

Afdeling Additieven      Datum: 1982-12-16  
Verslag 82.103            Pr.nr. 505.0060

Onderwerp: Monstervoorbehandeling.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (3x), afd. Additie-  
ven (4x), afd. Normalisatie (Humme), Projektbeheer.



Afdeling Additieven

Datum: 1982-12-01

VERSLAG 82.103

Pr.nr. 505.0060

Projekt: Harmonisatie Monsterneming en Analyse.

Onderwerp: Monstervoorbehandeling.

---

Samenvatting:

De "monstervoorbehandeling" is een weinig spectaculair maar tegelijk uiterst belangrijk deel van een analyseprocedure.

De keuze omtrent de wijze van monstervoorbehandeling is sterk afhankelijk van het doel van het onderzoek: karakterisering van een produkt of van een situatie.

Er wordt achtereenvolgens aandacht geschonken aan een reeks opeenvolgende stappen van monstervoorbehandeling: monsterneming, transport, ontvangst, bewaring, analysemonster, ontsluiting en extractie, reiniging en scheiding.

Als algemene opmerkingen worden besproken: controle op een juiste analyse, eenvoud van de analyse, hulpmiddelen, directe bepaling zonder monstervoorbereiding, automatisering.

Tekst voor een lezing, gehouden op de Studiedag "Trends in de levensmiddelenanalyse", gehouden te Antwerpen op 1982-10-12 door de Vlaamse Chemische Vereniging en de Nederlandse Vereniging voor Voedingsleer en Levensmiddelentechnologie.

---

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Samensteller: dr W.G. de Ruig

Projektleider: dr W.G. de Ruig



## MONSTERVOORBEHANDELING

W.G. de Ruig (Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-  
produkten, Wageningen, Nederland).

---

De grote sprong voorwaarts in de analyse van levensmiddelen is geweest de vervanging van de klassieke analytische chemie door analytische fysica met gebruikmaking van instrumentele technieken.

Een analysemethode wordt sindsdien gewoonlijk aangeduid met de uiteindelijke detectietechniek. Zware metalen worden bepaald met AAS of polarografisch. De monstervoorbehandeling is daarbij een weinig spectaculair onderdeel geworden. Toch: als we eenmaal een geschikte meetoplossing hebben, geven alle meettechnieken daarmee wel een goed resultaat. Bij de analyse van levensmiddelen zit de kunst echter in wat voorafging: hoe de te bepalen component uit het monster en in een meetbare vorm te krijgen.

De monstervoorbehandeling is, behalve van de te bepalen component en van de stof waarin deze component bepaald moet worden, sterk afhankelijk van het doel van het onderzoek.

Bij de vraagstelling kan men onderscheiden:

- karakterisering van een produkt
- karakterisering van een situatie.

In het eerste geval gaat het om de hoedanigheden van het produkt. (1)

Gevraagd kunnen worden hoofd- en nevencomponenten, additieven, contaminanten, enz. Is het produkt wat het voorgeeft te zijn (eerlijkheid) en: voldoet het aan de eisen (kwaliteit)? En men komt tot de conclusie: goed, of slecht, of wanneer men verschillende kwaliteitseisen hanteert: de klasse. De analyticus zal hierbij het produkt volgens de gewenste specificatie moeten onderzoeken.

In het tweede geval gaat het niet zozeer om een bepaald produkt, maar (2) om de besmetting of belasting van mens, dier, plant, bodem, milieu met een bepaalde component.

Hierbij gaat het er om een geschikte indicator te kiezen. Overwegingen hierbij zijn: waar zit het meeste in, en: wat is het gemakkelijkste te bepalen.

Voorbeeld: als men de stralingsbelasting van de mens door middel van voedsel wil meten is melk een geschikte indicator omdat daar relatief veel van de gevaarlijkst geachte radionucliden: strontium-90 en cesium-137 in voorkomen. Sr-90 heeft hierbij door zijn lange effectieve halveringstijd van 15,6 jaar de meeste interesse. Sr-90 is echter een beta straler, en het vereist een bijzonder langdurige en moeizame monstervoorbehandeling om dit te scheiden van de 20.000-voudige overmaat van het nauw verwante calcium en van alle andere radionucliden alvorens men tot een betatelling met een Geiger-Müller buis kan overgaan (tijdsduur, 1 à 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> maand).

Cs-137 is een beta en gamma straler. Wanneer men de verhouding tussen Sr-90 en Cs-137 kent is het daarom veel eenvoudiger met een gammaspectrometer een gammatelling aan Cs-137 uit te voeren. De monstervoorbehandeling kan hierbij veel simpeler zijn (tijdsduur, 3 dagen) daar een gamma spectrometer in tegenstelling tot een Geiger-Müller buis kan discrimineren tussen verschillende radionucliden is het hierbij niet nodig alle andere radionucliden te elimineren. Uit dit voorbeeld blijkt dat de keuze van de indicator (Sr of Cs) van invloed is op de toe te passen detectietechniek en deze weer een enorme invloed heeft op de monstervoorbereiding.

De monstervoorbehandeling kan men onderverdelen in een aantal stappen zoals aangegeven in bijgaand schema. Aangezien over elke stap wel een (3) lezing te houden is, kunnen hier slechts enkele punten aangestipt worden.

