



Opvolging en evaluatie van opleidingen

Vak I : Gegevens in verband met de opleiding

Titel opleiding	CEN/TC 327 (Animal feeding stuffs – Methods of sampling and analysis: WG 1)					
Duur	6 september 2007, Brussel					
Organisator	Cenelec (gastorganisatie); NEN (secretariaat CEN/TC)					
Naam deelnemer	Vermeulen Rudi					
Dienst/labo (aankruisen)	DG labo	FLVVG	FLVVM	FLVVT	LFSAGx	LFSAL
	X					

Vak II : Informatie van Bestuur Laboratoria

(Vak voorbehouden aan administratie Bestuur Laboratorium)

Te ondernemen acties door Bestuur Laboratoria:

Informatie verspreiden aan :

Vak III : Evaluatie van de opleiding

Gelieve punten toe te kennen van 1 (onvoldoende) tot 5 (zeer goed)

	1	2	3	4	5
Beantwoord de opleiding aan uw verwachtingen ?					
Evaluatie van de inhoud.					
Evaluatie van de presentatie.					
Evaluatie van de algemene organisatie van de opleiding					
Opmerkingen	Het betreft hier geen feitelijke opleiding maar een dienstopdracht				



Vak IV : Programma of samenvatting van de opleiding

Afkortingen

AAS : atoom absorptie spectrometrie
AES : atoom emissie spectrometrie
ASE : Accelerated Solvent Extraction
CEMA : DG Sanco working group on feed analysis
GEN : European Committee for Standardisation
CRL : community reference laboratory
CV-AAS : cold vapour AAS
DON : Deoxynivalenol
ECD : electron capture detector
EPA : Environmental Protection Agency
FLVVG : Federaal Laboratorium voor de Voedselveiligheid - Gentbrugge
GC : gaschromatografie
GPC : gel permeation chromatography
HG-AAS : hydride generation AAS
HPLC : hoge druk vloeistofchromatografie
IAC : immuno affiniteits chromatografie
ICP : inductive coupled plasma
IRMM : institute for reference materials and measurements
ISO : international standardisation organisation
LOQ : limit of quantification
MRL : Maximum Residue Limit
MS : massaspectrometrie (detector)
NRL : Nationaal Referentie Laboratorium
OC : organochloorpesticiden
OTA : ochratoxine A
PCB : Polychlorinated Biphenyls
PTV : Programmable Temperature Vaporizing Injector
RIKILT (Nederlands onderzoeksinstituut voor voedselveiligheid)
RSD_{R-r} : relative standard deviation under repeatability (r) or reproducibility (R) conditions
UV : detectie met ultra violet licht
VDLUFA : Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
WG : werkgroep
WIV : Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid



Agenda

CEN/TC 327: De volgende thema's kwamen bij de technische werkgroep 1 aan bod

Dioxines en PCB's (Werkgroep [WG] 1)

1. PCB's en organochloorpesticiden (GC-ECD en GC-MS)
2. Dioxines en co-planaire PCB's (HR GC-MS)

Mycotoxinen (WG 1)

3. DON (HPLC-UV na *IAC clean-up*)
4. Ochratoxine A, Fumonisine B₁ en B₂, Trichothecenen HT2 en T2
5. Zearalenone (HPLC-fluorescentie na *IAC clean-up*)

Mineralen, zware metalen, sporenelementen (WG 1)

6. Mineralen, zware metalen en sporenelementen: (a) klassieke destructie gevolgd door ICP-AES, (b) microgolf-hogedrukontsluiting gevolgd door ICP-AES en (c) microgolf-hogedrukontsluiting gevolgd door AAS met grafietoven
7. Kwik, Selenium en totaal Arseen: microgolf-hogedrukontsluiting gevolgd door *cold vapour* (CV)AAS (voor Hg) en *hydride generation* (HG)AAS (Se, As)
8. Inorganisch Arseen

Andere contaminanten (WG 1)

9. Blauwzuur (HCN): na enzymatische vrijzetting, destillatie en HPLC-UV
10. Fluoride: na behandeling in mild zuur milieu de detectie van F⁻ met een specifieke elektrode

11. Mogelijk toekomstige aandachtspunten voor TC 327

Aanvullingen en wijzigingen in vergelijking met het vorige verslag zijn in het blauw aangegeven

Situering

CEN TC 327 staat in voor de standaardisatie van methoden voor staalname en analyse van voedermiddelen. Zowel chemische, biochemische, fysische en microscopische methoden komen in aanmerking voor standaardisatie.

