Global)
15. Dyke, J., Kirk, A., Martinelango, P., & Dasgupta, P. (2006) *Anal. Chim. Acta* **567**, 73–78 255. doi:10.1016/j.aca.2006.02.024
16. Tokay, F., & Bağdat, S. (2022) *Food Chem.* **379**, 132162. doi:10.1016/j.foodchem.2022.132162
17. Steils, J.-M., Baumgartner, C., Schöne, K., Lang, M., Kraus, M., Thenmaier, H., & Cashman, J. (2023) *Milk Sci. Int.* **24–27**, <https://doi.org/10.48435/MSI.2023.4>
18. DIN ISO (2013) *Wasserbeschaffenheit—Abschätzung der Messunsicherheit beruhend auf Validierungs- und Kontrolldaten (DIN ISO 11352:2013)*
19. Lieck, G. (1998) *LaborPraxis* 62–67
20. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides (2021) *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed—SANTE/113112/2021*
21. Bylund, G. (2015) *Dairy Processing Handbook*. 2nd Ed., Tetra Pak
22. PubChem, open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed February 03, 2024)

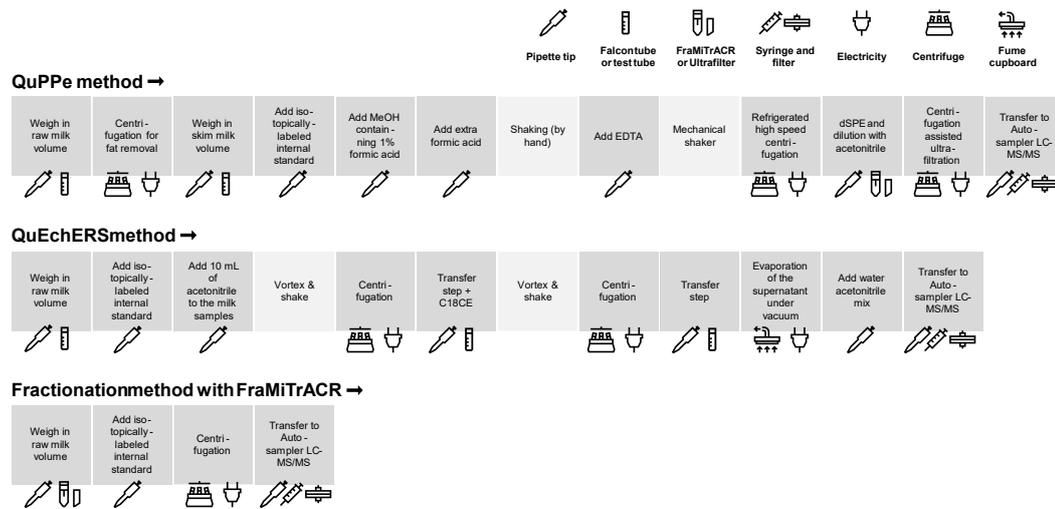
IV. BISHER UNVERÖFFENTLICHTE DATEN

In den beiden zuvor aufgeführten Publikationen wurde anhand geeigneter Beispiele gezeigt, dass die Fraktionierungsmethode für die Rückstandsanalytik in Rohmilch und anderen Matrices angewendet werden kann und verglichen zu anderen etablierten Methoden vergleichbare Ergebnisse produziert. Darüber hinaus wurde eine ökonomische Betrachtung hinsichtlich wichtiger Faktoren wie Aufwand an Arbeitszeit, Arbeitskosten, Material- und Stromverbrauch durchgeführt sowie die Auswirkung auf Umweltfaktoren mittels eines Life Cycle Assessments abgeschätzt. Die im Folgenden beschriebenen Daten sind in einer Zusammenarbeit der Unternehmen pureMilk analytical GmbH, Sartorius Lab Instruments GmbH und dem Milchprüfing Baden-Württemberg e.V. entstanden. An der Erhebung beteiligte Personen waren Jan-Michael Steils, Alexander Kaluza, Klaus Schöne, John Cashman, Christian Baumgartner, Maren Lang und Melina Kraus. Zudem sind die Daten zur Publikation eingereicht im Journal of AOAC INTERNATIONAL (IF 2023:1,7), Special Edition: Green Chemistry.

1. Life Cycle Assessment

Ziel der Lebenszyklusanalyse ist der Vergleich des Kohlenstoff-Fußabdrucks der Methoden QuEChERS, QuPPE und FraMiTrACR. Diese Datenerhebung ist unter der Bedingung erstellt worden, dass 16 Laborproben je Methode aufbereitet werden. Wie in Abbildung 1 dargestellt, liegen die Hauptunterschiede zwischen diesen Methoden in der Menge und den Eigenschaften der benötigten Verbrauchsmaterialien, der Anzahl der Arbeitsschritte, dem Strombedarf der Laborgeräte und der Verwendung von Chemikalien.

Abbildung 1: Vergleich der Arbeitsschritte und der Verbrauchsmaterialien zwischen der QuPPE-, QuEChERS- und Fraktionierungsmethode mit FraMiTrACR.

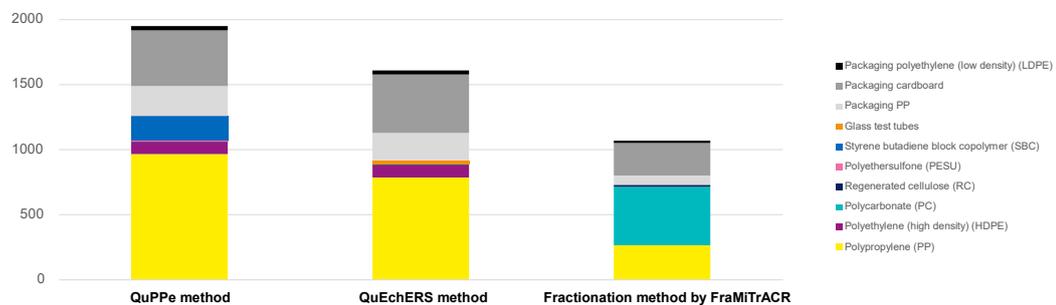


Daher bildete die Quantifizierung dieser Aspekte die Grundlage unserer Studie, die im Abschnitt über das Life Cycle Inventory (LCI) näher erläutert wird. Da unsere Bewertung ein repräsentatives Szenario in einem durchschnittlichen europäischen Prüfinstitut abbilden sollte, haben wir eine Reihe von Annahmen festgelegt. Die benötigten Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Röhrchen, Spritzen, Spritzenfilter usw.) sollten für eine typische Situation in einem europäischen Labor repräsentativ sein und nicht für einen bestimmten Hersteller von Verbrauchsmaterialien stehen. Daher wurde davon ausgegangen, dass die Herstellung der Verbrauchsmaterialien im Vereinigten Königreich erfolgt, wobei Rohstoffe von Lieferanten mit einer Transportentfernung von 1000 km zur Produktionsstätte, einem durchschnittlichen Strommix und einer durchschnittlichen Transportentfernung zu den Kunden von 1000 km verwendet werden. Als End-of-Life-Verfahren für die Verbrauchsmaterialien wurde die Verbrennung mit Energierückgewinnung angenommen. Die Anteile der Verbrennung, des Recyclings und der Deponierung am Ende der Lebensdauer von Verbrauchsverpackungen wurden auf der Grundlage durchschnittlicher Marktstatistiken ermittelt. Die Methode der Folgenabschätzung war EF3.1 Climate Change, fossil. Einzelheiten zu den Systemgrenzen, Einschränkungen und Abgrenzungen sind im Abschnitt über des LCI beschrieben.

