

Afd. Additieven 1982-07-01
VERSLAG 82.60 Pr.nr. 505.0060
Onderwerp: Verslag buitenlandse reis
naar "Analytica 82",
1982-04-26/30.

Verzendlijst: directeur, sektorchef (3x), direktie V.K.A., afd. Addi-
tieven (20x), afd. Contaminanten, afd. Normalisatie
(Humme), Projektbeheer, Projektleider (De Ruig).

Afdeling Additieven

1982-07-01

VERSLAG 82.60

Pr.nr. 505.0060

Projekt: Monsterneming en analyse.

Onderwerp: Verslag buitenlandse reis naar "Analytica 82",
1982-04-26/30

Samenvatting:

"Analytica 82" is een combinatie van een wetenschappelijk congres op analytisch chemisch gebied en een uitgebreide instrumenttentoonstelling. In dit verslag wordt vooral aandacht besteed aan één van de symposia van het congres, nl. "Nachweis von Pharmaka in Lebensmitteln".

Voorts worden enige indrukken weergegeven van de instrumenttentoonstelling.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerker/samensteller: dr W.G. de Ruig

Projektleider: dr W.G. de Ruig

dr

Symposium: Nachweis von Pharmaka in Lebensmitteln.

Dit symposium stond vrijwel geheel in het teken van de "hormonen-affaire", naar aanleiding van het "oestrogeenschandaal" in 1980.

In een algemene inleiding somde prof. Baltes een aantal oorzaken op voor toenemend gebruik van farmaca in de mesterij.

1. De moderne fokkerij wordt zeer intensief bedreven. Het vleesverbruik in de BRD is 100 kg per persoon per jaar. Volgens de oude methoden zou daarvoor het totaaloppervlak aan cultuurland van de BRD nodig zijn.

Er is een harde concurrentie. De voer-opbrengst relatie wordt nauwkeurig berekend en geoptimaliseerd. De voederbenutting dient optimaal te zijn.

2. Varkensvlees geeft een apart probleem: moet tegenwoordig vetarm of liefst vetvrij zijn. Daarvoor zijn andere varkensrassen gekweekt. Deze nieuwe rassen blijken erg stressgevoelig te zijn: 10-15% is al dood vóór de slacht. Daarom worden, niet alleen bij het transport, maar ook tijdens het mesten, tranquillizers toegepast.

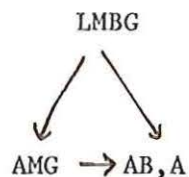
Farmaca mogen niet in het vlees aanwezig zijn. Hoe kon dit toch gebeuren? De concentraties zijn zeer laag < 1 ppb, dat wil zeggen spooranalyse, dus een zeer speciaal gebied, in vlees uiterst moeilijk aan te tonen. Bij de analyse hebben wij thans te maken met de volgende farmaca: oestrogenen, antibiotica en tranquillizers.

Na deze algemene inleiding waren er voordrachten van Prof. Hoffmann, Prof. Stan en Dr. Binnemann.

B. Hoffmann Die Anwendung radioimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Rückständen pharmakologisch wirksamer Stoffe in tierischen Lebensmitteln.

In de BRD zijn de volgende wettelijke regelingen van kracht.
Lebensmittel und Bedarfgegenständegesetz von 1974-08-15 (LMBG).
Arzneimittelgesetz.

Ausführungsbestimmungen A zur Fleischbeschauengesetz 1978-02-03 (o.a. voor stilbenen).



De EEG heeft in 1980 aan een toelating de eis gesteld dat de fabrikant een bepalingsmethode bijlevert.

De acceptabele dagelijkse opname hoeveelheden

$$ADI = \frac{NEL \times 76}{SF}$$

NEL = geen-effect niveau

SF = veiligheidsfactor: x 1000

76 = lichaamsgewicht

voor farmaca in levensmiddelen van dierlijke herkomst zijn gegrond op de volgende hoeveelheden dagelijkse consumptie:

spierweefsel	300 g
lever	100 g
nier	50 g
vet	50 g
melk	1 l
ei	1 stuk

De voorlopige toleranties resp. ADI's zijn:

tetracyclinen	0,01 µg/g	
sulfonamides	0,1 µg/g	
prostoglandinenanaloo	ADI < 1 µg	
benzimidazol	150 µg	betrokken op
tocolyticum	< 5 µg	500 g
sedativum	< 7 µg	

Enorme opdracht: genoemde gehalten voor al deze verbindingen moeten binnen 2 jaar analytisch bepaald kunnen worden.

Voor verboden stoffen zoals stilbenen geldt een nul-tolerantie, hier moeten methoden met de hoogst mogelijke gevoeligheid toegepast worden (zie echter hierna onder Discussie).

