



### 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&3 + Ad hoc WG Sample Preparation + Plenary TC meeting)					
Duur	29-30 januari 2007, Berlijn (Duitsland)					
Organisator	DIN (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 Laboratoria)

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

AAFCO : Association of American Feed Control Officials  
AAS : atoom absorptie spectrometrie  
AES : atoom emissie spectrometrie  
AOAC : Association of Official Agricultural Chemists  
GEMA : DG Sanco working group on feed analysis  
CEN : European Committee for Standardisation  
CRL : community reference laboratory  
CV-AAS : cold vapour AAS  
DGCCRF : Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes  
DMBA : dimethylbenzaldehyde  
DON : Deoxynivalenol  
ECD : electron capture detector  
EPA : Environmental Protection Agency  
FEFANA : Europese Federatie van Producenten van Voedertoevoegingen  
FLVVG : Federaal Laboratorium voor de Voedselveiligheid - Gentbrugge  
FLVVT : Federaal Laboratorium voor de Voedselveiligheid - Tervuren  
GC : gaschromatografie  
GGO: genetisch gewijzigde organismen  
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  
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry  
LFSAL : Laboratoire Fédéral pour la Sécurité alimentaire - Liège  
LOD : limit of detection  
LOQ : limit of quantification  
MRL : Maximum Residue Limit  
MS : massaspectrometrie (detector)  
NRL : Nationaal Referentie Laboratorium  
OC : organochloorpesticiden  
OES : optische emissie spectroscopie  
OTA : ochratoxine A  
PCB : Polychlorinated Biphenyls  
PTV : Programmable Temperature Vaporizing Injector  
ASE : Accelerated Solvent Extraction  
RIKILT (Nederlands onderzoeksinstituut voor voedselveiligheid)  
RSD<sub>R</sub> : relative standard deviation under reproducibility conditions  
UV : detectie met ultra violet licht  
VDLUFV : Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten  
WG : werkgroep  
WIV : Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid



## Agenda

CEN/TC 327: De volgende thema's kwamen bij de technische werkgroepen en de aansluitende plenaire vergadering aan bod

1. Staalvoorbereiding van laboratoriumstalen

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

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

Mycotoxinen (WG 1)

4. Aflatoxin B<sub>1</sub> (HPLC-fluorescentie met *post-column* derivatisatie [Br<sub>2</sub>] na *IAC clean-up*)
5. DON (HPLC-UV na *IAC clean-up*)
6. Ochratoxine A, Fumonisine B<sub>1</sub> en B<sub>2</sub>, Trichothecenen HT2 en T2
7. Zearalenone (HPLC-fluorescentie na *IAC clean-up*)

Mineralen, zware metalen, sporenelementen (WG 1)

8. 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
9. Kwik, Selenium en totaal Arseen: microgolf-hogedrukontsluiting gevolgd door *cold vapour* (CV)AAS (voor Hg) en *hydride generation* (HG)AAS (Se, As)
10. Inorganisch Arseen

Andere contaminanten (WG 1)

11. Blauwzuur (HCN): na enzymatische vrijzetting, destillatie en HPLC-UV
12. Fluoride: na behandeling in mild zuur milieu de detectie van F<sup>-</sup> met een specifieke elektrode

Voederadditieven en diergeneesmiddelen (WG 3)

13. Phytase (colorimetrische bepaling van enzymactiviteit)
14. Maduramicin (HPLC-UV met *post-column* derivatisatie met vanilline)
15. Nicarbazine (HPLC-UV detectie van dinitrocarbanilide)
16. Decoquinate (HPLC-fluorescentie)
17. Semduramicin (HPLC-UV met *post-column* derivatisatie [vanilline of DMBA])

18. Mogelijk toekomstige aandachtspunten voor TC 327

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

## Situering

GEN 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 werkitemen om te zetten tot actieve werkitemen.**



## Verslag

### Ad hoc Working Group Sample Preparation

1. **Staalvoorbereiding van laboratoriumstalen** (CEN/ISO-*Ad Hoc WG*, projectleider: Jürgen Danier, Technische Universität München)