#### Opmerkingen bij de opeenvolgende stappen van monstervoorbehandeling

Monsterneming. Deze dient representatief te zijn voor de te onderzoeken partij. In de praktijk is deze eis dikwijls onuitvoerbaar. Dan dient men er wel op bedacht te zijn dat de nauwkeurigheid die bij de monstervoorbereiding en bepaling betracht wordt, in overeenstemming is met die van de monsterneming. Wanneer het om de karakterisering van een situatie gaat kan het voordelig zijn een vloeistof als indicator te kiezen: melk, serum, urine. Bijvoorbeeld controle op hormonen in vlees door deze in runderurine te bepalen.

Transport. Bij instabiele, maar ook bij op zich stabiele, monsters moet veel aandacht worden besteed aan het voorkomen van ongelukken tijdens het transport: oxidatie, bacteriologische of chemische afbraak, contaminatie. De verpakking moet adequaat zijn (goede afsluiting, breuk voorkomen, eventueel koelen), maar is dat dikwijls niet. Algemene regels zijn nauwelijks te geven, maar van geval tot geval moet deze stap goed bekeken worden. Ten onrechte bestaat er op de laboratoria de neiging pas aandacht aan het monster te schenken als het eenmaal binnen is.

Monsterontvangst. Wanneer er een aparte monsterkamer is moet deze goede instructies hebben van de laboratoriumafdelingen. Hierbij moet het gehele onderzoek in ogenschouw worden genomen, bijvoorbeeld is er bacteriologisch onderzoek naast chemisch onderzoek nodig, of ultraspoorelementen naast hoofdcomponenten?

Monsterbewaring. Hier zullen soortgelijke voorzorgen gelden als bij het transport. Bewaring dient zonodig in het donker en in koelcellen te geschieden. Niet op een laboratoriumtafel in de zon boven de verwarming!

Analysemonster. Met deze stap wordt gewoonlijk een analyse geacht te beginnen. Uit het voorgaande blijkt dat deze gedachte onjuist is en dat de monstervoorbehandeling reeds in een veel eerder stadium begonnen is.

Het analysemonster is een bekende, over het algemeen kleine hoeveelheid getrokken uit het voor onderzoek aangeboden monster. Vooraf, of nadien, zijn bewerkingen nodig, verkleinen en homogeniseren: hakken, malen, mengen, roeren. Het kan handig zijn het monster hierbij te koelen met vloeibare stikstof.

Over de optimale grootte van het analysemonster wordt heel verschillend gedacht. Een mogelijkheid om in een inhomogeen produkt als een runderlever spoorelementen te bepalen is een hele lever of een groot gedeelte, in de orde van kilogrammen, in bewerking te nemen. Een andere benadering is op verschillende plaatsen een klein monster van enkele grammen te trekken.

Het voordeel van de laatste methode is, dat een kleine hoeveelheid gemakkelijker zonder ongelukken door de verdere analyse te slepen is; bovendien verkrijgt men dan meteen inzicht in de mate van inhomogeniteit. Bij een te klein gekozen analysemonster zullen inhomogeniteiten een te grote rol gaan spelen. De grootte hangt uiteraard bovendien af van de gekozen detectiemethode: de uiteindelijke meetwaarde moet in het dynamisch bereik van deze methode liggen.

Ontsluiting en extractie. Het analysemonster moet eerst zodanig behandeld worden dat het analyt in een analyseerbare vorm geraakt. De meest rigoureuze ontsluiting is een volledige natte destructie of droge verassing. Dit is de gebruikelijke methode voor de bepaling van (zware) metalen. Er kan dan bij de analyseuitslag niets meer gezegd worden over de toestand of verbinding van het onderzochte element in het monster ('speciation'). Maar ook bij de analyse van organische verbindingen kan ontsluiting nodig zijn, bijvoorbeeld hydrolyse van geconjugeerde verbindingen. Bij het aantonen van gedeeltelijke geconjugeerde stoffen (bijvoorbeeld diethylstilbestrol in urine) moet men zich overigens wel afvragen of de analyse wellicht eenvoudiger verloopt wanneer men alleen de vrije fractie analyseert.

Het vrijmaken van het analyt uit de matrix verdient alle aandacht: al te vaak wordt nog genoegen genomen met fijn hakken of malen waar een rigoureuze kapotmaken van celwanden of weefselstructuur noodzakelijk is, bijvoorbeeld door 'potteren'.

Voor de extractie worden dikwijls organische oplosmiddelen gebruikt: ether, methanol, dichloormethaan, enz. Toch verdient extractie van stoffen uit biologisch materiaal met (veel) water, gevolgd door een preconcentratie over een speciale HPLC voorkolom met grote capaciteit (4) zeker overweging. De hele monstervoorbehandeling kan dan in bepaalde gevallen zeer eenvoudig worden. Ook de beste volgorde van de handelingen (bijvoorbeeld eerst extractie of eerst hydrolyse) dient uitgezocht te worden. (5)

Reiniging en scheiding. Na de extractie volgt meestal een reiniging bijvoorbeeld door uitschudden met geschikte oplosmiddelen. Een heel andere mogelijkheid is uitvriezen. Voor een virtueus gebruik van de mogelijkheden speelt de ervaring van de analyticus een grote rol.

