

# commission du codex alimentarius



ORGANISATION DES NATIONS  
UNIES POUR L'ALIMENTATION  
ET L'AGRICULTURE

ORGANISATION  
MONDIALE  
DE LA SANTÉ



BUREAU CONJOINT: Viale delle Terme di Caracalla 00100 ROME Tél: +39 06 57051 | www.codexalimentarius.net Email: codex@fao.org Facsimile: 39 06 5705 4593

Point 6 de l'ordre du jour

CX/MAS 02/7-Add.1

## PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES

### COMITÉ DU CODEX SUR LES MÉTHODES D'ANALYSE ET D'ÉCHANTILLONNAGE

Vingt-quatrième session

Budapest (Hongrie), 18-22 novembre 2002

### APPROBATION DES DISPOSITIONS RELATIVES AUX MÉTHODES D'ANALYSE FIGURANT DANS LES NORMES CODEX

#### MÉTHODES D'ANALYSE POUR LA DÉTECTION DES DENRÉES ALIMENTAIRES IRRADIÉES (Proposées par la Communauté Européenne)

#### Méthodes générales du codex pour la détection des denrées alimentaires irradiées

À la demande de l'UE, le CCMAS a approuvé, lors de sa 23<sup>ème</sup> session, 5 méthodes de détection des denrées alimentaires irradiées qui ont été adoptées ultérieurement par la Commission du Codex Alimentarius, lors de sa 24<sup>ème</sup> session comme méthodes générales du Codex. Au cours de la procédure d'adoption, la Commission du Codex Alimentarius a encouragé le CCMAS à accorder plus d'importance aux méthodes validées dont l'utilisation serait appropriée dans les pays en développement.

#### Normalisation d'autres méthodes

Depuis la 23<sup>ème</sup> session du CCMAS, le Comité européen de normalisation (CEN) a normalisé 4 méthodes supplémentaires pour la détection des denrées alimentaires irradiées. Trois d'entre elles (EN 17351, EN 13783, EN 13784) devraient répondre à la demande ci-dessus de la Commission du Codex Alimentarius car elles peuvent être appliquées avec du matériel peu coûteux. En outre, le CEN a actualisé l'une des méthodes générales du Codex (EN 1788).

#### Proposition

a) La Communauté européenne demande au CCMAS d'approuver les normes suivantes comme méthodes générales du Codex:

- EN 13708:2001 Détection par spectroscopie RPE d'aliments ionisés contenant des sucres cristallisés
- EN 13751:2002 Détection d'aliments ionisés par luminescence photostimulée
- EN 13783:2001 Détection d'aliments ionisés en utilisant la technique d'épifluorescence après filtration et dénombrement de la flore aérobie sur milieu gélosé (DEFT/APC) – Méthode par criblage
- EN 13784: Test de comète d'ADN pour la détection d'aliments ionisés - Méthode par criblage

b) La Communauté européenne demande au CCMAS d'actualiser la méthode générale du Codex EN 1788:1996 en la remplaçant par

- EN 1788:2001 2001 Détection par thermoluminescence d'aliments ionisés dont peuvent être extraits des minéraux silicates – Méthode par thermoluminescence

**Annexe:** Résumé des 5 normes CEN (domaine d'application, principes, limites, fidélité et bibliographie)

## EN 13708

**Produits alimentaires — Détection par spectroscopie de RPE d'aliments ionisés contenant des sucres cristallisés****1 DOMAINE D'APPLICATION**

Cette présente norme européenne spécifie une méthode de détection de traitement ionisant appliquée à des produits alimentaires contenant des sucres cristallisés, par analyse du spectre de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) des aliments, aussi appelée Résonance Electronique du Spin [1] à [7].

Des essais interlaboratoires ont été menés à bien sur des figues, des mangues, des papayes et des raisins déshydratés [1] à [3].

**2 PRINCIPES**

La spectroscopie de RPE détecte les centres paramagnétiques (par exemple les radicaux). Ils sont dus aussi bien à l'ionisation qu'à la présence d'autres composés. Un champ magnétique externe intense permet de différencier les niveaux d'énergie des électrons de spin  $m_S = +\frac{1}{2}$  et  $m_S = -\frac{1}{2}$  en permettant l'absorption à la résonance de la fréquence micro-onde du spectromètre. Les spectres sont représentés usuellement sous forme de la dérivée première de l'absorption par rapport au champ magnétique.

Les valeurs du champ et de la fréquence des micro-ondes dépendent des conditions expérimentales (taille de l'échantillon et de son support), tandis que leur rapport (facteur g) est une caractéristique intrinsèque du centre paramagnétique et de ses interactions locales. Pour de plus amples informations, voir [1] à [7].

Les rayonnements ionisants induisent la formation de radicaux qui sont stables en pratique, et peuvent être détectés, dans les parties solides et sèches des aliments. L'intensité du signal obtenu croît avec la concentration des espèces paramagnétiques et donc avec la dose de rayonnement absorbée.

**3 LIMITES**

Bien que le processus général de formation des radicaux radio-induits soit connu, l'identification des radicaux responsables de chaque ligne des spectres observés n'est pas encore achevée. Toutefois, la relation existante entre le traitement ionisant et les signaux illustrés par le paragraphe 5 et les Figures A.2 et A.4 a été démontrée dans un certain nombre d'études [1] à [7].

Si un spectre de RPE multi-composante est une preuve d'ionisation, l'absence d'un spectre caractéristique ne constitue pas une preuve de non ionisation. Différent mono et di-saccharides peuvent être dominants dans l'échantillon et conduire après ionisation à des spectres de RPE différents. De plus, s'il n'y a pas de sucres cristallisés dans l'échantillon, l'ionisation ne conduit pas à la formation de spectres de RPE caractéristiques.

La détection des figues sèches, des mangues sèches, des papayes et raisins secs a été validée. La limite inférieure de détection dépend de la cristallinité de l'échantillon. La détection du traitement ionisant n'est pas influencé de façon significative par le stockage, au moins pendant quelques mois.

La validité des résultats obtenus avec cette méthode dépend de la présence en quantités suffisantes dans l'échantillon de sucres cristallisés, pendant toutes les étapes séparant le traitement ionisant de l'analyse. Une confirmation de la sensibilité à l'ionisation peut être obtenue, si nécessaire, en ionisant une partie de l'échantillon et en l'analysant. Il est important que les fruits déshydratés ne soient pas réhydratés avant l'analyse.

**4 FIDELITE**

Cette norme européenne repose sur deux essais interlaboratoires effectués sur des papayes et raisins secs, [1], [2] et un autre réalisé sur des mangues et figues sèches [3].

Dans un essai interlaboratoires organisé par le Bureau Communautaire de Référence (BCR) [1] et [2], 21 laboratoires devaient identifier des échantillons codés de papayes et raisins secs non ionisés ou traités à environ 0,5 à 7 kGy, voir Tableau 1.

**Tableau 1 — Données de fidélité**

Produit	Nombre d'échantillons	Nb de faux négatifs <sup>a</sup>	Nb de faux positifs <sup>b</sup>
Raisins	126	7 <sup>c</sup>	1
Papayes sèches	126	2 <sup>d</sup>	0
<sup>a</sup> Les faux négatifs sont des échantillons ionisés qui ont été identifiés comme non ionisés. <sup>b</sup> Les faux positifs sont des échantillons non ionisés qui ont été identifiés comme ionisés. <sup>c</sup> Résultats obtenus à partir de 19 échantillons ionisés à 0,5 kGy. <sup>d</sup> Résultats obtenus à partir de 21 échantillons ionisés à 0,5 kGy.			

Dans un essai interlaboratoires organisé par l'Institut fédéral allemand pour la Protection de la Santé et la Médecine Vétérinaire (BgVV) [3], 17 laboratoires devaient identifier des échantillons codés de mangues et de figes sèches non ionisés ou traités à environ 1 kGy, 3 kGy ou 5 kGy (voir Tableau 2).

**Tableau 2 — Données de fidélité**

Produit	Nombre d'échantillons	Nb de faux négatifs <sup>a</sup>	Nb de faux positifs <sup>b</sup>
Mangues sèches	184	0	0
Figes sèches	184	2	0
<sup>a</sup> Les faux négatifs sont des échantillons ionisés qui ont été identifiés comme non ionisés. <sup>b</sup> Les faux positifs sont des échantillons non ionisés qui ont été identifiés comme ionisés.			

**REFERENCES**

Veillez consulter la version anglaise pour la liste des références.

\*\*\*\*\*

ANNEXE 2

**EN 13751****Produits alimentaires - Détection d'aliments ionisés par photoluminescence****Domaine d'application**

La présente Norme européenne décrit une méthode de détection des produits ayant subi un traitement ionisant, par analyse de luminescence photostimulée (PSL). La technique décrite ici comprend un mesurage initial de l'intensité de PSL qui peut être utilisée pour des besoins de criblage ainsi qu'une méthode d'étalonnage permettant de déterminer la sensibilité de la PSL et d'aider la classification des aliments analysés. Un résultat positif de criblage doit être confirmé à l'aide de la PSL étalonnée ou d'une autre méthode normalisée (par exemple, les EN 1784 à EN 1788) ou validée.

La méthode a été appliquée avec succès lors d'essais interlaboratoires conduits sur des crustacés [1] et des aromates, des épices et des condiments. D'autres études montrent que cette méthode est applicable à une grande variété d'aliments [2], [3], [4], [5].