De projectleider stelde een eerste kladversie voor een ontwerp Norm die de verantwoordelijken voor de staalvoorbereiding in de laboratoria een leidraad moet bieden bij de staalvoorbereiding voor veevoederanalyses. De voorgestelde tekst is gebaseerd op een AAFCO publicatie (Guidelines for preparing laboratory samples), de ISO standaard 6498:1998 (Animal feeding stuffs- Preparation of test samples) en het VDLUFA methodenboek (Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln, 1976)

In de inleidende paragrafen wordt uitgebreid gewezen op de grote fouten die kunnen optreden door onoordeelkundige massareductie (*i.e.* subsampling) en wordt erop gewezen dat voorafgaande reductie van de partikelgrootte de foutenmarge sterk kan beperken. Na de eerder theoretische inleiding, wordt per productgroep een stroomdiagram voorgesteld waarin wordt aangegeven hoe de staalvoorbereiding dient te gebeuren rekening houdend met de analyten (thermische stabiliteit, lichtgevoeligheid, volatiliteit, ...).

Na de meeting, communiceerden IVH en RV een lijst met voornamelijk editoriale opmerkingen die in rekening zullen gebracht worden vooraleer een tweede versie voor commentaar onder de experts van de *Ad Hoc* Werkgroep zal verdeeld worden.

[RV: andere belangwekkende teksten in deze context: CEN/TC 380 (cereals) –WG 5 is bezig met het ontwikkelen van een norm omtrent sampling]; voor oliehoudende zaden bestaat een norm voor staalvoorbereiding; de invloed van sub-sampling op de spreiding/onzekerheid van het analytisch resultaat van mycotoxinebepalingen zijn beschreven in talrijke papers [bron: Jeroen Vancutsem].

### Working Group 1: Minerals and Contaminants / **Contaminants, Minerals and trace elements**

Er wordt afgesproken de naam van de WG te wijzigen in "Contaminants, Minerals and trace elements". Gezien het steeds stijgend aantal deelnemers stelt de voorzitter a.i. Jacob de Jong voor om de WG op te splitsen in een eerste vleugel die zich zou bezighouden met organische contaminanten, en een tweede die zich verdiept in de inorganische contaminanten. Volgende plenaire CEN TC 327 zal hierover een beslissing genomen worden.

2. **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 de Belgische vertegenwoordiging opmerkte dat de Europese regelgeving PCB 118 als een co-planaire PCB beschouwd, werd besloten dit congenere uit de scope van de methode te halen (resterende PCB's: PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153,



PCB 180).

De methode werd reeds in 2006 getoetst met een *collaborative trial*, maar deze was slecht geconcepieerd (het aantal matrix-concentratie niveaus voldeed niet aan de IUPAC richtlijnen). Bovendien was het aantal deelnemers te beperkt om tot een Europese standaard te komen (voor GC-MS; minstens 8 deelnemende laboratoria noodzakelijk), terwijl voor de GC-ECD methode de oorspronkelijke extractie- en opzuiveringsprocedure onvoldoende was, hetgeen resulteerde in een hoog percentage vals-positieven. Daarom zal de projectleider een nieuwe *collaborative trial* organiseren (met een verbeterde methode: extractieduur wordt verlengd, de GPC-opzuiveringsstap wordt verplicht). Hieromtrent werd ook aan de Belgische vertegenwoordiger gevraagd om enige Belgische laboratoria te mobiliseren. Naast FLVVT en het WIV heeft RV nog 13 andere erkende laboratoria de uitnodiging van de projectleider overgemaakt. Voor de laboratoria die thans de oude Beltest-methode gebruiken, is er echter geen objectiveerbare reden om deel te nemen (de staalvoorbereiding van deze nieuwe methode is omslachtiger en de solventverbruik groter, bron: Vincent Hanot [WIV]).

### 3. 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 (wellicht is dit in april 2007 geregeld). In afwachting hiervan werden de werkzaamheden nog niet gestart. De basisprincipes van de procedure werden op deze meeting herhaald (door het opnieuw tonen van de presentatie die op de vorige CEN TC 327 werd voorgesteld).