2. Life Cycle Inventory

Zur Modellierung der Lebenszyklusanalyse wurde das Gewicht der Verbrauchsmaterialien und Verpackungen sowie der Strombedarf für jede Methode ermittelt. Die Primärdatenerhebung für die Gewichte der Verbrauchsmaterialien und Verpackungen wurde bei Sartorius (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Abbildung 2 zeigt die jeweiligen Gewichte der Verbrauchsmaterialien, die für jede Methode bei der Vorbereitung von 16 Laborproben benötigt werden.

Abbildung 2: Vergleich der Verbrauchsmaterialien, die für die Vorbereitung von 16 Proben nach den Methoden QuPPE, QuEChERS und FraMiTrACR erforderlich sind, und ihrer Verpackung, nach Gewicht in Gramm.



Die Daten wurden durch Wiegen von Probenverbrauchsmaterialien verschiedener Hersteller und durch Überprüfung der Herstellerangaben zur Materialzusammensetzung erhoben. Wenn Daten für eine bestimmte Größe nicht verfügbar waren, wurde eine Skalierung für fehlende Größen vorgenommen. Bei den in der QuEChERS-Methode verwendeten Glasreagenzgläsern wurde davon ausgegangen, dass sie 20 Nutzungszyklen mit zwischenzeitlichen Reinigungs- und Autoklavierschritten durchlaufen. Für die QuPPE-Methode werden 1,95 kg Verbrauchsmaterial und Verpackung benötigt, für die QuEChERS-Methode 1,61 kg und für die Fraktionierung mittels FraMiTrACR nur 1,07 kg. Die wichtigsten Materialien sind Polypropylen (PP, für alle Verbrauchsmaterialien einschließlich Pipettenspitzen, Zentrifugenröhrchen, Spritzen und Spritzenfilter), Polycarbonat (PC, für FraMiTrACR) und Polyethylen hoher Dichte (HDPE, für Zentrifugenröhrchendeckel). Zu den Verpackungsmaterialien gehörten Polypropylen für Pipettenspitzenboxen, Polyethylen niedriger Dichte (LDPE) für Verpackungsfolien und Karton.

Die Tabelle 4 zeigt den Vergleich zwischen den Methoden über die erhobenen Daten zur Verpackungsmenge, zum Stromverbrauch, zum Chemikalienverbrauch, zum Kohlenstoff-Äquivalentverbrauch, zur benötigten Arbeitszeit und zu den Arbeitskosten bei der Aufarbeitung von 16 Proben.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Mengen des Verbrauchsmaterial- und Verpackungsgewichts, des Strombedarfs, des Lösungsmittelverbrauchs und des CO₂-Fußabdrucks für jede Methode.

	QuPPE- Verfahren	QuEChERS- Verfahren	Fraktionierungs- Verfahren
Summe der Verbrauchsmaterialien und Verpackungen in g	1950	1610	1069
Stromverbrauch in kW/h	1,7	5,63	0,27
Verbrauch der Chemikalien in mL	172	197	0
Summe kg CO ₂ eq	6,94	5,82	3,99

Die Primärdatenerhebung zur Ermittlung des Stromverbrauchs wurde ebenfalls bei Sartorius (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Daten sind in Tabelle 4 dargestellt. Repräsentative Testläufe einer Tischzentrifuge wurden gemessen, während der Strombedarf von Abzügen, die in der QuEChERS-Methode verwendet werden, anhand der an das Gerät angeschlossenen Leistungsdaten in Abhängigkeit von der Nutzungsdauer berechnet wurde. Bei unserer Bewertung wurde festgestellt, dass der Energiebedarf von mechanischen Mischern vernachlässigbar ist und daher nicht in unsere Berechnung einbezogen wurde. Der Verbrauch von Lösungsmitteln und Sorptionsmitteln ist ebenfalls in Tabelle 4 aufgeführt.

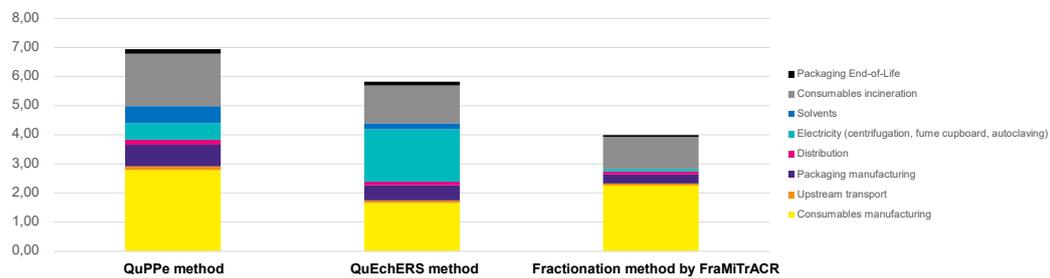
Das LCA-Modell wurde mit der Software Sphera LCAFE und der Datenbank Sphera 2023.2 sowie der Datenbank Ecoinvent 3.8 erstellt. Zu den aus diesen Datenbanken entnommenen Hintergrunddatensätzen gehören die Polymermaterialien für die Verbrauchsmaterialien und Verpackungen (PP, LDPE, HDPE, PC und Karton) sowie die Herstellungsprozesse für den Spritzguss und die Folienherstellung, die Strommixe für die Herstellung und die Produktnutzung, die Transportprozesse für den vorgelagerten Transport und den Vertrieb sowie die Datensätze für die Modellierung der Verbrennungs- und Deponieprozesse für das Ende der Lebensdauer. In ähnlicher Weise wurden die Daten für die Sterilisation

der Verbrauchsmaterialien und das Autoklavieren und Waschen der Glasreagenzgläser für QuEChERS aus den bei Sartorius verfügbaren Daten geschätzt. Die Beiträge sind in der Herstellungsphase der Verbrauchsmaterialien enthalten. Was die Lösungsmittel betrifft, so wurde der Datensatz für Acetonitril aus der Datenbank Sphera 2023.2 entnommen, während die Datensätze für Methanol, Ameisensäure und EDTA aus Ecoinvent 3.8 übernommen wurden. Die Verpackung und der vorgelagerte Transport von Lösungsmitteln wurden aufgrund ihrer geringen Auswirkungen nicht in das Modell einbezogen. Die bei den QuEChERS- und QuPPE-Methoden verwendeten Sorptionsmittel konnten nicht in das Modell einbezogen werden, da Informationen über ihre Umweltauswirkungsfaktoren fehlten. Die End-of-Life-Quote für Verpackungen wurde auf der Grundlage von Eurostat-Durchschnittsdaten aus dem Jahr 2021 modelliert, wobei für den Anteil der Kunststoffe an den Verpackungen von 40,7 % Recycling, 37 % Verbrennung mit Energierückgewinnung und 22,3 % Deponierung ausgegangen wurde, und für den Anteil der Pappe von 82,5 % Recycling, 8,2 % Verbrennung mit Energierückgewinnung und 9,3 % Deponierung. Die Recyclinganteile der Verbrauchsgüterverpackungen wurden anhand eines Cut-off-Ansatzes modelliert.

3. LCA - Impact Assessment

Als weiteren Teil unserer Lebenszyklusanalyse haben wir die Treibhausgasemissionen für jede Methode unter Verwendung der Folgenabschätzungsmethode EF 3.1 Klimawandel, fossil, berechnet. Dieser Indikator wurde gewählt, da insbesondere die Verringerung der fossilen Kohlenstoffemissionen industrieller Prozesse im Mittelpunkt steht. Abbildung 3 zeigt die ermittelten Werte für die Herstellung von Verbrauchsmaterialien, den vorgelagerten Transport, die Herstellung von Verpackungen, den Vertrieb, Strom, Lösungsmittel, die Verbrennung von Verbrauchsmaterialien und das Ende der Lebensdauer von Verpackungen. Die Gesamtmengen des Kohlenstoff-Fußabdruckes in kg CO₂-Äquivalent sind in Tabelle 4 dargestellt.

