

Projectnr.: 71.513.01
Onderzoek naar microverontreiniging

Projectleider: W.A. Traag

Rapport 2001.006

augustus 2001

POLYCYCLISCHE AROMATISCHE KOOLWATERSTOFFEN (PAK'S) IN DIERVOEDERS, DIERLIJKE VETTEN, PLANTAARDIGE OLIËN/ VETTEN, VETZUREN EN DERGELIJKE.

deel 1 normstelling

deel 2 meetmethoden

W. Traag, L.A.P. Hoogenboom, G. v.d. Weg, RIKILT, Wageningen
A.J. Baars, RIVM Bilthoven
T. Schouten, TNO, Zeist

Met bijdragen van:

G. Kraaijema, LABCO, Europoort RT, K. Cooreman, Oostende, E. Rillaerts, PIH Antwerpen,
G. Vanermen, VITO, Mol, M. Raemackers, CLO-Gent Oostende, H. van der Moolen, BV. Handelslab,
Dr. A. Verwey, B. Baumann, RIVM Bilthoven, A.J. Baars, RIVM Bilthoven, M. Verhoeff,
Dr. A. Verwey, D. Courteyn, ROLG, F. Van Stijn, Unilever, C. Vinckx, EWI

Verantwoordelijken:

R. Huibers, LNV, Den Haag
G. de Poorter, Ministerie Middenstand en Landbouw, Brussel
D. Standaert, Ministerie MML Brussel

Afdeling: NRC en VGV

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717

Copyright 2001, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

De heer F. Verstraete, Europese Commissie

De heer F. Bergmans, Produktschap MVO

INHOUD	blz.
SAMENVATTING	3

DEEL 1 NORMSTELLING

1	INLEIDING	5
1.1	Bronnen/vermijdbaarheid	5
1.2	Overdracht van diervoeder naar dier, mens en milieu	6
1.3	Schatting van blootstelling en daarmee gepaard gaande risico's	6
1.3.1	Schatting blootstelling	6
1.3.2	Risicoschatting	7
2	NORMSTELLING VOOR POLYCYCLISCHE AROMATISCHE KOOLWATERSTOFFEN IN DIERVOEDERS	7
2.1	Normen voor benzo(a)pyreen en andere PAK's	8
2.2	TEF waarden voor PAK's	9
2.3	Upper en Lower bound principe	10

DEEL 2 MEETMETHODEN

1	DOEL EN TOEPASSINGSGBIED	13
2	PRINCIPE	13
2.1	Beslisschema/flowschema	14
3	APPARATUUR, REAGENTIA EN MATERIALEN	15
3.1	Reagentia	15
3.1.1	Reagentia voor de extractie en clean-up	15
3.1.2	Reagentia voor de HPLC bepaling	15
3.1.3	Reagentia voor de GC/MS bepaling	16
4	MONSTERONTVANGST EN -VOORBEREIDING	18
4.1	Vetbepaling	18
4.2	Bepaling van het percentage droge stof	18
4.3	Toevoegen van de interne standaarden	18
5	EXTRACTIE	18
5.1	Extractie van voedingsmiddelen die niet of slechts gedeeltelijk oplosbaar zijn in het extractiemiddel, maar het alkali verzeepbaar	18
5.1.2	Aanpassing voor matrices met een lager vetgehalte zoals vlees, vis, etc.	19
5.1.3	Aanpassing voor matrices met een laag vetgehalte en een hoog watergehalte zoals melk, zuivel, dranken, (vloeibare) rookaroma's, etc.	19
5.2	Extractie van voedingsmiddelen die niet oplosbaar zijn in het extractiemiddel en gedeeltelijk bestand zijn tegen alkalische verzeeping	20
5.3	Extractie van vetzuren d.m.v. complexering m.b.v. cafeïne en mierenzuur/extractie met cyclohexaan	20

6	OPZUIVEREN	21
6.1	Vorbereiding silicagel	21
6.2	Kolomchromatografie over silicagel	21
7	ANALYSE VAN DE GEZUIVERDE EXTRACTEN MET BEHULP VAN HPLC	21
7.1	Principe HPLC-meting	21
7.2	Apparatuur en materiaal voor de HPLC-meting	21
7.3	Procedure HPLC	21
7.3.1	Monstervorbewerking	21
7.3.2	Calibratie	22
7.3.3	Meting	22
7.3.4	Identificatie	22
7.4	Berekening	23
8	ANALYSE VAN DE GEZUIVERDE EXTRACTEN MET BEHULP VAN GC/MS	23
8.1	Principe GC/MS meting	23
8.2	Apparatuur en materiaal voor de GC/MS meting	24
8.3	Procedure GC/MS	24
8.3.1	Monstervorbereiding	24
8.3.2	Meting	24
8.3.3	Kalibratie	25
8.3.4	Identificatie	25
8.4	Berekeningen (GC/MS)	26
9	KWALITEITSCONTROLE (GC/MS EN/OF HPLC/FL METING)	27
9.1	Responslineariteit (GC-MS)	27
9.2	Specificiteit (GC-MS)	27
9.3	Gevoeligheid (GC-MS en HPLC/FL)	27
9.4	Responsfactoren en relatieve responsfactoren (GC-MS)	28
9.5	Blanco (GC-MS en HPLC/FL)	28
9.6	Controlemonster (GC-MS en HPLC/FL)	28
9.7	Recuperatierendementen van de interne standaarden (GC-MS)	28
10	RAPPORTERING	29
11	OPMERKINGEN	29
12	LITERATUUR	30

BIJLAGE A	HPLC instellingen voor de bepaling van PAK's (Gradiëntprogramma)
BIJLAGE B	HPLC instellingen voor de bepaling van PAK's (Instelling van de detectoren)
BIJLAGE C	Typische GC/MS werkvoorwaarden voor de bepaling van PAK's
BIJLAGE D	Validatietraject

SAMENVATTING

Naar aanleiding van de verontreiniging van palmolie met dieselolie zijn er in België versneld voorlopige normen vastgesteld voor polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) in vetten en vetzuren bestemd voor diervoeder. Vervolgens is er een werkgroep opgericht bestaande uit een aantal Belgische en Nederlandse deskundigen, zowel analytici als toxicologen, om te komen tot een betere normstelling en om uniforme meetmethodes op te stellen. Een belangrijk uitgangspunt bij de normstelling is het hanteren van zogenaamde TEF-waarden waarmee in analogie met de dioxines het gehalte van de toxicologisch relevante PAK's wordt teruggerekend naar één stof, in dit geval benzo(a)pyreen. Als norm voor PAK's in vetten en daarvan afgeleide producten bestemd voor diervoeder is gekozen voor **50 µg BaPEQ/kg**, met daarnaast een actiegrens van **15 µg BaPEQ/g**. Idealiter zou deze norm ofwel gebaseerd moeten zijn op toxicologische kennis ofwel ALARA-principes. Helaas ontbreken daartoe gegevens omtrent de overdracht van PAK's vanuit diervoeder naar b.v. melk, al is de verwachting dat het grootste deel zal worden afgebroken. Of dit bij koeien resulteert in schadelijke metabolieten is niet bekend.

In de normstelling zijn op basis van hun toxiciteit de volgende verbindingen opgenomen:

- benzo(a)pyreen
- dibenzo(a,h)anthraceen
- benzo(a)anthraceen
- benzo(b)fluorantheen
- benzo(k)fluorantheen
- indeno(1,2,3-c,d)pyreen
- chryseen
- acenaphtyleen
- fluorantheen
- acenaphteen
- phenanthreen
- pyreen

Voorstellen voor normstelling, de toe te passen meetmethoden alsmede de wijze van rapportage worden in dit rapport beschreven. Daarbij heeft de werkgroep een aantal analysemethoden bestudeerd en voorstellen gedaan voor uniforme meetmethoden. Deze meetmethoden zijn inmiddels, aan de hand van rondzendmonsters, door de diverse laboratoria getoetst.

De meting met behulp van HPLC met detectie via fluorescentie is niet geschikt voor de bepaling van alle geselecteerde verbindingen. Met name de vluchtige verbindingen zijn niet kwantitatief te bepalen en er wordt daardoor een mogelijk geringe onderschatting gemaakt van de werkelijke waarde. Resultaten verkregen met HPLC/FL dienen vooralsnog dan ook als indicatief te worden beschouwd. Aangezien uit recente metingen inmiddels duidelijk is geworden dat PAK's ook gevormd worden tijdens allerlei droogprocessen en daardoor ook kunnen voorkomen in andere diervoedergrondstoffen zoals gedroogd gras, lucerne, citruspulp en copra, valt te verwachten dat op termijn ook voor dit soort producten normstelling vereist is.

DEEL 1 NORMSTELLING

1 INLEIDING

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) zijn organische verbindingen die uit twee of meer aromatische zesring-structuren bestaan. PAK's kunnen onder meer ontstaan bij verbrandingsprocessen wanneer organische verbindingen hoog worden verhit. Tijdens het verbranden van organisch materiaal worden koolstof-, waterstof- en CH-radicalen vrijgemaakt. Deze vrije radicalen kunnen polymeriseren en stabiele polycyclische aromatische koolwaterstoffen vormen. Deze vorming kan ook plaatsvinden bij lagere temperaturen (100-150°C), maar de reactiesnelheid is dan veel lager. De moleculen die bij deze lage temperaturen worden gevormd bevatten ook gesubstitueerde verbindingen, onder andere methyl en ethyl gesubstitueerde PAK's. In fossiele brandstoffen is het gehalte aan gesubstitueerde PAK's vaak hoger dan het gehalte aan PAK's zelf.

De mate van de emissie naar het milieu wordt voor het grootste deel bepaald door uitlaatgassen van auto's, rookgassen van allerlei industrieën en van afvalverbrandingsinstallaties. Na depositie binden de PAK's sterk aan organisch materiaal dat zich in de grond bevindt. Fysische eigenschappen zoals zuurgraad en temperatuur bepalen de verblijftijd en afbreekbaarheid van de PAK's in de grond. Afhankelijk van het milieu waarin ze zich bevinden kunnen PAK's chloreren, nitreren of alkyleren tot de desbetreffende metabolieten. Naar het onderzoek aan de verschillende metabolieten in grond, agrarische producten en b.v. diervoedergrondstoffen is nog niet veel gedaan. Met name de verhouding van deze metabolieten en de uitgangsstoffen is onbekend. Het is dus niet bekend of gerapporteerde gehalten aan ongesubstitueerde PAK's representatief zijn voor het totale gehalte aan PAK's.

PAK's hebben een geringe systemische toxiciteit. Vele PAK's zijn echter carcinogeen; de carcinogene potentie wordt pas manifest na biotransformatie in het lichaam tot z.g. diol-epoxiden. Volgens recente experimenten (RIVM 1999) bedraagt het additionele risico op kanker bij levenslange blootstelling aan 5 ng BaP (benzo[a]pyreen) per kg lichaamsgewicht (kg) per dag 1 per 10⁶. De huidige blootstelling van de bevolking wordt geschat op 2,7 ng BaP/kg kg/dag, en voor alle PAK's op basis van BaPEQ op 7.3 ng/kg kg/dag (RIVM 1999).