Met RIA, sinds 1978 in de Ausführungsbestimmungen opgenomen, zijn nano-, pico- en soms femtogrammen te bepalen. Trenbolon geeft kruisreacties met estrogenen.

Algemeen verloop van RIA:

1-3 g weefsel + ^3H tracer



homogeniseren



extraheren



1-2 extractiezuiveringen



(kolomchromatografie)



extract scheiding



RIA

Er zijn thans RIA's voor estrogenen, trenbolon, DES en hexestrol, nog niet voor zeranol en dienestrol. RIA is geen wondermiddel, geeft alleen in geoefende handen goede resultaten.

Uit proeven met radioactieve verbindingen is gebleken dat 17α trenbolon een voorkeur voor de lever heeft.

Testosteron:

Trenbolonacetaat gehaltes:

lever > vet > nier > vlees.

Hierbij was niet extraheerbaar (covalent gebonden):

23,8 0,37 16,4 1,28.

Ook in het geval van DES is slechts een deel extraheerbaar:

200 mg DES in olie, na 7 dagen

	spier	lever	nier	injectieplaats
vrij	70	233	75	830 ppb
geconjugeerd	32	517	543	48

Sinds 1978 is de RIA verbeterd. Bij elke RIA zijn positieve en negatieve referentiemonsters nodig. Hierdoor worden vals-positieve uitslagen voorkomen, zoals "in sommige landen bij minder kritische toepassing zijn voorgekomen".

Overeenkomende grensconcentraties voor DES:

spierweersel	0,02 ppb
lever/nier	0,05 - 0,1
urine	2,0
feces	5,0

Voor het gerecht zal het zeer moeilijk zijn met één enkele waarde aan te komen.

H.J. Stan Chemische Bestimmungsmethoden von Pharmaka in Lebensmitteln.

Eisen:

1. Omvatten van veel contaminanten in één arbeidsgang: multimethode.
 2. Geringe analytische inspanning per analyse.
 3. Hoge detectiegevoeligheid: spooranalyse.
 4. Hoge zekerheid bij kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de aparte stoffen, wegens economische en juridische consequenties.
- Bij ambtelijke controle kan men van positief verklaren afzien, bij importeren niet.

De analysemethoden moeten gevoelig en specifiek zijn.

Als multimethoden komen eigenlijk alleen fysisch chemische methoden in aanmerking.

Van de chromatografische technieken: DLC, GC en HPLC speelt DLC een geringe rol wegens ontoereikende gevoeligheid, bij GC is derivatisering nodig, bij HPLC weliswaar niet, maar daar zijn gevoelige detectietechnieken begrensd: fluorescentie en EC.

LC-MS is off line mogelijk, als bevestiging neemt GC-MS on line een eerste plaats in.

Scheiding met HPLC: achtereenvolgens ethanolestradiol, trans-DES, hexadien, dienestrol, estradiol, zeranol, cis-DES. Nader te bevestigen met off line MS of met oestrogeenreceptortest.

P.H. Binnenmann Die Prüfung von Lebensmitteln auf pharmakologisch wirksame Stoffe im Rahmen der amtlichen Überwachung.

Onderzoek van vlees, eieren, honing.

In 1980 moesten we van de Behörden alles bepalen, hoewel methoden ontbraken of ontoereikend waren. Eisen te stellen aan methoden:

1. Multimethode. Geen aantonen van een enkele stof, dit hoogstens in de eerste tijd als noodoplossing acceptabel.
2. Met apparatuur die voorhanden is of zijn moest.
3. Aantonen absoluut specifiek rechtszaak.

In Baden-Wurtemberg is in 1980 een werkgroep ingesteld die gekozen heeft voor een multimethode voor 35 stoffen, gebaseerd op de opwerkingsmethode van Verbeke.

Voor de uiteindelijke detectie heeft men echter niet, zoals Verbeke, gekozen voor DLC, maar voor GC-MS of GLC met elektroneninvang. Men heeft niet gekozen voor RIA: geen multimethode, kans op vals positieve uitslagen, problemen met blancowaarden, aanschaf vloeistof scintillatieteller nodig, radiologisch laboratorium nodig, radioactief afval.

Posters over het aantonen van schadelijke stoffen in levensmiddelen

Enige opmerkingen bij de posters.

Binnemann (A 47) heeft een paar hoge gehalten voor DES gevonden: in Franse kalfsnieren 300 ppb, in Italiaanse babyvoeding 200 ppb "afkomstig van een spuitplaats".