Abbildung 3. Vergleich des Kohlenstoff-Fußabdrucks [kg CO₂-Äq., EF 3.1 Klimawandel, fossil] zwischen den Methoden QuPpe, QuEChERS und FraMiTrACR bei der Vorbereitung von 16 Proben.



Die Herstellung von Verbrauchsmaterialien und die Verbrennung tragen bei allen drei Methoden am stärksten zu den Umweltauswirkungen bei. Dies kann mit dem in Abbildung 2 zusammengefassten Bedarf an Verbrauchsmaterialien in Verbindung gebracht werden, wobei QuPpe die höchste Anzahl an Verbrauchsmaterialien verwendet. Der Gewichtsvorteil der FraMiTrACR-Methode wird jedoch teilweise durch die Verwendung von Polycarbonat bei den Verbrauchsmaterialien kompensiert, verglichen mit den anderen Methoden, die einen größeren Anteil an Polypropylen-Verbrauchsmaterialien verwenden. Die Herstellung von Verpackungen und das Ende des Lebenszyklus von Verbrauchsmaterialien stehen in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der Verbrauchsmaterialien, die für die einzelnen Methoden verwendet werden. Der Strombedarf ist ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Umweltauswirkungen. Hier hat QuEChERS aufgrund des Vakuumverdampfungsschritts die größten Auswirkungen. Die Auswirkungen des Stromverbrauchs bei QuPpe und FraMiTrACR hängen mit der Zentrifugation zusammen, und die geringere Anzahl von Zentrifugationsschritten bei FraMiTrACR führt dazu, dass unsere Methode die geringsten Auswirkungen hat. Bei QuPpe entfallen fast 10 % der Kohlenstoffemissionen auf Lösungsmittel, insbesondere aufgrund der Verwendung von Acetonitril, während bei FraMiTrACR keine Kohlenstoffemissionen in dieser Kategorie anfallen, da für diese Methode keine Lösungsmittel erforderlich sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fraktionierung mit FraMiTrACR im Vergleich zu QuPpe und QuEChERS zu geringeren Kohlenstoffemissionen führt, was auf die geringere Anzahl der verwendeten Verbrauchsmaterialien, weniger Zentrifugationsschritte und das Fehlen von Lösungsmitteln bei dieser Methode zurückzuführen ist.

4. Ökonomisches Assessment

In zwei früheren Studien haben wir die Vorbereitung von Rohmilchproben im Labor als Modell verwendet, um unsere Fraktionierungsmethode mit QuPpe für die Bestimmung von Chlorat und Perchlorat und mit QuEChERS für die Bestimmung von Antibiotikarückständen zu vergleichen. In beiden Veröffentlichungen zeigte sich, dass die Probenvorbereitungszeit im Labor durch den Einsatz von FraMiTrACR deutlich reduziert werden konnte. Wir verwenden die erhobenen Laborprobenvorbereitungszeiten aus unseren früheren Studien, um die Arbeitskosten für jede Methode zu bewerten. Die Werte sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Vergleichende Darstellung zwischen den 3 Methoden bezüglich der Arbeitszeit und der Arbeitszeitkosten bei Aufarbeitung von 16 Laborproben.

	QuPpe- Verfahren	QuEChERS- Verfahren	Fraktionierungs- Verfahren
Arbeitszeit in Minuten	83	180	24
Arbeitszeitkosten in €	37,00	70,00	11,00

Die Vorbereitungszeit wurde auf der Grundlage von 16 Laborproben in aktive und passive Arbeitszeit aufgeteilt. Als Anzahl der Laborproben, die einem Probendurchlauf entsprechen, haben wir 16 gewählt, da dies die normale Kapazität der Zentrifugenröhrchen einer Tischzentrifuge ist und die Zentrifugation ein integraler Bestandteil aller drei Methoden ist. Für die Berechnung der Arbeitskosten haben wir einen Stundenlohn von 40 € für die aktive Arbeitszeit, in der ein Labormitarbeiter die Laborproben aktiv bearbeitet, und die Hälfte dieses Stundenlohns für die passive Arbeitszeit, in der ein Mitarbeiter teilweise andere Aufgaben wie das Wiegen der Laborproben erledigen kann, bis die Zentrifugations- oder Verdampfungsschritte abgeschlossen sind, angenommen. Die Summe der beiden errechneten Arbeitskosten stellt die Gesamtarbeitskosten dar. Für den Strombedarf wurden, wie bereits zuvor erwähnt, die Daten anhand der Spezifikationen und der Betriebszeit für jedes verwendete Gerät erhoben. Vergleichsmessungen wurden auch mit Hilfe von Stromverbrauchsmessgeräten durchgeführt, die an die Elektrogeräte angeschlossen waren. Diese Daten sind

bereits in Tabelle 4 gezeigt und werden daher hier nicht mehr aufgeführt. Erwähnt werden soll zusätzlich, dass der Stromverbrauch sowie der Material- und Chemikalienverbrauch einen Einfluss auf die Gesamtkostenstruktur eines Labors haben. Daher werden diese Faktoren nochmals aufgegriffen und im Hinblick auf eine ökonomische Betrachtung diskutiert.

V. DISKUSSION

Milch und Milchprodukte sind ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung. Um die breite Palette von Lebensmitteln aus Milch herzustellen, weiter zu verarbeiten und haltbar zu machen, wird eine Vielfalt von Fraktionierungsverfahren angewendet. Als Fraktionierung bezeichnet man die Aufteilung einer Stoffmenge in mindestens zwei Teilmengen oder die Trennung eines Stoffgemisches in Untergruppen, die Fraktionen.

1. Fraktionierung als Prozess

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, werden in der Milchverarbeitung zur Trennung der Milchbestandteile ganz unterschiedliche physikalische Verfahren wie Filtration und Zentrifugation genutzt.

Für die Produktion von Säuglingsmilchnahrungspulver kann der Produktionsablauf, wie folgt aussehen: Die Rohmilch wird aus dem Stapeltank entnommen, mittels Zentrifugen entrahmt und durch Filtrationstechniken entkeimt. Anschließend wird die Magermilch mittels Fallstromeindampfer oder Membranfiltration aufkonzentriert. In einem Mischschritt wird das Magermilchkonzentrat mit Molkenpulver, Fettpulvern und anderen Nährstoffsubstraten versetzt, um die gewünschte Zusammensetzung einzustellen. Im letzten Produktionsschritt wird das Stoffgemisch in speziellen Sprühtürmen zu Säuglingsmilchnahrungspulver getrocknet und konfektioniert. Da die eingesetzten Rohstoffe zum Teil just-in-time angeliefert werden, wäre es ideal notwendige Analyseergebnisse, speziell hinsichtlich einer Belastung mit unerwünschten Substanzen, auch just-in-time und wenn möglich an allen Stufen des Produktionsprozesses zur Verfügung zu haben.

Für einige Rückstandsklassen gelingt dies heute schon. So wird die Rohmilch vor bzw. beim Abladen vom Milchsammelwagen in der Milchannahme der Molkerei mittels Schnelltest auf verschiedene Antibiotika getestet. Diese Ergebnisse liegen just-in-time vor und werden – auch aufgrund spezifischer gesetzlicher Vorgaben – als Entscheidungsgrundlage für die Annahme des Rohstoffes oder dessen Zurückweisung und Ausschluss aus der Lebensmittelkette genutzt.

Für die meisten anderen Rückstände und Kontaminanten ist der Analytik-Prozess zeitaufwendiger und kann mehrere Tage in Anspruch nehmen, sodass das Endergebnis der Analysen erst nach der Produktion des Lebensmittels zur Verfügung steht. Häufig liegt dies nicht an der eigentlichen Analysemethode, sondern an der aufwendigen Probenvorbereitung für die entsprechende instrumentelle Analytik. Wären auch diese Ergebnisse just-in-time vorhanden – zumindest im Bereich einiger wenigen Stunden – würde dies erhebliche Vorteile in der Produktionssteuerung und der Wirtschaftlichkeit der Produktionsprozesse bringen.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte deshalb auch die Fragestellung beantwortet werden, ob mit Hilfe eines Fraktionierungsverfahrens eine ausreichend schnelle Alternative zum QuEChERS- und QuPPE-Verfahren entwickelt werden kann, um Analyseergebnisse zum Zeitpunkt der Rohstoffverarbeitung, also just-in-time, produzieren zu können.