Bij de moderne analyses, vooral wanneer het om kleine gehalten gaat, komt hierna een of andere chromatografische scheiding. Een en ander is afhankelijk van de matrix en van de meettechniek. Dit laatste bleek onder andere bij de gezamenlijke Gents-Utrechtse onderzoek naar dehydro-epiandrosteron met GLC, RIA en GCMS of bij het aantonen van hormonen met RIA, HPTLC, LCEC en GCMS. Aan de monstervoorbehandeling voor GCMS worden andere eisen gesteld dan voor RIA, een methode die geschikt is voor HPTLC kan blijken niet te voldoen voor LCEC en omgekeerd. (6)

### Algemene opmerkingen

Controle. De controle op een volledige onsluiting, extractie en verdere monstervoorbehandeling is even moeilijk als noodzakelijk. Controlemogelijkheden - die echter ieder voor zich nooit sluitend zijn - zijn:

- additie van een standaard aan het monster, terugvinding bepalen
- toevoeging van een radiolabel, na uitwisseling terugvinding bepalen
- getrapte inweeg: 100, 200, 300, 400 mg, meetresultaten op recht lijn?
- refereren aan andere, meer ingewikkelde, methode van monstervoorbehandeling
- variaties aanbrengen in tijdsduur en temperatuur van behandeling
- kritisch speuren naar fouten in de analysegang
- discussie met andere deskundigen.

Eenvoud. Is een methode eenmaal uitgezocht (veelal vanuit de optiek van de uiteindelijke instrumentele meettechniek), dan verdient het aanbeveling kritisch te speuren naar mogelijkheden van vereenvoudiging. Een zo eenvoudig mogelijke monstervoorbehandeling met zo weinig mogelijk chemicaliën vermindert de kans op contaminatie enerzijds en verliezen anderzijds, terwijl de reproduceerbaarheid toeneemt evenals de snelheid en de kostprijs afneemt. Als voorbeeld moge gelden een aantal bepalingsmethoden voor lood:

	blanco (ng)		detectiegrens (ng/g)
	x	s	(IUPAC definitie)
1. natte destructie, 2x complexeren, 8 stappen	1140	270	54
2. natte destructie, 1x complexeren, 4 stappen	690	90	20
3. droge verassing, 4 stappen	27	11	6
4. destructie in Tecatorblok, 2 stappen	19	6	4



Een zeer fraai voorbeeld van vereenvoudiging is de vervanging bij de melkcontrole van de Gerberbepaling voor vet, de eiwitbepaling volgens (7,8,9) de kleurbindingmethode en de lactosebepaling volgens Luff-Schoorl door één enkele infraroodbepaling. Benodigde chemicaliën: geen. Het gebruik van onprettige en milieuonvriendelijke chemicaliën als sublimaat, formaline en amidozwart was in één klap overbodig. Bovendien werd de benodigde hoeveelheid monster gehalveerd, hetgeen monstertransport en -opvang veel eenvoudiger maakte.

#### Hulpmiddelen

De analyticus heeft tegenwoordig de beschikking over een reeks handige hulpmiddelen voor éénmalig gebruik:

pipetten met wegwerptips, van 2  $\mu$ l tot 5 ml, kant en klaar filters van 5-0,2  $\mu$ , passend op injectiespuiten, van 1 tot 50 ml, kleine chromatografische kolommetjes, in tal van typen, maten en uitvoeringen.

Deze hulpmiddelen bevorderen niet alleen het handig en efficiënt werken, maar zijn vooral belangrijk omdat ze de kans op contaminatie verminderen.

Directe bepaling. Het ideaal van de analyticus is: helemaal geen monstervoorbereiding. Bij nieuw opkomende technieken wordt dit als voordeel aangeprezen; later blijkt het tegen te vallen. Bij de röntgenfluorescentie die berust op reacties van de binnenste electronen van het atoom lag een volledige onafhankelijkheid van de staat van het atoom en de matrix voor de hand. In de praktijk bleek de strooïing die een atoom ontvangt niet alleen afhankelijk te zijn van de primaire straling, maar ook van de strooïstraling van zijn burens. Hierdoor was toch weer monstervoorbereiding vereist, bijvoorbeeld het monster sterk verdunnen met cellulose. De wederzijdse strooïstraling van een monster is te berekenen. Daardoor is nu met de nieuwste apparaten dank zij ingebouwde computerprogramma's de monstervoorbehandeling weer overbodig geworden.

Bij de reeds genoemde infraroodanalyse van melk is de monstervoorbehandeling tot een minimum beperkt.

Met de dichtbij infrarood reflectietechniek, toegepast voor de analyse van onder andere graan, diervoeders, melkpoeders is directe meting in de vaste stof mogelijk. Wel moet men deze volledig empirische methode inrijken met minstens 50 voldoende gespreide monsters.

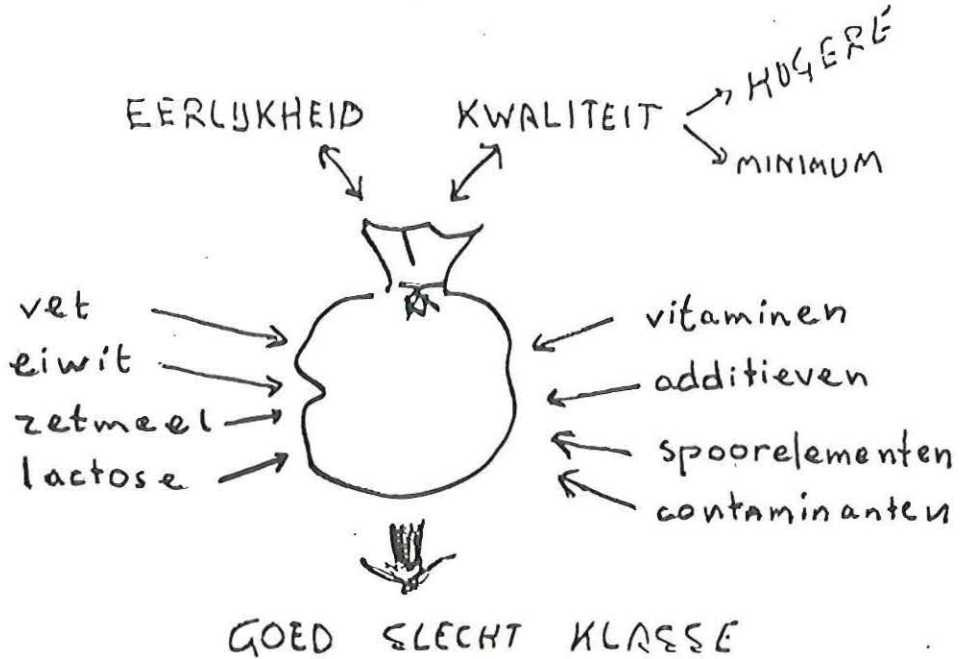
Automatisering. Dit heeft niet alleen zin bij grote series; ook bij kleine aantallen kan automatiseren zinvol zijn omdat daarmee de reproduceerbaarheid van de methode toeneemt, bijvoorbeeld monsterinvoer bij electrothermische AAS.