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. Daarom zal voor wat betreft de staalopzuivering 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).

Asuka Horigome (Fertiliser and Inspection Services, Japan) stelde de officiële Japanse methode voor de bepaling van dioxines voor. Deze analyse duurt maar liefst 4 dagen. Voor plantaardige matrices worden (1) een soxhlet extractie en een destructie met zwavelzuur gevolgd door (2) een opzuivering over kolommetjes van silica-gel (*multi layer*) en actieve kool/silica-gel (*reversed column*). (3) De scheiding en kwantificatie gebeurt vervolgens met GC-MS. Voor matrices van dierlijke oorsprong wordt de extractie (1) uitgevoerd met hexaan, na decompositie met alkalisch (10 M KOH) ethanol. Recentelijk werd de methode aangepast, waardoor ze in een halve dag kan uitgevoerd worden, en met 15 ml hexachloormethaan per staal.

### 4. Aflatoxine B<sub>1</sub> (CEN-WG 1, projectleider: Joerg Stroka, IRMM, CRL mycotoxines)

Aflatoxine B<sub>1</sub> wordt bepaald na extractie met aceton/water en IAC *clean-up*. Scheiding en detectie gebeuren met *reversed phase* HPLC gevolgd door een *post-column* derivatisatie met Br<sub>2</sub> en fluorescentie detectie.

De methode is aanvaard door ISO en CEN, en wordt nu als EN-ISO 17375 gecommmercialiseerd. De vraag van CEN/TC 327 om de Horat waarden te herrekenen volgens de nieuwe Thompson vergelijking (in plaats van de klassieke Horwitz



vergelijking) kwam te laat, en zal geïmplementeerd worden bij de eerstvolgende herziening van de norm.

Verordening 882/2004 stelt dat bij officiële controles door de Europese wetgeving opgelegde methoden moeten gebruikt worden, en bij ontstentenis hiervan, de methoden die in de nationale wetgeving zijn voorzien of CEN methoden die door middel van interlaboratorium studies gevalideerd zijn. Op dit moment legt Richtlijn 70/373/EEG, die via het KB van 8 november 1998 in de nationale wetgeving is ingeschreven, de analytische methode vast voor Aflatoxine B<sub>1</sub> (extractie met chloroform, *clean-up* met flurosil, HPLC fluorescentie na *post-column* derivatisatie met I<sub>2</sub>). Op dit moment is echter door SCOFCAH reeds een plaatsvervangende Verordening uitgewerkt, die na formele goedkeuring Richtlijn 76/371/EG zal intrekken. Dit zal tot gevolg hebben dat, volgens de strikte lezing van Verordening 882/2004 en volgens de engagementen van de Belgische overheden in CEN, de laboratoria verplicht zijn EN-ISO 17375 (extractie met aceton/water, *clean-up* met IAC, HPLC fluorescentie na *post-column* derivatisatie met Br<sub>2</sub>). toe te passen.

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

Dit project valt onder het nieuwe mandaat (waarvan het financiële luik wellicht in april wordt goedgekeurd). 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. Voor het opstellen van het eerste werkdocument is het wachten op CEN/TC 275 WG5 waarin 3 compatibele methoden voor de bepaling van DON in graan-gebaseerde levensmiddelen, inclusief babyvoeding, zullen samengevoegd worden.

#### 6. **Ochratoxine A** (projectleider: Joerg Stroka, IRMM, CRL mycotoxines)

Dit project valt onder het nieuwe mandaat (waarvan het financiële luik wellicht in april 2007 goedgekeurd wordt). Het IRMM heeft methode *in house* gevalideerd voor 45 matrices (IAC *clean-up* en HPLC fluorescentie) en wenst een ringtest te organiseren voor de inter-laboratorium validatie. Wellicht komt in juni 20 kg natuurlijk gecontamineerd materiaal vrij, waarna de uitnodiging voor de inter-laboratorium ringtest zal rondgestuurd worden.