2. Fraktionierung als Laborprobenvorbereitung

Ausgehend von dieser Fragestellung und meinen Kenntnissen über die Anwendung von Fraktionierungsprozessen in der Molkereitechnologie wurde die in dieser Arbeit beschriebene neue Fraktionierungsmethode zur Probenvorbereitung von Milch im Labor entwickelt.

Um die Fraktionierung im Labor umzusetzen, wurde eine Fraktionierungseinheit konzipiert in Zusammenarbeit mit der Sartorius Lab Instruments GmbH. Die Fraktionierungseinheit FraMiTrACR, als Akronym für „Fractionation of Milk for Trace Analysis of Contaminants and Residues“ ermöglicht es, in einem ein-Schritt-Verfahren komplexe Probenmatrices wie Milch passiv, schnell und extraktionsmittelfrei zu trennen und eine Fraktion daraus ohne weitere Bearbeitung direkt zur weiteren Analyse zu nutzen.

Die Fraktionierungseinheit ist so konfiguriert, dass auch komplexe und fetthaltige Probenmatrices, ohne den zusätzlichen Einsatz von Chemikalien, mittels einer Membran getrennt werden. Um die passende Membran für die Fraktionierung zu ermitteln, wurden bei der Entwicklung der Fraktionierungseinheit FraMiTrACR neben Rohmilch auch komplexere Proben, wie Säuglingsnahrungspulver, Getreidebreipulver, Sahnepulver, Paprikamark und Tomatenmark getestet. Proben

dieser Matrices wurden mit Wasser verdünnt und anschließend in verschiedenen Membran- und Prozesskonstellationen fraktioniert. Aus den Tests war abzuleiten, dass die Menge des gewonnenen Filtrats neben den Parametern des Zentrifugationsprozesses von der Trockenmasse der Probe, der "Komplexität" der Probe und deren Fettgehalt abhängt. Die publizierten Daten zeigen, dass eine Rohmilchprobe mithilfe einer Zentrifuge passiv in 15 Minuten in ein weiter verwendbares Filtrat und ein Retentat getrennt werden kann. Das gewonnene Volumen ist nach dieser Zeit ausreichend, um eine Mehrfachbestimmung aus dem Filtrat durchzuführen und auch noch Volumen für Rückstellproben zur Verfügung zu haben.

Neben der Entwicklung der grundsätzlichen Methodik und der Konfiguration einer praxistauglichen Fraktionierungseinheit war die Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse mit den anderen, etablierten Methoden zur Probenvorbereitung die entscheidende Fragestellung bezüglich der Bewertung der neuen Methode als Alternative. Dazu wurden dotierte Rohmilchproben mittels Fraktionierungsmethode aufbereitet und nachfolgend mit Flüssigchromatographie und Massenspektroskopie analysiert. Dotiert wurden die Rohmilchproben sowohl mit polaren Kontaminanten wie Perchlorat und Chlorat, als auch mit weniger oder eher unpolaren praxisrelevanten Rückständen aus der Gruppe der Antibiotika.

Diese dotierten Rohmilchproben wurden nicht nur mittels Fraktionierung, sondern auch mit den etablierten Verfahren QuEChERS und QuPPE aufbereitet und dann mit der gleichen Methodik parallel untersucht. Wie die Ergebnisse in den Publikationen zeigen, werden mit der Fraktionierungsmethode Bestimmungsgrenzen (LOD) und Nachweisgrenzen (LOQ) erreicht, die vergleichbar sind mit der QuEChERS- und der QuPPE-Methode. Wichtig für die Verwendung der Fraktionierungsmethode im Rahmen der Lebensmittelanalytik ist, dass sowohl LOD als auch LOQ wie bei den etablierten Methoden unterhalb der gesetzlich erlaubten Rückstandsmengen (MRL) liegen. Ebenso sind Wiederholbarkeit und Richtigkeit der angewendeten Analysemethode unter Verwendung der Fraktionierungsmethode mit den etablierten Verfahren vergleichbar, wie man an den publizierten Daten zur Methodvalidierung erkennen kann. Diese wurde nach DIN ISO 11352:2013, den Richtlinien zur Bestimmung von LOD und LOQ nach G. Lieck und nach den Richtlinien „Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues

analysis in food and feed-SANTE/2021/11312“ ermittelt.

Besonders ist hervorzuheben, dass sich mit der Fraktionierungsmethode sowohl polare als auch unpolare Stoffe gut aufbereiten lassen. Dies ist ein Hauptunterschied zu den etablierten Methoden. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass die Probenverarbeitung nicht nur schnell erfolgt, sondern auch kaum Probenhandling erfordert. Daher wird das Kontaminationsrisiko der Probe im Labor minimiert. Diese Reduktion des Kontaminationsrisikos ist besonders in der Spurenanalytik von Bedeutung.

Einschränkend muss zu diesem Zeitpunkt hervorgehoben werden, dass die Probenaufbereitungsverfahren QuPPE und QuEChERS ein weit größeres Spektrum an Analyten abdecken als bislang mit der Fraktionierungsmethode gezeigt werden konnte. Ergänzend bleibt anzumerken, dass die Fraktionierung mittels FraMiTrACR bereits im Routinebetrieb von Laboren eingesetzt wird und im Rahmen der Akkreditierung nach DIN/EN/ISO 17025 durch die DAKKS als Methode zur Probenvorbereitung anerkannt ist.

3. Fraktionierung ökonomisch betrachtet

Neben der Entwicklung des Fraktionierungsverfahrens und dem Vergleich der Validierungsparameter zwischen den verschiedenen Methoden der Probenvorbereitung sollten auch Daten erhoben werden, inwieweit sich die Methoden in wirtschaftlichen Faktoren unterscheiden. Dazu haben wir die drei Methoden der Probenvorbereitung in Bezug auf die Zahl der Arbeitsschritte, die aktive und passive Bearbeitungszeit, den Materialverbrauch und den Energieverbrauch verglichen. Die vorliegenden Daten zeigen (Tabelle 6), dass sich durch die Fraktionierung eine Arbeitszeiterparnis von bis zu 71% bzw. 87% gegenüber den bisherigen Verfahren erreichen lässt.

Tabelle 6: Vergleich der Probenvorbereitungsverfahren QuPPE, QuEChERS und Fraktionierung (FraMiTrACR) bezüglich Arbeitszeit, Energiekosten und Arbeitszeitkosten. Die Einsparungen mittels Fraktionierungsverfahren gegenüber QuPPE bzw. QuEChERS werden in % angegeben (entnommen aus Steils et al.,2023; Steils et al., 2024)

	QuPPE- Verfahren	QuEChERS- Verfahren	Fraktionierungs- Verfahren
Arbeitszeit in Minuten	83	180	24
Reduktion der Arbeitszeit in % mittels Fraktionierung	71%	87%	
Stromverbrauch in kW/h	1,7	5,63	0,27
Energieeinsparung in % mittels Fraktionierung	84%	95%	
Arbeitszeitkosten in €	37,00	70,00	11,00
Arbeitszeitkostenreduktion in % mittels Fraktionierung	70%	84%	

Diese Zeitersparnis ergibt sich aus dem großen Unterschied der Zahl der Prozessschritte zur Vorbereitung der Proben, da bei der Fraktionierung mit FraMiTrACR die native Rohmilchprobe nur in die Fraktionierungseinheit eingefüllt wird, gegebenenfalls noch mit einem Standard versetzt wird, um dann in der Zentrifuge fraktioniert zu werden. Nach der Fraktionierung wird das Filtrat entnommen, durch einen Spritzenvorsatzfilter filtriert und analysiert. Diese einfache und kurze Verarbeitung steht den aufwendigen Extraktions- und Aufreinigungsschritten der anderen beiden Probenaufbereitungsverfahren QuPPE und QuEChERS gegenüber. Diese Arbeitszeitersparnis führt zu einer Reduzierung der Arbeitszeitkosten je Probe um 70% bzw. 84% gegenüber den Standardverfahren. Damit betragen die Arbeitskosten für 16 aufbereitete Proben 11 Euro bei der Fraktionierungsmethode, 37 Euro bei der QuPPE Methode und 70 Euro bei der QuEChERS Methode.