Voor massaonderzoek is automatiseren een noodzakelijkheid, dit vereist (9) dan tevens een gestandaardiseerde monstervoorbereiding voor elk monster. Bijvoorbeeld het mengen, opwarmen en weer mengen van melkmonsters bij de infraroodanalyse.

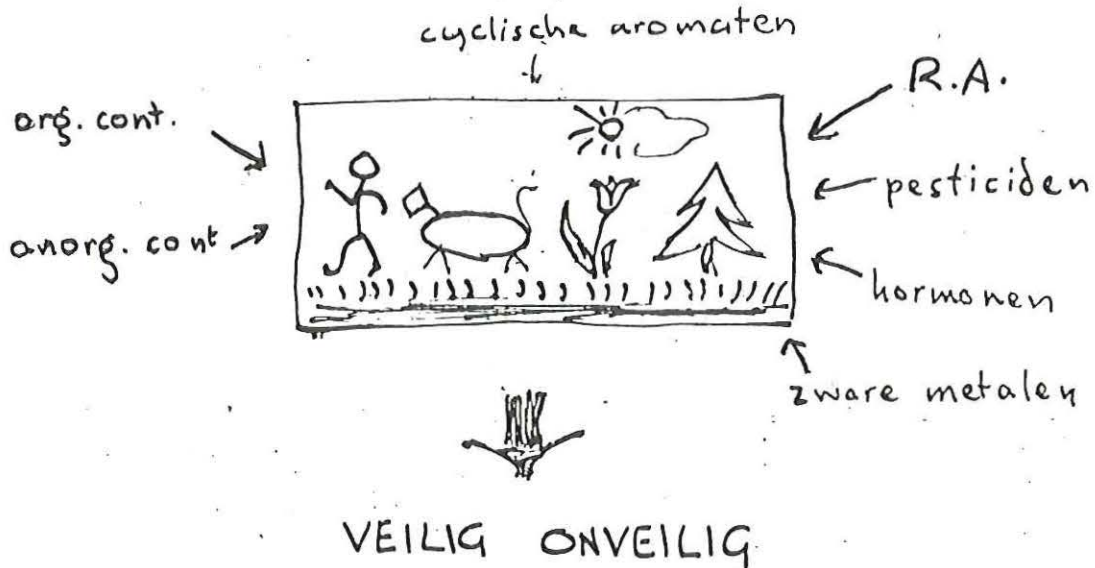
#### Conclusie

De monstervoorbereiding is een weinig spectaculair maar tevens uiterst belangrijk deel van de analyse. Een methode staat of valt met de monstervoorbereiding. Het is een bron van fouten enerzijds, maar anderzijds voor de analyticus een terrein voor succesvolle, efficiënte en betrouwbare arbeid.