Het IRMM heeft ook voor **fumonisin** een methode ontwikkeld. Vooraleer over te gaan tot een interlaboratorium ringtest stelt zich echter de fundamentele vraag welke vorm van deze mycotoxines opgespoord dienen te 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.



Ook voor **Trichothecenen HT2 en T2** wenst het IRMM een ringtest organiseren. De ringtest beperkt 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.

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

Dit project valt onder het nieuwe mandaat (waarvan het financiële luik wellicht in april wordt goedgekeurd). 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).

De LOQ van de IRMM was < 10 µg/kg (i.e. laagste door ringtest gevalideerde concentratie in natuurlijk gecontamineerde babyvoeding), terwijl de ISO methode een LOQ geeft van 30 µg/kg (i.e. *LOQ in single-lab validation study on feed*). Gelet op de actielimieten die gehanteerd worden in Duitsland voor biggen(of varkens-)voeders (50 µg/kg) zou de ISO methode niet voldoende gevoelig zijn. (RV: De Europese aanbevolen maxima opgenomen in Aanbeveling 2006/576/EG zijn gedifferentieerd naar gelang het gevoederde species, maar de laagste maximale grenswaarde is 100 µg/kg).

Beide methoden geven, wanneer ze niet gecorrigeerd worden voor *recovery*, een soortgelijke precisie. De *recovery* was echter lager voor de IRMM methode (IRMM 91% [baby food] 75% [feed] vs. ISO: 94-113% [feed]). Bij de CEN werkgroep stelde men zich vragen bij deze superieure resultaten van de ISO methode.

- In de ISO methode wordt geëist dat *recovery* > 85%, en werden op basis van een preliminaire test slechts 13 van de 20 geïnteresseerde laboratoria toegelaten tot de interlaboratorium validatiestudie, waardoor resultaten misschien artificieel opgekrikt werden. Volgens Harold Campell, projectcoördinator bij de ISO studie, werden laboratoria echter niet uitsluitend geweerd op basis van lage *recoveries*.

- Joerg Stroka herhaalde dat het gebruik van acetonitril in aanwezigheid van bv. suikers aanleiding geeft tot fasescheiding waardoor de *recoveries* artificieel hoog worden.

Op de volgende vergadering van WG1 wordt beslist welke methode tot CEN standaard uitgewerkt wordt.

#### 8. 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 Hauteghem, 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 klaar en worden in de loop van februari en maart naar de CEN leden rondgestuurd ter stemming (*formal vote*). Voor document (c) werden de bemerkingen, die tijdens de formele commentaarronde werden geformuleerd, besproken samen met enkele aanvullende commentaren van het leescomité. Na incorporatie van deze bemerkingen zal de tekst ook ter stemming worden rondgestuurd door CEN.

Jürgen Danier (namens Jens Schönherr) vermeldt 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. Er wordt besloten een uitnodiging voor een ringtest rond te sturen. Indien er voldoende interesse is, zal de ringtest in het najaar van 2007 georganiseerd worden.

#### **9. 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-hogedrukafsluiting gekozen. Voor Hg wordt *cold vapour* (CV)AAS als detectiemethode voorgesteld, terwijl voor Se en As *hydride generation* (HG)AAS geprefereerd wordt.

Vastgesteld werd dat als gevolg van de voorgestelde verdunningsstappen de LOQ van de methoden niet steeds voldoende laag waren in vergelijking met de specificaties (laagste MRL's voor As en Hg: 2 mg/kg, respectievelijk 0,1 mg/kg; natuurlijk aanwezig Se: 0,3 mg/kg; Se als toevoegingsmiddel: 1-50 mg/kg)

De projectleider zal de verdunningen aanpassen zodanig dat  $LOQ \times 5 < MRL$ .

Ook werd opgemerkt dat met microgolfafsluiting 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"). De projectleider vraagt zich af of het, net als voor Pb en Cd, niet mogelijk zou zijn in de Europese regelgeving de extractieprocedure voor te schrijven (zonder melding te maken van 'totaal' of 'inorganisch' As). Hij stelt bijgevolg ook voor om de projecten voor (a) de bepaling van As met HG-AAS en (b) de bepaling van inorganisch As op elkaar af te stemmen.