Neben dieser Kostenersparnis pro Probe, bezogen auf die reine Arbeitszeit der Labormitarbeiter ist es durch die schnelle Fraktionierung möglich, einen höheren Probendurchsatz pro Mitarbeiter und pro Zeiteinheit im Labor zu realisieren, was eine Reduzierung der Stückkosten durch eine geringere Belastung durch Fixkosten

und Abschreibungen zur Folge hat. Zusätzlich ist vorteilhaft, dass bei der Fraktionierungsmethode weniger Einweg- und Verbrauchsmaterialien eingesetzt werden. Dies ermöglicht eine weitere Kostensenkung durch Reduzierung der nötigen Lagerkapazität und der Abfallentsorgungskosten.

Vorteilhaft ist auch die Energieeinsparung von bis zu 84% bzw. 95% gegenüber QuPPE- oder QuEChERS-Methode. Diese Energieeinsparung ist im Wesentlichen auf die Minimierung der technischen Bearbeitung der Proben und damit des Stromverbrauchs zurückzuführen. In Summe führen diese Faktoren zu einer verbesserten Wirtschaftlichkeit des Fraktionierungsverfahrens gegenüber den Standardverfahren bei gleichbleibender hoher Ergebnisqualität.

4. Fraktionierung ökologisch betrachtet

Neben der rein analytisch-qualitativen und der wirtschaftlichen Betrachtung sollte die Fraktionierungsmethode auch bezüglich Ihrer ökologischen Auswirkungen bewertet werden. Die publizierten Daten zeigen, dass die Fraktionierungsmethode den ökologischen Fußabdruck von Laboren gegenüber der QuPPE- oder der QuEChERS-Methode verbessern kann. Dies liegt vor allem an dem geringeren Materialeinsatz und dem deutlich niedrigeren Energieverbrauch. Beim Materialverbrauch sind die Hauptvorteile der Fraktionierungsmethode, dass weniger Kunststoffmaterial eingesetzt wird und keinerlei Lösungs- oder Extraktionsmittel notwendig sind. Im erhobenen Life Cycle Assessment ergibt sich beim Einsatz der Fraktionierungsmethode eine Gesamtreduktion von 31% bzw. 43% Kilogramm Kohlenstoffdioxidäquivalent gegenüber dem QuPPE- bzw. dem QuEChERS-Verfahren.

Die erhobenen Daten zur ökologischen Betrachtung sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Vergleich der drei Probenvorbereitungsverfahren bezüglich der Verbrauchsmaterialien und des Verpackungseinsatzes, der Summe CO₂eq und des Chemikalienverbrauchs. Zudem werden die Ersparnisse durch das Fraktionierungsverfahren in % angegeben (entnommen aus Steils et al., 2023; Steils et al., 2024)

	QuPPE- Verfahren	QuEChERS- Verfahren	Fraktionierungs- Verfahren
Summe der Verbrauchsmaterialien und Verpackungen in g	1950	1610	1069
Müll- und Lagerreduktion in % mittels Fraktionierung	45%	34%	
Summe kg CO ₂ eq	6,94	5,82	3,99
Reduktion der CO ₂ eq in % mittels Fraktionierung	43%	31%	
Verbrauch der Chemikalien in mL	172	197	0
Reduktion der Chemikalien in % mittels Fraktionierung	100%	100%	

Diese dargestellten Einsparungseffekte durch die Fraktionierungsmethode bei der Probenvorbereitung könnten bei breiter Anwendung einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Nachhaltigkeit und der Umweltverträglichkeit von Laborunternehmen leisten.

5. Fraktionierung zur Verbesserung der Prozessüberwachung

Aufgrund der kurzen Bearbeitungszeit für die Probenvorbereitung bietet die Fraktionierungsmethode mittels FraMiTrACR erstmals die realistische Möglichkeit, just-in-time Analysen vor Ort in einem Produktionsstandort umsetzen. Es ist ohne großen Aufwand möglich aus Rohmilch, die angeliefert wird bzw. zur Verarbeitung ansteht, eine repräsentative Probe zu entnehmen und zu fraktionieren. Das Filtrat aus der Fraktionierungseinheit kann dann nach ca. 15 bis 20 Minuten direkt analysiert werden. Die Größe vieler Produktionsstandorte lässt den Einsatz von fortgeschrittener instrumenteller Analytik vor Ort zunehmend realistisch erscheinen. So könnte das Screening auf die häufigsten Kontaminanten wie Reinigungsmittelrückstände oder Antibiotika vor Ort durch frühzeitiges Vermeiden des Vermischens mit unbelasteten Chargen und durch den Ausschluss betroffener Chargen aus dem Produktionsprozess sich wirtschaftlich lohnen. Eine möglichst

frühe Identifikation nicht tauglicher Chargen eines Rohstoffes, bevor weitere Ressourcen in die Herstellung eines Produktes gesteckt werden, das später dann nicht als Lebensmittel freigegeben werden kann, hat nicht nur wirtschaftlichen Wert, sondern könnte auch zu einem erheblichen Imagegewinn der gesamten Branche führen.

Einschränkend sollte hier allerdings angemerkt werden, dass die Zeit bis zur Verfügbarkeit eines Analyseergebnisses nicht allein von der Probenvorbereitungszeit, sondern auch maßgeblich von der Analysezeit durch die jeweilige Gerätetechnik und den Analyten bzw. das Analysespektrum bedingt wird. Möglich ist, dass man im Rahmen der Prozessüberwachung ein definiertes Analysespektrum hinterlegt, das in der Prozesszeit von der Stapelung bis zur Verarbeitung einer Charge analysiert werden kann. Ebenso ist denkbar, dass definierte Analysen zur Stufenkontrolle durchgeführt werden, wenn bekannte Prozesskontaminanten nicht verhindert werden können. Dies wäre beispielsweise denkbar bei Erhitzungsprozessen und der Überwachung von den dabei entstehenden Acrylamiden. Ebenso wäre es möglich Zwischenprodukte auf Chlorat zu untersuchen, wenn chlorhaltige Reinigungsmittel in der Zwischenreinigung der Anlagen eingesetzt werden. Aufgrund der Schnelligkeit der Probenvorbereitung mittels Fraktionierung sind sicher noch viele andere Anwendungsmöglichkeiten denkbar.

Abschließend sollte noch betont werden, dass die Fraktionierungsmethode mittels FraMiTrACR bezogen auf das Risiko einer Kontamination von Proben innerhalb des Labors eine besonders sichere Methode ist. Da die Probe für die Fraktionierung nur mit Standard versetzt wird und keiner weiteren Behandlung oder Zugabe von anderen Stoffen unterliegt, ist das Kontaminationsrisiko um ein Vielfaches geringer als bei den anderen verglichenen Probenvorbereitungsmethoden. Dies kann beispielsweise von Bedeutung sein, wenn Stoffe untersucht werden sollen, die auch durch den Labormitarbeiter oder durch Reagenzien eingetragen werden können. Dies wurde unter anderem für die Bestimmung von perfluorierten Alkanen beim Einsatz von Ameisensäure beschrieben (Abafe et. al., 2021). Die Zugabe von Ameisensäure ist im Gegensatz zur Fraktionierungsmethode sowohl bei der QuPPE- als auch bei der QuEChERS-Methode ein notwendiger Prozessschritt.

