

MODERNE ANALYSEMETHODES VOOR ADDITIEVEN, CONTAMINANTEN EN RESIDUEN

H. F. De Brabander, K. De Wasch, L. Okerman, P. Batjoens

Vakgroep Diergeneeskundig Toezicht op Eetwaren,
Laboratorium voor Chemische Analyse
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,
Salisburylaan, 133, 9820 Merelbeke, België

SAMENVATTING

De sterke evolutie van het instrumentarium voor de analyse van additieven, contaminanten en residuen in eetwaren houdt verband met de zeer snelle ontwikkelingen in de elektronica en de informatica gedurende de voorbije 25 jaar. Gekoppelde compacte apparaten zoals GC-MS-MS (gaschromatografie-massaspectrometrie-massaspectrometrie) en LC-MSn (vloeistofchromatografie-massaspectrometrie) maken de specifieke detectie van zeer lage concentraties aan contaminanten en residuen in complexe matrixen mogelijk. Deze methodes kunnen ook de klassieke methodes voor sommige additieven vervangen.

INLEIDING

De analytische chemie (van eetwaren) was gedurende de laatste 25 jaar aan een grondige verandering onderhevig. Deze evolutie is nog steeds bezig en vooral opmerkelijk (of door de auteurs opgemerkt) op het vlak van de neven- en sporenelementen (analyse van respectievelijk additieven en contaminanten). Vijfentwintig jaar geleden werden, zowel in laboratoriumpraktijk als bij de praktische oefeningen voor studenten, nog vele colorimetrische en titrimetrische methodes gebruikt (bv. voor NaCl de "Volhard titratie", de colorimetrische methode "Van Waes" voor thyreostatica bepaling in de schildklier). Vandaag de dag liggen in de meeste laboratoria de buretten in het onderste schuif terwijl de fotometer veelal is vervangen door een microtiterplaatlezer. De klassieke methodes zijn dikwijls verdrongen door chromatografische, immunochemische of elektrochemische technieken. Deze evolutie is ontegensprekelijk verbonden aan de explosieve ontwikkeling van de personal computer: aan elk apparaat is of kan een computer worden geschakeld. Studenten en recent afgestudeerden kunnen zich waarschijnlijk niet voorstellen dat in 1970 "de" (ene) centrale computer van de Universiteit Gent over een geheugen beschikte van 64 K en een ganse kelderverdieping in beslag nam (IBM 360/30). Op vele burelen van onderzoekers prijken nu personal computers die deze mogelijkheden ver overtreffen. Dit brengt ons op een ander aspect nl. de miniaturisatie. Computers en ook analytische apparaten worden steeds kleiner en werken dikwijls met een kleinere hoeveelheid monster dan 25 jaar geleden. Waar echter eerst werd gedacht dat de computer de informatie op papier ging vervangen is een omgekeerde evolutie aan de gang. Analysten worden overstroomd door een steeds groter wordende papiermassa die door steeds snellere laserwriters in een steeds sneller tempo wordt uitgespuwd. De hoeveelheid uitgebrachte informatie dreigt echter het incasseringsvermogen van de analyst te overschrijden.

Gecomputeriseerde autoanalysatoren waar langs de ene kant een monster ingaat en langs de andere kant een papiertje met de uitslag komt zijn niet meer denkbeeldig maar zullen aan dezelfde (eenvoudige) maar strenge analytische regels moeten voldoen als de klassieke methodes.

In dit artikel worden enkele moderne analysetechnieken voor additieven, contaminanten en residuen besproken. Uiteraard zal dit overzicht gekleurd zijn door de specifieke onderzoeksterreinen van de auteurs en zal het daardoor ook onvermijdelijk onvolledig overkomen voor sommige lezers.

ADDITIEVEN, CONTAMINANTEN EN RESIDUEN

Additieven, contaminanten en residuen zijn te beschouwen als vreemde stoffen in onze voeding (Deelstra *et al.*, 1996). Additieven worden opzettelijk aan eetwaren toegevoegd om bepaalde karakteristieken van het levensmiddel te verbeteren of te wijzigen zoals:

- de houdbaarheid van het product te verhogen (conserveermiddelen, e.a.).
- de technologische verwerking van het product te verbeteren (emulgatoren, e.a.).
- de smaak en de kleur van het product aan te passen (kleurstoffen, aromastoffen, e.a.).

De additieven worden aangeduid, hetzij met hun eigen naam hetzij met een code bestaande uit de letter E gevolgd door een getal van 3 cijfers (zgn. E-nummer).

In eetwaren treft men ook verontreinigingen aan waarvan het niet de bedoeling is dat ze in het uiteindelijke product aanwezig zijn of erin kunnen gedetecteerd worden. Deze kunnen in het product terechtgekomen zijn op een ongewilde manier (contaminanten) doch ook het residu zijn van een gewilde (al dan niet verboden) behandeling (residuen). Deze verontreinigingen kunnen zowel tijdens de productieperiode (bv. de teelt- of fokperiode) als tijdens het verwerkingsproces plaatsgrijpen.

Tijdens de productieperiode

- via het voeder: bv. mycotoxines (aflatoxines), minerale verbindingen (o.a. Pb, Hg, Cd)
- via de mens: bv. antibiotica en hormonen: oraal, ingespoten of ingeplant
- via het milieu: bv. zware metalen en bestrijdingsmiddelen.

Uit het verwerkingsproces

- onzuiverheden van de toegevoegde additieven (bv. fluoriden in fosfaten)
- contaminaties tijdens het verwerkingsproces (bv. koelmiddelen, detergenten)
- interacties tussen verpakkingsmiddel en eetwaren (bv. Sn en Pb uit blik)
- secundaire reacties met hulpstoffen (nitrosaminevorming bij toevoeging van nitriet)
- als gevolg van bestraling of roken (bv. contaminatie met benzopyreen)

Een "spoor" (trace) is een component welke in een kleine concentratie aanwezig is in een ander materiaal welk de "matrix" wordt genoemd. Er is geen algemene norm of overeenkomst over het concentratieniveau waarbij men over een "spoor" kan spreken. Met de steeds beter wordende analytische technieken verschuift de detectielimiet naar steeds lagere concentraties. Vandaag de dag zou men kunnen stellen dat ppm hoeveelheden (mg/kg en lager) kunnen beschouwd worden als "sporen" concentraties. Ultra-sporen analyse kan worden beschouwd als het sub-ppm (1 mg/kg) of sub-ppb niveau (1 µg/kg). Een residu kan worden beschouwd als "een spoor van een product welke overblijft na een gewilde toediening". Enkele voorbeelden: Vb. 1: Een dier wordt behandeld met tetracycline. In vlees kan men residuen van tetracycline aantonen.

Vb. 2: Een rund graast langs de autosnelweg. In dit dier kan lood als contaminant worden aangetoond. Vb. 3: Een steen op Mars bevat sporen (geen residuen) Mn.

Afhankelijk van de situatie kan een spoor worden beschouwd als een contaminant of als een residu: wanneer bv. een dier wordt behandeld met zeranol kunnen residuen zeranol aanwezig zijn. Wanneer éénzelfde hoeveelheid zeranol echter afkomstig zou zijn van bedorven maïs dan is dit eerder een contaminant. Beide definities worden ook vaak door elkaar gebruikt.

In dit verband is een grondige achtergrondkennis van de analyst of van diegene die de analyse interpreteert of er gevolg aan geeft, vereist. Sommige producten kunnen van nature aanwezig zijn in sommige matrixen en kunnen dan ook niet als contaminanten of residuen worden beschouwd.