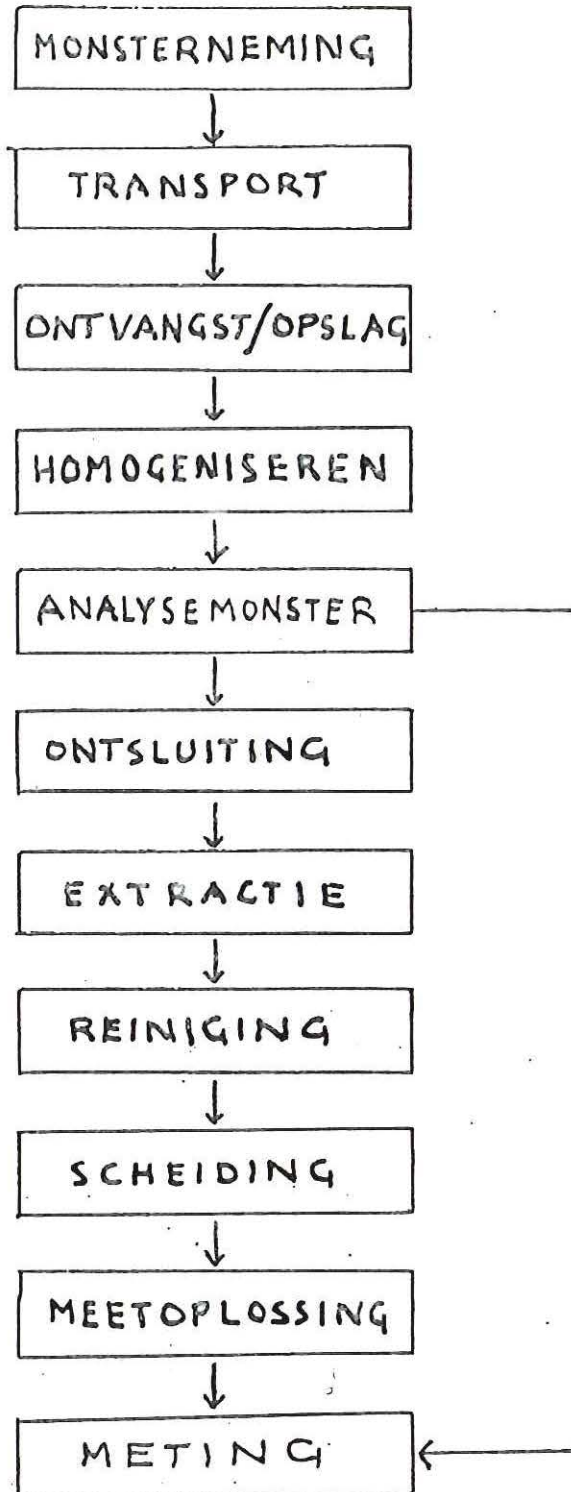
(1) KARAKTERISERING VAN EEN PRODUKT



(2) KARAKTERISERING VAN EEN SITUATIE



(3) Schema Monstervoorbehandeling.



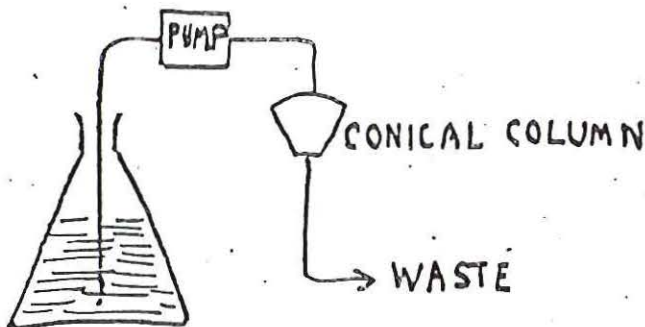
- (4) Voorconcentratie van relatief grote hoeveelheden van biologische monsters door integrale toepassing van een conische HPLC voorkolom.

H.M. Ruijten, H. de Bree e.a.

Drug Metabolism and Disposition (in druk).

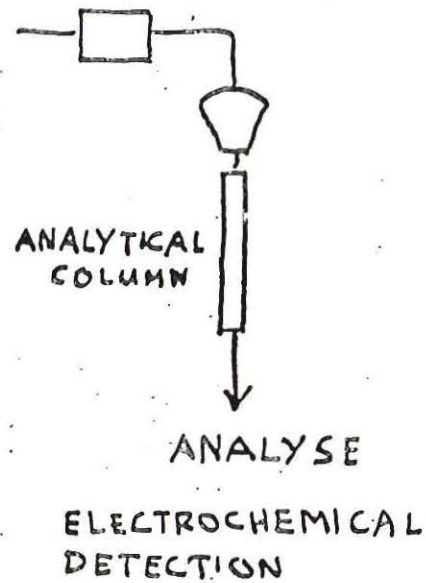
Stap 1

Voorconcentratie  
(van b.v. 1 liter)  
op conische HPLC  
voorkolom.