#### **10. 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.<sup>1</sup> 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.](#)

#### 11. Blauwzuur (projectleider: [Maria Baltussen](#), RIKILT)

[Maria Baltussen vervangt Dion Luykx als projectleider.](#)

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 en terugtitratie (Richtlijn 71/250/EG). In de nieuwe Verordening die de oude Richtlijnen zal vervangen, wordt echter geen specifieke methode meer voorzien 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. Door gebruik te maken van commercieel beta-glucosidase, kan na destillatie en derivatisatie het gevormde isoindol-derivaat door HPLC-fluorescentie gekwantificeerd worden met een LOQ van 2 mg/kg voor lijnzaad.

[Verdere in-house validatie van de methode op moeilijke matrices zoals melk-vervangers is bezig, en een voorbereidende ringtest wordt voorzien voor de lente 2007.](#)

#### 12. Fluoride (projectleider: [Ignacio Duch Martinez](#), Tolsa Group)

[Ignacio Duch Martinez vervangt Paco De Juan als projectleider.](#) 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.](#)

[Er wordt besloten geen pretrial te organiseren.](#) De *full collaborative trial*, met als matrices ondermeer vermiculiet en marine crustaceae (kril) (beiden met hoge F<sup>-</sup> concentratie) en voedermiddelen voor melkkoeien (lage F<sup>-</sup> concentratie), wordt voorzien voor [de zomer van 2007. In totaal zullen 9 verschillende materialen deel uitmaken van de ringtest, waarvoor nog een uitnodiging zal rondgestuurd worden door het NEN-secretariaat.](#)

#### 13. Phytase (projectleider: Christophe Von Holst, IRMM, CRL on feed additives)

In de voorgestelde methode wordt de phytase-activiteit gemeten bij pH=5,5 door de

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



vrijzetting van fosfaat uit phytaat colorimetrisch te doseren. De methode is ondertussen door een ringteststudie gevalideerd, maar CEN/TC 327 wacht met het uitsturen als *draft European Standard* totdat het financiële mandaat voor het project is goedgekeurd door de Commissie. [Ondertussen rees een nieuw probleem omdat SIGMA de verkoop van de benodigde substraten stopte. Gérard Berthin \(FEFANA\), die samen met Christophe Von Holst het project leidt, zal hierover contact opnemen met SIGMA.](#)

#### 14. Maduramicin (projectleider: Tine Zuidema, RIKILT)

Deze methode beoogt het kwantificeren van maduramicin in diervoeders (typisch 5 mg/kg) en voormengsels (500 mg/kg). In een methanol extract, bekomen door extractie bij 50 °C, wordt maduramicin bepaald met HPLC-UV na *post-column* derivatisatie met vanilline. De methode werd in 2002 gevalideerd door middel van een interlaboratorium ringtest (LOQ: 2 mg/kg). Een eerste werkdocument werd reeds eerder binnen TC 327/WG3 gecirculeerd.

[De staat van het project was onveranderd gebleven in vergelijking met de vorige CEN/TC meeting. Na goedkeuring van het financiële mandaat door de Commissie zullen de activiteiten hernomen worden.](#)

#### 15. Nicarbazine (projectleider: Tine Zuidema, RIKILT)

Deze methode beoogt het bepalen van nicarbazine in diervoeders (.....) en voormengsels (max. 25 g/kg). Nicarbazine wordt met een acetronitrille/methanol mengsel bij 50 °C geëxtraheerd. Kwantificering van het gevormde dinitrocarbanilide gebeurt met HPLC-UV (LOQ: 20 mg/kg). Bij de interlaboratorium validatiestudie, uitgevoerd in 2000, werd vertrokken van 2,5 g staal. Een eerste werkdocument met de methode werd reeds binnen TC 327/WG3 rondgestuurd. De Duitse experts waren toen van oordeel dat het staalvolume zou moeten opgedreven worden om eventuele inhomogeniteiten op te vangen. Dit zou echter betekenen dat een nieuwe ringtest dient georganiseerd te worden.