Alhoewel TC 327 reeds sinds 1996 bestond, werd zijn werking aanzienlijk gestimuleerd doordat de Europese Commissie voor 9 projecten een financieel mandaat verleende (2002). Ook nu nog worden de activiteiten volledig gedreven door de financiële middelen vrijgemaakt door de Commissie. Enerzijds worden de activiteiten in het kader van de eerste mandaten afgewerkt. Alhoewel de Commissie in november 2005 besliste 17 nieuwe projecten principieel te willen ondersteunen, is het thans wachten op de formele toekenning van de financiële mandaten om de preliminaire werkitens om te zetten tot actieve werkitens.

Verslag

Working Group 1: Contaminants, Minerals and trace elements

WG 1 zal aan de plenaire TC 327 meeting voorstellen WG1 op te splitsen in twee subgroepen: WG 1.1 'Organic contaminants' en WG 1.2 'Heavy metals, trace elements and minerals'. Er wordt wel gevraagd de sessies niet in parallel te organiseren zodat geïnteresseerde experts vergaderingen van beide sub-WG's kunnen bijwonen. Jacob Dejongh en Jürgen Danier worden als voorzitter voorgedragen. Het item betreffende blauwzuur (HCN) zal door de WG organische contaminanten behandeld worden, wegens de gebruikte analysetechnieken en de herkomst van de contaminatie.



1. PCB's en organochloorpesticiden (CEN-WG 1, projectleider: Wim Traag, RIKILT)

De voorgestelde methoden moet het mogelijk maken organochloorpesticiden (11 residu's) en merker-PCB's te bepalen, na (1) extractie met ethylacetaat, (2) opzuivering met behulp van GPC én florisil, (3) scheiding en detectie met ofwel GC-ECD, ofwel GC-MS. GC-ECD en GC-MS procedures worden in afzonderlijke procedures beschreven. Nadat een eerste *collaborative trial* onbevredigende resultaten gaf, werd de methode nog aangepast (de interne standaard moet toegevoegd worden voor de extractie, de extractieduur werd verlengd, de GPC-opzuiveringsstap werd verplicht; voor de MS methode werd het gebruik van isotoop-gelabelde standaarden afgevoerd om de kostprijs voor de laboratoria te drukken).

Een nieuwe ringtest met 9 stalen werd uitgevoerd met voldoende participerende laboratoria om standaarden te ontwikkelen voor zowel de GC-MS methode (8 resultaten) als de GC-ECD methode (10 resultaten). In vergelijking met de vorige interlaboratorium test nam de precisie toe. De "fitnes for purpose" werd nagegaan door het berekenen van de Horrat-ratio op basis van de gewijzigde Horwitz. De precisie van de resultaten blijkt gemiddeld 91% te zijn voor de oliemonsters en gemiddeld 87% voor diervoeders.

Toch zijn er nog belangrijke commentaren:

(1) Redelijk hoge concentraties werden gebruikt in de interlaboratorium studie (Knobloch, DIN); (2) De commentaren die tijdens de vorige meeting gegeven zijn en waarover overeenstemming bereikt werd, zijn niet opgenomen in de nieuwe methoden (Knobloch, DIN; de extractie en staalopzuivering zijn verschillend tussen de beide methoden, alhoewel daartoe geen aanleiding is [een meer similaire methode zou toelaten de methoden als modules te gebruiken voor screening en confirmatie]; (3) de gebruikte formule voor het berekenen van de gewijzigde Horwitz komt niet overeen met de formule die in het geciteerde artikel gebruikt wordt (Vermeylen, NBN); (4) voor pesticidenanalyses bestaat een QA document dat thans herschreven is en dat geldt voor alle pesticidenanalyses, dus ook voor deze op diervoeders (Vermeylen, NBN; Vanderschee, waarnemer TC 275)