Stap 2

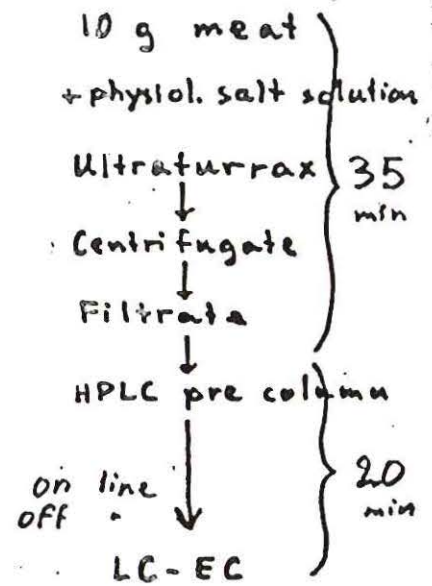
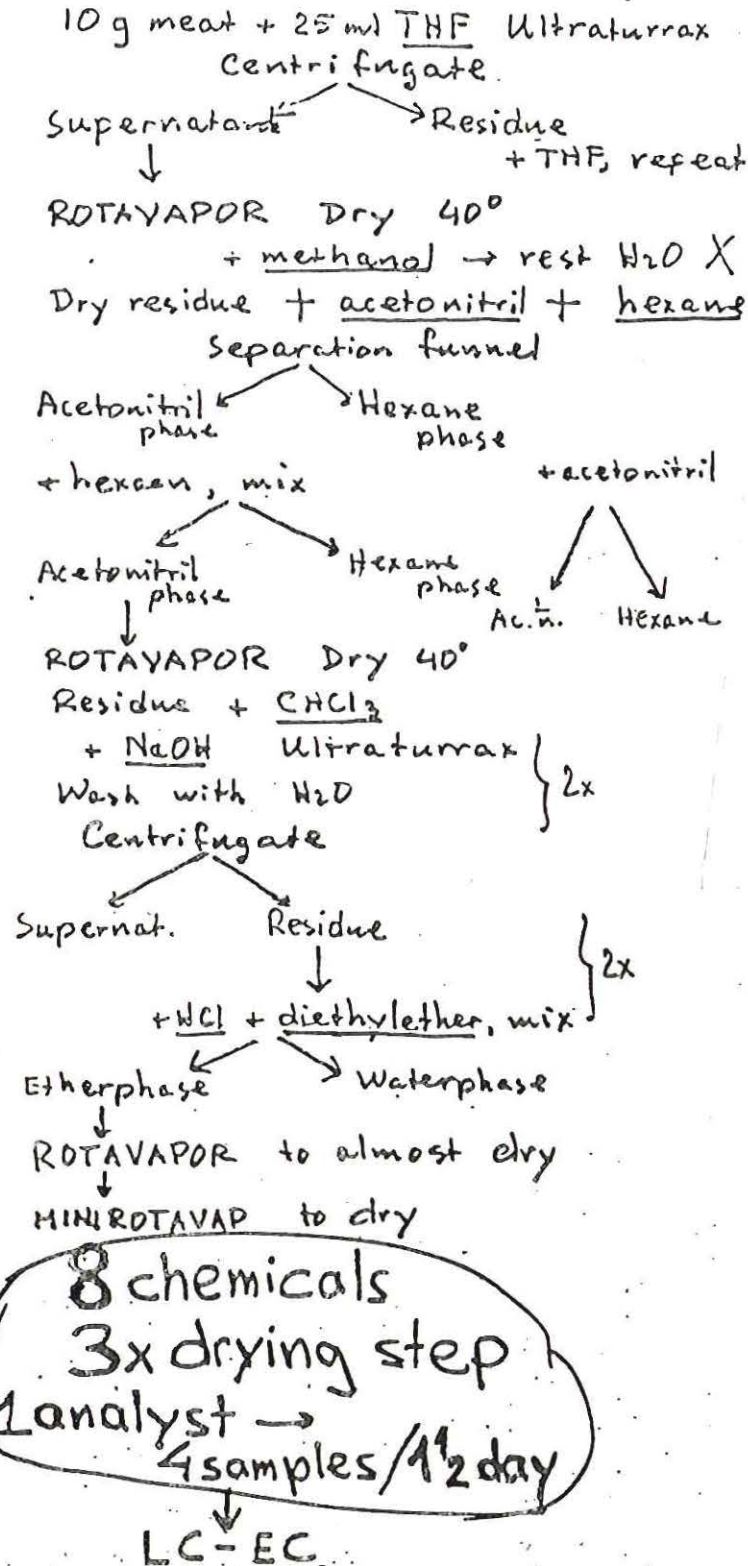
Eluering van de voorkolom  
Scheiding op analytische  
kolom.



(5) Extractie en concentratie van DES uit rundvlees.

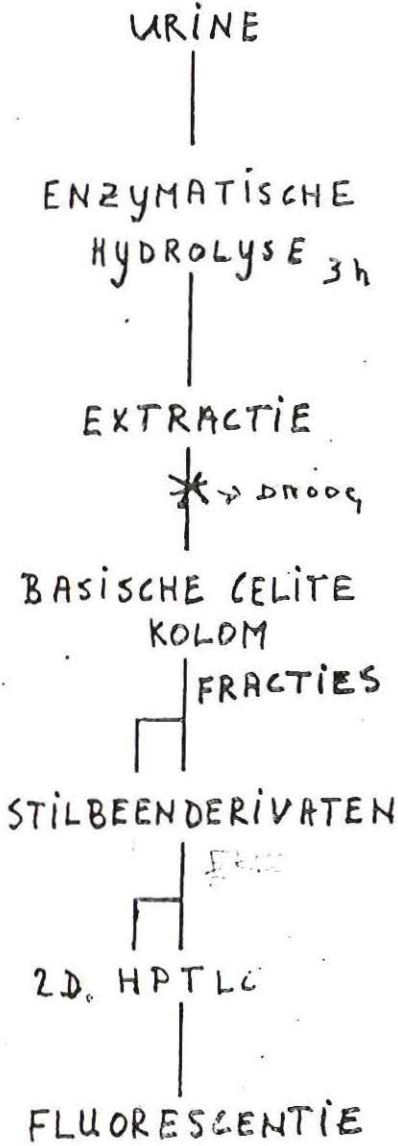
Methode, aanvankelijk ontwikkeld voor GCMS.

Methode gebruik makend van conische HPLC preconcentratiekolom.