Günther (A 51) beval een ELISA methode voor natuurlijke oestrogenen aan als screening voor synthetische. Bij een hoog gehalte oestrogenen (> 10 ppb) kijken naar synthetische. Men kan niet hard maken dat zo'n hoog gehalte afkomstig is van extra toevoeging, maar als men daarnaast een synthetisch hormoon vindt, is dat wel bewijzend. Vele preparaten bestaan nl. uit een combinatie van natuurlijk + synthetisch hormoon, en die kun je op deze manier vangen. De uitsluitend synthetische middelen detecteer je op deze wijze echter niet en die komen, volgens Hoffmann, ook veelvuldig voor.

Volgens Frischkorn (A 53) zijn er thans analytisch geen moeilijkheden meer.

Posterdiscussie onder leiding van Prof. Dr W. Baltes.

In de zeer levendige discussie - er was zowel bij de posters als bij de posterdiscussie grote belangstelling - kwam onder andere het volgende naar voren.

Schmidt: Niet afgaan op de resultaten van één enkele methode.

Dürbeck: Voorzuivering belangrijk. Met "detectiegrens" moeten wij aangeven wat door iedereen in normaal bedrijf haalbaar is, geen hoogstandjes. Met GC-MS is dat 0,2 ng/g, uitgaande van 50-80 g vlees. De door Binnemann geclaimde 0,02 ppb achtte hij, en ook Stan niet realistisch.

Voor RIA werd een detectiegrens van 0,02 ppb in vlees genoemd.

Stan: Het gaat er om welke hoeveelheid ik nog wil bepalen. Dicht bij de detectiegrens is het moeilijk. Vooral bij de GC-MS is de toestand van het apparaat belangrijk: het apparaat is erg gevoelig voor wat er tevoren mee gedaan is.

Voor verboden stoffen maximum toleranties vaststellen. Bijvoorbeeld in faeces 5 ng/g bij 1 g inweeg, in spierweefsel 0,2 ng/g.

Hoffmann: Men moet niet omdat het analytisch anders onmogelijk is max. toleranties stellen. Onderzoek aan levensmiddelen is onmogelijk, beperken tot levend dier. Binnemann was het hier niet mee eens.

Met het oog op de handel moeten we beide doen.

Met RIA in 1 g spierweefsel: 0,05 ppb

in 0,1 g feces 5-10 ppb

10 ppb in feces onofficiële norm, gehalte in vlees is dan 0,02 ppb.

Bij mycotoxinen zijn ook max. toleranties gesteld.

Hoffmann onderscheidde "verboden stoffen" zoals DES die toxicologisch niet acceptabel zijn en "nog niet toegelaten stoffen", waarvoor op dit ogenblik nog onvoldoende gegevens beschikbaar zijn, maar die in een later stadium toegelaten zouden kunnen worden, bijvoorbeeld trenbolon en zeranol.

Voor de verboden stoffen moet volgens prof. Hoffmann een nultolerantie gelden, en moet de gevoeligste analysetechniek toegepast worden. Dit standpunt werd door anderen niet gedeeld, onder anderen Stan en Binnemann, zoals uit het voorgaande reeds gebleken is. Suggestie uit het publiek: grenswaarde in vlees van bijvoorbeeld 1 ppb. Repliek van Hoffmann: 7 dagen na toepassing van 250 mg DES is het gehalte in vlees 0,07 ppb, met zo'n norm wordt het gebruik dus praktisch vrijgegeven. (In een persoonlijk gesprek verklaarde ook prof. Fresenius de voorkeur te geven aan een te stellen grens).

In de discussie was men het er algemeen over eens dat men niet af moet gaan op de resultaten van één enkele analysemethode: bevestiging is nodig. Ik heb daarop het probleem naar voren gebracht dat de screeningstechniek (RIA) gevoeliger is dan de bevestigingstechnieken (b.v. GC-MS).

Voorbeeld: wij vinden in Nederland met RIA 0,05 ppb, bevestiging met GC-MS beneden detectiegrens, dus negatief. Wat gaat er gebeuren als men na import in West-Duitsland op één van hun 50 controle-instellingen met RIA gaat analyseren, en dus ook weer 0,05 ppb vindt? Men onderkende het probleem, maar bedacht dat dit geen analytisch doch een politiek economisch probleem is, en dus niet thuis hoorde op de Analytica.

Wat het gebruik betreft, noemde Hoffmann in de USA voor zeranol 30.000.000 behandelingseenheden en voor trenbolon 20.000.000. In Frankrijk, Engeland en Spanje wordt 30% van de runderen behandeld.

Tranquillizers worden in humane geneesmiddelen in mg toegepast.

Choramfenicol wordt veel gebruikt. Dürbeck vertelde dat mensen die doping hadden gebruikt maar sindsdien negatief waren, na 1 jaar weer positief werden. Mogelijke oorzaak: depot in vet, komt onder stressomstandigheden vrij.