1.1 Bronnen/vermijdbaarheid

De voornaamste bronnen zijn onder andere producten welke door directe emissie zijn verontreinigd. Voor de agrarische sector is vooral de depositie op gras van belang alsmede op grootbladerige gewassen (spinazie, boerenkool etc). Voor wat het diervoeder betreft schuilt het gevaar voornamelijk in die grondstoffen die worden gedroogd, zoals grasbrokken, citruspulp, copra etc. Een andere mogelijke bron is het gebruik van technische vetten welke tengevolge van een behandeling verontreinigd kunnen zijn met PAK's.

Het achtergrond gehalte aan PAK's in dierlijke producten kan onder andere teruggedrongen worden door grondstoffen te gebruiken welke onverdacht zijn alsmede door het verwerken van rest of gerecycled materiaal achterwege te laten of door deze stromen goed te controleren.

Tevens dienen productieprocessen gecontroleerd te worden op kritische punten. Bij droogprocessen dient b.v. aardgas als brandstof te worden gebruikt.

1.2 Overdracht van diervoeder naar dier, mens en milieu

Gegevens betreffende de overdracht van PAK's vanuit diervoeder naar dierlijke producten zijn niet aanwezig. Beschikbare gegevens inzake kinetiek en metabolisme van PAK's in zoogdieren zijn uiterst schaars, en uitsluitend kwalitatief. PAK's worden vanuit het maagdarmkanaal goed opgenomen; in proefdieren is de absorptie > 50%. Hoewel PAK's tamelijk lipofiel zijn (zodat een zekere accumulatie verwacht zou mogen worden), worden ze relatief snel gemetaboliseerd tot gehydroxyleerde producten en conjugaten, die via urine en/of faeces worden uitgescheiden. De WHO concludeerde in 1998 dat de turnover van PAK's in het lichaam snel is, en dat geen accumulatie optreedt.

In het kader van de gerezen problematiek lijkt het zeer zinvol om de overdracht van PAK's bij met name melkgevende runderen te bestuderen. Runderen zullen daartoe gevoerd dienen te worden met besmette materialen, waarna gehalten in melk bepaald kunnen worden met een recent ontwikkelde zeer gevoelige GC/MS methode. Daarnaast zal m.b.v. levermicrosomen (evt leverslices) de afbraak van een aantal PAK's onderzocht kunnen worden, om zodoende na te gaan of er schadelijke metaboliëten kunnen ontstaan, die mogelijk in de melk terecht komen.

1.3 Schatting van blootstelling en daarmee gepaard gaande risico's

Naar aanleiding van door België vrijgegeven partijen met PAK's verontreinigde palmolie-vetzuren welke in Nederland zijn verwerkt in diervoeders en vervolgens zijn gevoerd aan melkvee hebben RIKILT en RIVM een schatting gemaakt van de blootstelling en risico.

1.3.1 *Schatting blootstelling*

Aannemend dat:

- 1 een melkgevend rund 10 kg voer per dag consumeert (*realistische schatting op basis van expert judgement*),
- 2 dit voer 1 % mengvetzuren, d.w.z. 100 gram bevat (*realistische schatting op basis van expert judgement*),
- 3 deze mengvetzuren 50 µg BaPEQ per kg bevatten (*de voorgestelde norm*), dan neemt dat rund per dag 5 µg BaPEQ op.

Vervolgens aannemende dat:

- 4 de biologische beschikbaarheid van PAK's na orale inname door het rund 100 % is (*realistische schatting op basis van expert judgement*),
- 5 in het rund binnen enkele dagen een steady state situatie ontstaat (*expert judgement*),
- 6 de door het rund opgenomen hoeveelheid BaPEQ niet wordt gemetaboliseerd en/of uitgescheiden, maar volledig overgedragen naar de melk (*"worst case" schatting*),
- 7 het rund 1 kg melkvet per dag produceert (*realistische schatting op basis van expert judgement*), dan bedraagt het gehalte in het melkvet 5 µg BaPEQ per kg melkvet.

De melkvetconsumptie van de gemiddelde Nederlander bedraagt 18,4 gram/dag, ofwel 0,325 g/kg lg/dag. De inname van BaPEQ als gevolg van het consumeren van verontreinigde

melk en melkproducten is dus $18,4 \times 5 = 92$ ng/dag ofwel 1,4 ng/kg lg/dag ofwel 28% van de "TDI" zoals hierboven beschreven.

Benadrukt moet worden dat vooral aanname 6 een "worst case" scenario betreft.

Door gebruik te maken van het MilCons-model (Freijer et al 1999) waarmee met behulp van PBPK-modelling de overdracht van oraal ingenomen lipofiele stoffen naar melk kan worden gemodelleerd, blijkt dat bij een dagelijkse inname van 5 µg BaPEQ door het rund, onder aanname dat de biologische halfwaardetijd 2 uur bedraagt, een steady state situatie bereikt wordt na ca. 3 maanden. In die steady state situatie bedraagt de uitscheiding via het melkvet 2,4 µg/kg, in de aanlooperperiode tot aan de steady state situatie is de uitscheiding via melkvet lager. Een kortere halfwaardetijd leidt tot een lagere steady state, en derhalve ook tot een lagere uitscheiding via de melk. Volgens dit model zal de inname van de gemiddelde consument via het melkvet derhalve maximaal (d.w.z. in de steady state situatie) 0,8 ng BaPEQ/kg lg/dag bedragen.

1.3.2 Risicoschatting

De ("worst case" voor gemiddelde consument) geschatte inname van BaPEQ als gevolg van het consumeren van verontreinigde melk en melkproducten van 1,4 ng/kg lg/dag leidt bij levenslange gemiddelde consumptie van deze melk en melkproducten tot een additioneel risico op kanker van 0,3 per 10^6 (nl. 1,4/5 per 10^6). De meer realistische schatting op basis van het MilCons-model leidt bij levenslange gemiddelde consumptie tot een additioneel risico op kanker van 0,2 per 10^6 (nl. 0,8/5 per 10^6).

Het actuele risico zal geringer zijn, en wel omdat:

- aangenomen mag worden dat de blootstelling van de runderen slechts een beperkte periode betreft;
- runderen die gedurende enige tijd met PAK's verontreinigd voer hebben genuttigd, na beëindiging van de blootstelling deze PAK's binnen enkele dagen zullen hebben gemetaboliseerd en uitgescheiden, zodat daarna de dierlijke producten, inclusief de melk, niet langer verontreinigd zijn;

De reële blootstelling van de consument zal dus beperkt zijn tot hoogstens enkele weken.

Onder die omstandigheden kan de bijdrage van deze consumptie aan het optreden van kanker als verwaarloosbaar worden beschouwd.

2 NORMSTELLING VOOR POLYCYCLISCHE AROMATISCHE KOOLWATER- STOFFEN IN DIERVOEDERS (TOEPASSING VAN HET TEF PRINCIPE)

De Belgische overheid heeft voorlopige grenzen van 10 en 50 µg/kg produkt voor respectievelijk benzo(a)pyreen en totaal PAK's ingesteld. De vraag is gerezen of er op basis van de huidige toxicologische kennis andere normen vastgesteld zouden kunnen worden. Aangezien het hier net als bij dioxines gaat om een complexe groep verbindingen speelt ook de vraag of het mogelijk is om hierbij een TEQ-principe toe te passen. Op grond van de hier gepresenteerde studie wordt een voorlopige norm van 50 µg BAPEQ/kg voor de carcinogene PAK's in diervoeders en diervoedergrondstoffen, met daarnaast een actiegrens van 15 µg BAPEQ/kg voorgesteld. De voorgestelde actiegrens en norm gaan uit van het upper bound principe.

2.1 Normen voor benzo(a)pyreen en andere PAK's

Bij de vaststelling van op toxicologie gebaseerde normen voor stoffen in diervoeders of diervoederbestanddelen, is het essentieel om na te gaan in hoeverre deze stoffen kunnen resulteren in nadelige effecten bij het doeldier of vervolgens via de residuen bij de consument. In het geval van PAK's is het natuurlijk de vraag of carcinogene effecten relevant zijn voor het doeldier, gezien hun relatief korte levensduur.

Belangrijker lijkt het om na te gaan of de blootstelling aan PAK's uiteindelijk leidt tot onacceptabele residuen in dierlijke producten als melk, eieren en vlees. Helaas is hierover weinig bekend. Wel zijn PAK's aangetoond in dierlijke producten en kan dus niet worden uitgesloten dat deze worden overgedragen via het diervoeder. Anders dan bij dioxines is er bij PAK's sprake van afbraak, die waarschijnlijk al voor een groot deel plaats vindt in de darmwand en in de lever. Dit leidt tot metabolieten die deels verantwoordelijk zijn voor de toxiciteit van genoemde stoffen. Deze reactieve metabolieten zullen vrij snel covalent binden aan eiwitten en DNA of worden afgebroken tot niet-toxische verbindingen. Met name een aantal diol-verbindingen blijkt echter nog steeds toxisch te zijn, mede doordat zij verder geactiveerd kunnen worden tot reactieve metabolieten. Ook kunnen eventuele conjugaten in de darm weer gesplitst worden tot de vrije diolen. Gezien hun vergrote polariteit zullen dergelijke conjugaten waarschijnlijk vrij snel worden uitgescheiden en niet ophopen. Over de mogelijke toxiciteit van de zogenaamde covalent gebonden metabolieten van PAK's is weinig bekend, maar in praktijk wordt aangenomen dat ze niet toxisch zijn. Een soortgelijke problematiek speelt bij tal van andere stoffen waaronder het mycotoxine aflatoxine B₁.

Op dit moment zijn er geen normen voor PAK's. Dit komt mede doordat de tot dusver gepubliceerde carcinogeniteitsstudies ongeschikt zijn voor een kwantitatieve risicoevaluatie. Om die reden is er door het Nederlandse RIVM recent een orale chronische studie uitgevoerd met benzo(a)pyreen bij ratten. Een voorlopig afgeleide norm, bereikt door lineaire extrapolatie en gebaseerd op 1 extra geval van kanker per miljoen mensen bij levenslange blootstelling komt neer op 5 ng/kg lichaamsgewicht per dag.

Op basis van deze norm zouden residulimieten kunnen worden vastgesteld, maar dit is nog niet gebeurd. Wel wordt er momenteel voor vetten en oliën bestemd voor humane consumptie, gewerkt met richtwaarden van 1, 5 en 25 µg/kg produkt voor respectievelijk benzo(a)pyreen, zware PAK's en totaal PAK's. Rekening houdend met de sterke afbraak van deze stoffen zou voor diervoeders en diervoedergrondstoffen voorlopig kunnen worden uitgegaan van een norm van 50 µg/kg. Daarnaast zou er gewerkt kunnen worden met een actiegrens van 15 µg/kg. Bij overschrijding van de actiegrens wordt nader onderzoek gestart naar de bron van de besmetting. Ter verdere onderbouwing van de norm zou onderzoek verricht moeten worden naar het gedrag van PAK's en toxicologisch relevante afbraakproducten in landbouwhuisdieren.