**PRINCIPE****GENERALITES**

Il est possible de trouver dans la plupart des aliments des débris de minéraux, généralement des silicates ou des matériaux biologiques inorganiques comme la calcite provenant des coquilles ou des exosquelettes, ou l'hydroxyapatite provenant des os ou des dents. Lorsqu'ils sont exposés à un rayonnement ionisant, ces matériaux accumulent de l'énergie grâce aux porteurs de charges qui sont piégés dans des positions structurales, interstitielles ou d'impuretés. La spectroscopie par excitation a montré que la stimulation optique de ces minéraux permettait de libérer les porteurs de charges [6], [7]. Il a été démontré par la suite que les mêmes spectres pouvaient être obtenus par photostimulation à partir d'échantillons entiers d'herbes et d'épices et d'autres aliments [2], [8], [9], [10]. Les mesurages par PSL ne détruisent pas l'échantillon, par

conséquent les échantillons entiers ou les autres mélanges de matériau organique et inorganique peuvent être mesurés de façon répétée. Cependant, les signaux de PSL diminuent si le même échantillon est mesuré à plusieurs reprises.

La méthodologie comprend les mesurages de PSL de criblage (initiale) pour établir une première classification de l'échantillon (voir 2.3) et un deuxième mesurage facultatif réalisé sur le même échantillon après l'avoir exposé à une dose déterminée de rayonnement pour confirmer la sensibilité de PSL de l'échantillon (voir 2.4).

### **PSL DE CRIBLAGE**

Pour le criblage (voir 2.3), les intensités du signal sont comparées à deux seuils (voir 2.5). La majorité des échantillons ionisés émet un signal élevé supérieur au seuil haut. Les signaux inférieurs au seuil bas laissent supposer que l'échantillon n'a pas été ionisé. Les signaux intermédiaires, situés entre les deux seuils, indiquent qu'une recherche plus approfondie est nécessaire. L'utilisation de seuils permet d'obtenir une méthode de criblage efficace qui peut être confirmée par l'étalonnage, par la thermoluminescence (TL) comme décrit dans l'EN 1788 ou une autre méthode validée, par exemple [3], [4], [8].

### **PSL ETALONNEE**

Pour l'étalonnage, l'échantillon est exposé après le mesurage de PSL initiale à une dose de rayonnement définie, puis mesuré à nouveau. Les échantillons ionisés présentent seulement une petite augmentation de l'intensité de la PSL après cette exposition au rayonnement, alors que les échantillons non ionisés présentent généralement une augmentation importante du signal de la PSL après l'ionisation d'étalonnage.

### **LIMITES**

La méthode par PSL peut, en principe, être appliquée à la détection de l'ionisation de tout aliment contenant des débris de minéraux. La sensibilité par PSL d'un échantillon dépend des quantités et des types de minéraux présents dans l'échantillon individuel. Les signaux en dessous du seuil bas (T1) sont généralement associés à une matière non ionisée, mais peuvent être obtenus à partir d'aliments ionisés de faible sensibilité. L'étalonnage peut aider à distinguer ces cas. Il convient que les échantillons de faible sensibilité (signaux négatifs ou intermédiaires après étalonnage) fassent l'objet d'une recherche plus approfondie par analyse de la TL ou par une autre méthode validée ou normalisée.

En général, les mesurages par PSL étalonnée sont recommandés pour les crustacés à faible teneur en minéraux et les épices "propres" (par exemple, les noix de muscade, le poivre blanc et le poivre noir moulus) pour éviter les résultats négatifs erronés.

Les meilleurs résultats sont obtenus à partir des produits non mélangés. Les aliments composés, par exemple, le curry et les mélanges peuvent contenir des débris présentant une large plage de sensibilité par PSL, auquel cas la PSL étalonnée risque de fournir des résultats ambigus.

La présence de sel dans un produit peut dominer l'intensité par PSL au point de masquer les signaux émis par les ingrédients ionisés restants. Une hydratation du produit suivie d'un nouveau mesurage peut à la fois permettre d'identifier le problème et de rectifier la situation.

### **VALIDATION**

Dans le cas des crustacés, la méthode a été soumise à un petit essai interlaboratoire organisé par le SURRC pour le compte du Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (MAFF : Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) [1] entre 5 laboratoires participants. Chacun d'entre eux a analysé en aveugle 10 échantillons ionisés et 5 échantillons non ionisés provenant de 5 espèces vivant en eau chaude et en eau froide. Les 10 échantillons ionisés étaient composés d'un crustacé de chaque espèce exposé à chacune des deux doses de rayonnement (0,5 kGy et 2,5 kGy). Il a été demandé aux participants de mesurer six aliquotes d'échantillons entiers et six fractions aliquotes d'intestins pendant 60 s et d'utiliser à chaque fois les deux résultats les plus élevés pour prendre des décisions qualitatives de criblage relatives aux seuils de  $T1 = 1000$  dénombrements/60 s et  $T2 = 4000$  dénombrements/60 s. Sur cette base, la totalité des 75 classifications était correcte. Les mesurages par PSL étalonnée ont été ensuite réalisés en négligeant les aliquotes de faible sensibilité. Des résultats qualitatifs identiques ont été obtenus à la fois par les mesurages par PSL de criblage et les mesurages par PSL étalonnée.

Dans un autre essai interlaboratoire plus important organisé par le SURRC pour le compte du MAFF [5], 9 participants ont soumis à essai 40 aromates, épices et condiments et 4 mélanges ionisés avec une dose maximale de 10 kGy, des seuils de  $T1 = 700$  dénombrements/60 s et  $T2 = 5000$  dénombrements/60 s et des temps de mesurage de 60 s ont été utilisés.

Les mesurages par criblage ont été consignés à partir de 662 échantillons (345 ionisés et 317 non ionisés), donnant 557 classifications qualitatives basées sur des relevés d'instrument négatifs ou positifs. 569 (98,6 % des résultats positifs ou négatifs) ont bien identifié l'état d'ionisation du produit ; 8 (1,4 % des résultats erronés positifs ou négatifs) étaient incorrects et attribués à une erreur de l'opérateur. 85 échantillons, parmi les 662 échantillons étudiés dans l'étude de criblage (12,8 %), ont émis des signaux intermédiaires (24 sur les 345 échantillons ionisés et 61 sur les 317 échantillons non ionisés). Ces échantillons ont nécessité des recherches plus approfondies (voir Tableau 1).

Les mesurages par PSL étalonnée provenaient de 400 échantillons (201 ionisés et 199 non ionisés). À partir de ces échantillons, 55 déterminations (13,8 %) ont abouti à des résultats de criblage intermédiaires. Après l'étalonnage, 33 résultats positifs ont été enregistrés, confirmant la sensibilité à l'ionisation. Ceci a permis une classification définitive des résultats par PSL, ce qui a permis de résoudre 60 % des cas intermédiaires. Les 22 échantillons intermédiaires restant (5,5 % des 400 échantillons étudiés ici) ont fourni une réponse intermédiaire ou négative à l'ionisation ; par conséquent, ces échantillons nécessitent d'être analysés par une autre méthode validée ou normalisée, telle que décrite dans l'EN 1788.

L'étude comportait 4 exemples de mélanges d'épices ionisés à des concentrations de 1 %, 5 % et 10 % dans des épices non ionisées de sensibilité adaptée. Dans cette étude, tous les mélanges ont bien été identifiés comme contenant des ingrédients ionisés ; cependant, il est reconnu que le problème général de la détection des faibles quantités d'ingrédients ionisés implique l'analyse de mélanges d'aliments de sensibilité par PSL variable pour lesquels les performances de détection peuvent être plus limitées.

**Tableau 3 — Résultats des mesurages par PSL de criblage des essais interlaboratoires réalisés sur les crustacés, aromates, épices, condiments et mélanges**

	Ionisé		Non ionisé	
	Identification correcte	Faux négatif	Identification correcte	Faux positif
Crustacés <sup>a</sup>	100 (100 %)	0 (0 %)	50 (100 %)	0 (0 %)
Herbes, épices, condiments et mélanges <sup>b</sup>	320 (93 %) <sup>c</sup>	1 (0,3 %) <sup>c</sup>	249 (78,5 %) <sup>c</sup>	7 (2,2 %) <sup>c</sup>
	344 (99,7 %) <sup>d</sup>		10 (97,8 %) <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Ces résultats sont issus d'un total de 75 échantillons analysés en aveugle et en utilisant les échantillons entiers et les fractions aliquotes d'intestins indépendamment. Deux résultats par échantillon, en accord dans chaque cas, ont été enregistré.

<sup>b</sup> PSL de criblage pour un total de 662 échantillons d'aromates, épices, condiments et mélanges analysés en aveugle.

<sup>c</sup> Ces chiffres sont issus des résultats de criblage initiaux dans les bandes positives (ionisé) et négatives (non ionisé), et indique le nombre et la proportion des 577 résultats positifs et négatifs qui ont pu être classés correctement sur la base des résultats de criblage seulement.

<sup>d</sup> Dans ce cas il est considéré que les résultats de criblage sont pointés seulement en vue de sélectionner des échantillons pour une recherche plus approfondie basée sur des résultats positifs ou intermédiaires. Pour cette recherche, la sélection d'un échantillon non ionisé est considérée ici comme une identification correcte.