Een voorbeeld: de beer (het mannelijk varken) produceert nortestosteron (een hormoon dat als "het" anabolicum bij het rund kan worden beschouwd (De Bruykere *et al.*, 1990)). Varkensvlees, afkomstig van mannelijke varkens, bevat dan ook van nature nortestosteron. Enkele jaren geleden werd bij import van ravioli vanuit Italië naar Duitsland nortestosteron aangetroffen in de vleesdeeg en werd de import van dit product geschorst. Deze maatregel was wetenschappelijk onjuist vermits het varkensvlees (misschien "Duits" varkensvlees ??) afkomstig kon zijn van mannelijk dieren en dus nortestosteron kon bevatten als natuurlijk bestanddeel.

Analoge voorbeelden zijn te geven voor andere contaminanten en residuen.

Naast een grondige achtergrondkennis in zijn eigen specialisatie dient de analyst ook een basiskennis te hebben van andere aanverwante vakgebieden. Bepaalde analyten kunnen in een andere context een totaal andere en zelfs totaal onverwachte functie of eigenschappen vertonen. Zo kunnen bepaalde antibiotica ook thyreostatische eigenschappen bezitten en aldus interfereren met bepaalde screeningstests. Bepaalde pesticiden, kunnen omwille van hun structuur oestrogene eigenschappen vertonen. "Onverwachte" moleculen, zoals nonylphenol, een additief voor plastics, kunnen ageren als milieuoestrogenen enz..

DE EISEN VOOR DE ANALYSEMETHODES

Door het steeds hoger wordend impact van het resultaat wordt van de analysemethoden een steeds hogere accuraatheid en precisie gevraagd. Hierbij dient duidelijk een onderscheid gemaakt tussen kwalitatieve analyse (die alleen de aanwezigheid of afwezigheid van een component vaststellen) en kwantitatieve analyses.

Kwantitatieve analyses zijn noodzakelijk voor het bepalen van componenten die in een maximale concentratie mogen aanwezig zijn (bv. MRL (Maximale Residu Limiet) of PL (Permissible Level)) in welbepaalde matrixen (en in andere soms niet). De methode dient vast te stellen of de concentratie van het analyt boven of onder deze limiet is gelegen. De methodes moeten een kwantificatielimiet (LOQ: Limit of Quantification) vertonen die lager is dan de MRL. Recent werd een consensus bereikt waarbij de LOQ (minstens) = aan 0.5 MRL. Wanneer het bekomen resultaat hoger ligt dan de MRL (en dus actie tot gevolg kan hebben) dienen kwaliteitscriteria gebruikt voor kwalificatie en kwantificatie. Voor een resultaat in de buurt van de MRL (bv. 300 ppb) is de kwalitatieve en kwantitatieve accuraatheid en de intra- en inter-laboratorium reproduceerbaarheid in een relatief hoog concentratiegebied van het grootste belang. Het is bijzonder frustrerend wanneer een actie wordt genomen bij een resultaat van 310 ppb (>MRL) en bij tegenanalyse van hetzelfde staal in een ander erkend laboratorium 290 ppb wordt gevonden. Speciale aandacht dient hierbij gegeven aan het afronden van de resultaten: slechts alle "zekere" cijfers en het eerste onzekere cijfer dient te worden weergegeven. Al te vaak wordt echter gezien dat deze eenvoudige regel analysten (en andere onderzoekers) zeer zwaar valt.

Voor waarden veel lager dan de MRL spelen kwalitatieve fouten (zie later) een minder belangrijke rol tenzij de analysemethode een analyt volledig zou missen.

Kwalitatieve methodes kunnen worden gebruikt bij door de wet verboden analyten (bv. stoffen met oestrogene, androgene of gestagene werking). Deze methodes zullen echter steeds een soort semi-kwantitatief karakter vertonen. In de praktijk gebruikt men voor het bepalen van de aan- of afwezigheid van het analyt een actielimiet: dit is een waarde, meestal in een relatief laag concentratiegebied (bv. 2 µg/kg) waarboven een

staal als positief en waaronder het als negatief wordt beschouwd. Deze actielimiet is geen wettelijke waarde maar een praktische limiet die wordt bepaald door de analytische mogelijkheden van het ogenblik.

De aanwezigheid en de identiteit van het analyt volgt uit verschillende criteria: retentie tijden of R_w waarden, specifieke kleurreacties, (massa) spectrometrische gegevens enz... De kwaliteitscriteria voor residuanalyse werden beschreven door de EU (EEC, 1987, 1989, 1993) maar zijn aan voortdurende aanpassing onderhevig. Kwalitatieve methodes hebben echter een intrinsiek (semi) kwantitatief karakter: de minimale hoeveelheid om een spot te zien of een signaal te onderscheiden uit de achtergrond.

Het verschil tussen een MRL (of een PL) en een Actie Limiet (AL) is 3-voudig. Ten eerste is een MRL meestal in een hoger concentratiegebied gelegen dan een AL (bv. MRL voor sommige diergeneesmiddelen = 100 ppb). Ten tweede zijn MRL's enkel toepasselijk voor toegelaten producten in eetwaren of eetbare delen. Zo zal er bv. nooit een MRL kunnen bestaan voor een analyt in urine, haren of pluimen. Ten derde is een MRL een wettelijke waarde terwijl de AL een overeenkomst is tussen laboratoria en inspectiediensten.

METHODES VOOR DE ANALYSE VAN ADDITIEVEN

Daar de meeste additieven toegelaten zijn in een welbepaalde en meestal hoge concentratie (in welbepaalde matrixen) zijn dit meestal (semi-) kwantitatieve methodes.

Enkele additieven en hun klassieke opsporingsmethodes

Hierbij worden enkele additieven uitgekozen waarvan de routinematige opsporing ons vertrouwd is.

Fosfaten en (lineaire) polyfosfaten worden, omwille van hun gunstige technologische eigenschappen veel als additieven in verschillende eetwaren gebruikt. Fosfaten zijn echter ook normale bestanddelen van sommige eetwaren zoals vlees en zuivelproducten. De verhouding van het fosfaatgehalte tot het eiwit % wordt dikwijls als een waardemeter voor toegevoegde P-houdende additieven gebruikt (bv. als de fosfor-index). Voor de kwantitatieve bepaling van P₂O₅ kan een tijdrovende, gravimetrische methode gebruikt worden. Praktisch geschiedt de bepaling van het P₂O₅-gehalte door colorimetrie van het (vanado)fosfomolybdeen-complex.

Nitriet wordt vooral gebruikt voor zijn kleurverbeterende effecten op vlees (omroding). Nitraat kan in nitriet worden omgezet en vice-versa. Nitraat is eveneens een normaal bestanddeel van sommige eetwaren (bv. groenten) en grondwater. De meest gebruikte methode is gebaseerd op de diazo-reactie van nitriet met sulfanilzuur en koppeling met α -naphthylamine. Het nitrietgehalte wordt rechtstreeks in het extract bepaald. De som van nitriet en nitraat wordt dan bepaald door het nitraat eerst te reduceren tot nitriet (bv. door een Cd

kolom). Het nitraatgehalte wordt berekend bij verschil: (nitriet na Cd-kolom) - (nitriet in extract).