2. Dioxines en co-planaire PCB's (CEN-WG 1, projectleider: Wim Traag, RIKILT)

Dit nieuw *work item* valt onder het nieuwe mandaat, dat weliswaar reeds politiek, maar nog steeds niet financieel is goedgekeurd. In afwachting hiervan werden de werkzaamheden nog niet gestart. De basisprincipes van de procedure werden op deze meeting herhaald. De uiteindelijke norm zal modulair opgebouwd worden om een zo groot aantal laboratoria in de mogelijkheid te stellen aan de uiteindelijke *full-collaborative trial* deel te nemen (een rondvraag hieromtrent wordt eind 2007 georganiseerd). Isotoop-gelabelde standaarden zullen toegevoegd worden voor 29 moleculen (PCDD, PCDF) en mogelijk ook nog voor 6 merker PCB's. In lijn met de richtlijnen van het CRL zal een mengsel van toluen en een polair solvent gebruikt worden. Voor de staalopzuivering zal gekozen kunnen worden tussen de manuele methoden voorgesteld door EPA en VDLUFA en een geautomatiseerde procedure die sinds begin 2006 gebruikt bij RIKILT (ASE extractie, power-prep purification, turbovap concentratie en PTV large volume injector).



3. DON (CEN-WG 1, projectleider: Joerg Stroka, IRMM, CRL mycotoxines)

Dit project valt onder het nieuwe mandaat (waarvan het financiële luik [nog moet goedgekeurd worden](#)). Het IRMM heeft een multi-matrix methode ontwikkeld die, wegens zijn lage LOQ (< 150 ppb), zowel geschikt is voor feed als babyvoeding. De methode, die reeds door middel van een interlaboratorium ringtest werd gevalideerd, maakt gebruik van een IAC *clean-up* na extractie met water, terwijl voor de scheiding en kwantificatie een HPLC-UV configuratie gebruikt wordt. [Een werkdocument werd rondgestuurd en de leden van WG1 worden gevraagd voor 14 september hun commentaren door te sturen naar het secretariaat.](#)

4. Ochratoxine A (projectleider: Joerg Stroka, IRMM, CRL mycotoxines)

Dit project valt onder het nieuwe mandaat (waarvan het financiële luik [nog moet goedgekeurd worden](#)). Het IRMM heeft methode *in house* gevalideerd voor 45 matrices (IAC *clean-up* en HPLC fluorescentie) en wenst een ringtest te organiseren voor de interlaboratorium validatie. [Deze is gepland voor begin 2008, en de monsters zullen bestaan uit natuurlijk gecontamineerde mengsels van granen, soja en suikerbiet \(?\)](#).

Het IRMM heeft ook voor **fumonisinen** een methode ontwikkeld. [Het IRMM zoekt in samenwerking met een Italiaans en een Nederlands laboratorium \(Hans van Rijn; RIKILT\) naar een analytische oplossing voor de lage terugvindingspercentages die opgetekend worden](#). In de wetenschappelijke literatuur werd melding gemaakt van 'verborgen' fumonisinen die ontstaan door de condensatie van het mycotoxine met carboxylzuurgroepen van aminozuren. Deze condensatiereactie zou ook de verklaring zijn van de lage terugvindingspercentages (40 – 50%) die opgetekend werden bij bepaalde studies. De problemen werden vastgesteld wanneer na toevoegen van een fumonisineoplossing aan samengestelde diervoeders of babyvoeding het solvent werd verdampt. Voor andere matrices (maïs), of wanneer het solvent niet werd verdampt, werden 'normale' terugvindingspercentages bekomen. [Als er een oplossing wordt gevonden dan kan van begin november 2007 af een *collaborative trial* georganiseerd worden. Reeds een 40-tal laboratoria hebben zich 'voor'-ingeschreven.](#)