## REFERENCES

- [1] Sanderson D.C.W., Carmichael L.A., and Fisk, S., 1997a, An International Collaborative Blind Trial of Photostimulated Luminescence Detection of Irradiated Shellfish, Final Report; MAFF IB073 (Journal of Associated Public Analysts JAPA).
- [2] Sanderson, D.C.W., 1990, Luminescence Detection of Irradiated Foods, in "Food Irradiation and the Chemist", eds. Johnston, D.E., and Stevenson, M.H., Royal Society of Chemistry ISBN 0851868576, 25 – 56.
- [3] Sanderson, D.C.W., Carmichael, L.A., and Naylor, J.D., 1995, Photostimulated luminescence and thermoluminescence techniques for the detection of irradiated food, FSTT 9(3), 150 – 154.
- [4] Sanderson, D.C.W., Carmichael, L.A., and Naylor, J.D., 1996, Recent Advances in thermoluminescence and photostimulated luminescence detection methods for irradiated foods, in

Detection Methods for Irradiated Foods, ed McMurray et al, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 124 – 138.

- [5] Sanderson, D.C.W, Carmichael, L., and Fisk, S., 1998a, Establishing luminescence methods to detect irradiated foods. Food Science and Technology Today, 12(2), 97 - 102.
- [6] Hutt, G., and Jaek, I., 1989, Infrared stimulated photoluminescence dating of sediments, Ancient TL, 7 (3), 48 - 52.
- [7] Huntley, D.J., Godfrey Smith, D.I., and Thewald, M.L.W., 1985, Optical Dating of Sediments, Nature, 313, 105 - 107.
- [8] Sanderson, D.C.W., Carmichael, L.A., and Naylor, J.D., 1996, Recent Advances in thermoluminescence and photostimulated luminescence detection methods for irradiated foods, in Detection Methods for Irradiated Foods, ed. McMurray et al, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 139 - 148.
- [9] Sanderson, D.C.W., 1991, Photostimulated luminescence (PSL): A new approach to identifying irradiated foods, in Potential new methods of detection of irradiated food, ed. Raffi J., Belliaro J.J., EUR 13331, 159 - 167.
- [10] Sanderson, D.C.W., and Clark, R.J. (1994): Pulsed photostimulated luminescence of alkali feldspars. Radiat. Meas. 23(2/3), 633 - 639.
- [11] Clark, R.J., and Sanderson, D.C.W., (1994): Photostimulated luminescence excitation spectroscopy of feldspars and micas. Radiation Measurements 23(2 - 3, Apr - Jul, special issue), 641 - 646.
- [12] Sanderson, D.C.W., 1993, Detection of Irradiated Samples, Patent No.93-8542930424
- [13] Sanderson, D.C.W., 1997, Detection of Irradiated Samples, Patent No.2,291,70

\*\*\*\*\*

## ANNEXE 3

### EN 13783

#### **Produits alimentaires - Détection d'aliments ionisés en utilisant la technique d'épifluorescence après filtration et dénombrement de la flore aérobie sur milieu gélosé - Méthode par criblage**

#### **DOMAINE D'APPLICATION**

Le présent projet de Norme européenne spécifie une méthode de criblage microbiologique permettant de détecter les herbes et les épices ayant subi un traitement ionisant, en utilisant à la fois la technique d'épifluorescence directe après filtration (DEFT) et le dénombrement de la flore aérobie sur milieu gélosé (APC). La technique DEFT/APC n'étant pas spécifique des traitements ionisants, il est donc recommandé de confirmer les résultats positifs par une méthode normalisée (par exemple EN 1788 et prEN 13751) permettant de prouver spécifiquement que les aliments suspectés ont subi un traitement ionisant.

La méthode s'est révélée satisfaisante lors des essais interlaboratoires portant sur les herbes et des épices [1] à [5].

#### **PRINCIPE**

La méthode est basée sur la comparaison des résultats obtenus par la méthode APC avec ceux obtenus par la méthode DEFT. La méthode APC indique le nombre de micro-organismes viables présents dans l'échantillon après une éventuelle ionisation, tandis que le dénombrement par la méthode DEFT indique le nombre total des micro-organismes, y compris les cellules non viables, présents dans l'échantillon. La différence entre les dénombrements par les méthodes DEFT et APC, pour des épices traitées avec des doses de 5 kGy à 10 kGy, est généralement égale ou supérieure à 3 à 4 unités de log. D'autres traitements (thermiques, par exemple) des produits alimentaires provoquent la mort des micro-organismes, entraînant ainsi des différences similaires entre les dénombrements par les méthodes DEFT et APC. Les résultats positifs doivent, par conséquent, être confirmés.

Un volume connu d'échantillon est filtré à pression réduite sur membrane filtrante afin que les micro-organismes se concentrent sur le filtre. Les micro-organismes sont colorés avec un fluorochrome, de

l'acridine-orange (AO), qui entraîne une fluorescence orange, jaune-orangé lorsqu'ils sont excités par une lumière bleue à 450 nm - 490 nm. Ces micro-organismes sont dénombrés à l'aide d'un microscope à épifluorescence afin d'obtenir le dénombrement par la méthode DEFT. Cependant, les micro-organismes non viables avant l'ionisation présentent une fluorescence verte et ne sont pas dénombrés. Le dénombrement sur milieu gélosé (APC) est réalisé en parallèle à partir d'une deuxième portion du même échantillon d'essai [6] à [10].

## LIMITES

La méthode peut rencontrer des limites lorsque la contamination microbienne de l'échantillon est faible ( $APC < 10^3$  cfu/g). Lorsqu'une fumigation ou un traitement par la chaleur a été utilisé pour décontaminer l'échantillon analysé, la différence entre le dénombrement par les méthodes DEFT et APC peut être similaire à la différence de dénombrement obtenue après ionisation. Cependant l'utilisation de la fumigation peut être détectée en analysant l'échantillon.

Certaines épices telles que les clous de girofle, la cannelle, l'ail et les moutardes contiennent des composants inhibiteurs présentant une activité anti-microbienne pouvant entraîner la diminution de la méthode APC (résultat faux positif).

## VALIDATION

La méthode combinée DEFT/APC a été validée lors de l'analyse d'herbes et d'épices, [2] et [3]. Lorsque les échantillons de poivre de Jamaïque, de poivres et de cardamome ont été ionisés avec une dose d'au moins 10 kGy, les différences entre les comptages DEFT et APC étaient supérieures à 6 unités de log pour le poivre de Jamaïque et le poivre blanc ionisés, supérieures à 4,5 unités de log pour le poivre noir et supérieures à 7 unités de log pour la cardamome [2]. Lorsque des épices telles que les poivres, le paprika, la cardamome, la cannelle et le gingembre et des herbes telles que le thym, la marjolaine, le basilic et l'origan ont été analysées après une ionisation avec des doses de 5 kGy et 10 kGy, les différences entre les comptages DEFT et APC étaient respectivement comprises entre 3,9 unités de log et 6,8 unités de log d'une part, et 5,7 unités de log et 7,5 unités de log, d'autre part [3].

Une étude collective financée par le BCR [1] a été réalisée sur 192 échantillons de poivre de Jamaïque entier, de poivres noirs entiers et en poudre, de poivre blanc entier, de paprika en poudre, de basilic coupé, de marjolaine coupée, et de cardamome concassée, non ionisés ou ionisés avec des doses de 5 kGy et 10 kGy et analysés dans huit laboratoires. Les valeurs moyennes des différences entre les comptages DEFT et APC, pour des échantillons ionisés avec des doses de 5 kGy et 10 kGy, étaient respectivement de 5,1 unités de log et 6,1 unités de log. Pour tous les échantillons ionisés analysés, les différences entre les comptages DEFT et APC atteignaient généralement au moins 3,5 unités de log, tandis qu'aucune différence de dénombrement significative n'a été reportée entre les différentes épices non ionisées. Les écart-types de reproductibilité étaient respectivement de 12,3 %, 19,9 % et 20,7 %, pour les échantillons respectivement ionisés avec les doses de 10 kGy et 5 kGy et non ionisés, ce qui indique que les variations interlaboratoires restent dans des limites acceptables.

La probabilité de juger un échantillon non ionisé comme ionisé (résultat faux positif) à l'aide de la limite de 4,0 unités de log est faible [1]. D'un autre côté, la limite de 4,0 unités de log donne quelques fois des résultats faux négatifs. Cela a été démontré pour des échantillons de basilic [1] et [11].

## REFERENCES

- [14] Wirtanen. G., Sjöberg, A-M., Boisen, F. and Alanko, T.: Microbiological Screening method for Indication of Irradiation of Spices and Herbs: A BCR Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 1993, 76, 674-681.
- [15] Sjöberg, A-M., Manninen, M., Pinnioja, S. and Härmälä, P.Z.: Methods for detection of irradiation of spices. *Zeitsch. Lebensm. Unters. Forsch.* 1990, 190, 99-103.
- [16] Manninen, M. and Sjöberg, A.-M.: Evaluation of a microbiological method for detection of irradiation of spices. *Zeitsch. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1991, 192, 226-229.
- [17] Wirtanen. G. and Sjöberg, A-M.: A microbiological method (DEFT/APC) for the identification of irradiation of spices and seafood. Recent advances on detection of irradiated food. Edited by Leonardi, M., Raffi, J.J. and Belliardo, J.-J. BCR-Information. 1993, Luxembourg : Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/14315/en), 25-34.
- [18] Boisen, F. and Leth, T.: Screening of imported spices for irradiation using the combined DEFT/APC method. Internal report CLA 1993.2. (Danish version). Published by the Danish National Food Agency, 1993.