2.2 TEF waarden voor PAK's

Regelgeving omtrent toelaatbare residu-niveaus is meestal gebaseerd op individuele stoffen. Dit levert met name problemen op bij complexe mengsels van stoffen met soortgelijke toxische effecten. Een bekend voorbeeld zijn de dioxines, waarvan er 17 van toxicologisch belang zijn.

Bovendien zijn er nog een aantal polychloorbiphenylen (PCBs) die eveneens aan de zogenaamde Ah-receptor kunnen binden en daardoor een vergelijkbare werking als de dioxines hebben. Om dit probleem te ondervangen is gekozen voor het zogenaamde TEQ-principe, waarmee de toxiciteit van een groep dioxines gerelateerd wordt aan die van de meest toxische, het 2,3,7,8-tetrachloor-p-dioxine ofwel TCDD. Daarvoor zijn door internationale commissies zogenaamde Toxische equivalentiefactoren ofwel TEF waardes bepaald voor de individuele dioxines en PCB's, waarvan de meest recente herziening heeft plaatsgevonden onder auspiciën van de WHO. Genoemde TEF-waarden worden daarom WHO-TEFs genoemd. Bij de analyse worden de gehalten van de individuele dioxines vermenigvuldigd met de TEF waarde en uiteindelijk gesommeerd tot een gehalte in μg BAPEQ/kg product of vet. De TEF waardes worden vastgesteld door weging van allerlei mogelijke effecten waarbij uiteraard effecten bij de mens en vervolgens dieren zwaarder tellen dan b.v. effecten op gekweekte cellen.

Een aantal polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) is net als dioxines in staat om te binden aan de Ah-receptor en zou op basis van die werking een dioxine-TEF toegewezen kunnen krijgen. In praktijk zijn er echter te grote verschillen tussen dioxines en PAK's. Zo worden dioxines zeer slecht afgebroken en hebben ze daardoor de neiging om te accumuleren in vetweefsel. Ook is de recent aangescherpte norm voor TCDD niet langer gebaseerd op de kankerverwekkende eigenschappen maar op effecten op het immuunsysteem en de bij apen aangetoonde endometriosis. Daarentegen is van een aantal PAK's duidelijk de carcinogeniteit aangetoond alsmede de DNA-beschadigende eigenschappen, zoals die naar voren komt uit tal van genotoxiciteitstesten. Derhalve zou voor PAK's een andere set TEF waardes moeten worden gehanteerd, gebaseerd op deze kankerverwekkende eigenschappen en eventuele effecten in genoemde testen. Aangezien benzo(a)pyreen de meest toxische congener lijkt, ligt het voor de hand om deze stof als standaard te nemen en daarvoor een TEF van 1 vast te stellen.

Toepassing van het TEQ-principe voor deze groep van stoffen, betekent voor de analytiek dat in principe alle toxicologisch relevante stoffen zouden moeten worden geanalyseerd. Mogelijk kan op basis van de praktijk besloten worden om congenere die moeilijk te analyseren zijn en niet wezenlijk bijdragen aan het totale gehalte (in BAPEQ's) niet op te nemen in de analyse. Op dit moment worden benz(a)anthraceen, benzo(a)pyreen, dibenz(a,h)anthraceen door het IARC (1983) geclassificeerd als waarschijnlijk carcinogeen voor de mens (groep 2A) en benzo (b)fluorantheen, benzo(j)fluorantheen, benzo(k)fluorantheen en indeno(1,2,3-c,d)pyreen als mogelijk carcinogeen voor de mens (groep 2B). Ook chryseen zou inmiddels aan dat lijstje moeten worden toegevoegd, terwijl fluorantheen verdacht is (IPCS, 1998). Naphtaleen, anthraceen, benzo(g,h,i)peryleen en fluoreen lijken niet carcinogeen, de resterende stoffen (acenaphteen, acenaphtyleen, phenanthreen en pyreen) blijven verdacht op basis van positieve genotoxiciteitstesten. Mogelijk speelt daarbij ook de zuiverheid van de onderzochte stoffen een belangrijke rol.

Een groot voordeel van het gebruik van TEF-waardes t.o.v. de huidige praktijk is echter dat de niet relevante PAK's van veel minder groot belang worden. Zo houden de voorgestelde grenzen van 10 μg en 50 $\mu\text{g/kg}$ product voor respectievelijk benzo(a)pyreen en totaal PAK's geen rekening met de toxiciteit van genoemde stoffen, aangezien de carcinogene PAK's in praktijk vaak een klein percentage van het totaal uitmaken.

Alhoewel er in het verleden diverse voorstellen zijn gedaan voor TEF waardes voor PAK's (Nisbet en Lagoy 1992, EPA 1993 en Kalberlah 1995), zijn deze tot dusver niet algemeen gebruikt (appendix 1). Ook een recente publicatie van Collins et al. (1998) ondersteunt de meeste van deze waarden. Een belangrijk verschil tussen de voorstellen van Nisbet en Lagoy enerzijds en de EPA en Kalberlah anderzijds, is het toekennen van kleine TEF-waardes aan een aantal PAK's waarvan de carcinogeniteit niet bewezen is. Het gaat daarbij met name om anthraceen, benzo(g,h,i)peryleen, naphtaleen en fluoreen. Het ligt voor de hand om aan deze stoffen geen TEF-waarde toe te kennen. De TEF waarde voor dibenzo(a,h)anthraceen zoals voorgesteld door Nisbet en Lagoy ligt vrij hoog en zou verlaagd dienen te worden naar 1. Tabel 1 doet op basis van deze overwegingen een voorstel. Tabel 2 laat een rekenvoorbeeld zien voor een verontreinigde palmolie.

In de toekomst lijkt het verstandig om Internationale consensus te verkrijgen voor deze waardes, bij voorkeur door het instellen van een internationale commissie. Om misverstanden te voorkomen lijkt het ook wenselijk om duidelijk te maken dat er sprake is van verschillende soorten TEF waardes, al dan niet gebaseerd op stofgroep of toxisch effect bv dioxine-TEF (of Ah-TEF), PAK-TEF (of carcinogeniteits-TEF).

2.3 Upper en Lower bound principe

Nadat een analyse is uitgevoerd is de data-interpretatie als volgt:

Uit de analyse volgen gehalten per gemeten verbinding (dus van de twaalf geselecteerde verbindingen) uitgedrukt in $\mu\text{g/kg}$ vet of product. Vervolgens wordt aan de hand van toxiciteitsfactoren een totaalgehalte berekend uitgedrukt in $\mu\text{g BAPEQ/kg}$ vet of product wat vervolgens getoetst wordt aan de actiegrens en/of (voor)gestelde norm.

Bij de interpretatie van analyseresultaten wordt het principe van "Upper bound" gehanteerd. Dit betekent dat voor niet geïdentificeerde congenereën een waarde gelijk aan de detectiegrens wordt ingevuld, welke dan uiteraard weer wordt vermenigvuldigd met de bijbehorende TEF waarde. Met andere woorden, niet geïdentificeerde verbindingen dragen bij aan het totaal gehalte. Bij het hanteren van het "Lower bound" principe worden niet geïdentificeerde verbindingen niet meegenomen. Dit betekent dat voor niet geïdentificeerde congenereën nul wordt ingevuld. Het "lower bound" principe geeft dus per definitie een lagere waarde of, wanneer alle congenereën zijn geïdentificeerd, een gelijke waarde aan als bij hanteren van het "Upper bound" principe. In het rekenvoorbeeld in tabel 2 is e.e.a. aanschouwelijk gemaakt.

Tabel 1. Lijst met voorgestelde TEF waarden voor polycyclische aromatische koolwaterstoffen

Stof	Voorgestelde
	TEF
Benzo(a)pyreen	1
Dibenzo(a,h)anthraceen	1
Benzo(a)anthraceen	0,1
Benzo(b)fluorantheen	0,1
benzo(k)fluorantheen	0,1
indeno(1,2,3-c,d)pyreen	0,1
chryseen	0,01
acenaphtyleen	0,01
fluorantheen	0,01
acenaphteen	0,001
phenanthreen	0,001
pyreen	0,001

Tabel 2. Rekenvoorbeeld gebaseerd op een verontreinigd palmzurenmonster

Stof	TEF	gehalte (µg/kg)	gehalte (µg BAPEQ/kg) lower bound	gehalte (µg BAPEQ/kg) upper bound
dibenzo(a,h)anthraceen	1	<1,0	0	1
benzo(a)pyreen	1	11	11	11
benzo(a)anthraceen	0,1	98	9,8	9,8
benzo(b)fluorantheen	0,1	<1,0	0	0,1
benzo(k)fluorantheen	0,1	<1,0	0	0,1
indeno(1,2,3-c,d)pyreen	0,1	<1,0	0	0,1
chryseen	0,01	26	0,26	0,26
acenaphteen	0,001	<1,0	0	0,001
acenaphtyleen	0,01	<1,0	0	0,01
fluorantheen	0,01	93	0,93	0,01
phenanthreen	0,001	510	0,51	0,51
pyreen	0,001	235	0,24	0,24
Totaal		973	21,9	23,1

Appendix 1. Lijst met voorgestelde TEF waarden voor polycyclische aromatische koolwaterstoffen

Stof	Nisbet Lagoy (1992) TEF	en EPA (1993) TEF	Kalberlah (1995) TEF
dibenzo(a,h)anthraceen	5	1	1
benzo(a)pyreen	1	1	1
benzo(a)anthraceen	0,1	0,1	0,1
benzo(b)fluorantheen	0,1	0,1	0,1
benzo(k)fluorantheen	0,1	0,01	0,1
indeno(1,2,3-c,d)pyreen	0,1	0,1	0,1
anthraceen	0,01		
benzo(g,h,i)peryleen	0,01		
chryseen	0,01	0,001	0,01
acenaphteen	0,001		0,001
acenaphtyleen	0,001	n.g.	0,01
fluorantheen	0,001	n.g.	0,01
fluoreen	0,001		
naphtaleen	0,001		
phenanthreen	0,001	n.g.	0,001
pyreen	0,001	n.g.	0,001

n.g.: niet geëvalueerd

DEEL 2 MEETMETHODEN

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

De beschreven methode is van toepassing op de bepaling van het gehalte aan polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK) in diervoeders, dierlijke vetten, plantaardige oliën/ vetten, vetzuren en dergelijke.

