



Monitoring van vluchtige  
organische verbindingen in  
mariene organismen:  
analyse, kwaliteitsborging  
en haalbaarheid

**DUURZAAM BEHEER  
VAN DE NOORDZEE**



**FEDERAAL WETENSCHAPSBELEID**

Plan voor wetenschappelijke ondersteuning van een beleid gericht  
op duurzame ontwikkeling (PODO I)

PROGRAMMA "DUURZAAM BEHEER VAN DE NOORDZEE"

*Monitoring van vluchtige organische verbindingen in  
mariene organismen: analyse, kwaliteitsborging en  
haalbaarheid*

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek – Gent  
Departement Zeevisserij  
Ankerstraat 1, 8400 Oostende

Promotor:

Dr. ir. Rudy De Clerck

Projectverantwoordelijke:

Dr. ir. Marc Raemaekers

Technici:

Bruno Devisscher, Nancy Tyberghein

Plan voor wetenschappelijke ondersteuning van een beleid gericht  
op duurzame ontwikkeling (POOD)

PROFESSOR DR. J. M. A. M. VAN DER WOUDE

Afdeling van vruchtbare organische verbindingen in  
medische opname; analyse, kwaliteitsborging en  
kwaliteitsbeheer

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek (CLO)

Departement Landbouw  
En Landbouwkundig Onderzoek

Proefopst.

De Landbouw en Landbouw

Landbouw en Landbouw  
Landbouw en Landbouw

Landbouw

Landbouw en Landbouw

## 1 INHOUD

1	INHOUD.....	i
2	ABSTRACT .....	1
3	INLEIDING.....	6
4	Materiaal en Methoden .....	10
4.1	Analyse van standaarden, stalen en blanco .....	10
4.2	Bereiding en analyse van een referentiemateriaal voor VOS .....	10
4.3	Beschrijving van het purge&trap-GC-MS systeem.....	11
4.3.1	Purge&Trap-fase .....	12
4.3.2	Gaschromatografie .....	12
4.3.3	Massaspectrometrie .....	12
4.4	Bewaarprouven met VOS-gedopeerde visolie .....	13
4.4.1	Bewaarprouven met VOS-gedopeerde visolie in Certanflesjes en ampullen.....	13
4.4.2	Bewaarprouven met VOS-gedopeerde visolie in semi-permeable membranen (SPMD) .....	14
4.5	Silanisering van Certanflesjes .....	15
4.6	Statistiek .....	16
5	RESULTATEN .....	17
5.1	Verfijning van de huidige analytische methodologie .....	17
5.1.1	Verhogen van de robuustheid .....	17
5.1.2	Verkorten van de analysetijd .....	17
5.1.3	Verlagen van de detectiegrenzen.....	18
5.1.4	Validatie van de analysemethode voor VOS in standaardoplossingen ..	18
5.1.4.1	Herhaalbaarheid .....	18
5.1.4.2	Lineariteit van de respons .....	19
5.1.4.3	Opstellen van controlegrenzen voor de respons van de standaardoplossingen .....	20
5.1.4.4	Beslissingsgrens ( $CC\alpha$ ) en detectiegrens ( $CC\beta$ ) .....	22
5.1.4.5	Reproduceerbaarheid van standaarden .....	23
5.2	Ontwikkelen van intern referentiemateriaal voor VOS-analyse.....	25
5.2.1	Precisie en recovery van analyse van VOS-gedopeerde visolie 1 .....	25
5.2.2	Precisie en recovery van analyse van VOS-gedopeerde visolie 2 .....	29
5.3	Bewaarprouf met gedopeerde visolie als IRM in certanflesjes .....	30
5.4	Bewaarprouf met gedopeerde visolie als IRM in ampullen .....	33
5.5	Bewaarprouven met gedopeerde visolie in semi-permeabele membranen . .....	36

5.5.1	Bewaarproef 1 .....	36
5.5.2	Bewaarproef 2 .....	37
5.5.3	Bewaarproef 3 .....	38
6	Besluiten .....	42
7	Referenties .....	45
8	dankwoord .....	47
9	Afkortingen .....	48
10	Bijlagen.....	49