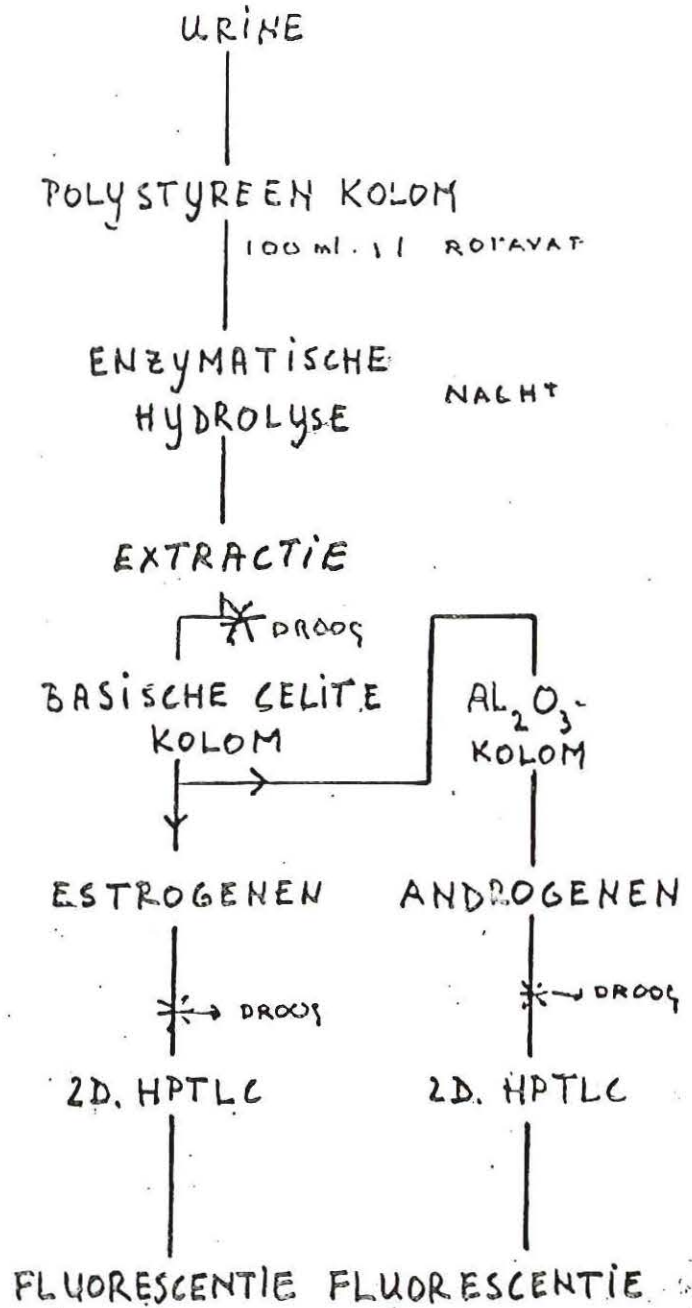
(6) HPTLC methode voor het aantonen van anabolica in urine.

Methode gericht op het aantonen van zoveel mogelijk anabole stoffen.