Bij de bepaling van PAK worden de volgende verbindingen bepaald:

- benzo(a)pyreen
- dibenzo(a,h)anthraceen
- benzo(a)anthraceen
- benzo(b)fluorantheen
- benzo(k)fluorantheen
- indeno(1,2,3-c,d)pyreen
- chryseen
- acenaphtyleen
- fluorantheen
- acenaphteen
- phenanthreen
- pyreen

Nadat de gehalten van de individuele verbindingen in $\mu\text{g/kg}$ product zijn berekend wordt de somparameter in $\mu\text{g BaPEQ/kg}$ product berekend. Hiertoe worden de gehalten van de individuele verbindingen omgerekend naar het gehalte aan, de meest toxische component, benzo(a)pyreen met behulp van de Toxische Equivalent Factoren (TEF) en vervolgens worden deze waarden gesommeerd. Bij producten met een percentage vet $<2\%$ wordt het gehalte uitgedrukt op productbasis en bij vetpercentages $>2\%$ op vetbasis. Voordat het onderzoek wordt aangevangen dient aan de hand van het gemeten vetpercentage of aan de hand van productkennis besloten worden tot welke categorie het product behoort

Wellicht beter: Dierlijke produkten, alsmede dierlijke en plantaardige vetten en vetzuren worden gerapporteerd op vetbasis. Andere diervoedergrondstoffen en complete diervoeders op produktbasis. Een uitzondering vormen dierlijke produkten met een vetpercentage kleiner dan 2% die eveneens op produktbasis worden gerapporteerd.

2 PRINCIPE

Alle monstertypen met uitzondering van vetzuren worden verzeept met ethanolische loog en vervolgens geëxtraheerd met cyclohexaan. Vetzuren worden geëxtraheerd via een cafeïne-mierenzuur complexering. De via een silicagel clean-up verkregen extracten worden gemeten met GC/MS of HPLC/Fluorescentie. De gekozen methode dient voordat deze toegepast gaat worden voor het analyseren van "echte" monsters gevalideerd te worden. In bijlage 4 is een validatietraject beschreven.

Opmerking 1:

Bij gebruik van een zeer gevoelige meetsysteem (b.v. hoge resolutie massaspectrometer of bij een Time Of Flight massaspectrometer) kan de in bewerking genomen hoeveelheid monster en de gebruikte chemicaliën interne standaarden etc. met factor 20 verminderd worden.

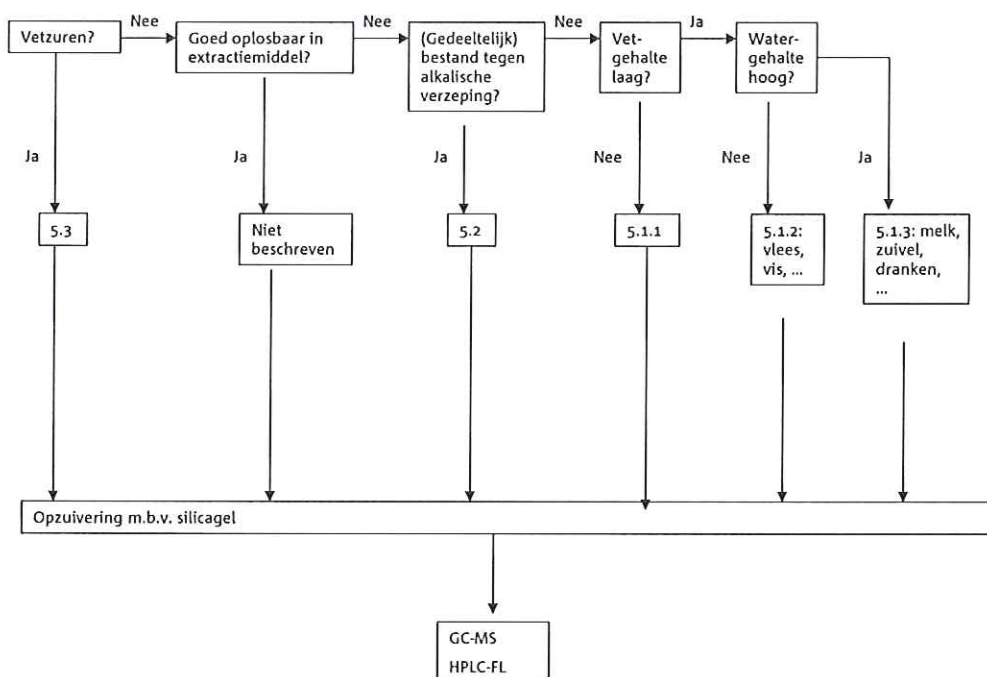
Opmerking 2:

De meting met behulp van HPLC/Fluorescentie is niet geschikt voor de bepaling van alle geselecteerde verbindingen. Acenaphtyleen vertoont geen fluorescentie en wordt derhalve niet gemeten. Voor met name de vluchtige verbindingen zoals acenaphteen treden tijdens de opwerking verliezen op waarvoor, in tegenstelling tot bij de GC-MS meting, niet kan worden gecorrigeerd. Er wordt dus een onderschatting gemaakt van de werkelijke waarde.

Resultaten verkregen met HPLC/FL dienen dan ook als indicatief te worden beschouwd. Monsters met een gehalte net onder de actiegrens of onder de voorgestelde norm dienen dan ook opnieuw te worden geanalyseerd met behulp van GC-MS

2.1 Beslisschema/flowschema

In onderstaand schema is aangegeven welk type monster met welke methode onderzocht kan worden



3 APPARATUUR, REAGENTIA EN MATERIALEN

3.1 Reagentia

3.1.1 *Reagentia voor de extractie en clean-up*

- Aceton. p.a.
- Acetonitril, HPLC grade
- Cyclohexaan gedestilleerd of gelijkwaardig.
- Dichloormethaan
- Hexaan
 - Voeg aan 3 l cyclohexaan p.a. ongeveer 50 g kaliumhydroxide toe en destilleer met 10% voor- en 10% naloop.
- Ethanol 96%, gedestilleerd of gelijkwaardig.
 - Voeg aan 3 l ethanol technisch zuiver ongeveer 50 g kaliumhydroxide toe en destilleer met 10% voor- en 10% naloop.
- Ethanolische kaliumhydroxide oplossing 2 M.
 - Los 112 g kaliumhydroxide op in 100 ml water en verdun dit tot 1 l met gedestilleerde ethanol. Deze oplossing moet iedere dag vers bereid worden.
- Ethanolische kaliumhydroxide oplossing 1 M.
 - Los 56 g kaliumhydroxide op in 100 ml water en verdun dit tot 1 l met gedestilleerde ethanol. Deze oplossing moet iedere dag vers bereid worden.
- Kaliumhydroxide p.a.
- Silicagel, ICN 63- 200 mesh, Activ 60A (ICN Biomedicals).
- Water gedemineraliseerd of van minstens dezelfde zuiverheid.
- Stikstof, zuiver
- Mierenzuur
 - Maak een 40%-ige en een 90%-ige oplossing in demiwater.
- Natriumchloride
 - Maak een 2%-ige oplossing in demiwater.
- Caffeine-mierenzuuroplossing
 - 150g cafeïne aangevuld naar 1 liter met 90% mierenzuuroplossing.
- Gegloeide natriumsulfaat (24 uur bij 160°C)

3.1.2 *Reagentia voor de HPLC bepaling*

- Milli Q water: Weerstand: > 10 mΩ cm.
- Acetonitril, Uvasol
- Acetonitril, Pestiscan
- PAK standaardoplossingen in acetonitril.

Moederstandaardoplossingen:

Bij voorkeur moeten gecertificeerde standaarden gebruikt worden.

Van de onderstaande PAK's wordt uitgaande van zuiver (min.98%) vast product, gravimetrisch een stockoplossing van ongeveer 100 µg/ml in acetonitril bereid.

benzo(a)pyreen

dibenzo(a,h)anthraceen

benzo(a)anthraceen

benzo(b)fluorantheen
benzo(k)fluorantheen
indeno(1,2,3-c,d)pyreen
chryseen
acenaphtyleen
fluorantheen
acenaphteen
phenanthreen
pyreen

Een gecertificeerde mengstandaard SRM 1647D is verkrijgbaar. Deze mengstandaard bestaat uit de 16 EPA verbindingen in een concentratie van 1-20 µg/ml in acetonitrile. Van deze mengstandaard worden slechts de bovengenoemde verbindingen gebruikt voor kwantificering. De concentratie in deze mengstandaard in microgram/ml is als volgt:

fluorentheen	7.78
pyreen	8.38
B(a)A	3.94
Chryseen	3.69
B(b)F	4.16
B(k)F	4.70
B(a)P	4.92
dibenz(a,h)A	3.64
B(ghi)P	3.76
I[1,2,3-cd]P	4.37

- weeg nauwkeurig ca. 0.8 gram af in een maatkolpje van 25 ml en vulden aan tot de streep. Rekenden de concentratie uit voor elke PAK (m.b.v. het certificaat) en verdunnen vervolgens de verkregen oplossing als volgt: 0.5 ml; 1.0 ml; 2.0 ml; 3.0 ml; 4.0 ml; 5.0 ml naar 50 ml ACN.

Opmerking:

De hierboven aangegeven verdunningreeks zal in vele gevallen voldoen. Afhankelijk van de gevoeligheid van de detector en het gewenste meetbereik kunnen andere verdunningsreeksen gemaakt worden

3.1.3 Reagentia voor de GC/MS bepaling

Opmerking:

De hieronder beschreven werkwijze vertrekt van vaste producten waarbij de moederstandaarden zelf aangemaakt worden. In de handel zijn echter reeds bereide en gecertificeerde PAK mengsels verkrijgbaar.

- Standaardoplossingen voor GC-MS bepaling

Moederstandaardoplossingen:

Natieve PAK's : (niet gedeutereerde standaarden)

Bij voorkeur moeten gecertificeerde standaarden gebruikt worden.

Interne standaarden:

Van de onderstaande isotoop-gemerkte PAK's wordt uitgaande van zuiver (min.98%) vast product, gravimetrisch een stockoplossing van ongeveer 100 µg/ml in n-nonaan of een ander alkaan of toluen bereid.

D8-acenaphtyleen
D10-acenaphteen
D10-phenanthreen
D10-fluorantheen
D10-pyreen
D12-benzo(a)anthraceen
D12-chryseen
D12-benzo(b)fluorantheen
D12-benzo(k)fluorantheen
D12-benzo(a)pyreen
D12-indeno(1,2,3,c,d)pyreen
D14-dibenzo(a,h)anthraceen

▪ *Recovery standaard :*

Van D10-anthraceen of een andere isotoop gemerkte PAK wordt rechtstreeks, uitgaande van zuiver (min.98%) vast product, gravimetrisch een werkoplossing van ongeveer 100 µg/ml in n-nonaan of een ander alkaan of toluen bereid.

Opmerking:

M.b.t. de houdbaarheid van de standaarden is nonaan als oplosmiddel de beste keuze. In geval van groot-volume injectie kan het gebruik van meer vluchtige alkanen echter meer aangewezen zijn.

De moederstandaardoplossingen zijn max. 2 jaar houdbaar en moeten koel bewaard worden bij ± 4°C.