- [19] Betts, R.P., Farr, L., Bankes, P. and Stringer, M.F.: Detection of irradiated foods using the Direct Epifluor-escient Filter Technique. *Journal of Applied Bacteriology*, 1988, 64, 329-335
- [20] Boisen, F., Skovgaard, N., Ewald, S., Olsson, G. and Wirtanen, G.: Quantitation of Microorganisms in Raw Minced Meat using the Direct Epifluorescent Filter Technique: NMKL Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 1992, 75, 465-473.
- [21] Boisen, F.: Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) standard, no. 137. Bacterial Count. Determination by Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT) in raw minced meat, 1990.
- [22] Pettipher, G.L.: The direct epifluorescent filter technique for the rapid enumeration of microorganisms. Research Studies Press LTD, 1983.
- [23] Copin, M-P., Jehanno, D. and Burgeois C.M.: Detection of irradiated deepfrozen foodstuffs by comparison of DEFT and APC counts. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 75, 254-258.
- [24] Hammerton, K.M. and Banos. C.: Detection of irradiated spices with a microbiological method. DEFT/APC method. In: *Detection Methods for Irradiated Foods, Current Status*. Edited by McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., and Pearce, J. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 392-396.

## ANNEXE 4

### EN 13784

#### **Produits alimentaires — Détection d'aliments ionisés en utilisant le test de comète d'ADN — Méthode par criblage**

#### **1 DOMAINE D'APPLICATION**

La présente norme européenne décrit une méthode de criblage des produits alimentaires contenant de l'ADN. Cette méthode se base sur l'électrophorèse par micro-gel de cellules simples ou de noyaux, pour détecter la fragmentation éventuelle de l'ADN résultant d'une ionisation [1] à [8]. L'essai de comète d'ADN n'est pas spécifique au rayonnement. Par conséquent, il est nécessaire de confirmer les résultats positifs à l'aide d'une méthode normalisée permettant de prouver scientifiquement que ces produits alimentaires ont bien été ionisés (par exemple EN 1784, EN 1785, EN 1786, EN 1787, EN 1788, EN 13708 et EN 13751).

Des études interlaboratoires ont été menées avec succès sur plusieurs produits alimentaires, d'origines animale et végétale, qu'il s'agisse de viandes [9], de [11] graines, de fruits séchés et d'épices [6], [12]. D'autres études [13] à [32] montrent que la méthode peut s'appliquer à une large gamme de produits alimentaires mais que certaines limites existent également (voir article 8).

#### **2 PRINCIPES**

La fragmentation de l'ADN peut être causée par divers traitements chimiques ou physiques, y compris par le rayonnement ionisant. Lorsque les produits alimentaires contenant de l'ADN subissent un traitement par rayonnement ionisant, une modification des grandes molécules se produit ainsi qu'une fragmentation par rupture de chaîne simple ou double. Cette fragmentation peut être étudiée au cours de l'électrophorèse par micro-gel de cellules simples ou de noyaux. Les noyaux sont incorporés à de l'agarose sur des lames de microscope, sont lysés pour provoquer la rupture des membranes à l'aide d'un détergent, avant de subir une électrophorèse à une tension définie. Les fragments d'ADN vont former une bande ou migrer des cellules, formant une queue en direction de l'anode, donnant ainsi aux cellules endommagées l'apparence d'une comète. Cet essai de comète, qui permet de mesurer les dommages de l'ADN, peut être effectué dans diverses conditions. Il existe des protocoles alcalins et neutres. En général, dans des conditions alcalines, les ruptures de chaîne simple et double d'ADN ainsi que les positions alkali-labiles peuvent être mesurées, alors que, dans des conditions neutres, seules les ruptures de chaîne double sont observées. Cependant, dans des conditions neutres [1] les ruptures de chaîne simple exercent également une influence sur l'apparence de la comète, causée par le relâchement de l'ADN surenroulé dans le noyau [7], [8]. Les cellules ionisées présentent une extension accrue d'ADN depuis le noyau jusqu'à l'anode, elles se présentent donc sous la forme de comètes beaucoup plus longues (plus de fragmentation) que les cellules non ionisées. Les cellules non ionisées apparaissent sous une forme circulaire ou alors très petite (voir figure A.1).

Le présent projet de norme européenne décrit l'utilisation d'un montage de couche unique d'agarose simple, utilisant un pH neutre, une tension basse et un temps d'électrophorèse court.



### 3 LIMITES

En principe, l'essai de comète de l'ADN peut, être utilisé pour détecter l'ionisation de tous les produits alimentaires contenant de l'ADN. L'essai de comète a déjà été appliqué avec succès sur plusieurs produits alimentaires, tant d'origine animale, tels que le poulet, le canard, la caille, le faisan, le porc, le sanglier, le bœuf, le veau, le mouton, le chevreuil, le poisson (truite, saumon) que d'origine végétale, tels que les amandes, les figues, les lentilles, les graines de soja, le carioca, les graines de macaçar, les fraises, le raisin, les graines de lin, les graines de sésame, les graines de tournesol, le poivre rose.

Il faut remarquer que si l'essai de comète permet d'opérer un premier tri, les résultats doivent être confirmés par une autre technique spécifique à l'ionisation, car la fragmentation de l'ADN peut résulter d'un autre phénomène (voir les graines de moutarde tel que décrit ci-dessous dans ce paragraphe, par exemple).

Chaque nouveau type de produit alimentaire doit être soumis à l'essai avant d'analyser des échantillons inconnus : pour obtenir une migration adéquate de l'ADN dans le gel, il peut s'avérer nécessaire de modifier certains paramètres tels que la solution lyse, le temps de traitement et le temps d'électrophorèse, ainsi que le niveau de champ.

Pour divers produits alimentaires, les motifs en comète d'ADN sont encore assez méconnus. Pour se familiariser avec les différents types de motifs en comète, il est donc recommandé d'utiliser des produits provenant de différentes sources. Il est également recommandé d'étudier l'effet de l'irradiation et des conditions de stockage. La préparation des suspensions de cellules constitue, en outre, une étape importante de l'essai de comète. Pour certains produits alimentaires, tels que les papayes, les tamarins [32], de nombreux débris de cellule bruts interfèrent avec le motif en comètes, d'autres étapes sont donc nécessaires à la préparation de la suspension des cellules, avant d'aboutir à un arrière-plan convenable. Pour d'autres produits, tels que certaines noix et épices, certains poissons, il peut s'avérer difficile d'obtenir des cellules appropriées [31] et [32]. Les produits alimentaires qui ont été chauffés, se caractérisent par l'absence de cellule, la chaleur les ayant largement endommagées. C'est pourquoi la méthode n'est pas applicable aux crevettes blanchies ou le poulet [6] cuit (au micro-ondes).

En ce qui concerne la viande, il convient de reconnaître qu'en fonction des conditions de conservation (température et temps écoulé entre l'abattage et la congélation) de la viande fraîche, une dégradation (enzymatique) naturelle de l'ADN se produit, ayant pour résultat une fragmentation de l'ADN [33]. Dans ce cas, les comètes ont des formes diverses. La présence d'un grand nombre de cellules présentant une dégradation avancée de l'ADN peut être due uniquement à de mauvaises conditions de conservation. Les cycles répétés de congélation/décongélation de la viande endommagent également l'ADN (fragmentation), selon des motifs qui sont similaires à ceux obtenus par la dégradation naturelle de l'ADN et qui peuvent généralement être distingués des échantillons ionisés qui forment des motifs homogènes [6]. Il n'est possible de déterminer si l'échantillon a été ionisé ou non, que si toutes les cellules présentent une dégradation avancée de l'ADN. C'est une des principales limites de l'essai de comète.

Une lyse incomplète des cellules constitue une autre limite de cet essai, la perméabilité des membranes étant nécessaire pour permettre aux fragments d'ADN de migrer des noyaux. Lors de précédentes expériences [4], [5], [15], [17], [19], [20] on a pu noter que la lyse était insuffisante, la concentration de SDS étant de 0,1 % seulement, ce qui est insuffisant. En augmentant la concentration de SDS à 2,5 %, ce problème a été résolu au moins pour les cellules d'origine animale. Pour certaines cellules végétales, il a fallu augmenter la durée de la lyse de 30 à 60 min, pour les graines de soja ou le raisin [6], [26], [30]. Pour d'autres produits végétaux, tels que les spores de champignons de la variété *Agaricus bisporus*, il n'a pas été possible de réaliser une lyse de la paroi des cellules [6], [19], rendant impossible la réalisation de l'essai de comète. Une lyse insuffisante peut également être à l'origine de la présence de cellules intactes observées dans les échantillons ionisés, tels que le gramme séché, les amandes effilées [28], les haricots rouges et les tamarins [32]. Des solutions de lyse plus fortes ou un temps d'incubation plus long peuvent résoudre ce problème.

Pour certains produits alimentaires, des préparations de cellules peuvent être obtenues relativement facilement, mais la difficulté réside dans la différenciation entre les échantillons ionisés et non ionisés, par exemple pour certaines noix, graines ou épices [31]. Des difficultés ont également été observées en analysant des produits alimentaires à ioniser avec des doses relativement faibles, tels que les oignons et les pommes de terre [6] et [32]. L'utilisation d'un analyseur d'images complexes peut faciliter l'identification, un simple contrôle visuel n'ayant pas permis d'établir avec certitude si l'échantillon avait été ionisé ou non.

Les graines de moutarde sont un cas particulier. Ce cas présente un motif en comète correspondant à un échantillon ionisé avec des comètes bien reconnaissables et aucune cellule intacte. Cet échantillon a été soumis à essai par thermoluminescence (EN 1788) et s'est avéré non ionisé. La capacité de germination des graines de moutarde a également indiqué qu'elles n'avaient subi aucun traitement par ionisation [6]. Des problèmes similaires ont été rencontrés sur un échantillon de millet. Bien que l'observation de l'échantillon ait permis de repérer un grand nombre de comètes, d'autres méthodes de détection, comme les mesurages par thermoluminescence (EN 1788) ou la formation d'hydrocarbone des lipides contenus dans les produits alimentaires (EN 1784), ont permis de mettre en évidence que l'échantillon n'avait pas été ionisé (Cerde et Delincée, en cours). L'état des graines, en dormance ou non, joue vraisemblablement un rôle.