6. Zusammenfassende Bewertung und offene Fragestellungen

In der Zusammenfassung der vorausgehenden Diskussionsabschnitte können folgende Aussagen getroffen werden:

- Fraktionierung ist bei der Auswahl passender Prozessparameter, wie sie in der Fraktionierungseinheit FraMiTrACR umgesetzt werden konnten, eine geeignete Probenvorbereitungsmethode für die Analyse von Rohmilchproben.
- Zusätzlich zeigt die Fraktionierungsmethode auch das Potential andere Probenarten, wie Säuglingsmilchnahrungen, Getreidebreie und Gemüseproben aufbereiten zu können.
- Die Fraktionierungsmethode unterscheidet sich in Ihrer Anwendbarkeit gegenüber der bekannten QuPPE- bzw. QuEChERS-Methode durch eine deutlich reduzierte Aufbereitungszeit und geringeren Materialeinsatz.
- Mit der Fraktionierungsmethode lassen sich sowohl polare Pestizide als auch unpolare antibiotische Wirkstoffe analysieren.

Einschränkend muss zum aktuellen Zeitpunkt gesagt werden, dass sowohl bei der QuPPE- als auch bei der QuEChERS-Methode die publizierte Probenvielfalt und das publizierte Analysespektrum wesentlich größer sind als bei der entwickelten Fraktionierungsmethode. Erst mit der breiteren Anwendung der Fraktionierungsmethode wird sich zeigen, wie sich diese neue Methode zwischen den bekannten Methoden etablieren kann. Es ist denkbar, dass sich die Fraktionierungsmethode als "Brückenmethode" zwischen stark polaren und stark unpolaren Analyten als besonders vorteilhaft erweist. Ebenso ist es möglich, dass stark oberflächenaktive Substanzen an der Membran der Fraktionierungseinheit binden und nicht quantitativ bestimmt werden können. Es könnte auch sein, dass Stoffe, die an eine definierte Probenfraktion gebunden sind, nicht ins Filtrat übergehen und somit nicht zuverlässig analysiert werden können. Möglich ist auch, dass eine Adaptation der Fraktionierungsmethode für bestimmte Analysen notwendig ist oder für diese Stoffe eine andere Membran genutzt werden muss.

Von den publizierten Daten ausgehend lässt sich aber bereits heute festhalten, dass für die Untersuchung vieler für die Milchindustrie, die Lebensmittelindustrie und insbesondere die Babynahrungsindustrie relevanter Parameter die Proben mit der Fraktionierungsmethode zuverlässig aufbereitet werden können.

Die erarbeiteten Daten belegen eindeutig, dass die Fraktionierungsmethode für

Lebensmittellabore von sehr großer wirtschaftlicher und auch ökologischer Bedeutung sein kann. Die stark reduzierte Probenbearbeitungszeit ist sicherlich der größte wirtschaftliche Vorteil gegenüber anderen Methoden. In Kombination mit der reduzierten Menge an Verbrauchsmaterialien und dem geringeren Energieverbrauch verstärkt sich dieser Kosteneffekt zusätzlich.

Neben der reinen Kosteneinsparung ist auch die Möglichkeit mehr Proben an einem Tag verarbeiten zu können ein wirtschaftliches Argument für den Einsatz von Fraktionierungseinheiten. Darüber hinaus verbindet die Fraktionierungsmethode ökonomische mit ökologischer Innovation. Da die Methode einen sehr geringen Material- und Energieverbrauch hat und zusätzlich auf Lösungsmittel und andere chemische Stoffe verzichtet, ist der ökologische Fußabdruck geringer als bei den etablierten Methoden. Somit wird dadurch das Labor in seiner Probenaufbereitung nicht nur effizienter, sondern auch „grüner“.

Ein weiterer innovativer Aspekt für Labore, die an Produktionsstandorten der Lebensmittelindustrie angegliedert sind oder für diese als Dienstleister arbeiten, ist, dass die Proben just-in-time aufbereitet werden können und somit Qualitätsergebnisse von Rohwaren noch vor oder während der Verarbeitung zur Verfügung stehen. Dies ist besonders für Produktionsverfahren von Interesse, deren Rohstoffe eine geringe Haltbarkeit haben. Zudem ist es möglich, dass Zwischenprodukte vor der Weiterverarbeitung aufbereitet und analysiert werden, womit auch Verschneidungen von Chargen denkbar sind, um sich Zielparametern möglichst weit annähern zu können.

Hervorzuheben ist noch, dass die Methode gegenüber den anderen verglichenen Methoden das Risiko von Kontaminationen deutlich reduziert, weil die Probe kaum manipuliert werden muss. Da auch keine Extraktions- oder Lösungsmittel sowie andere chemische Stoffe zur Probe gegeben werden, bleibt der ursprüngliche chemisch-physikalische Zustand der Probe bestmöglich erhalten.

In der Gesamtschau aller erhobenen Daten lässt sich festhalten, dass das Fraktionierungsverfahren mittels FraMiTrACR bei vergleichbarer Ergebnisqualität eine ökonomisch und ökologisch sinnvolle Alternative zum QuPPE- bzw. QuEChERS-Verfahren darstellt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das QuPPE- und das QuEChERS-Verfahren sind weltweit anerkannte Probenvorbereitungsmethoden für Lebensmittel. Sie werden für die Vorbereitung einer Vielzahl von Probenarten verwendet, insbesondere zur Analyse von polaren bzw. unpolaren Analyten. Beide Methoden sind jedoch aufgrund einer Vielzahl von Prozessschritten zeitaufwendig und erfordern eine große Menge an Material und Chemikalien.

In dieser Studie wurden diese beiden Verfahren mit einer neu entwickelten, auf der Fraktionierung der Proben beruhenden Vorbereitungsmethode verglichen. Die neue Methode erfordert für die Probenvorbereitung eine Fraktionierungseinheit, die als FraMiTrACR bezeichnet wird (Akronym für Fractionation of Milk for Trace Analysis of Contaminants and Residues). Als Probenmaterial wurde fetthaltige, nicht homogenisierte Rohmilch verwendet. Diese wird in die Fraktionierungseinheit pipettiert, mit einem passenden Referenzmaterial versetzt und dann in einer Zentrifuge 15 Minuten lang fraktioniert. Die Rohmilch wird dabei in Retentat und Filtrat getrennt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Filtrat zur Analyse auf polare Pestizide und unpolare antibiotische Substanzen verwendet. Anhand der Daten konnte gezeigt werden, dass die Fraktionierungsmethode eine Alternative zu den etablierten Probenvorbereitungsmethoden darstellt. Mit der neuen Methode werden Ergebnisse erzielt, die mit dem QuPPE- bzw. dem QuEChERS-Verfahren vergleichbar sind. Der große Vorteil ist, dass durch die Fraktionierung Labore kosteneffizienter und nachhaltiger arbeiten können. Die Arbeitszeit und die Arbeitszeitkosten werden um mehr als 80% reduziert. Darüber hinaus reduziert die Fraktionierungsmethode den Materialeinsatz um bis zu 45 %, den Energieverbrauch um bis zu 95 %. Ein Einsatz von Lösungs- und Extraktionsmitteln ist überhaupt nicht mehr nötig. Insgesamt spart die Anwendung der Fraktionierungsmethode bis zu 43 % Kohlendioxidäquivalente in kg im Vergleich zum QuPPE- bzw. dem QuEChERS-Verfahren.