[De staat van het project is onveranderd gebleven in vergelijking met de vorige CEN/TC meeting. Nadat de Commissie het financiële mandaat voor dit project goedgekeurd heeft, worden de debatten heropend.](#)

#### 16. Decoquinat (projectleider: Christophe Genouel, SCL [fusie van douane-laboratoria en het DGCCRF])

Dit project, waarvoor een financieel mandaat aan de Commissie is gevraagd, beoogt het bepalen van decoquinat in kippenvoerders (typisch 20-40 mg/kg) en voederadditieven (e.g. deccox: 60 g/kg). De projectleider stelde een document voor waarin extractie plaatsvindt met een methanol/water mengsel waaraan CaCl<sub>2</sub> wordt toegevoegd. Kwantificering gebeurt met *reversed phase* HPLC met fluorescentie detectie. De LOQ van de methode is 0,5-1,0 mg/kg omdat de bivalente ionen (Ca<sup>2+</sup> en Mg<sup>2+</sup>) in het extractiesolvent en de HPLC mobiele fase zorgen voor een tienvoudige versterking van het signaal. Bevestiging van de identificatie wordt bekomen door een alternatieve excitatie-golflengte te kiezen.

[In house validatie van de methode is volledig afgerond en gaf bevredigende resultaten](#)



voor kippen-, varkens-, en veevoerders (bij 9 en 30 mg/kg: recovery 81-107%,  $RSD_R$  4-5%), terwijl voor melkvervangers de *within-laboratory* reproduceerbaarheid groter was (7-10%), tenzij de extractie in een ultrasoon bad gebeurde ( $RSD_R$  3-6%). De robuustheid van de methode werd getest door enerzijds verscheidene parameters te veranderen in de methode en anderzijds voor een groot aantal onderscheiden voederstalen de mogelijke matrix-interferenties na te gaan. Er werden geen interferenties aangetroffen, terwijl de methode ook robuust bleek ten opzichte van geringe afwijkingen van de analyseprotocol. CEN TC 327 zal als eerste stap in de interlaboratorium validatie een *pretrial* opzetten. De full collaborative trial is gepland voor het najaar 2007.

Ook bij het AOAC staat de standaardisatie van een methode voor de bepaling van decoquinate op het programma. Als startdocument werd een Canadese methode gebruikt die grotendeels equivalent is met de methode voorgesteld door Christophe Genouel. Amplificatie van het signaal wordt echter bekomen door het toevoegen van  $MgSO_4$ . Volgens de ervaring van de projectleider leidt kristallisatie van dit zout tot overdruk in het HPLC systeem, waardoor een speciale spoelprocedure moet voorzien worden. AOAC voert reeds op dit moment de interlaboratorium validatiestudie uit.

Misschien kan wel nog samenwerking met het AOAC gezocht worden wanneer later (2009) een ISO methode zal opgemaakt worden (Christophe Genouel)

#### 17. Semduramicin (projectleider: Gonzalez de la Huebra; IRMM, CRL on feed additives)

Dit project valt onder het nieuwe, nog goed te keuren, financiële mandaat. Ursula Vincent (IRMM) schetst het gebruik van semduramicin en de doelstelling van het project. Semduramicin wordt onder de merknaam Aviax 5% (51 g/kg actief bestanddeel) gecommmercialiseerd door Phibrio. Zijn gebruik is toegelaten in het voeder van vleeskippen (typische dosering: 20-25 mg/kg). Alhoewel informatie op niveau van versleping zeer interessant kan zijn voor de controlerende overheden, valt dit buiten de scope van het huidige project.

In een discussie met Christophe Genouel en Jaroslava Petrova worden een aantal mogelijk interessante methoden overlopen.