#### 4 FIDELITE

La procédure décrite dans cette Norme européenne se base sur des études interlaboratoires effectuées sur des produits alimentaires d'origine animale (poulet, porc) [9] à [11] et d'origine végétale [6], [12], ainsi que sur des études menées sur certain nombre de produits alimentaires [13] à [32].

Dans un essai interlaboratoire organisé par la «Swedish national Food Administration», neuf laboratoires participants ont analysé trois types de suspensions de cellules codées composées de moelle osseuse de poulet ionisée et non ionisée, et de tissu musculaire de porc et de poulet. Les doses de rayonnement variaient entre 0 kGy, 1 kGy, 2,5 kGy, 3 kGy et 5 kGy. Sur un total de 162 échantillons distribués, 148 échantillons ont donné des résultats valides. Parmi ces échantillons, 138 ont été correctement identifiés. Sur 106 échantillons ionisés, 99 ont été correctement détectés alors que 39 sur 42 échantillons non ionisés ont été classés correctement, voir Tableau 1 [11].

**Tableau 4 — Données interlaboratoires pour le poulet et le porc**

Produit	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons (résultats valides) <sup>1</sup>	Nombre d'identifications correctes	Nombre de résultats faux négatifs <sup>2</sup>	Nombre de résultats faux positifs <sup>3</sup>
Moelle osseuse de poulet	54	54	52	1	1
Muscle de poulet	54	46	42	3	1
Muscle de porc	54	48	44	3	1
Total	162	148	138	7	3

1) Aucun résultat reporté pour les échantillons manquants.  
2) Les résultats faux négatifs sont des échantillons ionisés identifiés comme non ionisés.  
3) Les résultats faux positifs sont des échantillons non ionisés identifiés comme ionisés.

Il convient de noter que, au moment de cette collaboration, les connaissances de certains laboratoires concernant l'essai de comète étaient très limitées. Bien que chaque laboratoire ait reçu une série d'échantillons de référence composés de moelle osseuse de poulet ionisés avec des doses de 0 kGy, 1 kGy, 3 kGy ou 5 kGy et étiquetés avec des doses données, certains laboratoires ont rencontré des difficultés à mettre en œuvre cette nouvelle méthode. Toutefois, six laboratoires ont réussi à identifier correctement tous les échantillons.

Un autre essai de collaboration [6] a été mené sur divers produits végétaux, tels que les amandes, les figues, les lentilles, les graines de lin, le poivre rose, les graines de sésame, les graines de soja et les graines de tournesol. Les échantillons codés étaient non ionisés ou ionisés avec des doses de 0,2 kGy, 1 kGy ou 5 kGy. En plus des 20 échantillons codés, les participants ont reçu une série de référence de 12 échantillons ayant reçu une dose de rayonnement connue. Quatre laboratoires ont participé à cette intercomparaison. Sur les 78 réponses reçues, 74 étaient correctes (95 %). Les résultats sont indiqués dans le Tableau 2.

**Tableau 5 — Données interlaboratoires pour les cellules végétales soumises à essai (pendant 10 mois de conservation après ionisation)**

Echantillon	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons (résultats valides) <sup>1</sup>	Nombre d'identifications correctes	Nombre de résultats faux négatifs <sup>2</sup>	Nombre de résultats faux positifs <sup>3</sup>
Non ionisé	32	31	29	0	2
Ionisé	48	47	45	2	0
Total	80	78	74	2	2

1) Un seul laboratoire n'a pas fourni les résultats sur les graines de soja, à cause des problèmes sur les conditions de la lyse.

2) Les résultats faux négatifs sont des échantillons ionisés identifiés comme non ionisés.

3) Les résultats faux positifs sont des échantillons non ionisés identifiés comme ionisés.

## REFERENCES

- [25] Östling, O., and Johanson, K. J.: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1984, **123**, 291-298.
- [26] Östling, O., and v.Hofsten, B.: Radiation-induced DNA strand breaks in single cells.: Health Impact, Identification, and Dosimetry of Irradiated Foods. Report of a WHO Working Group. Edited by Bögl, K.W., Regulla, D.F., and Suess, M.J. Bericht des Instituts für Strahlenhygiene des Bundesgesundheitsamtes. 1988, ISH-125, Neuherberg: Institut für Strahlenhygiene des Bundesgesundheitsamtes, 305-307.
- [27] Johanson, K. J.: The microelectrophoresis method, a method for determination of irradiated food.: Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Edited by Raffi, J. J., and Belliaro, J.-J. BCR-Information.1991, Luxembourg: Commission of the European Community, 1991, (Report EUR/13331/en), 52-54.
- [28] Cerda, H., v.Hofsten, B., and Johanson, K. J.: Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells.: Recent advances on detection of irradiated food. Edited by Leonardi, M., Raffi, J.J., and Belliaro, J.-J. BCR-Information. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/14315/en), 401-405.
- [29] Cerda, H.: Analysis of DNA in fresh meat, poultry and fish. Possibility of identifying irradiated samples: Changes in DNA for the detection of irradiated food. Edited by Delincée, H., Marchioni, E., and Hasselmann, C. BCR-Information. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/15012/en), 5-6.
- [30] Cerda, H., Delincée, H., Haine, H., and Rupp, H.: The DNA "comet assay" as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutation Res.*, 1997, **375**, 167 -181.
- [31] McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Méo, M. P., and Collins, A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Res.*, 1993, **288**, 47 -63.
- [32] Fairbairn, D. W., Olive, P. L., and O'Neill, K. L.: The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Res.*, 1995, **339**, 37 -59.
- [33] Delincée, H.: Application of the DNA "Comet Assay" to detect irradiation treatment of foods.: Detection Methods for Irradiated Foods - Current Status. Edited by McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., and Pearce, J. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 349-354.
- [34] Haine, H., Cerda, H., and Jones, L.: Microgel electrophoresis of DNA to detect irradiation of foods. *Food Sci.Technol.Today*, 1995, **9**, 139 -140.
- [35] Cerda, H.: Detection of irradiated frozen meat with the comet assay. Interlaboratory test. *J.Sci.Food Agric.*, 1998, **76**, 435 -442.
- [36] Haine, H. E., Cerda, H., and Jones, J. L.: Detecting irradiation of seeds using microgel electrophoresis (a collaborative trial). Campden & Chorleywood Food Research Association, R&D Report No.10. MAFF Project No. 19456, 1995, 1-16.

- [37] Nilson, H., and Cerda, H.: Analys av bestrålnade livsmedel - verksamhetsrapport under perioden 1989/90 - 1992/93. Uppsala: National Food Administration, 1993, SLV rapport 1993, nr. 17.
- [38] Leth, T., Eriksen, H., Sjöberg, A.-M., Hannisdal, A., Nilson, H., and Cerda, H.: Påvisning af bestråling - to analysemetoder. Konsument Tema Nord, 1994, 609, Copenhagen: Nordic Council of Ministers, 1994, 1 -26.
- [39] Haine, H. E., and Jones, J. L.: The analysis of DNA fragmentation as a method for detecting irradiation of food. Campden Food and Drink Association, Technical Memorandum No. 711, 1992, 57 -59.
- [40] Haine, H. E., and Jones, L.: Microgel electrophoresis of DNA as a method to detect irradiated foods. Food Sci.Technol.Today, 1994, 8, 103 -105.
- [41] Delincée, H.: Micro gel electrophoresis of chicken DNA to detect radiation processing.: Changes in DNA for the detection of irradiated Food. Edited by Delincée, H., Marchioni, E., and Hasselmann, C. BCR-Information. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/15012/en), 7.
- [42] Delincée, H., and Marchioni, E.: Intercomparison study with micro gel electrophoresis of DNA for detection of irradiated chicken: a preliminary trial.: Changes in DNA for the detection of irradiated food. Edited by Delincée, H., Marchioni, E., and Hasselmann, C. BCR-Information. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/15012/en), 8-14.
- [43] Delincée, H.: Detection of the irradiation treatment of food using micro gel electrophoresis of DNA.: New Developments in Food, Feed and Waste Irradiation. Edited by Schreiber, G. A., Helle, N., Bögl, K. W. Bericht des Instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, 1993, Berlin: Bundesgesundheitsamt, Soz-Ep Heft 16/1993, 112 -116.
- [44] Leffke, A., Helle, N., Bögl, K.-W., and Schreiber, G. A.: DNA-Electrophoresis of single cells - A method to screen for irradiated foodstuffs.: New Developments in Food, Feed and Waste Irradiation. Edited by Schreiber, G. A., Helle, N., Bögl, K. W. Bericht des Instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, 1993, Berlin: Bundesgesundheitsamt, Soz-Ep Heft 16/1993, 117 -121.
- [45] Raffi, J., Delincée, H., Marchioni, E., Hasselmann, C., Sjöberg, A.-M., Leonardi, M., Kent, M., Bögl, K. W., Schreiber, G., Stevenson, H., and Meier, W.: Concerted action of the Community Bureau of Reference on methods of identification of irradiated foods. Final report. BCR-Information. 1994, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1994, (Report EUR/15261/en), 1 -119.
- [46] Delincée, H.: Detection of irradiated food using simple screening methods. Food Sci.Technol.Today, 1994, 8, 109 -110.
- [47] Delincée, H., Funk, P., and Roig, D.: Fortschritte bei der Entwicklung von einfachen Schnelltests für bestrahlte Lebensmittel.: Lebensmittelbestrahlung, 4. Deutsche Tagung. Edited by Brockmann, A., Erning, D., Helle, N., Schreiber, G. A. Bericht des Instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, 1994, Berlin: Bundesgesundheitsamt, SozEp-Heft 5/1994, 149 -157.
- [48] Delincée, H.: Rapid and simple screening tests to detect the radiation treatment of food. Radiat.Phys.Chem., 1995, 46, 677 -680.
- [49] Delincée, H.: DNA "Comet Assay" for rapid detection of irradiated food. Acta Alimentaria, 1996, 25, 319-321.
- [50] Koppen, G., and Cerda, H.: Identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay. Lebensm.Wiss.Technol., 1997, 30, 452 -457.
- [51] Cerda, H.: Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA Comet Assay. Lebensm.Wiss.Technol., 1998, 31, 89 -92.
- [52] Khan, H.M., and Delincée, H.: Detection of Irradiation Treatment of Foods Using DNA 'Comet Assay'. Radiat. Phys. Chem., 1998, 52, 141-144.
- [53] Villavicencio, A.L.C.H., Mancini-Filho, J., and Delincée, H.: Application of different techniques to identify the effects of irradiation on Brazilian beans after six months storage. Radiat. Phys. Chem., 1998, 52, 161-166.
- [54] Delincée, H.: Detection of Irradiated Food: DNA Fragmentation in Grapefruits. Radiat. Phys. Chem., 1998, 52, 135-139.
- [55] Rupp, H., and Zoller, O.: Nachweis von Lebensmittelbestrahlung mittels Mikroelektrophoreseverfahren. 2001, in preparation.
- [56] Khan, A.A., and Delincée, H.: DNA 'Comet Assay' for detection of irradiated food.: 5. Deutsche Tagung Lebensmittelbestrahlung. Edited by Ehlermann, D.A.E., Bericht der Bundesforschungsanstalt