Werkoplossingen:

• *Interne standaard-werkoplossing (IS doseringsstandaard):*

Door menging van de individuele hoofdstandaardoplossingen van de deuterium-gemerkte PAK's wordt gravimetrisch een interne standaard-werkoplossing bereid met een concentratie van ongeveer 10 µg/ml van elk van de interne standaarden in n-nonaan of een ander alkaan of.

• *Standaard-werkoplossingen voor controle van de responslineariteit*

Uitgaande van de hoofdstandaardoplossingen van de natieve en deuterium gemerkte PAK's worden gravimetrisch minstens 5 standaard-werkoplossingen in n-nonaan of een ander alkaan of toluen bereid die de te analyseren PAK's bevatten in oplopende concentraties van 0.02 tot 5 µg/ml en de interne standaarden in een constante concentratie van ongeveer 1 µg/ml.

• *Standaard-werkoplossing voor GC-MS kalibratie:*

Voor de bepaling van de relatieve responsfactoren wordt gebruik gemaakt van een standaard-werkoplossing in n-nonaan of een ander alkaan of toluen die de te analyseren PAK's en de

deuterium-gemerkte PAK's (interne standaarden en 'recovery'-standaard) bevat in een concentratie van ongeveer 1 µg/ml. (Opmerking 11.3)

4 MONSTERONTVANGST EN -VOORBEREIDING

Het monster moet zeer homogeen zijn alvorens substalen te nemen. PAK's kunnen geëxtraheerd worden uit natte en gedroogde monsters maar bewaren, homogeniseren en extractie is eenvoudiger met gedroogde monsters.

Het drogen van monsters bij kamertemperatuur of hogere temperaturen, zowel als vriesdrogen, kan de concentraties wijzigen, vb. door contaminatie of verlies van componenten door evaporatie (Law *et al.*, 1994).

4.1 Vetbepaling (wanneer aan de orde)

PAK-data worden gewoonlijk niet uitgedrukt op vetbasis. De bepaling van het vet in de weefsels kan evenwel interessant zijn, bijvoorbeeld om het weefsel te karakteriseren. Het vetgehalte wordt het best bepaald op een apart submonster. Het totaal vetgehalte kan bepaald worden met de methode van Bligh en Dyer (1959) of een equivalente methode.

Bij de vetbepaling volgens Bligh en Dyer wordt het vet, zowel vrij als gebonden uit het monster geëxtraheerd met een systeem van chloroform, methanol en water.

Het gehalte kan ook bepaald worden conform NEN 3148 (1965), NEN-ISO 6492 (1999) (zie ook www.nni.nl <<http://www.nni.nl>> normshop, ics code diervoeders 65.120)

4.2 Bepaling van het percentage droge stof

Het kan soms nuttig zijn PAK-data uit te drukken op drooggewichtbasis. Dit kan eveneens gebeuren op een apart substaal van het homogenaat dat gedroogd wordt tot constante massa bij 105°C. Het percentage droge stof kan bepaald worden conform NEN 3327 (1966), NEN 5397 (1982), NEN-EN-ISO 6865 (2001). (zie ook www.nni.nl <<http://www.nni.nl>> normshop, ics code diervoeders 65.120)

4.3. Toevoegen van de interne standaarden

Aan die monsters welke met GC-MS gemeten worden dient voor de extractie een bekende hoeveelheid van het interne standaardmengsel. Voeg aan 10 gram monster 40 µl van de Interne standaard-werkoplossing (IS doseringsstandaard) met een concentratie van 10 µg/ml toe (3.1.3)

5 EXTRACTIE

5.1 Extractie van voedingsmiddelen die niet of slechts gedeeltelijk oplosbaar zijn in het extractiemiddel, maar met alkali homogeen verzeepbaar

- Directe verzeping met ethanolische KOH (olie, vet, chocolade, etc.)

- Weeg 10 gram monster af in een erlenmeyer van 500 ml.
- Reflux gedurende 2 uur met 100 ml 2 molair ethanolische KOH (ethanol/water, 9/1,v/v).
- Voeg door de koeler 200 ml cyclohexaan toe en laat de oplossing nog 10 minuten koken. De kookplaat kan alvast uitgezet worden.
- Voeg door de koeler 200 ml 1 molair ethanolische KOH toe.
- Spoel de hals van de erlenmeyer met enkele milliliters water en sluit af met een glazen stop.
- Laat de oplossing 1 nacht staan om een goede scheiding tussen de water- en de cyclohexaan laag te krijgen.
- Neem 100 ml van de cyclohexaan laag en damp in tot ca. 2 ml. (zie opmerking 11.4)
- Werk op een zelfde wijze tenminste één chemicaliën blanco op.

Reinig het extract met behulp van silicagel kolomchromatografie (6).

5.1.2 *Aanpassing voor matrices met een lager vetgehalte zoals vlees, vis, etc.*

- Weeg 10 gram monster af in een erlenmeyer van 300 ml.
- Reflux gedurende 2 uur met 50 ml 2 molair ethanolische KOH (ethanol/water, 9/1,v/v).
- Voeg door de koeler 100 ml cyclohexaan toe en laat de oplossing nog 10 minuten koken. De kookplaat kan alvast uitgezet worden.
- Voeg door de koeler 100 ml water toe.
- Spoel de hals van de erlenmeyer met enkele milliliters water en sluit af met een glazen stop.
- Laat de oplossing 1 nacht staan om een goede scheiding tussen de water- en de cyclohexaan laag te krijgen.
- Neem 50 ml van de cyclohexaan laag en damp in tot ca. 2 ml. (zie opmerking 11.4)
- Werk op een zelfde wijze tenminste één chemicaliën blanco op.

Reinig het extract met behulp van silicagel kolomchromatografie (6).

5.1.3 *Aanpassing voor matrices met een laag vetgehalte en een hoog watergehalte zoals melk, zuivel, dranken, (vloeibare) rookaroma's, etc.*

- Weeg 20 gram monster af in een erlenmeyer van 300 ml.
- Voeg 6.7 g KOH pellets toe, los op.
- Voeg 100 ml ethanol toe en meng.
- Reflux gedurende 2 uur.
- Voeg door de koeler 100 ml cyclohexaan toe en laat de oplossing nog 10 minuten koken. De kookplaat kan alvast uitgezet worden.
- Voeg door de koeler 100 ml water toe.
- Spoel de hals van de erlenmeyer met enkele milliliters water en sluit af met een glazen stop.
- Laat de oplossing 1 nacht staan om een goede scheiding tussen de water- en de cyclohexaan laag te krijgen.
- Neem 50 ml van de cyclohexaan en damp in tot ca. 2 ml. (zie opmerking 11.4)
- Werk op een zelfde wijze tenminste één chemicaliën blanco op.

Reinig het extract met behulp van silicagel kolomchromatografie (6).

5.2 Extractie van voedingsmiddelen die niet oplosbaar zijn in het extractiemiddel en gedeeltelijk bestand zijn tegen alkalische verzeping

- Weeg ongeveer 8 ± 0.1 g monster af in een vooraf met aceton geëxtraheerde soxhletextractiehuls.
- Extraheer het monster in een soxhletextractor gedurende 4 uur met 200 ml aceton in een 300 ml erlenmeyer waarin enige kooksteentjes zijn gedaan. Wikkel de erlenmeyer tijdens de extractie in aluminiumfolie (zie Opmerkingen: 11.2)
- Damp vervolgens de aceton voorzichtig (kookvertraging) af, met behulp van een rotatiefilmverdamer bij circa 40 °C. Er mag geen aceton meer te ruiken zijn.
- Voeg aan het residu 100 ml 1 M ethanolische loog toe en laat het geheel in 2 uur verzeppen onder refluxen.
- Vervolg met de procedure zoals beschreven onder 5.1.2.

5.3 Extractie van vetzuren d.m.v. complexering m.b.v. cafeïne en mierenzuur/ extractie met cyclohexaan

Opmerking:

Bij de hieronder beschreven methode wordt het aanbevolen om de eerste stappen tot aan verzamel de t.b.v. een snellere scheiding bij iets verhoogde temperatuur uit te voeren. Warm houden kan eenvoudig m.b.v. (een bak met) warm water.

- Weeg 10 g olie of vet in een erlenmeyer van 100 ml.
- Breng het monster over in een scheitrechter van 250 ml met behulp van 40 ml cyclohexaan.
- Schud tot een homogene oplossing is ontstaan.
- Spoel de hals van de scheitrechter met enige milliliters cyclohexaan.
- Schud de cyclohexaan driemaal uit met 20 ml mierenzuur (90%).
- Schud de cyclohexaan krachtig gedurende twee minuten met 20 ml 90 % cafeïnemierenzuur oplossing.
- Herhaal deze stap met 12 ml 90 % cafeïnemierenzuur oplossing.
- Verzamel de cafeïnemierenzuur fracties in een scheitrechter van 1000 ml.
- Voeg 300 ml van een 2% NaCl oplossing toe en schud krachtig.
- Extraheer de waterige laag twee maal gedurende twee minuten met 50 ml cyclohexaan.
- Verzamel de cyclohexaan in een scheitrechter van 250 ml.
- Was de cyclohexaan twee maal met 30 ml mierenzuur (40%).
- Voeg voorzichtig 2.5 g gegloeide natriumsulfaat toe aan de cyclohexaan.
- Decanteer de cyclohexaan in een 250-ml rondbodempkolf/ KD-buis.
- Spoel na met 2 x 15 ml cyclohexaan.
- Concentreer de cyclohexaan en damp de cyclohexaan in tot ca. 2 ml. (zie opmerking 11.4)
- Werk op een zelfde wijze tenminste één chemicaliën blanco op.

Reinig het extract met behulp van silicagel kolomchromatografie (6).

6 OPZUIVEREN

6.1 Voorbereiding silicagel

De silicagel wordt gedeactiveerd met 15 % water.

Pipetteer 15 ml gedestilleerd water in een droge, schone fles met schroefdop. Voeg toe 85 g verse silicagel (1 nacht gedroogd bij 130 °C). Sluit de fles en schud tot alle klonten verdwenen zijn. Om een gelijkmatige verdeling van het water te verkrijgen wordt de fles nog 2 uur op een rollenbank gerold bij een toerental van 100 rpm).

6.2 Kolomchromatografie over silicagel

Zie opmerking 11.2.

Weeg 10 g gedeactiveerde silicagel af in een bekersglasje en voeg 20 ml hexaan toe. Roer dit mengsel tot alle luchtballen eruit zijn.

Spoel het mengsel over in een chromatografiekolom en spoel de wanden na met weinig hexaan . Laat de hexaan weglopen tot net boven het silicagel-oppervlak. Breng het geconcentreerde extract verkregen volgens de procedures beschreven in paragraaf 5, met een pasterspiket over op de kolom en spoel de erlenmeyer (of K.D.-buis) 3x na met telkens 2 ml hexaan. Laat dit inzakken tot de kolom net niet droog valt. Elueer met 120 ml hexaan/dichlormethaan (80:20 v/v) Vang het eluaat op in het oorspronkelijke vat. Voer deze kolomzuivering uit in een verduisterde zuurkast (zie opmerking 11.2). Concentreer het eluaat tot enkele milliliters (zie opmerking 11.4)

7. ANALYSE VAN DE GEZUIVERDE EXTRACTEN MET BEHULP VAN HPLC

7.1 Principe HPLC-meting

De meting vindt plaats m.b.v. vloeistofchromatografie/ fluorescentie detectie. De scheiding gebeurt op een C-18 kolom en water-acetonitril gradiëntelutie. De identificatie geschiedt op grond van retentietijd.