Sulfiet is toegelaten in verschillende levensmiddelen zoals suiker, jam en wijn in sterk wisselende concentraties (10-450 mg/kg). Naast een antimicrobieel effect hebben sulfieten ook een anti-oxiderend effect. Sulfiet geeft gemalen vlees een vers-rood uitzicht terwijl de geur van SO₂ eventueel bederf maskeert. Om te voorkomen dat microbiel besmet vlees met een vers uitzicht (door sulfiet) zou verkocht worden, is het gebruik van sulfiet in vlees volledig verboden. Daardoor volstaat kwalitatieve detectie in vleesproducten (bv. de malachietgroen test: gehakt mengen met malachietgroen-oplossing. Normaal vlees is blauw-groen gekleurd. Vlees met sulfiet ontkleurt. Volgens de Belgische wetgeving wordt het SO₂ gehalte van een eetwaar kwantitatief bepaald door titratie na overdestilleren van het aangezuurde extract.

Keukenzout of NaCl is een van de oudst gekende ingrediënten. Cl⁻ wordt titrimetrisch bepaald (Volhard) door toevoegen van een overmaat AgNO₃ (vorming AgCl). De overmaat Ag⁺ worden teruggetitreerd met KSCN en Fe³⁺ als indicator. Voor dieetproducten speelt ook het Na⁺- en K⁺-gehalte een rol (mg Na/K/100 g eetwaar).

Moderne methodes voor additieven

Bovenstaande additieven kunnen eveneens op tientallen diverse methodes worden bepaald. Bij de bediening welke methode te gebruiken spelen vele factoren een rol zoals

- 1) de frequentie waarmee de analyse dient uitgevoerd: éénmalig? tot honderden per week
 - 2) het controlesysteem waarin deze analyse past: volgt er actie? welke?
 - 3) de accurateheid en precisie die wordt gevraagd door de klant
 - 4) de prijs / kwaliteit verhouding
- Enkele voorbeelden worden hieronder gegeven.

Enzymatische methodes

In de meeste gevallen is er geen ingewikkelde monster voorbereiding nodig bij enzymatische bepalingen in voedsel. Het is niet nodig het te bepalen substraat te isoleren of chemisch analoge componenten te verwijderen. Het doel van de monster voorbereiding bestaat erin de matrix om te zetten in een kleurloze oplossing (vermits de meting zal gebeuren door fotometrie). De extractie gebeurt meestal met gedestilleerd water. Voor onteiwitting wordt meestal perchloorzuur gebruikt. Vetten worden grotendeels verwijderd uit de monsteroplossing door filtratie.

De specificiteit van de analyse wordt bepaald door de specificiteit van het enzyme. Zo kan pyro- of trifosfaat enzymatisch worden geanalyseerd naast monofosfaat met pyrofosfatase. Nitraat en nitriet kunnen enzymatisch naast elkaar worden bepaald (bv. in worst; Arneth, 1988). Sulfiet kan in verschillende levensmiddelen worden gemeten door oxidatie tot sulfaat met sulfietoxidase. NaCl daarentegen kan niet enzymatisch worden bepaald.

Ook andere additieven zoals ascorbinezuur, D-glucono- δ -lacton, glutaminezuur, melkzuur, zetmeel kunnen enzymatisch worden bepaald. (Boehringer Mannheim, 1995). Enzymatische analyse is ook een eenvoudige manier om diastereoisomeren te meten (bv. l-ascorbinezuur)

Electrochemische methodes / vlamfotometrie

Hoewel vele additieven kunnen worden bepaald met elektrochemische methodes beperken wij ons hier tot zout (NaCl). NaCl kan snel bepaald worden met verschillende ionselectieve electrodes. Als voorbeeld van moderne technologie vermelden wij hier de "shirt-pocket" zoutmeters. Deze complete apparaatjes (grootte van een audiocassette) kunnen het zoutgehalte van een eetwaar meten op 100 μ l extract of staal (bv. melk) dat op de sensor wordt aangebracht. Van belang voor diëtproducten is hierbij of zout wordt gemeten via Cl⁻ of dat ook Na⁺ of K⁺ worden bepaald. Voor elk van de 3 ionen is een appart "shirt-pocket" apparaatje beschikbaar. Dit toestelletje is een goedkoper alternatief voor vlamfotometrie.

Chromatografische methodes

Zowel in de TLC, HPLC als GC literatuur zijn diverse methodes te vinden om diverse additieven kwalitatief en kwantitatief te bepalen. Enkele voorbeelden: polyfosfaten en metafosfaten kunnen kwalitatief en kwantitatief worden bepaald naast mono, di- en trifosfaat door TLC of ionenchromatografie. Het differentiëren van fosfaten kan van belang zijn voor de eetwareninspectie.

Nitriet, nitraat, chloride, sulfiet en sulfaat kunnen worden gemeten in een enkele run. Voor sulfiet bv. is dit van belang omdat nogal wat eetwaren S-verbindingen bevatten die kunnen interfereren bij de klassieke bepaling via destillatie en daardoor bij vleesproducten vals positieve resultaten veroorzaken.

Capillaire elektroforese

Bij capillaire elektroforese wordt een hoge spanning aangelegd over een met buffer gevuld capillair. Deze techniek is bijzonder geschikt voor de analyse van additieven omdat deze in relatief hoge concentratie tov de matrix aanwezig zijn. De elektrokinetische scheidingen zijn een alternatief voor ionenchromatografie. Uiteraard stelt zich hier, net zoals bij de chromatografische methoden de vraag naar de opportuniteit om een relatief duur apparaat in "stand-by" te houden voor een bepaling die misschien eenvoudiger (en/of goedkoper) kan (bv. voor Na⁺ en K⁺). De oplossing van die vraag kan niet algemeen worden gegeven doch zal steeds afhangen van de specifieke omstandigheden van het laboratorium.

METHODES VOOR CONTAMINANTEN EN RESIDUEN

Deze worden klassiek opgedeeld in screeningsmethodes en bevestigingsmethodes. Het doel van een screeningsmethode is een aantal verdachte stalen uit een zeer groot aantal monsters selecteren. Met de

bevestigingsmethode wordt dan nagegaan of het verdacht monster inderdaad het analyt bevat (in voldoende hoge concentratie).

Screeningsmethodes

Alhoewel ook instrumentele methodes (zoals GC-MS) in sommige gevallen zinvol als screeningsmethode kunnen worden aangewend zijn de meeste gebaseerd op immunochemische technieken.

Het principe van deze bepaling berust op competitie tussen gemerkte en ongemerkte analyten tot het bezetten van een beperkt aantal bindingsplaatsen op een specifiek anti-lichaam. Vanuit een praktisch standpunt is daarbij vooral de specificiteit van het anti-lichaam van belang. Er kan alleen op een kosten-efficiënte wijze gescreend met een aspecifiek anti-lichaam tegen een groep producten (bv. multi-residu screening van beta-agonisten). Wanneer men werkt met zeer specifieke anti-lichamen (tegen 1 analyt) en er dienen meerdere analyten gescreend dan wordt een immunologische methode duur ten opzichte van andere technieken.

Bevestigingsmethodes

In moderne multi-residu analyse spelen chromatografische technieken de belangrijkste rol zowel voor screening (naast immunoassays) als voor bevestigingsanalyse. Zowel de tweede (clean-up) als de derde (detectie) stap van een standaardprocedure voor residu-analyse bestaat hoofdzakelijk uit chromatografische stappen.