für Ernährung. 1998, Karlsruhe: Bundesforschungsanstalt für Ernährung, BFE-98-04, in preparation, BFE-R - - 99-01, 216-221.

- [57] Delincée, H.: Silver staining of DNA in the "Comet Assay". Comet Newsletter, July 1995.
- [58] Cerda, H.: DNA silver staining after electrophoresis in agarose gels: Changes in DNA for the detection of irradiated food. Edited by Delincée, H., Marchioni, E., and Hasselmann, C. BCR-Information. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/15012/en), 6.
- [59] Kent, C.R.H., Eady, J.J., Ross, G.M., and Steel, G.G.: The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. Int.J.Radiat.Biol., 1995, **67**, 655-660.
- [60] Hellman, B., Vaghef, H., and Boström, B.: The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. Mutat. Res., 1995, **336**, 123-131.
- [61] Cerda, H., and Koppen, G.: DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. Z.Lebensm.Unters.Forsch. A, 1998, **207**, 22-25.
- [62] Cerda, H., and Delincée, H.: Identification of irradiated seeds using the comet assay, 2001, in preparation.

EN 1788 – Version Française

\*\*\*\*\*

## ANNEXE 5

### **EN 1788 - Produits alimentaires - Détection par thermoluminescence d'aliments ionisés dont peuvent être extraits des minéraux silicatés**

#### **DOMAINE D'APPLICATION**

La présente Norme européenne spécifie une méthode de détection de traitement ionisant appliquée à des produits alimentaires par analyse de la thermoluminescence des minéraux silicatés contaminant l'aliment. Cette méthode s'applique aux produits alimentaires à partir desquels il est possible d'isoler une quantité suffisante de minéraux silicatés.

La méthode a été appliquée avec succès lors d'essais interlaboratoires conduits sur des aromates, des épices, leurs mélanges, [1] à [3], sur des crustacés incluant les crevettes et les langoustes [4] à [6], sur des légumes et des fruits, frais ou déshydratés [7] à [9], et sur des pommes de terre [10]. D'autres études [11] à [46] montrent que cette méthode est applicable à une grande variété d'aliments.

#### **PRINCIPE**

Les minéraux silicatés qui contaminent les produits alimentaires emmagasinent de l'énergie par piégeage des charges résultant de l'exposition aux rayonnements ionisants. La libération de cette énergie par chauffage contrôlé des minéraux silicatés isolés, permet de mesurer la luminescence et de tracer les courbes correspondantes.

Les minéraux silicatés sont donc isolés des produits alimentaires essentiellement lors de la séparation par densité. Pour qu'ils ne perturbent pas la thermoluminescence, il faut que les constituants organiques des aliments soient bien séparés des silicates. On réalise un premier enregistrement de la luminescence des extraits minéraux après séparation (luminescence 1). Etant donné que les diverses quantités et/ou divers types de minéraux (quartz, feldspath etc.) présentent des intégrales d'intensités de TL très variables après l'ionisation, il est nécessaire de soumettre le même échantillon à une deuxième mesure de luminescence (luminescence 2) après les avoir exposés à une dose déterminée de rayonnement, pour normaliser la réponse.

Le rapport de luminescence obtenu à partir de ces deux mesures est utilisé pour mettre en évidence le traitement ionisant subi par l'aliment puisque la population des échantillons ionisés est, en principe, caractérisée par des rapports de luminescence plus élevés que celle des échantillons non ionisés. L'allure des courbes de luminescence contribue également à permettre l'identification des aliments ionisés. La présente méthode d'analyse par thermoluminescence qui concerne uniquement les minéraux silicatés pouvant être séparés des différents aliments, n'est généralement pas influencée par le type du produit alimentaire considéré.

#### **LIMITES**

Cette méthode d'analyse par TL peut en principe être appliquée à la détection de n'importe quel aliment à partir duquel des minéraux silicatés peuvent être extraits. Les limites de détection et la stabilité dépendent

des quantités et du type de minéraux extraits de chaque échantillon, et des intervalles de température choisis pour l'analyse de la courbe de luminescence. Les minéraux provenant d'échantillons non ionisés présentent un signal de TL d'origine géologique dont la courbe présente un maximum au-dessus de 300 °C et des composantes mineures dans la région 200 °C à 300 °C qui peuvent affecter les limites de détection. La stabilité des signaux de TL dépend de la température à laquelle ils apparaissent. Elle est d'autant plus grande que la température de mesure est élevée. Pour les températures voisines de 200 °C à 250 °C, les signaux de TL sont stables sur plusieurs années.

La méthode a été validée avec des échantillons entièrement ionisés ou non. Dans le cas où des produits ionisés sont mélangés avec des produits non traités, le résultat de l'analyse dépend des sensibilités relatives des composants ionisés et non traités.

La détection des herbes, épices et de leurs mélanges ionisés a été validée pour des doses d'au moins 6 kGy et sur une période de plus de neuf mois ce qui couvre l'éventail des applications commerciales [1] à [3]. D'autres études ([11] à [13], [15] à [17], [19] à [21], [23] à [27], [29] à [34], [36], [37], [40] à [43]) ont montré que la méthode pouvait s'appliquer dès 1 kGy, pour des durées de conservation de plusieurs années.

La détection des crustacés ionisés a été validée pour des doses de 0,5 kGy à 2,5 kGy et des durées de conservation supérieures à la durée de vie commerciale, [4] à [6]. D'autres études, [19] à [23], [27], [31], [35], [39], [42], ont montré que l'application de la méthode par TL peut être également appliquée aux produits de la mer.

La détection des fruits et légumes déshydratés ou frais a été validée pour des doses d'environ 1 kGy pour les fruits et légumes frais, [7], [8], et de 8 kGy pour les fruits et légumes déshydratés [9]. D'autres études, [11] à [14], [17] à [21], [23], [25], [27], [28], [31], [38], [42] ont montré que l'application de la méthode par l'analyse de TL peut être également appliquée aux fruits et légumes.

Certains problèmes peuvent parfois arriver lorsqu'une quantité limitée de minéraux est présente dans les échantillons. Dans un test interlaboratoires [8], les laboratoires concernés n'ont pu obtenir de résultats valables que sur 97 % des fraises, 82 % des avocats, 48 % des champignons, 83 % des papayes et 95 % des mangues, du fait d'une quantité limitée d'échantillons et donc de minéraux.

Un problème similaire est arrivé dans un autre test interlaboratoire effectué sur des fruits et légumes frais [7] et un autre sur les fruits et légumes déshydratés [9]. Dans cette dernière étude, les échantillons de pomme étaient contaminés par d'excessivement faibles quantités de minéraux. Des quantités suffisantes de minéraux n'ont pu être obtenues que dans 75 % des échantillons.

Il faut savoir que l'irradiation des fruits et légumes frais effectuée dans un but de désinfection l'est à des doses plus faibles que celles utilisées dans le test interlaboratoire cité, [7], [8]. Dans ce cas spécial, un protocole similaire à celui des pommes de terre [10] peut être adapté.

La détection des pommes de terre ionisées a été validée pour des doses aussi faibles qu'environ 50 Gy et quatre mois environ après irradiation [10]. D'autres études, [7], [11], [13], [15], [18], [23], ont montré la possibilité d'appliquer la TL aux pommes de terre. L'une de ces études [15] a montré que la détection des pommes de terre ionisées par analyse de TL était possible pendant toute la durée de vie de cet aliment.

Comme des impuretés minérales sont incluses systématiquement dans tous les aliments exposés au vent ou au contact avec le sol, toutes les sortes de produits agricoles devraient pouvoir être étudiés par TL. En plus des produits cités ci-dessus, la TL a été utilisée pour les bulbes tels que l'oignon ou l'ail, [18], [23], les céréales [44] et les tubercules [45], [46].