7.2 Apparatuur en materiaal voor de HPLC-meting

- Vloeistofchromatograaf geschikt voor gradiëntelutie en voorzien van een programmeerbare fluorescentiedetector, een autosampler en een PC met sturings- en dataverwerkingsprogrammatuur.
- HPLC-kolom; Vydac 201 TP 5µm, 4.6 x 25 cm of gelijkwaardig. (de instelling van de gradiënt is weergegeven in BijlageA)

7.3 Procedure HPLC

7.3.1 *Monstervoorbewerking*

Laat het restant oplosmiddel van het in 6.2 verkregen gezuiverde extract 1 nacht in het donker aan de lucht verdampen, of verwijder het restant oplosmiddel voorzichtig met een stroompje N₂.

Neem het residu op in 1.0 ml acetonitril. Het extract kan enige dagen, in het donker, bewaard worden. Alvorens een serie monsters te injecteren wordt eerst een gradiënt zonder injectie gedraaid om de kolom te laten stabiliseren.

Daarna wordt een geschikte standaardoplossing tenminste tweemaal geïnjecteerd waarbij de golflengte als volgt zijn ingesteld (Exitatie 298 nM, Emissie 439 nM) (surveyrun). Aan de hand van deze twee surveyruns worden de schakeltijden van de fluorescentiedetector ingesteld. In bijlage A1 zijn de optimale golflengten gegeven.

Als eerste monsters van een meetserie worden de blanco's gemeten. Vervolgens worden vijf mengstandaard kalibratie-oplossingen geïnjecteerd en de ijklijn bepaald (zie 7.3.2).

Als de ijklijn lineair is (zie 9.7) en de chromatogrammen voldoen aan de gestelde criteria m.b.t. de resolutie (de piekscheiding van het slechts gescheiden piekenpaar moet minimaal 0.6 zijn en de asymetrie factor van alle analytpieken moet in de range 0.9- 1.5 liggen), worden de monsterextracten gemeten. Verdun het monster indien noodzakelijk, om een concentratie te verkrijgen die binnen het traject van de ijklijn valt. Van alle oplossingen, standaarden, blanco's en monsteroplossingen wordt 20 µl geïnjecteerd.

7.3.2 Calibratie

De kwantitatieve bepaling van de in paragraaf 1 genoemde verbindingen gebeurt volgens de externe standaard-methode. Hierbij wordt elke component in een monster gekwantificeerd ten opzichte van de ijklijn.

Minstens in het begin van elke analysereeks worden de calibratiestandaarden (3.1.2) gemeten. Verder wordt om een welbepaald aantal extracten (b.v. 5), een kalibratie-oplossing geïnjecteerd. Van elke relevante PAK-verbinding wordt het piekoppervlak gemeten. Deze ijkpunten worden gemiddeld voor elke analyt en deze waarde wordt gebruikt voor de berekening.

7.3.3 Meting

Een extract kan indien er onvoldoende scheiding wordt verkregen, om de verschillende pieken bij optimale golflengte-instellingen te meten, tweemaal gemeten worden

Programma A wordt bij meting 1 gedraaid en programma B bij meting 2. De instellingen voor beide series voor de fluorescentiedetector staan in de tabel in BijlageB.

7.3.4 Identificatie

De identificatie geschiedt door vergelijking van de retentietijden van de pieken in het monster met die van de standaard.

7.4 Berekening

Het gehalte van elke component wordt berekend volgens:

$$G = \frac{C_{st} * (H_m - H_{bl}) * E}{H_{st} * W * V}$$

- G = gehalte van de afzonderlijke PAK's (ng/g),
C_{st} = concentratie van de standaard (ng/ml),
V = verdunning van de standaard,
H_{st} = opp. PAK piek van de standaard (mV),
H_m = opp. PAK piek in monster (mV),
H_{bl} = opp. PAK piek in blanco (mV)
W = ingewogen massa (g),
E = eindvolume (ml).

8 ANALYSE VAN DE GEZUIVERDE EXTRACTEN MET BEHULP VAN GC/MS

8.1 Principe GC/MS meting

De meting vindt plaats m.b.v. een gaschromatograaf (GC), uitgerust met een massaspectrometrische detector (MS), volgens de 'selected ion monitoring' (SIM) methode. Alternatief kan, mits voldoende detecteerbaarheid en mits aanpassing van de hieronder gegeven concentraties van kalibratie- en doseringsstandaarden, in "full scan" modus gewerkt worden uitgaande van geëxtraheerde ionchromatogrammen.

De identificatie van een te bepalen polyaromaat steunt op de vergelijking van de retentietijd in het specifieke ionchromatogram van monster en kalibratie-oplossing. De kwantitatieve bepaling verloopt volgens de interne standaard-methode, waarbij gekende hoeveelheden van deuterium-gemerkte componenten als interne standaarden vóór de extractie aan het staal worden toegevoegd. Voor elk van de te analyseren polyaromaten wordt de overeenkomstige deuterium-gemerkte verbinding toegevoegd (isotoop dilutie).

Gehalten worden berekend gebruik makend van de geïntegreerde piekoppervlakken en/of piekhoogten van de meest karakteristieke ionen van de natieve verbindingen en de interne standaarden.

De kwantitatieve bepaling volgens de interne standaard-methode laat toe automatisch en accuraat de verliezen in rekening te brengen die in de extractie-, zuiverings-, indamp- en injectiestap van de analyse kunnen optreden. Door toevoegen van een zgn. 'recovery'-standaard, b.v. D10-anthraceen of een andere niet-coëluerende verbinding. Er wordt ook rekening gehouden met de kwaliteitscriteria zoals vastgelegd in de Europese Richtlijn EEG 93/256.

8.2 Apparatuur en materiaal voor de GC/MS meting

- Injectiespuiten van 50-250 µl voor het toevoegen van de interne standaard en 'recovery' standaard
- GC-MS bestaande uit een capillaire gaschromatograaf, een autosampler, een massaspectrometer en een PC met sturings- en dataverwerkingsprogrammatuur. De GC is ev. uitgerust met een PTV of on-column groot-volume injector.
- Fused silica GC-kolom met apolaire stationaire fase bv. DB5-ms, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm of gelijkwaardig.

Opmerking :

Op een apolaire fase coëlueren benzo(b)fluorantheen en benzo(j)fluorantheen enerzijds en dibenzo(a,c)anthraceen en dibenzo(a,h)anthraceen anderzijds. Alternatief kan een semipolaire kolom gebruikt worden (b.v. een 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm DB-1701 of gelijkwaardig). In dat geval co-elueert benzo(j)fluorantheen met benzo(k)fluorantheen, wat een interferentievrije bepaling van benzo(b)fluorantheen toelaat. Op basis van de simultane analyse van reële stalen op beide kolommen kan afgeleid worden dat benzo(j)fluorantheen steeds aanwezig is in een concentratie die ongeveer 40% bedraagt van de concentratie van benzo(b)fluorantheen.

8.3 Procedure GC/MS

8.3.1 Monstervoorbereiding GC-MS analyse

Werkwijze voor finale concentrering en toevoeging van de 'recovery'-standaard:

- breng het gezuiverde en tot enkele ml's teruggebrachte extract (6.2) over in een amberkleurig monsterflesje, waarin ev. vooraf 100 µl n-nonaan of toluen als 'keeper' is gebracht (spoel de buis na)
- damp het extract in naar een eindvolume van ongeveer 1 ml;
- voeg m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de 'recovery' standaard-werkoplossing toe aan het eindextract, zodanig dat de concentratie ca. 1 µg/ml bedraagt.

Het extract kan enige dagen, in het donker, bewaard worden.

Opmerking:

In geval van groot-volume injectie zijn bovenstaande handelingen niet van toepassing en wordt een in relatie met het injectievolume een aangepaste hoeveelheid recovery standaard toegevoegd (typisch wordt 1 ng recovery standaard geïnjecteerd).

8.3.2 Meting (GC/MS)

Van de extracten verkregen onder 8.3.1. en van de standaard-werkoplossing voor GC-MS kalibratie wordt standaard 1 µl splitless of on-column in de gaschromatograaf geïnjecteerd. Alternatief kan groot-volume injectie met een PTV injector of een on-column injector met solvent vapour exit toegepast worden. De chromatografische scheiding van de componenten wordt normaal uitgevoerd op een apolaire capillaire kolom met chemisch gebonden fase. De detectie van de componenten gebeurt met een lage resolutie massaspectrometer in de SIM-mode, met selectie en registratie van het moleculair ion van de te analyseren PAK's, de deuterium-gemerkte interne standaarden en de 'recovery'-standaard. Alternatief kan gebruik gemaakt worden van de full scan modus, met extractie van de voor de PAK's specifieke ionchromatogrammen. Gezien de

verminderde detecteerbaarheid in full scan modus kunnen de concentraties van de kalibratiestandaard en de doseringshoeveelheden van inwendige standaarden en recoverystandaard met een factor 10 verhoogd te worden.

De massaspectrometer wordt ingesteld naar maximale respons voor de ionen 131, 219, 264 en 414 m.b.v. het referentiegas PFTBA of gelijkwaardig.

De typische GC-MS werkvoorwaarden voor PAK-analyse zijn weergegeven in BijlageC in bijlage.

Opmerking:

Wordt een signaal waargenomen groter dan de hoogste concentratie van het (lineaire) bereik (zie hieronder) dan dient het extract verdund te worden.

8.3.3 Kalibratie (GC/MS)

De kwantitatieve bepaling van de verschillende PAK's gebeurt volgens de zgn. interne standaard-methode. Hierbij wordt elke component gekwantificeerd t.o.v. de deuterium-gemerkte overeenkomstige verbinding die bij het begin van de extractie of bij het begin van de zuivering aan het monster werd toegevoegd.

Minstens in het begin en aan het einde van elke analysereeks, en verder om een welbepaald aantal extracten (b.v. 5), wordt de kalibratie-oplossing geïnjecteerd. Van elke PAK, natief of gemerkt, wordt de piekoppervlakte in het ionchromatogram van het karakteristieke ion gemeten, en dit zowel voor de kalibratie-oplossingen als voor de monsterpreparaten. Relatieve responsfactoren voor elke te bepalen component worden vervolgens bepaald uit de verhouding van de oppervlakten van de natieve componenten en de overeenkomstige interne standaarden (zie verder 7.2). Voor de interne standaarden worden relatieve responsfactoren bepaald t.o.v. de 'recovery'-standaard.