Dunnelaagchromatografie (HPTLC)

HPTLC was 25 jaar geleden "the method of choice" voor residuanalyse. De redenen daartoe waren zeer eenvoudig: de lage kostprijs om op te starten en de eenvoud om twee dimensionale chromatogrammen (2D) te bekomen. In de voorbije twee decades werden verschillende HPTLC methods voor residu analyse ontwikkeld. Voorbeelden zijn deze voor thyreostatica en anabolica (De Brabander en Verbeke, 1975; De Brabander *et al.*, 1989, 1990, 1991, 1993; Smets *et al.*, 1991), beta-agonisten en corticosteroiden (Courthéyn *et al.*, 1988, 1993). Ook voor andere contaminanten zoals albendazole (Abjean, 1996), quinolones (Juhel-Gaugain, 1996), tiamuline (Posyniak *et al.*, 1996b) en sulfonamides (Posyniak *et al.*, 1996b; Steinbeck *et al.*, 1996; Van Poucke, 1994) werden HPTLC methodes beschreven.

HPTLC heeft diverse voordelen: het chromatografisch systeem wordt weggegooid na elke analyse. Dit heeft zijn voordeel bij zeer "vuile" stalen die een GC of HPLC kolom irreversibel kunnen beschadigen en ook bij monsters waarin de concentraties sterk kunnen variëren (bv. bij spuitplaatsen). Het is dan veilig eerst een HPTLC toe te passen voor een eerste inschatting van het staal. De voordelen van de 2D techniek zijn niet altijd gekend en daarom ook niet geliefd door een groot aantal analisten. Nochtans geeft een 2D-TLC de analyt een zeer goed beeld van het onderzochte monster. Nieuwe contaminanten, die een gelijkaardige structuur vertonen als de onderzochte zullen bij TLC

sneller worden opgemerkt dan in een GC of HPLC chromatogram.

HPTLC is eveneens een zeer goede starter voor laboratoria met geringe middelen (bv. ontwikkelingslanden) of op plaatsen waar stroomvoorziening problematisch is.

De verdere ontwikkeling van de HPTLC wordt op dit ogenblik vooral gehinderd door het gebrek aan mogelijkheden tot automatisering. Het is nochtans theoretisch mogelijk een TLC plaat volledig automatisch te spotten, te ontwikkelen en te reveleren. Het is echter aan de firma's die "van TLC moeten leven" om daaraan iets te doen.

Gaschromatografie (GC)

Voor de analyse van contaminanten is vooral het gebruik van specifieke detectoren, zoals de Electron Capture Detector (ECD) van belang. Deze detector, die bijzonder gevoelig is voor halogeenhoudende verbindingen (Cl, F) en weinig voor andere is mede gegroeid met het onderzoek van residuen van gechloreerde pesticiden. Ook andere specifieke detectoren zoals de N-detector en de S-detector worden regelmatig gebruikt. Een overzicht van het gebruik van moderne chromatografische methodes bij het onderzoek van pesticiden is weergegeven in een recent themanummer van de "Journal of Chromatography" van 22/11/1996 ((1996) 754 nr 1+2 : Chromatography and Electrophoresis in Environmental analysis: Pesticides residues).

Voor de analyse van molecules die geen halogenen bevatten zijn reagentia ontwikkeld waarmee halogeenhoudende groepen op de molecules worden geplaatst (specifieke derivatisatie). Een voorbeeld daarvan is de bepaling van lincomycine (een antibioticum) in zalmweefsel door derivatisatie en bepaling op een N, P detector (Wenhong, 1996).

GC-MS

De meeste laboratoria zijn voor analyse van contaminanten overgeschakeld (of zullen (moeten) overschakelen) op GC-MS (gaschromatografie-massaspectrometrie). Bij massaspectrometrie worden de analyten geïoniseerd en gefragmenteerd. De fragmenten kunnen worden gebruikt voor kwalitatieve en kwantitatieve analyse. Er zijn verschillende types GC-MS apparaten. Het belangrijkste verschil tussen deze apparaten is de manier waarop de ionen worden gedetecteerd. De meeste quadrupool apparaten dienen voor het bepalen van lagere concentraties (d.w.z. onder 1 ng) over te gaan op Selected Ion monitoring (SIM); slechts een beperkt aantal diagnostische fragmentio-

nen wordt gevolgd. Ion Trap systemen werken in full-scan bij lage (pg) concentraties. Een recente trend in GC-MS is de verbetering van de detecteerbaarheid (detectielimiet) van de massaspectrometers, ook bij klassieke quadrupool apparaten (meten van lagere concentraties in full-scan).

Bij SIM worden een aantal diagnostische ionen van het analyt gevolgd gedurende een bepaald venster rond de verwachte retentietijd. Deze diagnostische ionen dienen aanwezig te zijn in de juiste relatieve intensiteiten ($\pm 20\%$ (CI) of $\pm 10\%$ (EI)). Hoe hoger het aantal gevolgte ionen hoe hoger de specificiteit doch ook hoe hoger de kans op vals negatieve resultaten.

Bij full-scan identificatie worden in de meeste gevallen een groot aantal (bv. 16) van de belangrijkste pieken van het massa spectrum van de onbekende vergeleken met dat van de standaard opgenomen onder identieke omstandigheden. Dit gebeurt met een computer en wordt bv. uitgedrukt in een FIT waarde (bv. 80 %).

Beide technieken hebben hun voor- en nadelen en ook hun eigen supporters. Als illustratie het volgende. Bij (eenvoudige) MS (Fig. 1) zijn de ionen en pieken in het massaspectrum afkomstig van het analyt AD-CDEF maar ook van de interferenties PQT, XYZ, UVW en PQRS. Wanneer de concentratie van AD-CDEF daalt tov deze van de interferenties zal het massaspectrum van het analyt bij full-scan langzaam "wegzinken" in de achtergrond van interferenties.

In SIM ziet de massaspectrometer deze interferenties niet, doch ze zijn er wel. Een SIM signaal dat het ion 440 (bv. piek 2; Fig. 2) bevat zal ernstig gestoord worden door de veel grotere piek 1 met het ion 438 (isotoop interferentie; De Brabander *et al.*, 1993, 1996). De vraag zal steeds dienen gesteld of de piek in SIM afkomstig is van het analyt of van een interferentie. Zo zal, bij afwezigheid van piek 2, piek 1 (als deze binnen het retentietijdsvenster valt) valselijk kunnen aanzien worden voor het analyt.

In sommige gevallen (bv. bij betwistingen, een tegenanalyse enz.) is het echter zeer nuttig ook de afwezigheid van een analyt in een matrix te kunnen bewijzen. Naast het uitvoeren van blanco en versterkte stalen is de beste manier het nagaan van de recovery van gedeuteerde standaarden (CD_3 i.p.v. CH_3) toegevoegd aan het monster op het concentratie niveau van de beslissingslimiet (bv. 2 ppb). Ook bij kwantificering zijn gedeuteerde analyten zeer nuttig, soms zelfs noodzakelijk.

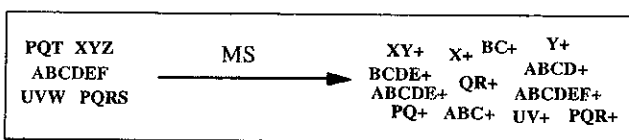


Fig. 1. Voorstellingen van MS (ABCDEF = analyt; PQT, XYZ, UVW en PQRS = interferenties).