- (1) Phibrio-methode: in overeenstemming met Verordening 1831/2003 wordt deze ter beschikking gesteld van de officiële controlelaboratoria. Een variant van deze methode wordt ook door de Canadese overheden gebruikt (extractie met iso-octaan/methyleenchloride [50:50 v/v], *clean-up* over silica kolom, *isocratic straight-phase* HPLC met iso-octaan/azijnzuur/triethylamine/water [500:1500:8:4:2 v/v/v/v/v] als mobiele fase en *post-column* derivatisatie met vanilline en UV detectie). Aangezien Phibrio zich in deze eerste fase van het project zich nog niet uitgesproken enthousiast getoond heeft, kan het niet uitgesloten worden dat er problemen kunnen rijzen met betrekking tot het copyright van deze methoden.
- (2) ISO 14183 – determination of monensin, salinomycin and narasin in feed. (reversed phase HPLC, post-column derivatisatie met vanilline en UV detectie) Semduramicin blijkt te overlappen met één van de andere coccidiostatica. Het veranderen van het derivatisatiereagens vanilline door DMBA vergroot de problemen slechts, omdat de gevoeligheid voor semduramicin, in tegenstelling tot deze van de andere coccidiostatica, niet toeneemt door over te schakelen op het DMBA (bron U. Vincent).



- (3) Tsjechische methode: extractie met methanol/water [2:8 v/v], *clean-up* over een silica kolom, *isocratic reversed-phase* HPLC met tetrahydrofuran/fosforzuur/acetonitril [100:2:898 v/v/v] als mobiele fase en *post-column* derivatisatie met DMBA en UV detectie (bron J. Petrova)
- (4) De Europese methode (Richtlijn 1999/76/EC) voor de bepaling van lasalocide zou ook bruikbaar zijn voor semduramicin (bron Ch. Genouel). De gevoeligheid voor lasalocide ligt weliswaar 8 à 10 maal hoger, maar de piek voor semduramicin is duidelijk onderscheiden. (principe: extractie met aangezuurde methanol, *reversed-phase* HPLC met fosfaat-buffer/methanol [5:95 v/v] als mobiele fase en fluorescentie detectie).

Het IRMM zal bijkomende experimenten uitvoeren om de haalbaarheid van de 4<sup>e</sup> optie nader te bekijken, zodanig dat op de volgende vergadering een methode gekozen kan worden.

#### 18. Mogelijk toekomstige aandachtspunten voor TC 327

Het CEN TC 327 secretariaat zal een rondvraag rondsturen naar de leden. De bedoeling is voor de 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) voor pesticideresidu'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 overgangperiode 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).
- **Werkgroep Voeder additieven**
  - **probiotica** (Gérard Bertin en Christophe Van Holst)  
Ongeveer 60 bacterie- en giststammen zijn toegestaan als voederadditieven (*Sacharomyces cerevisiae*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, ..). Bij het opstellen van standaardmethoden verdient niet alleen de opkweek, maar ook de identificatie van probiotica aandacht. Enkele methoden zijn beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur. Anderen worden thans ontwikkeld bij FEFANA. Om stammen eenduidig te identificeren is de beschikbaarheid van gecertificeerde referentie stammen essentieel. Christophe Van Holst suggereert een "elektronisch profiel" van de stammen op te stellen.
  - **xylanase** (Gérard Bertin)  
Onder de paraplu van FEFANA werken een tiental xylanase-producenten samen om



een methode te standaardiseren. Na langdurig overleg bleek de piste om tot één methode te komen om commerciële redenen niet haalbaar.

- **carbadox en olaquinox** (Jacob de Jongh)

In het kader van een 5th framework SIMBAG FEED onderzoeksproject werden HPLC-DAD methoden ontwikkeld voor de bepaling van de genoemde verboden groeibevorderaars. Aangezien deze methoden ook met *collaborative trials* gevalideerd zijn, komen ze ten volle in aanmerking voor standaardisatie.

- **Sulfonamiden en tetracyclines**: kruiscontaminatie (Christophe Genouel)

- **Organische zuren**: e.g. citroenzuur, benzoëzuur, ascorbinezuur (Jürgen Danier)

- **Vitamine A en E**: hiervoor bestaan reeds methoden (EN 6867, EN 14565), maar het zou mogelijk zijn beide componenten met één HPLC-methode te bepalen, terwijl voor *clean-up* gebruik gemaakt kan worden van SPE (Jens Schönherr)

#### Vak V : Praktische toepassingsmogelijkheden