8.3.4 Identificatie (GC/MS)

De aanwezigheid van natieve PAK's in de monsters wordt bevestigd op basis van de onderstaande gegevens en criteria:

- de registratie van een piek bij de karakteristieke m/z, met piekhoogte groter dan 3 keer de ruishoogte.
- de retentietijd van de waargenomen piek in het ionchromatogram van de natieve PAK, waarbij een afwijking van maximaal 10 sec t.o.v. de retentietijd voor de deuterium gemerkte PAK wordt gehanteerd (deuterium gemerkte PAK's elueren ca 5 sec vroeger dan de natieve PAK's).

De identificatie van interne standaarden is eveneens gebaseerd op de karakteristieke m/z en de signaal/ruis verhouding, en verder op de elutievолgorde zoals experimenteel vastgelegd.

Van de geïdentificeerde pieken wordt de oppervlakte of alternatief de piekhoogte bepaald.

In bijlage C zijn de karakteristieke m/z van de natieve en gemerkte PAK's weergegeven,

8.4 Berekeningen (GC/MS)

Interne kalibratie

Relatieve responsfactoren

Op basis van de geïntegreerde piekoppervlakken van de native PAK component en de overeenkomstige interne standaard in de resp. ionchromatogrammen van de kalibratie-oplossing wordt voor elke PAK-component de relatieve responsfactor (RRF) op de volgende wijze berekend :

$$RRF_i = \frac{A_i \cdot C_{IS}}{A_{IS} \cdot C_i}$$

met

RRF_i = relatieve responsfactor van PAK-component i

A_i = piekoppervlakte van PAK-component i bij injectie van de kalibratie-oplossing

C_i = concentratie (in ng/μl) van PAK-component i in de kalibratie-oplossing

C_{IS} = concentratie (in ng/μl) van de overeenkomstige interne standaard in de kalibratieoplossing

A_{IS} = piekoppervlakte (piekhoogte) van de overeenkomstige interne standaard bij injectie van de kalibratie-oplossing

Voor de bepaling van de PAK-gehalten in een monster wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van de gemiddelde RRF-waarden berekend, uitgaande van twee injecties van de kalibratie-oplossing, nl. de laatste voorafgaand aan en de eerste volgend op het monsterpreparaat.

Gehalte van de PAK-componenten in het monster

Gebruik makend van de geïntegreerde piekoppervlakten (piekhoogten) van de PAK-component en de overeenkomstige interne standaard in de resp. ionchromatogrammen van het monsterpreparaat en rekening houdend met de relatieve responsfactor van de beschouwde PAK-component, kan de concentratie van de PAK-component in het monster als volgt berekend worden :

$$C_i = \frac{A_i \cdot g_{IS}}{A_{IS} \cdot \langle RRF_i \rangle \cdot G \cdot 1000}$$

met

C_i = het gehalte in mg/kg van PAK-component i in het monster

A_i = piekoppervlakte van de PAK-component i bij injectie van het preparaat

A_{IS} = piekoppervlakte van de overeenkomstige interne standaard bij injectie van het preparaat

g_{IS} = hoeveelheid in ng van de overeenkomstige interne standaard toegevoegd aan het monster

$\langle RRF_i \rangle$ = de gemiddelde relatieve responsfactor voor PAK-component i uitgaande van twee injecties van de kalibratie-oplossing, voorafgaand aan en volgend op het monsterpreparaat
G = ingewogen massa (g)

Opmerking:

Zoals hierboven vermeld coëlueert op apolaire kolommen benzo(j)fluorantheen met benzo(b)fluorantheen en worden beide verbindingen dus samen gemeten. Men rapporteert benzo(b)fluorantheen+benzo(j)fluorantheen.

9 KWALITEITSCONTROLE (GC/MS EN/OF HPLC/FL METING)

Hieronder zijn een aantal kwaliteitscontroles beschreven. Per onderdeel is aangegeven voor welke meettechniek deze controles relevant zijn

9.1. Responslineariteit (GC-MS)

Uitgaande van minimaal 5 standaardoplossingen met verschillende concentraties aan PAK-verbindingen, en in geval van interne kwantificatie met een vaste concentratie aan inwendige standaarden, en vertrekkend van tienmaal de minimum detecteerbare hoeveelheid (zie hieronder), wordt de lineariteit van de detectorrespons gecontroleerd.

In geval van interne kwantificatie wordt de verhouding van de detectorrespons van de PAK-component en de overeenkomstige inwendige standaard uitgezet ten opzichte van de verhouding van de concentratie van de PAK-componenten en de inwendige standaard.

Voor elke PAK-verbinding dient een rechte berekend te worden waarvan de variatiecoëfficiënt V_{xo} (zie ISO-8466-1990:1) kleiner is dan of de determinatiecoëfficiënt groter is dan een vooropgestelde waarde (b.v. $V_{xo} < 15\%$, $r > 0.99$).

Bijkomend dient men C_i/A_i uit te zetten i.f.v. C_i of $(A_i \cdot C_{IS})/(A_{IS} \cdot C_i)$ i.f.v. C_i . Het lineair bereik wordt gedefinieerd als dat gebied waarvoor de afwijking van C_i/A_i of $(A_i \cdot C_{IS})/(A_{IS} \cdot C_i)$ t.o.v. de gemiddelde waarde maximaal 15 % bedraagt.

Een controle van de lineariteit wordt uitgevoerd bij elke ernstige instrumentele ingreep.

Opmerking:

Wanneer de piekoppervlakte voor een bepaalde component in een geïnjecteerd monster-extract hoger is dan de hoogste oppervlakte die bij de recentste lineariteitstest of bij de opstelling van de kalibratierechte werd bekomen dient een hermeting te gebeuren op het oorspronkelijke extract na verdunning.

9.2 Specificiteit (GC/MS)

In geval van GC-MS analyse wordt de kolomkwaliteit geverifieerd aan de hand van de scheiding van het kritische paar benzo(b)fluorantheen en benzo(k)fluorantheen in het chromatogram van de kalibratie-oplossing. Het gaschromatografisch scheidingspercentage ($100 \times$ hoogte vallei / hoogte hoogste piek) dient, bij gebruik van een 30 m apolaire kolom, kleiner te zijn dan 60 %.

9.3 Gevoeligheid (GC-MS en HPLC/FL)

De minimum detecteerbare hoeveelheid is een maat voor de gevoeligheid van het apparaat. Aan de hand van de signaal-ruisverhouding geregistreerd voor de PAK verbindingen in het chromatogram van de kalibratiestandaardoplossing kan de gevoeligheid van het toestel geverifieerd te worden. Deze moet van die aard zijn dat zonder problemen de gevraagde rapporteergrens kan gehaald worden.

Dit moet voor iedere serie gecontroleerd worden.

9.4 Responsfactoren en relatieve responsfactoren (GC-MS)

In geval van interne kalibratie worden relatieve responsfactoren bepaald aan de hand van een kalibratie-oplossing uit het middengebied van het lineair bereik. Binnen een zelfde analysereeks dient gecontroleerd te worden in hoeverre de relatieve responsfactoren berekend voor twee opeenvolgende injecties van de kalibratie-oplossing, met tussentijdse injectie van tenminste één monsterextrakt, van elkaar afwijken. Voor elke PAK moet de verhouding RRF_1/RRF_2 tussen 0.85 en 1.15 liggen. Bij voorkeur wordt het gemiddelde van 2 relatieve responsfactoren genomen voor de berekening van de gehalten van een tussenliggende reeks monsters.

9.5 Blanco (GC-MS en HPLC/FL)

Bij elke analysereeks wordt tenminste één procedureblanco bepaald. Hierbij wordt de volledige analyseprocedure gevolgd, doch zonder inname van monster. Het geregistreerde chromatogram dient vrij te zijn van interfererende pieken groter dan 10% van de pieken geregistreerd voor het monster met uitzondering van monsterwaarden kleiner dan 5 maal de gevraagde rapporteergrens, waarvoor de interfererende pieken niet groter mogen zijn dan de helft van de gevraagde rapporteergrens.

9.6 Controlemonster (GC-MS en HPLC/FL)

Op regelmatige basis wordt een controlemonster meegenomen.

Van minstens 3 PAK's verspreid over het gehele retentietijdsgebied worden de gehalten opgetekend in controlekaarten, samen met de som van het gehalte van alle PAK's. De opgetekende waarden moeten voldoen aan de voor controlekaarten geldende criteria.

Opmerking:

Bij de validatie wordt i.f.v. de matrix gebruik gemaakt van een gecertificeerd referentiemateriaal (tenzij dit niet beschikbaar zou zijn). Voor de controle van de juistheid en reproduceerbaarheid van de dagelijkse analyses mag gebruik gemaakt worden van een gedopeerd monster of in het slechtste geval een onafhankelijke controlestandaard.

9.7 Recuperatierendementen van de interne standaarden (GC-MS)

Wordt gebruik gemaakt van de interne kwantificatiemethode dan kunnen aan de hand van het signaal geregistreerd voor de interne standaarden en de recovery standaard voor elk monster de recuperatierendementen van de interne standaarden bepaald worden:

$$R\% = \frac{A_{IS} \cdot g_{RS} \cdot 100}{A_{RS} \cdot g_{IS} \cdot RRF_{IS}}$$

met

$R\%$ = recuperatierendement (in %)

A_{IS} = piekoppervlakte van de interne standaard bij injectie van het preparaat

A_{RS} = piekoppervlakte van de 'recovery' standaard bij injectie van het preparaat

g_{RS} = hoeveelheid (in ng) van de 'recovery'-standaard toegevoegd aan het preparaat bij het einde van de opwerking

g_{IS} = hoeveelheid (in ng) van de interne standaard toegevoegd aan het monster

$\langle RRF_{IS} \rangle$ = gemiddelde relatieve responsfactor van de interne standaard t.o.v. de 'recovery'-standaard, uitgaande van twee injecties van de kalibratie-oplossing, voorafgaand en volgend op het monsterpreparaat

Verantwoorde kwantificering is slechts dan toegelaten indien het recuperatierendement van de afzonderlijke inwendige standaarden minimaal 50 % bedraagt.

10 RAPPORTERING

Naast de gehalten voor de individuele congenen in $\mu\text{g/kg}$ product wordt ook de somparameter in $\mu\text{g BaPEQ/kg}$ vet of product berekend. Hiertoe worden de gehalten van de individuele congenen omgerekend naar het gehalte aan, de meest toxische component, benz(a)pyreen met behulp van de Toxische Equivalent Factoren (TEF) (zie tabel 1 deel 1) en vervolgens zijn deze waarden gesommeerd.

Bij overschrijding van de actiegrens van $15 \mu\text{g BaPEQ/kg}$ wordt nader onderzoek gestart naar de bron van de besmetting. Bij overschrijding van de norm van $50 \mu\text{g BaPEQ/kg}$ mag het product niet gebruikt worden bij de bereiding van diervoeder.

11 ALGEMENE OPMERKINGEN

11.1 Afval van reagentia, reactieproducten en oplosmiddelen moet worden afgevoerd in speciale containers conform de locatieregeling.