Günther rapporteerde hoge gehalten testosterol. Met een kolomreiniging wordt de achtergrond tot praktisch nul gereduceerd.

Volgens Hoffmann is RIA momenteel beter en betrouwbaarder dan ELISA. Overigens acht hij een RIA pas goed als deze in de handel verkrijgbaar is. RIA heeft een reuzegrote capaciteit. De bottleneck is de extractie.

TENTOONSTELLING

Waters

2 module: nieuw model radiale compressie module, te gebruiken naast de reeds bestaande RCM.

Themostrener van RCM kan: gewoon in waterbad onderdompelen.

Interface M 777: Data transfer module.

UV detector: Model 480 Lambda Max 190-380 nm.

Nieuwe routine HPLC M 320 met ingebouwde monsterwisselaar, 48 monsters, 5 µl-4 ml. Isocratisch, cartouchesysteem. DM 30-45.000.
Apple of Commodore als passief datasysteem.

Aminozuuranalysator: scheidt natieve aminozuren, modificeert aan kolomuitgang. Reagentia: HOCl, hypochloriet en OPA orthoфтаal-dialdehyde. Fluorimetrische detector, kolomoven 60°, ionenuitwisselaar.

Varian

Werkend HPLC systeem:

isocratisch: model 5010	DM 13.000,--
monstergever 60 monsters 1,4 ml-250 µl	" 19.000,--
ventiel	" 4.000,--
kolom 20-50 cm	> 500,--

Monsters worden niet aangezogen, maar uitgeduwd.

fractieverzamelaar: Gilson 15.

FT-IR

Digilab

Nieuwe koppeling GC-IR. Geschikt voor fused silica kolommen, cabavox en OV 101.

Diffuse reflectance accessory: erg gevoelig.

Foto acoustische detector.

Aparte brochure: pharmaceutical note.

Thans meest gevoelige FT-IR.

Op Achema wordt "goedkoop" routineapparaat geïntroduceerd: Qualimatic.

Nicolet

MX-S heet nu 5 MX, opl. vermogen 4 cm^{-1} DM 61.000-150.000.

MX 1: 1 cm^{-1} vanaf DM 130.000.

7000: $0,06 \text{ cm}^{-1}$ DM 290.000, met GC lightpipe DM 350.000.

Te introduceren op Achema:

60 SX: $0,25 \text{ cm}^{-1}$ DM 250.000.

60 scans/sec.

Monsterruimte voor micromonsters.

Modulaire optiek ATR-diffuse reflectie.

PAS-micromonsters.

Experimentele veelzijdigheid voor multiple applicatie.

Brucker

Reeks apparaten, van (relatief) goedkoop tot duur.

Perkin Elmer

FT-IR: 1500 Analek interferometer.

Dispersieve IR: 783,

983 i.p.v. 580: opl. verm. max. $0,5 \text{ cm}^{-1}$, routine: 3 cm^{-1}
1430.

983 dispersief	versus	1500 FT
opl. vermogen		sneller 1 scan: 2 s
differentiespectra in apparaat		constante opl. verm.: 4 cm^{-1}
		heel spectrum: 12 s
dubbelstraalapparaat		enkelstraalapparaat
DM 82.000		inclusief datasysteem DM 121.000
met datasysteem DM 121.000.		

UV/vis: nieuw: Lambda 1.

HPLC: Series 10 (nieuw)	0,1- 9,9 ml/min flow	DM 10.000,-
" 1	0,1-29,9	
" 22 met gradient	0,1-29,9	25.000,-
UV detector: LC 75	190-600 μ m	15.000,-
Automatische monstergever: 100 monsters	1-2000 μ l	20.000,-

Hierbij alleen stroom nodig, geen gas.

Monsterwisselaar, tijd of piekgestuurd: Abimed of LKB.

Abimed HPLC systeem Gilson:

Monsterautomatiek Gilson 212	DM 15.000,-
Fractieverzamelaar 201	6.850,-
HPLC pomp 303	6.800,-
Manometermodule 802	2.000,-
Kolom	300 - 600

Detector.

Pabisch

Cecil UV/vis spectrofotometer Model 588 DM 30.000,-

Verschillende scansnelheden.

Lage ruis, daardoor geschikt om te combineren met:

Differentiator TL B 6000 DM 10.000,-,

hiermee tot 6e afgeleide te berekenen. Hierdoor is het mogelijk een klein schoudertje op een grote piek nog te scheiden, of ook: twee pieken op dezelfde plaats maar van verschillende vorm te scheiden.

ICT

Vac elut: om stoffen uit biologische materialen te elueren. Vertegenwoordiger in Nederland: Supelchem Holland, Hilversum, 035-19587.

Supelco GC HPLC TLC.

Durabond kolomvullingen.