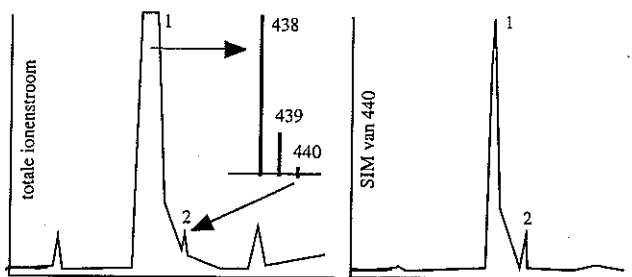


Fig. 2. Isotoopinterferentie bij SIM signalen (links = full scan; rechts = SIM signaal van ion 440).

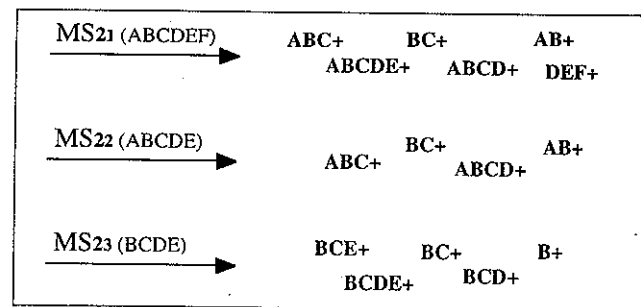


Fig. 3. Voorstelling van MS-MS op verschillende "ouder" ionen.

GC-MS-MS

GC-MS-MS of tandem MS bestaat sinds geruime tijd op grotere apparaten. Eerst sinds kort (1994) werd de eerste benchtop GC-MS-MS machines voorgesteld op basis van een modificatie van een Ion Trap. Deze manier van werken heeft aanzienlijk kleinere en ook goedkopere apparaten tot gevolg. Bij Tandem MS kan een ion (bv. het moleculair ion) worden gekozen als "ouder" ion, in de trap geïsoleerd en geconcentreerd worden terwijl alle andere ionen uit de trap worden verwijderd.

Daarna wordt de snelheid van het ion opgedreven waardoor de interne energie van het ion stijgt en het opnieuw dissocieert. De fragmenten (dochterionen) worden gemeten. Bij de fragmentatie van dit

ouder ion zijn de dochters "alleen" afkomstig van het analyt en zou theoretisch de achtergrond volledig dienen weg te vallen. Verschillende ionen kunnen als "ouder" ion worden gekozen (Fig. 3).

GC-MS-MS biedt op verschillende manieren voordelen: ten eerste is het een manier om bij "vuile" monsters de achtergrond te reduceren. Daardoor kan de detectielimiet van de analyse worden verlaagd of de clean-up worden vereenvoudigd. Ten tweede kan op die manier meer informatie over het analyt worden ingewonnen. In figuur 4 is als voorbeeld het massaspectrum van norethandrolone (NE) en de MS-MS spectra genomen op de drie belangrijke ionen van NE weergegeven. Voor de positieve identificatie van een analyt (hier norethandrolone) worden volgens de EU criteria 4 ionen gevraagd. Deze zijn in NE aanwezig doch het vierde ion zal een veel lagere abundantie vertonen dan de andere 3. Door echter een MS-MS spectrum te nemen op de 3 belangrijkste ionen van NE kan het aantal diagnostische ionen sterk worden uitgebreid (Courtheyn *et al.*, 1996). Een nadeel is evenwel dat elk verdacht staal 3-4 maal dient te worden geïnjecteerd. Dit is echter niet zo een groot nadeel omdat deze extra runs enkel dienen te gebeuren voor "echt verdachte" stalen, alleen instrumenttijd kosten en normaal van elk uiteindelijk extract toch maar ca 1 µl van ca 25 µl wordt geïnjecteerd. Er is dus genoeg extract over om deze extra MS-MS runs te doen.

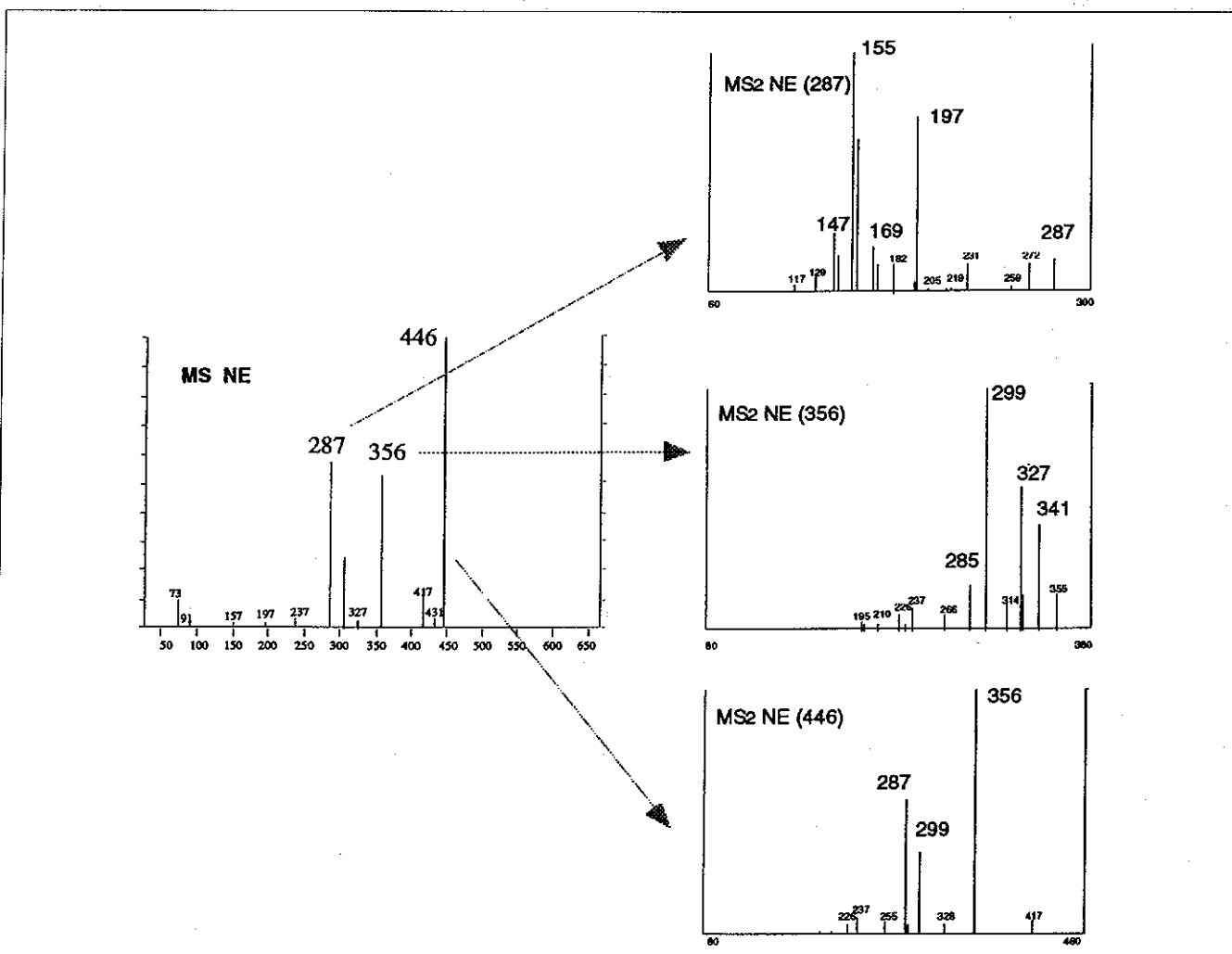


Fig. 4. Voorbeelden van een MS spectrum en MS-MS spectra op verschillende "ouder" ionen van norethandrolone (NE).