PAK's worden ervan verdacht kankerverwekkende eigenschappen te hebben. Contact met de huid van vaste stof, extracten en oplossingen van PAK's moet vermeden worden.

11.2 Omdat PAK's onder invloed van UV licht snel afbreken moeten alle monsters, eventuele vaste standaardstoffen, standaardoplossingen en extracten zoveel mogelijk in het donker bewaard worden.

Tijdens het werk op tafel moet zonlicht geweerd worden. Tijdens het verzepen en de soxhletextractie dienen de erlenmeyers in aluminiumfolie gewikkeld te worden.

De silicagelzuivering is een kritische stap in de analyse. PAK's geadsorbeerd aan silicagel zijn zeer gevoelig voor foto-oxidatie. De kolomzuivering dient daarom snel en in een verduisterde zuurkast uitgevoerd te worden.

11.3 De mengstandaardenkalibratie-oplossingen zijn ongeveer 1 jaar houdbaar, mits goed afgesloten en in het donker bewaard.

- 11.4 Het indampen van het cyclohexaan extract kan desgewenst ook met behulp van Kuderna-Danish apparatuur of Gelsh waardige apparatuur geschieden.
- 11.5 De PAK analyse is gevoelig voor contaminatie. Soxhletthulzen worden vooraf geëxtraheerd met aceton, gedroogd en vervolgens stofvrij opgeborgen. Glaswol en kooksteentjes kunnen op deze manier gelijktijdig gereinigd worden.
- 11.6 Glaswerk moet zorgvuldig gespoeld worden met een geschikt oplosmiddel (voldoende zuivere diethylether of aceton). Speciale aandacht dient uit te gaan voor het gevaar van contaminatie uit rotatiefilmverdamper en refluxkoelers. Let op bij het gebruik van pipetteerballonnen/ pipettors en perslucht (droogblazen van glaswerk).
- 11.7 Voer altijd (voldoende) chemicaliënblanco's uit.
- 11.8 Solventen voor de HPLC analyse moeten goed ontgast zijn, vb. door continue ontgassing van de solventreservoirs met helium vóór en tijdens gebruik of vacuumontgassing, om twee redenen: een optimale werking van de hoge drukpomp(en) garanderen en 'quenching' effecten van fluorescentiesignalen (vb. van pyreen) door zuurstof te voorkomen. Polytetrafluorethylene (PTFE) leidingen moeten niet gebruikt worden stroomafwaarts van de solventtanks omdat dit materiaal zuurstofdoorlatend is. Roestvrij staal of polyetheretherketone (PEEK) is aangeraden.
Bij de opwerking van vetzuren wordt aanbevolen om zowel de vloeistof, het monster als het glaswerk tot aan de complexering warm wordt gehouden. Warm houden is niet vereist, maar kan nuttig zijn t.b.v. een snellere scheiding. Warm houden kan eenvoudig m.b.v. (een bak met) warm water.

12 LITERATUUR

- 1 Law *et al.*, 1994.
Bligh en Dyer (1959)
- 2 Jacob, J., en G. Grimmer
Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples in IARC publications 29. Environmental Carcinogens, Selected methods of analysis Vol. 3 pg 79, Intern. Agency for Research on Cancer, Lyon France (1979)
- 3 Grimmer, G., Böhne, M., Polycyclic aromatic hydrocarbon profile analysis of high-protein foods, oils and fats by gas chromatography, J.Ass.Off. Analyt. Chem. 58, 725- 733.

Bijlage A HPLC gradiënt instellingen voor de bepaling van PAK's (Gradiëntprogramma)

Step	Time	Flow	%A Water	%B ACN
0	0	1.00	50.0	50.0
1	2.0	1.00	50.0	50.0
2	30.0	1.00	0.0	100.0
3	15.0	1.00	0.0	100.0
4	5.0	1.00	50.0	50.0
5	5.0	1.00	50.0	50.0

Bijlage A1: geoptimaliseerde excitatie- en emissiegolflengten voor PAK's^{*1}

PAK	λ_{ex} nm	λ_{em} nm
acenaphteen	292	324
Fluorantheen	360	460
Pyreen	336	376
Benz(a)anthraceen	288	390
Chryseen	268	383
Benzo(b)fluorantheen	300	436
Benzo(k)fluorantheen	308	414
Benzo(a)pyreen	296	408
Benzo(g,h,i)peryleen	300	410
Dibenzo(a,h)anthraceen	297	398
Indeno(1,2,3,c,d)pyreen	302	506

*1 Ontleend aan NEN 5771

Bijlage B HPLC instellingen voor de bepaling van PAK's bij tweemaal meten
(instelling van de detectoren)

Prog	Tijd in min.	λ_{em}	λ_{ex}
1	t ₁	280	334
	t ₂	280	340
	t ₃	292	366
	t ₄	360	460
	t ₅	288	390
	t ₆	305	430
	t ₇		
2	t ₁	280	334
	t ₂	280	340
	t ₃	253	402
	t ₄	336	376
	t ₅	288	390
	t ₆	295	427
	t ₇	302	506

Bijlage C Typische GC-MS werkvoorwaarden voor de bepaling van PAK's

Kolomspecificaties : DB-5MS of equivalent, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

GC-instellingen

Draaggas en druk : Helium, 75 kPa
 Injectiemodus : Splitless (purge on na 1 min)
 Split vent : 30 ml / min
 Septum purge : 1 ml / min
 Injectievolume : 1 µl
 Injectietemperatuur : 300°C
 Interfacetemperatuur : 275°C

MS-instellingen

Brontemperatuur : 250°C
 Electronenenergie : 70 eV
 SIM-ionen : zie tabel 1

Temperatuursprogrammatie GC-oven

125°C : isotherm gedurende 1 min
 125°C → 205°C: 20°C / min
 205°C → 305°C: 10°C / min
 305°C : isotherm gedurende 15 min
 totale duur : 30 min

m/z waarden :

<i>PAK-component</i>	<i>m/z</i>
Acenaftyleen	152
Acenafteen	154
Fluorantheen	202
Pyreen	202
Benzo(a)anthraceen	228
Chryseen	228
Benzo(b)fluorantheen	252
Benzo(k)fluorantheen	252
Benzo(a)pyreen	252
Indeno(1,2,3,c,d)pyreen	276
Dibenzo(a,h)anthraceen	278
Benzo(g,h,i)peryleen	276
d8-acenaftyleen	160
d10-acenafteen	164
D10-fluorantheen	212
D10-pyreen	212
D12-benzo(a)anthraceen	240
D12-chryseen	240
D12-benzo(b)fluorantheen	264
D12-benzo(k)fluorantheen	264
D12-benzo(a)pyreen	264
D12-indeno(1,2,3,c,d)pyreen	288
D14-dibenzo(a,h)anthraceen	292
D12-benzo(g,h,i)peryleen	288

Bijlage D

Validatie traject

Voor de validatie dienen per type matrix (dierlijke vetzuren, diervoeder) onderstaande prestatiekenmerken bepaald te worden:

Specificiteit

Het discriminerend vermogen van de methode voor de te bepalen analyten en verwante producten moet nagegaan worden. Representatieve blanco monsters moeten getest worden om het voorkomen van mogelijke interferenties en het effect van interfererende stoffen na te gaan.

Daarvoor moet een aantal blanco monsters geanalyseerd worden en nagegaan worden of geen interferenties waargenomen worden in het gebied, waar de te bepalen analyten verwacht worden. Aanvullend moeten representatieve blanco monsters belast worden met een relevante concentratie van een of meer stoffen welke kunnen interfereren voor de identificatie en/of kwantificatie

Juistheid

Voor de bepaling van de juistheid moet gebruik gemaakt worden van een gecertificeerd referentiemateriaal, waarvan het gehalte van de te bepalen componenten zo dicht mogelijk bij de geldende normwaarde aanleunt. Dit monster dient zes maal geanalyseerd te worden.

De juistheid wordt berekend met de volgende formule:

$$J (\%) = 100 \times X/W$$

Waarbij: X, het gemiddelde is van de 6 metingen;
W, de ware waarde is.

Indien geen (C)RM beschikbaar is, dient het terugvindingspercentage bepaald te worden op monsters met toevoeging van de moederstandaarden.

Terugvindingsrendement

Indien geen (C)RM beschikbaar is moet per type matrix het terugvindingspercentage bepaald worden aan de hand van belaste monsters op drie niveaus.

De volgende formule wordt gebruikt:

$$R (\%) = (X - X_{bl})/Z \times 100$$

Waarbij: Z, de toegevoegde hoeveelheid analyt is;
 X_{bl} , het gemiddelde gehalte van de analyt in het blanco monster is.

Precisie

Herhaalbaarheid: de mate van overeenstemming tussen opeenvolgende resultaten die worden verkregen met dezelfde methode bij identiek analysemateriaal en onder herhaalbaarheidsomstandigheden. De herhaalbaarheid wordt berekend op ten minste 6 metingen uitgevoerd op hetzelfde monstermateriaal. De criteria voor de herhaalbaarheid (intralaboratorium relatieve standaardafwijking VC %) bedragen de helft als deze verkregen worden met de vergelijking van Horwitz voor de interlaboratoriumvariatiecoëfficiënt.

Intrareproduceerbaarheid: de mate van overeenstemming tussen opeenvolgende resultaten die worden verkregen met dezelfde methode bij identiek analysemateriaal en onder reproduceerbaarheidsomstandigheden. Een maat voor de intrareproduceerbaarheid is de relatieve standaardafwijking (RSD %) of variatiecoëfficiënt (VC%), berekend op basis van de Horwitz-vergelijking:

$$VC \% = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Waarbij: C, het gehalte is uitgedrukt als een macht van tien.

In functie van de te detecteren gehalten dienen de volgende VC %-waarden gevonden te worden:

		1	µg / kg	→	30 %
100	µg / kg	→	23 %		
200	µg / kg	→	21 %		
1000	µg / kg	→	16 %		

Aantoonbaarheidsgrens (LOD)

De belasting van een blanco monster op het verwachte LOD-niveau moet resulteren in een signaal/ruis-verhouding die ten minste 3/1 bedraagt.

Bepaalbaarheidsgrens (LOQ)

De belasting van een blanco monster op het verwachte LOQ-niveau moet resulteren in een signaal/ruis-verhouding die ten minste 6/1 bedraagt.

Lineariteit

Het bereik van de calibratiecurve moet zodanig gekozen worden dat het representatief is voor de te verwachten concentraties van de onderscheiden analyten in de monsters.

Ten minste 5 concentratieniveaus (met inbegrip van 0) moeten gebruikt worden bij het bepalen van de curve. De curve mag niet gedwongen door het nulpunt gaan.

Het mathematisch verband van de curve en de 'goodness-of-fit' van de waarden t.o.v. de curve moet beschreven worden.

Men mag een 1- puntskalibratie gebruiken op voorwaarde dat de curve door het nulpunt gaat (niet gedwongen) en het verband lineair is.