Voor **Trichothecenen HT2 en T2** heeft het IRMM een ringtest georganiseerd, en de [resultaten worden thans verwerkt](#). De ringtest beperkte zich tot een GC-MS methode, waardoor het CODA dat eerder interesse getoond had om met een LC-MS methode te participeren, dan toch niet kan deelnemen. [De plannen voor een ringtest met LC-MS methoden zijn op de lange baan geschoven.](#)

5. Zearalenone (projectleider: Joerg Stroka, IRMM, CRL mycotoxines)

Dit project valt onder het nieuwe mandaat (waarvan het financiële luik [nog moet goedgekeurd worden](#)). Er zijn twee methoden ter beschikking die als uitgangspunt voor de te ontwikkelen standaard kunnen dienen. Een eerste methode is beschreven in ISO/DIS 17372 en omvat een extractie met acetonitril/water, opzuivering met IAC en fluorescentie-detectie na *reversed phase* HPLC. De tweede methode, door het IRMM ontwikkeld, maakt eveneens gebruik van een HPLC-fluorescentie systeem, maar omvat



een extractie met methanol/water en een eenvoudigere *IAC clean-up*.

Beide methoden werden gevalideerd door middel van een interlaboratorium ringtest. Aan de ISO-ringtest namen geen Belgische laboratoria deel, terwijl bij de IRMM ringtest onder andere LABUG, SGS en WIV participeerden. De IRMM methode werd zowel gevalideerd voor babyvoeding (*recovery study* bij 20 en 30 µg/kg) als diervoeders (*recovery study* bij 100 en 150 µg/kg). De ISO methode werd uitsluitend op diervoeders gevalideerd (*recovery study* bij 100 µg/kg).

Na stemming werd besloten de IRMM methode als basis voor de standaard te gebruiken. Commentaren op het werkdokument kunnen door WG1 leden tot 14 september naar het NEN-secretariaat gestuurd worden.

6. Mineralen, zware metalen en sporenelementen: (a) klassieke destructie gevolgd door ICP-AES, (b) microgolf-hogedrukontsluiting gevolgd door ICP-AES en (c) microgolf-hogedrukontsluiting gevolgd door AAS met grafietoven (projectleider: Inge Van Hautegehem, FAVV)

Deze projecten vallen onder de financiële mandaten die de Commissie in 2002 toegekend heeft. De ringtesten ter validatie van de methoden zijn ondertussen dan ook uitgevoerd en de resultaten ervan verwerkt in (a) een *draft-standard* (prEN15510 'Animal feeding stuffs – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum, arsenic, lead and cadmium by ICP-AES'), (b) een *draft-technische specificatie* (pr CEN/TS15621 'Animal feeding stuffs - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese, cobalt and molybdenum after pressure digestion by ICP-AES'), (c) een *draft-standard* (prEN 15550 'Animal feeding stuffs - Determination of cadmium and lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) after pressure digestion'). De documenten (a) en (b) zijn formeel goedgekeurd door de lidstaten, en hun publicatie is in voorbereiding.

Tijdens de vorige CEN TC 327 meeting vermeldde Jürgen Danier dat er interesse vanuit Duitsland is voor de *draft-technische specificatie* (document b), waardoor, mits organisatie van een nieuwe ringtest de technische specificatie zou kunnen opgewaard worden tot een norm. Nadat 32 laboratoria aangegeven hebben dat ze aan de ringtest willen deelnemen, heeft Inge Van Hautegehem 11 monsters aangemaakt. Jürgen Danier heeft de homogeniteit van deze monsters nagegaan, en na verificatie van de resultaten kan de ringtest georganiseerd worden.

De uitnodiging voor een interlaboratorium ringtest voor de opwaardering van prCEN/TS 15621 (ICP-AES met microgolfontsluiting) werd verspreid onder de erkende laboratoria. Positieve reactie, via het FAVV hoofdbestuur, kwam van ondermeer SGS-Belgium, LOVAP, Institut Ernest Malvoz, ERC.