HPLC (of LC ?)

Voor een groot gamma producten (zwaardere met een MM 1500 amu of thermisch labiele moleculen) kan een scheiding niet worden uitgevoerd met GC maar wel met HPLC. Zoals bij gaschromatografie kan HPLC alleen (of vooral) voor het onderzoek van contaminanten worden gebruikt in combinatie met een specifieke detector. De belangrijkste specifieke detector met een lage detectielimiet is de fluorescentiedetector. Deze is bv. gebruikt bij het bepalen van residuen van tetracyclines in eetwaren (Croubels, 1997). Ook met UV-VIS detectoren kan door het uitvoeren van een zeer specifieke reactie een lage detectielimiet worden gehaald, bv. het bepalen van clenbuterol met post-kolom derivatisatie (Courtheyn *et al.*, 1991).

LC-MS

De laatste jaren worden HPLC en MS door verschillende fabrikanten aan elkaar gekoppeld. Eigenaardig genoeg spreekt men dan nooit van HPLC-MS maar van LC-MS. Misschien is het dan ook de tijd om het voorvoegsel HP (High Performance) (dat ook het beeld van een specifieke producent oproept) te laten vallen en gewoon te spreken van LC en TLC. De koppeling gebeurt door middel van een interface die grote hoeveelheden vloeistof dient te verwijderen (bv. 1 ml methanol/minuut). Vloeistof is heel wat moeilijker te verwijderen dan dragergas: er bestaat (nog) niet zoiets als een universele interface. Afhankelijk van de soort analyse zal de ene interface (bv. ES, APCi enz.) beter werken dan de andere. In figuur 5 is als voorbeeld een algemeen overzicht van API (Atmospheric Pressure Interface) interfaces weergegeven.

In essentie komt het er op neer dat het analyt via een stel kamers, die steeds in druk dalen, wordt overgebracht naar de massaspectrometer. De eigenlijke ionisatie grijpt plaats buiten het vacuum vandaar de naam API. Praktisch dient daarbij opgemerkt dat een API interface nogal wat stikstof verbruikt, wat in praktijk niet door normale flessen kan worden geleverd. Een laboratorium dat een toestel met API interface aanschafte dient een speciale stikstof toevoer te voorzien.

De overgang van HPLC naar LC-MS methodes is niet altijd zo eenvoudig als in eerste instantie wordt gedacht. De analyst is bv. beperkt in het gebruik van reagentia zowel in de clean-up als voor de LC mengsels: alleen vluchtige mengsels kunnen worden gebruikt (dus bv. geen fosfaatbuffers). LC-MS is nog niet zo ingeburgerd in routine in residu-laboratoria. Er zijn verschillende redenen: ten eerste is de prijs van de apparatuur een factor 2-4 maal hoger dan voor GC-MS.

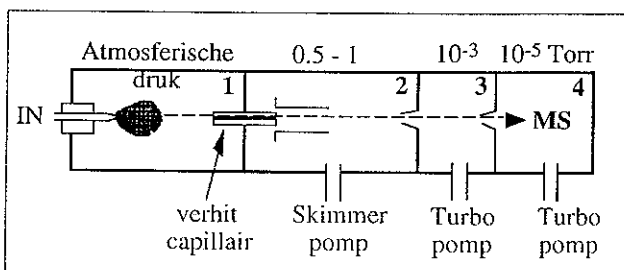


Fig. 5. Algemeen schema van een API interface.

Ten tweede zijn de detectielimieten ongeveer 100 X hoger dan in GC-MS (1 ng is een typische detectielimiet voor LC-MS zelfs in de SIM mode). Een van de redenen van dit fenomeen is de piekbreedte van een HPLC piek (in vergelijking met een GC piek): dezelfde hoeveelheid analyt is verdund in een grotere hoeveelheid drager. De grotere hoeveelheid monster die kan worden geïnjecteerd in een LC systeem compenseert enigszins dit nadeel. In onze experimenten met Finnigan MAT SSQ710C ondervonden we moeilijkheden om voor β -agonisten een detectielimiet van 1 ppb (ug/kg) met LC-MS te halen: de detectielimiet is zeer afhankelijk van de gebruikte clean-up.

LC-MS-MS- enz.. kan een oplossing zijn om de detectielimiet te verbeteren (zie verder). In MSn is de grotere piekbreedte eerder een voordeel: meerdere scan events per piek, meer tijd om MSn in functie van tijd uit te voeren.

LC-MSn

Recent werden ook benchtop LC-MSn apparaten op de markt gebracht. De Finnigan LCQ bv. is een combinatie van de LC-MS en Ion Trap technologie. Dit apparaat laat niet alleen een lagere detectielimiet toe dan de klassieke LC-MS apparaten (opgegeven ca 50 pg in full-scan; onze LOD voor β -agonisten: 20 pg in LC-MS-MS (SRM-full-scan)) maar opent ook de weg naar LC-MSn. In figuur 6 (in aansluiting met figuur 5) is een voorstelling van MSn weergegeven. Daarbij zijn de "dochter" ionen telkens afkomstig van een "ouder" die op zijn beurt een "dochter" is van een vroeger "ouder" ion. (dus eigenlijk kleindochters en achterkleindochters). Dit is een duidelijk verschil met het nemen van dochterspectra van verschillende ouderionen. Bovendien gebeurt dit in eenzelfde run en op de LCQ met het gemak van een klik van de muis.

Theoretisch opent dit de weg naar een sterke reductie (of zelfs het volledig weglaten) van de voorzuivering van het staal. In praktijk is in het laboratorium gebleken dat praktisch ongezuiverde stalen rechtstreeks in de MSn (dus zonder LC) kunnen worden geïnfuseerd en de spectra geïnterpreteerd. Als voorbeeld wordt hier het spectrum van het NBD derivaat van tapazole (een thyreostaticum) door rechtstreekse

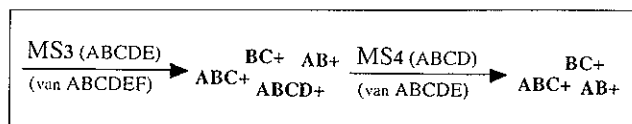


Fig. 6. Voorstelling van MSn: vorming van kleindochters en achterkleindochters.

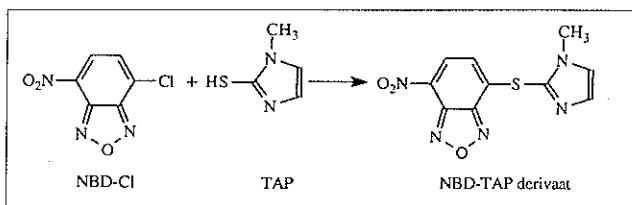


Fig. 7. Reactievergelijking van tapazole (MM = 114,2) met NBD-Cl (MM = 199,5).