Für die Probenart Milch und das getestete Analytenspektrum hat sich die Probenfraktionierung gegenüber dem QuPPE- bzw. dem QuEChERS-Verfahren als eine qualitativ gleichwertige, aber deutlich kostengünstigere und nachhaltigere Methode erwiesen.

VII. SUMMARY

The QuPPE and QuEChERS methods are globally recognized sample preparation methods for food. They are used for the preparation of a variety of sample types, especially for the analysis of polar and non-polar analytes respectively. However, both methods are time consuming due to a large number of process steps and require a large amount of material and chemicals.

In this study, these two methods were compared with a newly developed preparation method based on sample fractionation. The new method requires a fractionation unit for sample preparation called FraMiTrACR (acronym for Fractionation of Milk for Trace Analysis of Contaminants and Residues). Fat-containing, non-homogenized raw milk was used as sample material. This is pipetted into the fractionation unit, mixed with a suitable reference material and then fractionated in a centrifuge for 15 minutes. The raw milk is separated into retentate and filtrate. In the present study, the filtrate was used to analyze for polar pesticides and non-polar antibiotic substances. The data showed that the fractionation method is an alternative to the established sample preparation methods.

The new method achieves results that are comparable with the QuPPE and QuEChERS methods. The great advantage is that laboratories can work more cost-efficiently and sustainably thanks to fractionation. Working time and labor costs are reduced by more than 80%. In addition, the fractionation method reduces material usage by up to 45% and energy consumption by up to 95%. The use of solvents and extraction agents is no longer necessary at all. Overall, the use of the fractionation method saves up to 43% carbon dioxide equivalents in kg compared to the QuPPE or QuEChERS process.

For the substrate milk and the tested analyte spectrum, sample fractionation has proven to be a qualitatively equivalent, but significantly more cost-effective and sustainable method compared to the QuPPE or QuEChERS method.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. AOAC Official Method 2007.01 (2007), Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate
2. Ovokeroye A. Abafe, Linda R. Macheka and Joshua O. Olowoyo (2021). Confirmatory Analysis of Per and Polyfluoroalkyl Substances in Milk and Infant Formula Using UHPLC–MS/MS. *Molecules*. 2021 Jun; 26(12): 3664.
3. Waleed Alahmad, S. Irem Kaya, Ahmet Cetinkaya, Pakorn Varanusupakul, Sibel A. Ozkan (2023). Green chemistry methods for food analysis: Overview of sample preparation and determination. *Advances in Sample Preparation* 5 (2023) 100053.
4. Alshymaa A. Aly, Tadeusz Górecki (2020). Green Approaches to Sample Preparation Based on Extraction Techniques. *Molecules* 2020, 25, 1719.
5. Michelangelo Anastassiades, Steven J. Lehotay, Darinka Stajnbaher and Frank J. Schenck (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* VOL. 86, NO. 2, 2003.
6. M. Anastassiades, D. Mack, B. Tasdelen, I. Sigalova, D. Kostelac, E. Scherbaum (2008). Residues of Highly Polar Pesticides in Samples from the Market. Poster presentation at CRL for Pesticide Residues using Single Residue Methods hosted at the Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart.
7. Ramiz M.R. Azad, Brijesh Pandey, Dasharath Oulkar and Sagar Utture (2020). A generic approach for simultaneous detection and quantification of pesticides, veterinary drugs, and aflatoxin M1 in milk using LC-MS/MS. *Thermo Fisher Scientific Application Note* 65933.
8. BVL (2024) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, §38 TabakerzG, §28b GenTG, Stand 2024-07, Zuletzt zugegriffen am 25.08.2024.
9. Gösta Bylund, Tetra Pak Processing Systems AB (2015). *Dairy Processing Handbook*. ISBN 9176111326
10. Soledad Cárdenas (2021). Including Simplicity and Sustainability Concepts in Sample Preparation. *LCGC Supplements Recent Developments in Sample*

- Preparation Volume 39 Issue s11 Pages: 24–26.
11. Alberto Chisvert, Soledad Cárdenas, Rafael Lucena (2019). Dispersive micro-solid phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 112, March 2019, Pages 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.005>
 12. CRL (2009) Community Reference Laboratories for Residues of Pesticides - Single Residue Methods. Quick Method for the LC-MS/MS Analysis of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving a Common Extraction Step with Methanol. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE_Version1.PDF. Zuletzt zugegriffen am 24.06.2024.
 13. CVUA Stuttgart (2024) Chemisches Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart. Unsere Themen, QuEChERS und QuPPE (2024). https://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=5&ID=2200&Pdf=No&lang=DE. Zuletzt zugegriffen am 17.06.2024.
 14. DVO (EU) 2022/1646. Durchführungsverordnung (EU) 2022/1646 der Kommission vom 23. September 2022 über einheitliche praktische Modalitäten für die Durchführung amtlicher Kontrollen der Verwendung pharmakologisch wirksamer Stoffe, die als Tierarzneimittel oder Futtermittelzusatzstoffe zugelassen sind, und verbotener oder nicht zugelassener pharmakologisch wirksamer Stoffe und ihrer Rückstände, über besondere Inhalte mehrjähriger nationaler Kontrollpläne und besondere Modalitäten für deren Aufstellung. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1646>. Zuletzt zugegriffen am 10.09.2024.
 15. Jason V. Dyke, Andrea B. Kirk, P. Kalyani Martinelango, Purnendu K. Dasgupta (2005). Sample processing method for the determination of perchlorate in milk. *Analytica Chimica Acta* 567 (2006), 73–78. doi:10.1016/j.aca.2006.02.024
 16. EFSA (2022) European Food Safety Authority. Report for 2022 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2024:EN-8669 101 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2024.EN-8669
 17. EURL-SRM (2013) EU Reference Laboratory for Single Residue Methods. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement.

- Food of Animal Origin - Version 1. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_AO_V1.pdf.
Zuletzt zugegriffen am 24.06.2024.
18. EURL-SRM (2019) EU Reference Laboratory for Single Residue Methods. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement. Food of Animal Origin - Version 3.2. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_AO_V3.pdf
Zuletzt zugegriffen am 16.09.2024.
19. EURL-SRM (2020) EU Reference Laboratory for Single Residue Methods. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement. Food of Plant Origin (QuPpe-PO-Method) Version 10.1. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_PO_V10_1.pdf.
Zuletzt zugegriffen am 24.06.2024.
20. EURL-SRM (2024). EU Reference Laboratory for Single Residue Methods. Home of the QuPpe Method, Download (2024). https://www.quppe.eu/quppe_doc.asp. Zuletzt zugegriffen am 18.06.2024.
21. Wolfgang Frenzel, Inga Markeviciute (2016). Membrane-based sample preparation for ion chromatography—Techniques, instrumental configurations and applications. *Journal of Chromatography A* <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.052>
22. Gold Book (2024). 'fraction' in IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 3rd ed. International Union of Pure and Applied Chemistry; 2006. Online version 3.0.1, 2019. <https://doi.org/10.1351/goldbook.F02494>. Zuletzt zugegriffen am 14.09.2024
23. Raúl Gonzalez-Martín, Adrian Gutierrez-Serpa, Veronica Pino, Muhammad Sajid (2023). A tool to assess analytical sample preparation procedures: Sample preparation metric of sustainability. *Journal of Chromatography A* 1707 (2023) 464291. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464291>
24. IDF (2023) International Dairy Federation. Prevention of the development of chlorate in the dairy chain (Bulletin of the IDF n° 526/2023). <https://doi.org/10.56169/QVPK6979>
25. Luana Izzo, Alfonso Narváez, Luigi Castaldo, Anna Gaspari, Yelko Rodríguez-Carrasco, Michela Grosso and Alberto Ritieni (2021). Multiclass and multi-