## **FIDELITE**

La méthode décrite dans la présente Norme européenne est fondée sur des essais interlaboratoires qui ont porté d'une part sur des aromates, des épices, leurs mélanges, [1] à [3], des crustacés, [4] à [6], des fruits et légumes frais ou déshydratés, [7] à [9], des pommes de terre, [10] ainsi que sur des études effectuées sur d'autres produits alimentaires, [11] à [46].

En ce qui concerne les aromates et les épices, la méthode a été mise à l'épreuve dans le cadre d'un essai interlaboratoires limité et préliminaire, organisé par le Bureau Communautaire de Référence (BCR), et ayant entraîné la participation de six laboratoires. Chaque laboratoire a analysé 12 aromates et épices ionisés et non ionisés [1].

Un autre essai interlaboratoire de plus grande ampleur organisé par le bureau fédéral allemand de Santé (Bundesgesundheitsamt, BGA), a impliqué 14 laboratoires qui ont soumis à l'essai 18 sortes différentes d'aromates et d'épices ou mélanges de ceux-ci, trois et/ou neuf mois après une exposition à un rayonnement

ionisant, avec une dose d'environ 6 kGy ou 11 kGy, respectivement. Sur un total de 317 échantillons examinés, 99,1 % ont été correctement identifiés. Seulement trois échantillons ionisés ont été classés comme ne l'ayant pas été. Aucun des échantillons non ionisés n'a été classé dans la catégorie ionisée, [2] et [3].

Dans un troisième essai interlaboratoires organisé par l'ancien BGA (présentement Institut fédéral allemand pour la protection de la Santé des consommateurs et la médecine vétérinaire, BgVV), 23 laboratoires ont analysé des échantillons codés de crevettes (Vietnam Cat Tiger et China Reds) soit non ionisés soit ionisés à des doses de 1 ou 2 kGy. 123 échantillons sur 125 ont été correctement identifiés. Deux échantillons ionisés à 1 kGy ont été identifiés comme non ionisés en utilisant une valeur de rapport de TL limite de 0,5. Si la forme de la courbe de TL avait été également étudiée, en comparaison avec le rapport de TL, tous les échantillons auraient dû être correctement identifiés [4], [5].

Dans un test interlaboratoire organisé sur les crustacés par le Ministère britannique de l'agriculture, des pêches et de l'alimentation (MAFF), les sept laboratoires concernés ont analysé cinq espèces, plus précisément des langoustines (Norway lobsters), des "black tiger prawns", des crevettes brunes, des moules et des coquilles Saint-Jacques. Les échantillons codés étaient non ionisés ou ionisés à des doses de 0,5 kGy ou 2,5 kGy. Sur un total de 105 échantillons, des quantités suffisantes de minéraux ont été extraits de 103 échantillons et ceux-ci ont tous été correctement identifiés.

Dans un test interlaboratoire organisé sur des fruits et légumes par le Ministère britannique de l'agriculture, des pêches et de l'alimentation (MAFF), neuf laboratoires concernés ont analysé cinq types de fruits et légumes, plus précisément des fraises, avocats, champignons, papayes et mangues. Ils ont été présentés à une analyse en aveugle selon trois formes : non ionisés, ionisés à 1 kGy ou ionisés à 1 kGy et blanchis. Sur un total de 405 échantillons, des résultats valables ont été obtenus à partir de 327 échantillons, tous ayant été correctement identifiés. Les 78 autres échantillons n'ont pas permis d'obtenir suffisamment de minéraux silicatés.

Dans un test interlaboratoire organisé sur des fruits et légumes déshydratés par le Centre Technique français de la Conservation des produits Agricoles (CTCPA), les huit laboratoires concernés ont analysés cinq types de fruits et légumes, à savoir des cubes de pommes, des tranches de carottes, des poireaux, des oignons morcelés et de l'asperge en poudre. Les échantillons codés non ionisés ou ionisés à une dose d'environ 8 kGy ont été analysés six mois après ionisation. Sur un total de 240 échantillons, des quantités suffisantes de silicates ont été obtenues à partir de 223 échantillons. Les participants étaient obligés de respecter des valeurs fixes de rapport de TL, en considérant comme ionisés les échantillons ayant un rapport de TL supérieur à 0,5, comme non ionisés les échantillons ayant un rapport de TL inférieur à 0,1 ; les échantillons ayant un rapport de TL compris entre 0,1 et 0,5 devant être considérés comme douteux. 200 échantillons des 223 précédents ont été correctement identifiés, deux échantillons non ionisés ont été considérés comme ionisés (probablement suite à une erreur d'étiquetage) et 21 échantillons ont été considérés comme douteux ou conduisant à des résultats contradictoires.

Dans un essai interlaboratoire organisé par l'Institut fédéral allemand pour la protection de la Santé des consommateurs et la médecine vétérinaire (BgVV), les 22 laboratoires concernés ont analysé des échantillons codés de pommes de terre non ionisés ou ionisés à des doses d'environ 50 Gy, 160 Gy ou 310 Gy. Par application des critères d'identification de la clause 9, 216 échantillons sur un total de 220 ont été correctement identifiés. Deux échantillons conduisant à des résultats contradictoires ont été exclus, un échantillon non ionisé a été identifié comme ionisé et un échantillon ionisé a été identifié comme non ionisé.

## Bibliographie

- [63] Sanderson, D.C.W., Schreiber, G.A., Carmichael, L.A. (1991) A European Trial of TL Detection of Irradiated Herbs and Spices. SURRC Report to BCR.
- [64] Schreiber, G.A., Wagner, U., Leffke, A., Helle, N., Ammon, J., Buchholtz, H.-V., Delincée, H., Estendorfer, S., Fuchs, K., von Grabowski, H.-U., Kruspe, W., Mainczyk, K., Münz, H., Nootenboom, H., Schleich, C., Vreden, N., Wiezorek, C., Bögl, K.W., (1993) Thermoluminescence analysis to detect irradiated spices, herbs and spice - and - herbs mixtures - an intercomparison study. Bericht des instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes. SozEp-Heft 2/1993 (Bundesgesundheitsamt, Berlin).
- [65] Schreiber, G.A., Helle, N., Bögl, K.W. An inter-laboratory trial on the identification of irradiated spices, herbs and spice-herbs mixtures by thermoluminescence analysis. JAOAC, 1995, 78, 88-93.

- [66] Schreiber G.A., Mager M., Ammon J., Brunner J., Buchholtz H-V., Butz B., Delincée H., Fienitz B., Fromuth G., Hammerton K., Jahr D., Kispeter J., Klein H., Kruspe W., Kühn T., Mainczyk K., Meier H., Münz H., Nootenboom H., Pfordt J., Pinnioja S., Roberts P.B., Sanderson D., Schleich C., Vreden N., Zachäus U., Zehnder H., Bögl K-W., An interlaboratory study on the detection of irradiated shrimps by thermoluminescence analysis, report of the federal Institute for Health Protection of Consumers and veterinary Medicine, BgVV-heft 3/1995, Berlin.
- [67] Schreiber G.A., Helle N., Schullzki G., Linke B., Spielgerlberg A., Mager M. Bögl K-W, Internlaboratory tests to identify irradiation treatment of various foods via gas chromatographic detection hydrocarbons, ESR spectroscopy and TL analysis, in " detection methods for irradiated food - curent status ", M.H. Stevenson & C.H. McMurray Eds. (Royal Soc. Chem., Cambridge, U-K), 1996, 98-107.
- [68] Sanderson, D.C.W., Carmichael, L.A., Naylor J.D. et Fisk S. (1997) An international collaborative blind trial of thermoluminescence of irradiated shellfish, SURRC report to MAFF.
- [69] Schreiber, G.A., Wagner, U., Helle, N., Ammon, J., Buchholtz, H.-V., Delincée, H., Estendorfer, S., von Grabowski, H.-U., Kruspe, W., Mainczyk, K., Münz, H., Schleich, H., Vreden, N., Wiezorek., C., Bögl, K.W. (1993) Thermoluminescence analysis to detect irradiated fruit and vegetables - an intercomparison study. Bericht des Instituts für Sozialmedizin and Edemiologie des Bundesgesundheitsamtes. SozEp-Heft 3/1993 (Bundesgesundheitsamt, Berlin).
- [70] Sanderson, D.C.W., Carmichael, L.A., Naylor J.D. et Fisk S. (1997) An international collaborative blind trial of thermoluminescence of irradiated fruits and vegetables, SURRC report to MAFF.
- [71] Marchioni, E., Anklam, E., Chabane, S., Delincée, H., Douifi, L., Hungerbühler, H., Pelleau, Y., Pinnioja, S., Raffi, J., Sanderson, D., Wagner, U.: Detection by Thermoluminescence of an Irradiation Treatment of Five Species of Dehydrated Fruit and Vegetables. Report on a CTCPA/AIFLD International Interlaboratory Study. Edited by Marchioni, E., Delincée, H. Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, 1999, BFE-R—99-02 (Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe).
- [72] Schreiber G., Wagner U., Ammon J., Brunner J., Butz B., Carmichael L.A., Delincée H., Eisen S., Fienitz B., Hammerton K., Helle N., Jahr D., Kispeter J., Klein H., Kruspe W., Kühn T., Mainczyk K., Meier H., Münz H., Nootenboom H., Pfordt J., Sanderson, D.C, Schleich C., Vreden N., Zachäus U., Zoost C., Bögl K-W., An interlaboratory study on the identification of irradiated potatoes and on the estimation of applied doses by thermoluminescence analysis. Report of the federal Institute for Health Protection of Consumers and veterinary Medicine, BgVV-heft 3/1997, Berlin.
- [73] Sanderson, D.C., Slater, C., Cairns, K.J., (1989) Detection of Irradiated Food. *Nature*, **340**, pp. 23-24.
- [74] Sanderson, D.C.W., Slater, C., Cairns, K.J., (1989) Thermoluminescence of foods : origins and implications for detecting irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **34**, 915-924.
- [75] Sanderson, D.C.W.: Luminescence detection of irradiated foods. *Food Irradiation and the Chemist*, edited by Johnston, D.E. and Stevenson, M.H.: Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1990, 25-56.
- [76] Heide, L., Guggenberger, R., Bögl, K. W. (1990) Application of thermoluminescence measurements to detect irradiated strawberries. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, pp. 2160-2163.
- [77] Autio, T., Pinnioja, S., (1990) Identification of irradiated foods by the thermoluminescence of mineral contamination. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **191**, pp 177-180.
- [78] Göksu, H.Y., Regulla, D.F., Hietel, B., Popp, G. (1990) Thermoluminescent dust for identification of irradiated spices. *Rad. Protect. Dosimetry* **34**, 319-322.
- [79] Delincée, H. (1992) Detection methods for irradiated food. In : "Irradiation for the food sector", *Proceedings Symp. Saint-Hyacinthe (Québec) Canada*, 13 May, 1992, Agriculture Canada, 24-60.
- [80] Sanderson, D.C, Carmichael, L.A., Clark, P.A., R.J. (1992) Development of luminescence tests to identify irradiated food. Final report on project N 1701. Thermoluminescence of irradiated fruits and vegetables, SURRC report to MAFF.