7. Kwik, Selenium en totaal Arseen (projectleider: Jürgen Danier, Technischen Universität München)

In het kader van de nieuwe mandaten van de Commissie werd door de projectleider voor



elk van de drie elementen een draft-methode uitgewerkt op basis van een TC 275 template (prEN 14627). Bij de drie methoden wordt voor eenzelfde microgolf-hogedrukontsluiting gekozen. Voor Hg wordt *cold vapour* (CV)AAS als detectiemethode voorgesteld, terwijl voor Se en As tijdens de vorige CEN meeting *hydride generation* (HG)AAS geprefereerd wordt.

Ook werd opgemerkt dat met microgolfontsluiting temperaturen van typisch 260 °C bereikt worden, terwijl voor de adequate destructie van bepaalde organische arseenverbindingen (As-betaïne) 320 °C noodzakelijk is. Hierdoor zou er een probleem zijn met de scope van de methode ("totaal As"). Dit probleem zal voorgelegd worden aan de plenaire CEN TC 327 meeting, en zo mogelijk Frans Verstraete (DG SANCO). Wellicht zal besloten worden om voor As geen HG-AAS toe te passen maar ICP-MS (voorafgegaan door microgolfontsluiting). Ook voor Se, kunnen er problemen zijn met de HG-AAS techniek wanneer de onderzochte voeders Cu bevatten (delegatie Ierland): Cu leidt tot een zwakker Se-sigitaal (wat eventueel opgelost kan worden door verdunnen, of door toevoegen van fenantroleen). Het blind toepassen van HG-AAS, zonder voorafgaand de concentratie van Cu te verifiëren kan dus voor foutieve resultaten lijden.

8. Inorganisch Arseen (projectleider: Jens Sloth, Danish Institute for Food and Veterinary Research)

De bedoeling van dit project is de som van het inorganisch As te kunnen detecteren. De LOQ van de te ontwikkelen methode moet kleiner zijn dan 2 mg/kg, de strengste norm voor totaal As.

Het principe van de voorgestelde methode is dat As (III) geoxideerd wordt tot As (V) tijdens een alkalische hydrolyse van de matrix.¹ Anionen-uitwisselingschromatografie zal worden gebruikt om As (V) te scheiden. Naar aanleiding van de resultaten van een enquête bij geïnteresseerde laboratoria vraagt CEN TC 327 aan de projectleider om twee methoden uit te werken. De eerste methode, die zou moeten uitmonden in een Europese Norm, zal As (V) door middel van SPE concentreren, waarna het vervolgens door middel van AAS gekwantificeerd zal worden. Een tweede methode, die zou moeten uitmonden in een Technische Specificatie, zal gebaseerd zijn op tandem HPLC-ICP/MS.

De projectleider heeft laten weten dat het financiële budget niet zal toelaten de beide pistes te bewandelen. SPE-AAS zal dus tot een standaard worden uitgewerkt. Bij de *in-house* validatie zal HPLC-ICP/MS door de projectleider wel als referentiemethode gebruikt worden.

9. Blauwzuur (projectleider: Maria Baltussen, RIKILT)

Klassiek wordt blauwzuur (HCN) bepaald door het mengen van het te onderzoeken veevoeder met een natuurlijke drager van beta-glucosidase (*i.e.* amandelen). Na splitsen van het cyanoglycoside wordt blauwzuur vrijgezet. Kwantificering gebeurt na destillatie in een overmaat Ag^+ -oplossing, precipitatie van $AgCN$ en terugtitratie van het overblijvende Ag^+ (Richtlijn 71/250/EG). Gebleken is dat thiocynaat (SCN^-) dat ook aanwezig kan zijn in diervoeders, kan zorgen voor vals-positieve resultaten. In de nieuwe Verordening die de oude Richtlijnen zal vervangen, wordt echter geen specifieke methode meer voorzien

¹ Sloth J., Larsen E.H., Julshamn K. *J. Agric Food Chem.* 2005, 53, 6011.