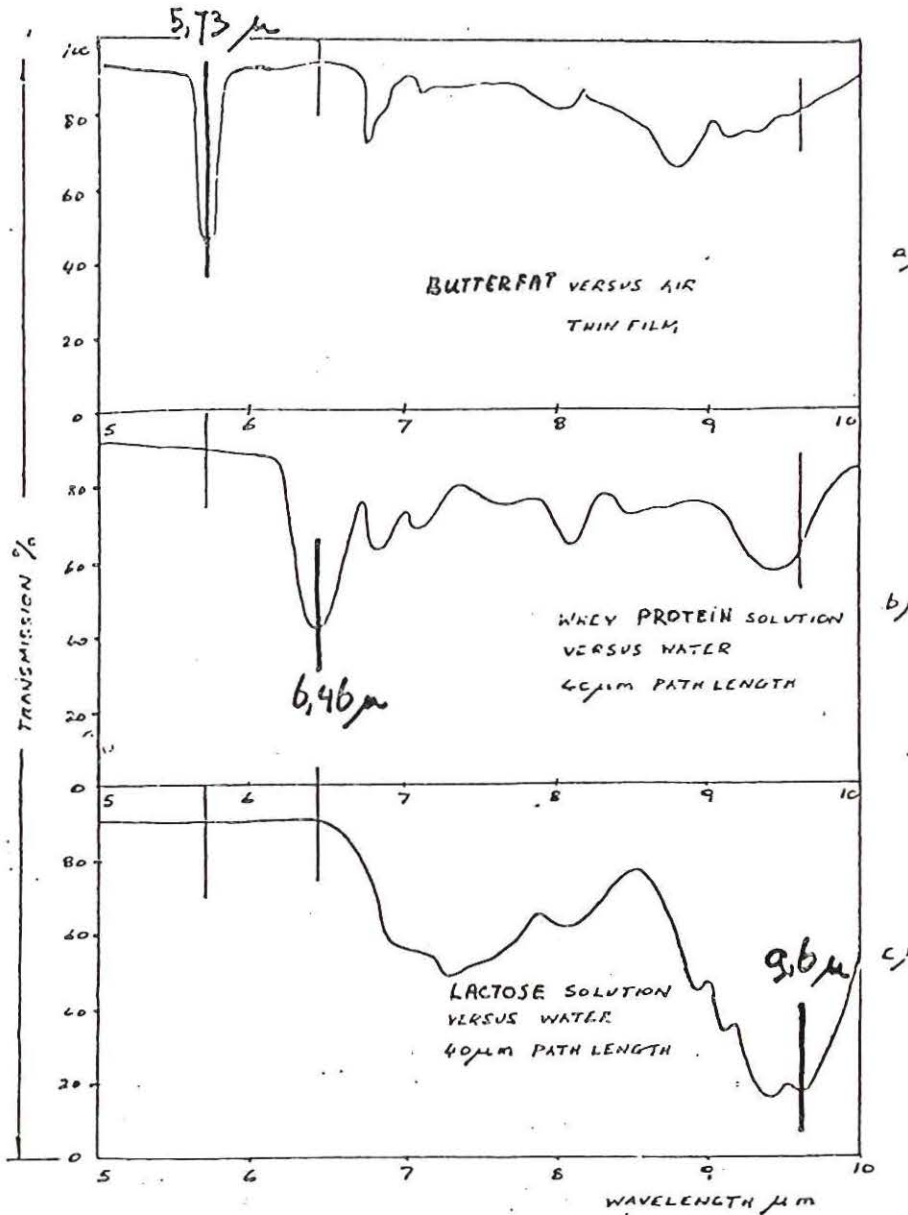
1 ANALIST  
20 MONSTERS/WEEK

Methode gericht op het snel, gevoelig en eenvoudig aantonen van anabolica



1 ANALIST  
10 MONSTERS/WEEK

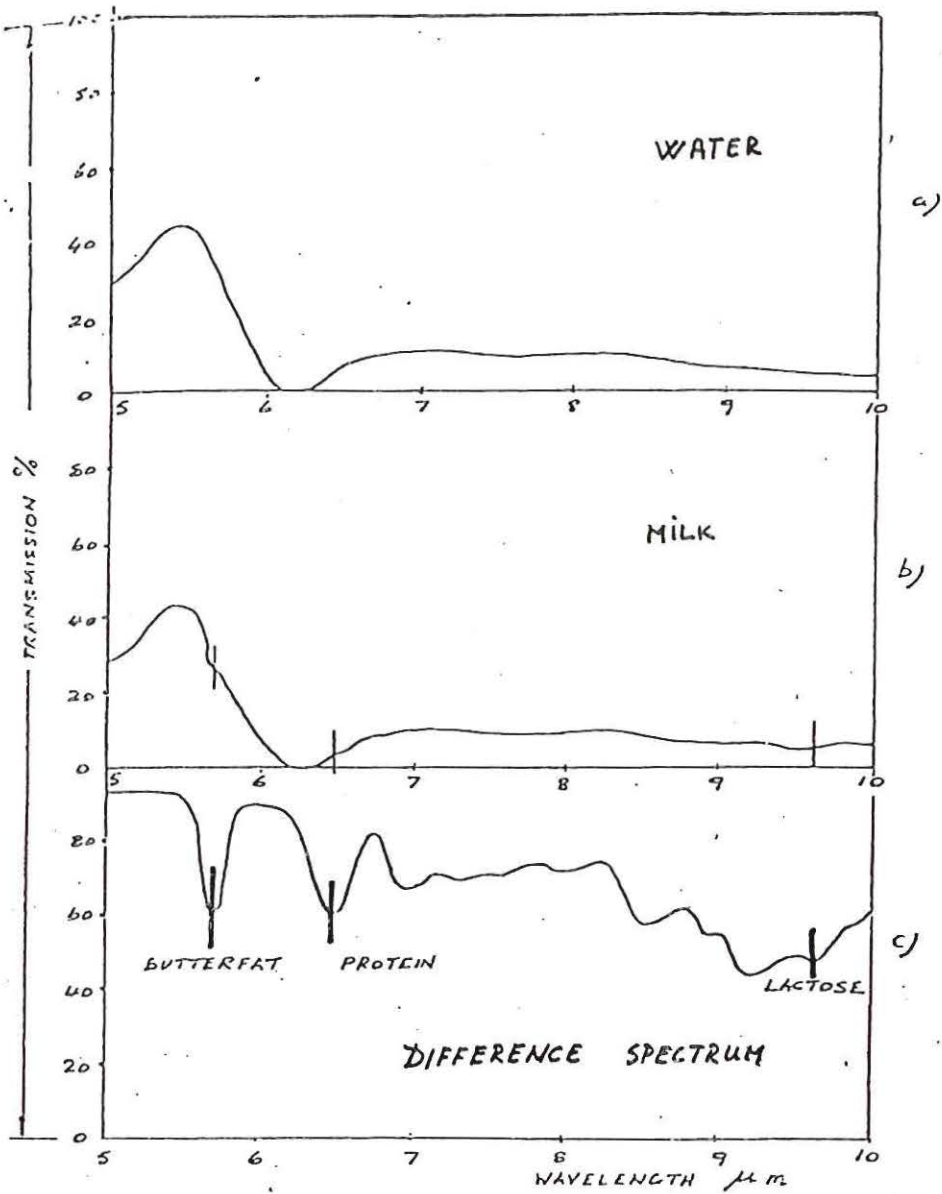
- (7) Infraroodspectra van botervet, wei-proteïnen en lactose. Meting in de melk vindt plaats bij resp.  $5,73 \mu$ ,  $6,46 \mu$  en  $9,6 \mu$ .



DOUBLE-BEAM SPECTRA OF MILK COMPONENTS



(8) Infraroodspectra van water, melk en het verschil spectrum melk-water.



40 μm PATH LENGTH CELLS USED IN EACH CASE

DOUBLE-BEAM SPECTRA OF :-

a) WATER b) MILK c) MILK VERSUS WATER

- (9) Automatisering in de melkcontrole, door gebruikmaking van IR meting van vet, eiwit en lactose direkt in de melk.

## MELKCONTROLE

VOORHEEN — 0 —		GEAUTOMATISEERD — 0 —
3x/WEEK 170 ml	MONSTERNEMING	3x/WEEK 85 ml
SUBLIMAAT	CONSERVERING	GEEN
6x 20 ml	STAPELMONSTER	—
HAND	MONSTERVOORBER	GESTANDAARDISEERD
1x / 14 DAGEN	ANALYSE	DIRECT
GEHALTE GEMIDDELD	UITSLAG	DAGELIJKS GEWOGEN
OVER 14d		GEMIDDELDE
NIET	CONTROLE OP RES.	DIRECT
NIET OPGEMERKT	MOEILYKHEDEN VERMINDER	OPGEMERKT

GERBER $s=0,04$	VET	R	5,73 $\mu$	$s=0,02$
KLEURSTOFB. 0,04	EIWIT		6,46	0,02
(LUFF-SCHOORL 0,08)	LACTOSE		9,6	0,03
(POLARIMETER 0,04)				

16 PERS → 8000 MONSTERS  
IN 4 d.

8 PERS → 4000 MONSTERS  
PER DAG