- [81] Autio, T., Pinnioja, S., (1993) Identification of irradiated foods by thermoluminescence of the contaminating minerals. In : Leonardi, M., Raffi, J.J., Belliaro, J.-J. (eds.), "Recent advances on detection of irradiated food". Luxembourg, EUR-14315 : Commission of the European Communities, pp. 183-191.
- [82] Pinnioja, S., Autio, T., Niemi, E., Pensala, O. (1993) Import control of irradiated foods by the thermoluminescence method. Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. **196**, pp. 111-115.
- [83] Pinnioja, S. (1993) Suitability of the thermoluminescence method. For detection of irradiated foods, Radiat. Phys. Chem., **42**, 397-400.
- [84] Schreiber, G.A., Hoffmann, A., Helle, N., Bögl, K.W. (1994) Methods for routine control of irradiated food : determination of the irradiation status of shellfish by thermoluminescence analysis. Rad. Phys. Chem. **43**, pp. 533-544.
- [85] Schreiber, G.A., Ziegelmann, B., Quitzsch, G., Helle, N., and Bögl, K.W. (1993) Luminescence techniques to identify the treatment of foods by ionizing radiation. Food Structure **12**, pp. 385-396.
- [86] MAFF, 1992, Detection of Irradiated Herbs and Spices, MAFF validated methods for the Analysis of foodstuffs, V 27, 16 p., Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods, London ; also published as MAFF : Detection of irradiated herbs and spices : Scottish Universities research and Reactor centre procedure for thermoluminescence detection of irradiated herbs and spices using renormalized separated minerals, J. Assoc. Publ. Analysts, 1993, **29**, 187-200.
- [87] Untersuchung von Lebensmitteln : Nachweis einer Strahlenbehandlung (ionisierende Strahlen) von Frischobst/Gewürzen und Gewürzmischungen mittels Thermolumineszenz (Détection des fruits frais/épices et mélanges d'épices traités avec des radiations (ionisantes) par spectrométrie RPE) in : Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG ; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/Bundesgesundheitsamt (Dans : Collection des méthodes officielles sous l'article 35 de l'Acte Fédéral Allemand sur les Aliments ; Méthodes d'échantillonnage et d'analyse des aliments, des produits de tabac, des cosmétiques et des biens de consommation/Office Fédéral de la Santé). Losebattausgabe, Sand Aug. 1993 Bd. 1 (Edition non reliée, à partir de 1993-08, Vol. I) Berlin, Köln : Beuth Verlag GmbH.
- [88] Raffi J., Delincée H., Marchioni E., Hasselmann C., Sjöberg A-M., Leonardi M., Kent M., Bögl K-W., Schreiber G., Stevenson H., Meier W., Concerted Action of the Community Bureau of Reference on methods of identification of irradiated Foods, BCR, 1994, EUR 15261 EN, european Commission, Bruxelles, Luxembourg.
- [89] Sanderson D.C.W., Carmichael L., Ni Riani S., Naylor J., Spencer J., Luminescence studies to Identify Irradiated Food, Food Sci. Technol. Today, 1994, 8(3), 93-96.
- [90] Sillano O., Roman A., Deza A., Rubio T, Espinoza J., Application of thermoluminescence measurements to detect low dose gamma-irradiated table grapes, Radiat. Phys. Chem., 1994, 43, 585-588.
- [91] Calderon T., rendell H.M., neneitez P., Townsend P.D., Millan A., Wood R., thermoluminescence spectra of inorganic dust from irradiated herbs and spices, J. Food Sci., 1994, 59, 1070-1071.
- [92] Raffi J., Fakirian A., Lesgards G., Comparison between electron spin resonance and thermoluminescence in view of identification of irradiated aromatic herbs, Ann. Fals. Exp. Chim., 1994, 87, 125-134.
- [93] Sanderson, D.C.W., Carmichael, L.A., and Naylor, J.D.: Recent advances in thermoluminescence and photostimulated luminescence detection methods for irradiated foods. Detection Methods for Irradiated Foods - Current Status. Edited by McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., and Pearce, J., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 124-138.
- [94] Hammerton, K.M. and Banos, C.: Detection of irradiated spices by thermoluminescence analysis. Detection Methods for Irradiated Foods - Current Status. Edited by McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray R., and Pearce J., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 168-177.
- [95] Roberts, P.B. and Hammerton, K.M. : Thermoluminescence detection of irradiated herbs and spices : An Australasian trial. Detection Methods for Irradiated Foods – Current Status. Edited by C.H. Mc

- Murray, E.M. Stewart, R. Gray, and J. Pearce, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 178-181.
- [96] Kawamura, Y., Murayama, M., Uchiyama, S., and Saito, Y. : Comparison of thermoluminescence detection methods for irradiated spices. *Detection Methods for Irradiated Foods – Current Status*. Edited by C.H. Mc Murray, E.M. Stewart, R. Gray, and J. Pearce, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 149-157.
- [97] Sanderson, D.C.W., Carmichael, L.A., Spencer, J.Q., and Naylor, J.D. : Luminescence detection of shellfish. *Detection Methods for Irradiated Foods – Current Status*. Edited by C.H. McMurray, E.M. Stewart, R. Gray, and J. Pearce, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 139-148.
- [98] Calderon, T., Correcher, V., Millan, A., Beneitez, P., Rendell, H.M., Larsson, M., Townsend, P.D., and Wood, R.A. : New data on thermoluminescence of inorganic dust from herbs and spices. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 1995, 28, 415-423.
- [99] Beneitez, P. Correcher, V., Millan, A., and Calderon, T. : Thermoluminescence analysis for testing the irradiation of spices. *J. Radioanalyt. Nucl. Chem.*, 1994, 198, 401-410.
- [100] Khan, H.M. and Delincée, H. : Detection of irradiation treatment of dates using thermoluminescence of mineral contaminants. *Radiat. Phys. Chem.*, 1995, 46, 717-720.
- [101] Pinnioja, S. and Pajo, I : Thermoluminescence of minerals usefull for identification of irradiated seafood. *Radiat. Phys. Chem.*, 1995, 46, 753-756.
- [102] Polonia, I., Estevos, M.P., Andrade, M.E., and Empis, J. : Identification of irradiated peppers by electron spin resonance, thermoluminescence and viscosity. *Radiat. Phys. Chem.*, 1995, 46, 757-760.
- [103] Khan, H.M. and Delincée, H. : Detection of radiation treatment of spices and herbs and Asian origin using thermoluminescence of mineral contaminants. *Appl. Radiat. Isot.*, 1995, 46, 1071-1075.
- [104] Sanderson, D.C.W., Carmichael, L.A., and Naylor, J.D. : Photostimulated luminescence and thermoluminescence techniques for the detection of irradiated food. *Food Sci. Technol. Today*, 1995, 9, 150-154.
- [105] Lesgards, G., Fakirian, A., and Raffi, J. : Thermoluminescence identification of irradiated foodstuffs : LARQUA research. *Detection methods for irradiated foods – Current status*. Edited by C.H. McMurray, E.M. Stewart, R. Gray, and J. Pearce, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 158-167.
- [106] Leffke, A., Helle, N., Linke, B., Bögl, K.W., and Schreiber, G.A. : Studies on detection of irradiated citrus fruit and grains : Germination and some other techniques. *Recent advances on detection of irradiated food*. Edited by Leonardi, M., Raffi, J.J., and Belliardo, J.J. BCR-Information, 1993, Luxembourg : Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/14315/en), 111-121.
- [107] Khan, H.M., Bhatti, I.A., Delincée, H. : Identification of irradiated pulses by thermoluminescence of the contaminating minerals. *Radiat. Phys. Chem.* 1998, 51, xxx – yyy.
- [108] Villavicencio, A.I.C.H., Mancini-Filho, J. Delincée, H. : Application of different techniques to identify the effects of irradiation on Brazilian beans after six months storage. *Radiat. Phys. Chem.* 1998, 52, 161-166.