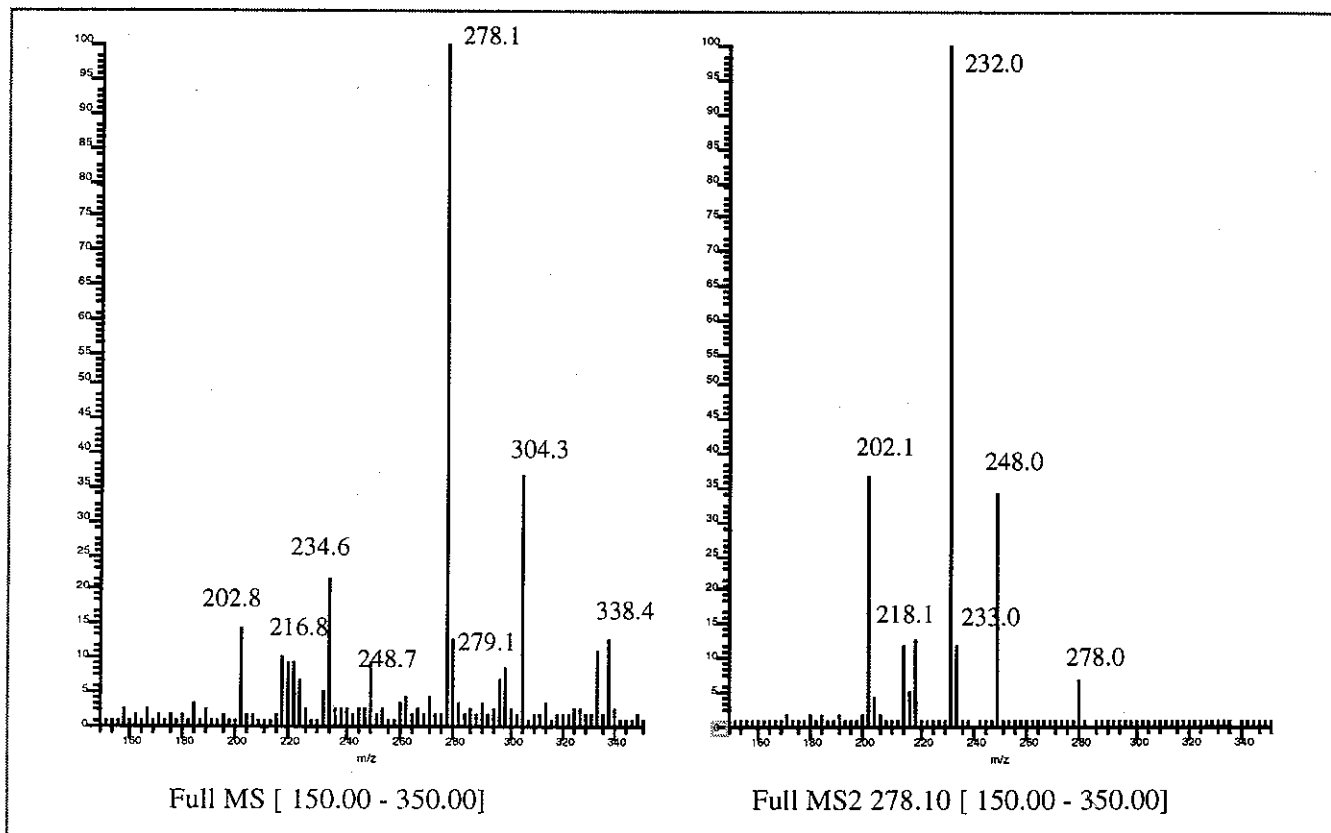


Fig. 8a. MS, MS2 spectrum van het tapazole-NBD derivaat bekomen door rechtstreekse infusie in de massaspectrometer ($MH^+ = 278.1$).

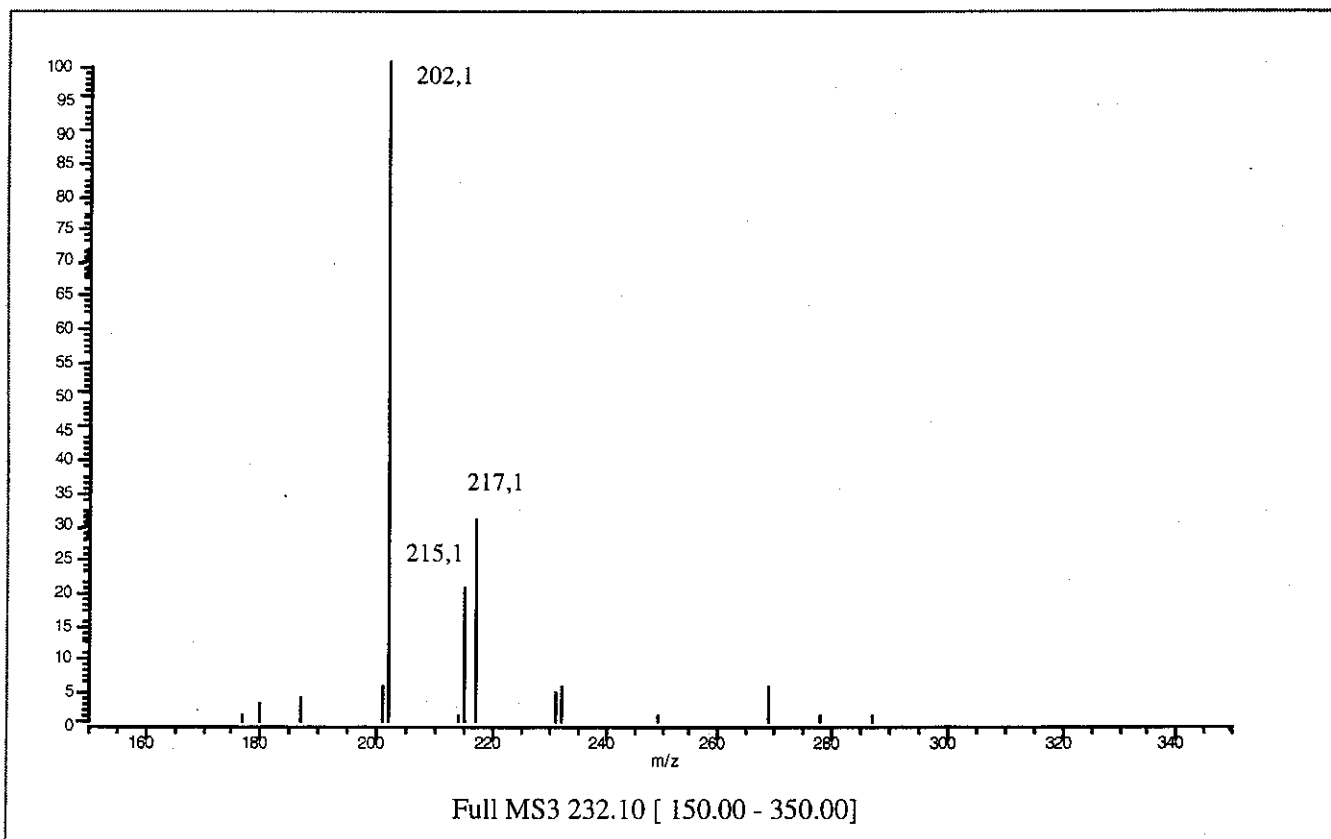


Fig. 8b. MS3 spectrum van het tapazole-NBD derivaat bekomen door rechtstreekse infusie in de massaspectrometer.

Deze techniek opent ook een nieuwe weg voor de analyse van bio-moleculen. Met de API interface kunnen multiële ladingen op de molecule worden aangebracht, meestal onder de vorm van protonen. De massaspectrometer meet de m/z-verhouding en reduceert daardoor de zeer hoge massa van het eiwit tot binnen het bereik van de MS (bv. 2000 - 3000 amu). Er ontstaat een spectrum dat verschillende van deze multipel geladen ionen bevat. Door een speciaal computerprogramma kan dit spectrum worden omgezet naar een "normaal" massaspectrum.