- residue screening of mycotoxins, pharmacologically active substances, and pesticides in infant milk formulas through ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry analysis. *J. Dairy Sci.* 105:2948–2962. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21123>
26. A Bakarr Kanu (2021). Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. *Journal of Chromatography A*, Volume 1654, 27 September 2021, 462444. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462444>
27. Massoud Kaykhahi (2021). Introductory Chapter: Evolution of Sample Preparation [Internet]. *Sample Preparation Techniques for Chemical Analysis*. IntechOpen; 2021. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.101434>. Zuletzt zugegriffen am 12.09.2024.
28. LFGB (2005). *Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB) Ausfertigungsdatum: 01.09.2005.*
29. Steven J. Lehotay (2007). Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* VOL. 90, NO. 2, 2007 4
30. Angela I. Lopez-Lorente, Francisco Pena-Pereira, Stig Pedersen-Bjergaard, Vania G. Zuin, Sibel A. Ozkan, Eleftheria Psillakis (2022). The ten principles of green sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry* 148 (2022) 116530. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116530>
31. MIV (2024) Milchindustrie-Verband e. V.. Deutschland: Pro-Kopf-Verbrauch von Milchprodukten Stand April 2024. https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2024/05/ProkopfDeutschland_Mopro_2017-2023x_Homepage.pdf. Zuletzt zugegriffen am 09.09.2024.
32. MRI (2014) Max-Rubner-Institut. *Ernährungsphysiologische Bewertung von Milch und Milchprodukten und ihren Inhaltsstoffen. Bericht für das Kompetenzzentrum für Ernährung, Bayern.*
33. Didier Ortelli, Emmanuelle Cognard, Philippe Jan, Patrick Edder (2009). Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 2363–2374. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.03.006.
34. Cihat Özdemir, Salih Özdemir, Emel Oz, Fatih Oz (2019). Determination of

- organochlorine pesticide residues in pasteurized and sterilized milk using QuEChERS sample preparation followed by gas chromatography–mass spectrometry. *J Food Process Preserv.* 2019;43:e14173. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14173>
35. R. Perestrelo, P. Silva, P. Porto-Figueira, J.A.M. Pereira, C. Silva, S. Medina, J.S. Câmara (2019). QuEChERS - fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta.* <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>. Bastien Raccary, Philippe Loubet, Christophe Peres, Guido Sonnemann (2022). Life cycle assessment of sample preparation in analytical chemistry: a case study on SBSE and SPE techniques. *Advances in Sample Preparation* 1 (2022) 100009. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100009>
36. Tomasz Rejczak, Tomasz Tuzimski (2015). A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.*, 2015; 13: 980–1010. DOI: 10.1515/chem-2015-0109
37. Kathy Ridgway, Sam P.D. Lalljie, Roger M. Smith (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153 (2007) 36–53
38. RohmilchGütV (2021). Verordnung zur Förderung der Güte von Rohmilch. Rohmilchgüteverordnung vom 11. Januar 2021 (BGBl. I S. 47) (Rohmilchgüteverordnung – RohmilchGütV)
39. O. Shimelis, und J. Claus (2023). Reporter 34.1 Food and Beverage. Order: 800-325-3010 (U.S.) 814-359-3441 (Global)
40. Barbara Schwaiger, Jürgen König, Céline Lesueur (2017). Development and Validation of a Multi-class UHPLC-MS/MS Method for Determination of Antibiotic Residues in Dairy Products. *Food Analytical Methods* (2018) 11:1417–1434. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1101-1>
41. Jan-Michael Steils, Christian Baumgartner, Klaus Schöne, Maren Lang, Melina Kraus, Harald Thenmaier, John Cashman (2023). Single step fractionation of raw milk with FraMiTrACR® prior to detection of the residual contaminants chlorate and perchlorate. *Milk Science International* (76) 2023 P. 24-27. ISSN 2567-9538; <https://doi.org/10.48435/MSI.2023.4>.
42. Jan-Michael Steils, Maren Lang, Melina Kraus, Klaus Schöne, John Cashman and Christian Baumgartner (2024). A Novel Approach for Single-Step Analyte Fractionation of Raw Milk Prior to Antibiotic Residue Trace Analysis as an

- Alternative to QuEChERS-Based Extraction. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2024, 1–14. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsae022>
43. Rachel Townsend, Geertje van Keulen, Claire Desbrow, Amy Ruth Godfrey (2020). An investigation of the utility of QuEChERS for extracting acid, base, neutral and amphiphilic species from example environmental and clinical matrices. *Anal Sci Adv.* 2020;1:152–160. DOI: 10.1002/ansa.202000018.
44. VO EG Nr. 178/2002. Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit
45. VO (EG) Nr. 852/2004. Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene.
46. VO (EG) Nr. 882/2004. Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz.
47. VO (EU) 2017/625. Verordnung (EU) 2017/625 des europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel.
48. WO2021048427 (2021). Process for the manufacture of perchlorate depleted milk. https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021048427&_cid=P21-M15H6B-74802-1. Zuletzt zugegriffen am 16.09.202

IX. DANKSAGUNG

Danke zu sagen, heißt auch die richtigen Worte an die richtige Stelle zu setzen. Ein Talent, das mir bisweilen fehlt. Denn oft habe ich die gute Idee bereits fest in der Hand, sehe die Möglichkeiten und renne los zu vermeintlich großen Siegen. Daher versuche ich nun innezuhalten und die Rennbahn nochmal abzugehen.

Am Start, am Ende, an der Strecke. Immer da. Meine Familie. Viel zu oft nur Zuschauer und zu weit weg. Daher möchte ich Euch Danke sagen, dass Ihr immer da seid, wenn mir die Puste ausgeht und Ihr meine Misserfolge wie die größten Siege feiert.

In Liebe denke ich an Euch.

Meine Rennbahn ist oft turbulent. Wer hält mit, wer hält dagegen? Wer steht im Weg oder versteht den Weg? Nur als Team kann man gewinnen. Staffellauf braucht die Übergabe in die Hand. Ich hatte Glück im Rohstoff Milch mit mehr als einem Teammitglied. Daher bedanke ich mich bei Dr. Christian Baumgartner für die Unterstützung vom ersten Austausch bis hierher und hoffentlich in die Zukunft. Ich bedanke mich bei Dr. Markus Albrecht, der nicht nur die Idee begleitet hat, sondern Sie ins Leben getragen hat und Mentor dieser Arbeit ist. Ich bedanke mich bei Frau Lang und Frau Kraus und dem ganzen Milchprüfring Baden-Württemberg für die geleistete Arbeit, die Unterstützung und partnerschaftliche Zusammenarbeit.

Manchmal kommt man entscheidenden Kreuzungen nicht weiter. Es muss doch gehen. Man muss nur den Richtigen finden, der das kann. Wer weiß den Weg? Und plötzlich hat man eine Mailboxnachricht in schönstem Dialekt. Und dann eine Mannschaft bei sich, die seines gleichen sucht. Ich bedanke mich bei Harald Thenmaier, Klaus Schöne, Adam Green, Carmen Laake, John Cashman, Alexander Kaluza und der Sartorius AG für die gemeinsame Entwicklung und herausragende Zusammenarbeit, die hoffentlich noch lange anhält.

Zusätzlich frage ich mich, wo kam ich eigentlich her. Das Team Milch war meine Heimat, meine Lehrzeit in Rohmilch und Molke. Und das Unternehmen gab mir Freiraum für viele Ideen. Daher bedanke mich bei der HiPP Werk Georg Hipp OHG, meinem alten Team Milch, dem Agrarteam und dem QS-Team für die spannende Zeit, in der ich meine Ideen entwickeln konnte. Mein Dank geht auch an die Familie Hipp, die mir den Freiraum für meine Entwicklung gegeben hat.

Am Schluss eines meiner Läufe hat mir nun noch ein Helfer gefehlt. Mein Dank geht an Professor Märtlbauer, der mir diesen Etappensieg ermöglicht hat.