voor de bepaling van blauwzuur, waardoor er ruimte komt voor het implementeren van meer moderne methoden. In het kader van dit nieuwe, gemandateerde project wordt een alternatieve methode uitgewerkt die moet leiden tot een gevoeliger en robuustere methode. **De extractie wordt uitgevoerd met een fosforzuuroplossing, waarmee hogere rendementen bekomen worden dan met een waterig extract.** Door gebruik te maken van commercieel beta-glucosidase, kan na destillatie en derivatisatie het **door reactie van HCN met Taurine en NDA** gevormde isoindol-derivaat door HPLC-fluorescentie gekwantificeerd worden met een LOQ van 2 mg/kg voor lijnzaad. **Thiocyanaat kan bij deze analysetechniek geen vals-positieve resultaten opleveren. Wel is het belangrijk om het reactieproduct na reactie te koelen, omdat anders een degradatie van de gevormde chromofore verbinding optreedt.**

Bij de in house validatie bleek RSD_r : 7%, terwijl RSD_R : 24%. Er is dus nog onvoldoende controle op lange termijn effecten. De enzymatische activiteit van het toegevoegde wijze werd tot nog toe niet nauwkeurig gecontroleerd, laat staan gedoseerd.

10. Fluoride (projectleider: Ignacio Duch Martinez, Tolsa Group)

Ook dit project valt onder het nieuwe EC mandaat. Het principe van de methode bestaat in de bepaling van het fluoride ion met een selectieve elektrode na behandeling van het staal met 1 M HCl. Als dusdanig is de procedure in lijn met Richtlijn 2005/87/EG. De *full collaborative trial*, met als matrices ondermeer vermiculiet en marine crustaceae (kriel) (beiden met hoge F^- concentratie) en voedermiddelen voor melkkoeien (lage F^- concentratie), **werd georganiseerd. Van de 18 ingeschreven laboratoria waren er twee Belgische (FLVVG en Tessenderlo Chemie).** In totaal 9 verschillende materialen in de validatiestudie meegenomen (3 complete feeds; 3 complementary feeding stuffs; 3 minerals). Tot nog toe hebben 14/18 laboratoria resultaten ingestuurd, en schijnbaar rapporteert een viertal laboratoria systematisch hogere waarden dan de andere 10.

Er werd opgemerkt door Lars Ostergard (Deens Normalisatie-instituut) dat het belangrijk was de pH te meten na extractie (als $pH < 2$ dan OK, anders minder monster nemen).

11. Mogelijk toekomstige aandachtspunten voor TC 327

Het CEN TC 327 secretariaat heeft een rondvraag rondgestuurd naar de leden. De bedoeling is voor de door de plenaire GEN TC 327 meeting gekozen items een (financieel) mandaat te krijgen van de Commissie.

- **Werkgroep Contaminanten, zware metalen en sporenelementen**

- **T2 en HT2 mycotoxinen** (Jörg Stroka)

een ringtest ter validatie van de door het IRMM ontwikkelde methode is gepland

- **ergot alkaloiden**

er komt een aanbeveling van de Commissie om de concentraties van 6 ergot alkaloiden te volgen (monitoring) in granen (feed and food). Op de CEMA meeting van 7/8 september 2006 werd aan de experts gevraagd een compilatie van de bestaande methoden hiervoor op te maken.

- **multi-methode voor mycotoxines**

Verwacht wordt dat LC-MS procedures in aanmerking kunnen komen voor standaardisatie

- **multimethode (GC-MS and LC-MS) voor pesticidenresidu's in veevoeder**

Volgens Verordening 396/2005 moet ook veevoerders op pesticidenresidu's worden



onderzocht. Stelselmatig zullen voor diverse residu's ook MRLs worden opgelegd. Na een overgangsperiode worden *default* MRLs van kracht voor die residu's waarvoor er nog niet eerder werden vastgelegd. Een Duitse studie waarbij een GC-MS/MS methode werd gebruikt is ondertussen afgerond (Jürgen Danier, Jens Schönherr).

- een **multi-element ICP-MS methode** die voorafgegaan wordt door microgolfontsluiting
- **inorganisch As met HPLC-ICP/MS**

Vak V : Praktische toepassingsmogelijkheden