Anorganische contaminanten

Een verhaal over analysemethoden voor contaminanten of residuen zou niet compleet zijn zonder het te hebben over de anorganische contaminanten. Bij de analyse van sporen metalen in eetwaren wordt vaak gebruik gemaakt van atomaire absorptie (vlam of grafietoven) of ICP (Inductively Coupled Plasma). De combinatie van deze laatste techniek met massaspectrometrie (ICP-MS) is zeer interessant: de techniek laat de simultane detectie van verschillende metalen toe; haalt detectielimieten in het lage ppb gebied ($\mu\text{g/kg}$) en geeft bovendien informatie over de isotoopsamenstelling. In de meeste gevallen dient de eetwaar behandeld met een mineraal zuur en wordt het monster geïntroduceerd bv. door flow injectie (Harrington *et al.*, 1997)

BESLUIT

Gedurende de laatste 25 jaar was er een sterke evolutie te zien van het beschikbaar analytisch instrumentarium voor de analyse van additieven, contaminanten en residuen in eetwaren. Deze evolutie lijkt steeds sneller te gaan en houdt verband met de zeer snelle ontwikkelingen in de elektronica en de informatica. De laboratoria worden daardoor gedwongen tot voortdurende investeringen voor hun instrumentarium. Daarbij moet steeds de vraag worden gesteld naar de rendabiliteit van een aangekocht instrument.

Het bekomen van een niet alleen correct (kwalitatief en eventueel kwantitatief gevalideerd in het kader van accreditatie) maar ook een betaalbaar resultaat zal onvermijdelijk een specialisatie van de laboratoria met zich meebrengen. Niet elk laboratorium zal elk analyt correct in om het even welke matrix binnen een redelijke termijn kunnen bepalen. Samenwerking tussen groepen laboratoria lijkt daarbij aangewezen.

LITERATUUR

Abjean J.P. (1996). Screening of albendazole residues in cattle liver by planar chromatography. *Proceedings Euroresidue III, Veldhoven, Mei 6-8*, 191-193.

Batjoens P., H. F. De Brabander, F. Smets, G. Pottie. (1994). GC-MS Confirmation of Anabolic Compounds in Injection Sites. *The Analyst* 119, 2607-2610.

Boehringer Mannheim (1995) Methods of Enzymatic Bioanalysis and Food Analysis using test combinations, *Instructions handbook*.

Courtheyn D., Boonen I., Bakeroort V. (1988). Dünnelaagchromatografische bepaling van clenbuterol en cimaterol in opgezuiverde extracten. *Document Benelux Economische Unie SP/LAB/h* (88) 42.

Courtheyn D., Desaeveer C., Verhe R. (1991). HPLC determination of clenbuterol and cimaterol using post-column determination. *Journal of Chromatography* 564, 537-549.

Courtheyn D., Verheye H., Bakeroort V., Dal V., Schilt R., Hoojerink H., Van Bennekom E., Haasnoot W., Stouten P., Huf F., (1993). Detection of corticosteroids in animal feed and premixes: a new category of growth promoters. *Proceedings Euroresidue II, Veldhoven, Mei 3-5* 251-256.

Courtheyn D., De Brabander H. F., Batjoens P., Vercammen J., De Wasch K. (1996). MS-MS: applications and tentative quality criteria. *Proceedings Euroresidue III, Veldhoven, Mei 5-8*, 75-85.

Croubels S. (1997). Methodologie voor de bepaling van residuen van enkele tetracyclines in voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong. *Doctoraats thesis Faculteit Farmaceutische Wetenschappen, RUG*.

De Brabander H.F., Van Hoof J. (1990). HPTLC analysis of residues of anabolics in kidney fat. *Journal of Planar Chromatography*, 3, 236-242.

De Brabander H.F., Smets F., Pottie G. (1991). HPTLC in residue analysis of food. *Journal of Planar Chromatography* 4, 52-57.

De Brabander H.F., Batjoens P., Vanden Braembussche C., Dirinck P., Smets F., Pottie G. (1993a). Pitfalls in Selected Ion Monitoring in GC-MS, a theoretical example. *Analytica Chimica Acta* 275, 9-15.

De Brabander H.F., Hendriks L., Smets F., Delahaut P., Batjoens P., Leyssens L. Pottie G. (1993b). Recent advances in the analysis of anabolic residues in kidney fat. *Proceedings Euroresidue II, Veldhoven Mei 3-5*, 211-216.

De Brabander H. F., Batjoens P., De Wasch K., Courtheyn D., Vercammen J. (1996). Comparison of the possibilities of GC-MS and tandem MS systems for the analysis of anabolics in biological material. *Journal of Chromatography* 750, 105-114.

Debruyckere G., Van Peteghem C., De Brabander H.F., Debackere M. (1990). GC-MS confirmation of 19-nortestosterone in the urine of non-treated boars. *Veterinary Quarterly* 12, 247 - 250.

Deelstra H., Massart D.L., Daenens P., Van Peteghem C. (1996). Vreemde stoffen in onze voeding - *Monografieën Stichting Leefmilieu*.

EEC (1987). Document 87/410/EEC. Commission decision of 14/6/1987 laying down the methods to be used for detecting residues of substances having a hormonal or a thyreostatic action. *Official Journal of the European Communities*, no. L 2231 18-36.

EEC (1989). Document 89/610/EEC. Commission decision of 14/11/1989 laying down the reference methods and the list of national laboratories for detecting residues. *Official Journal of the European Communities*, no. L 351 9-19.

EEC (1993). Document 93/256/EEC Commission decision of 14/4/1993 laying down the methods to be used for detecting residues of substances having a hormonal or a thyreostatic action. *Official Journal of the European Communities*, no L 118/64.

Harrington C.F., Fairman B.E., Catterick T. (1997). Analysis of Cr, Ni, Cd and Pb in food samples by flow injection ICP-MS. *Spectroscopy Europe* 9/1, 10-16.

Juhel-Gaugain M., (1996). Screening of Quinolone residues in pork muscle by planar chromatography. *Proceedings Euroresidue III, Veldhoven, Mei 6-8*, 578-581.

Posyniak A., Niedzielska J., Semeniuk S., Zmudski J. (1996a). Determination of tiamuline in Feed and Animal tissues based on chromatographic separations after SPE extraction. *Proceedings Euroresidue III, Veldhoven, Mei 6-8*, 800-803.

Posyniak A., Niedzielska J., Semeniuk S. and Zmudski J. (1996b). Isolation and Determination of sulfonamide residues in animal tissues by SPE extraction and chromatographic techniques. *Proceedings Euroresidue III, Veldhoven, Mei 6-8*, 804-807.

Smets F., De Brabander H.F., Bloom P.J., G. Pottie (1991). HPTLC of anabolics in injection sites. *Journal of Planar Chromatography* 3, 207-212.

Steinbeck E. Glaser B., Petz M. (1996). Determination of sulfaguanidine residues in meat and egg samples by quantitative HPTLC using matrix solid phase dispersion clean-up. *Proceedings Euroresidue III, Veldhoven, Mei 6-8*, 885-889.

Van Poucke L. (1995). De bepaling van sulfonamiden in eetwaren van dierlijke oorsprong. *Doctoraatsthesis Faculteit Farmaceutische Wetenschappen, RUG*.

Wenhong L., Yin B., Ang C.Y.W., Rushing L., Thompson H.C. (1996). Determination of licomycin residues in salmon tissues by gaschromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography* 687, 405-411.