## 2 ABSTRACT

### *Inleiding*

De monitoring van vluchtige organische stoffen (VOS) in biologische stalen is technisch veeleisend, ondermeer door het ontbreken aan kennis in verband met de meest geschikte methoden voor analyse, bemonsteren en bewaren van het staal (vis,...). Daarenboven is er tot op heden geen gecertificeerd referentiemateriaal beschikbaar, zodat de kwaliteit van de analyse slechts in beperkte mate kan opgevolgd worden. Dit project had tot doel een oplossing te bieden aan deze problemen.

### *Verbeteringen aan de analytische techniek*

De analytische methodologie werd verbeterd en gevalideerd aan de hand van standaardoplossingen van VOS in methanol. De gebruikte techniek is gebaseerd op "purge&trap"-concentratie gekoppeld aan gaschromatografie-massaspectrometrie (P&T-GC-MS). Twaalf VOS werden geselecteerd op basis van hun moleculaire structuur, vluchtigheid en voorkomen in het mariene milieu:

- Monocyclische aromatische koolwaterstoffen (MAK's): benzeen, toluen, ethylbenzeen, m-, p- en o-xyleen.
- Chloorkoolwaterstoffen (CK's): 1,2-dichloorethaan, 1,1,1-trichloorethaan, chloroform, tetrachloormethaan, trichlooretheen en tetrachlooretheen.

Het bestaande P&T-systeem werd aangepast door het vervangen van de cryostaat, het inkorten van gasleidingen, het vervangen van metalen door teflon connecties en het installeren van terugslagkleppen. De analysetijd voor P&T-concentratie en gaschromatografie werd ingekort. Door het installeren van een betere capillaire GC-kolom (DB-VRX 60 m x 0.32 mm x 1.8  $\mu$ m) kon de cryofocusing stap overgeslagen worden. Zo kunnen zeven analysecycli per dag uitgevoerd worden.

Optimale omstandigheden voor de analyse van stalen waren als volgt. De standaardreeks bestaat uit vijf flesjes voorzien van een "open hole" schroefdop met septum, gevuld met zuiver water (Spa Reine) waaraan de inwendige standaard (IS) (1,1,1-trifluortolueen) werd toegevoegd. Elk flesje bevat een VOS-standaard tussen 10 en 50 ng. Een blanco flesje dient ter controle van de achtergrondwaarden. Standaard- en blanco flesje dienen gelijktijdig bereid te worden. Purgeernaalden worden door het septum

gestoken. Stockoplossingen van standaarden worden bewaard in gesilaniseerde Certanflesjes bij kamertemperatuur.

#### *Validatie van de analytische techniek*

Lineariteit, kalibratiefactoren, beslissings- en detectiegrenzen, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor de 12 VOS werden bepaald. Kwantificatie gebeurde op basis van de piekoppervlakten van geselecteerde specifieke ionfragmenten, in verhouding tot die van de IS. De herhaalbaarheid van de 50 ng standaard, als variatiecoëfficiënt uitgedrukt, varieerde van 0,2% (tolueen) tot 7,0% (trichlooretheen). De lange termijnreproduceerbaarheid van de relatieve respons van de 50 ng standaardoplossing gedurende 80 dagen, varieerde tussen 2,9% (benzeen) en 9,6% (tolueen). IJkcurven werden tweewekelijks opgesteld. Lineariteit voor tolueen, ethylbenzeen en o-xyleen was beperkt tot 44 ng. IJkcurven van tetrachlooretheen, tetrachloormethaan en m- en p-xyleen waren lineair tot 80 ng. Elke reeks van stalen werd voorafgegaan door een blanco (water met interne standaard), en de 50 ng standaardoplossing. Controlekaarten voor beide werden opgesteld.

Beslissings- en detectiegrenzen van de VOS werden berekend op basis van het intercept en de helling van de ijkcurven, de standaardfout op de lineaire regressie en 11 achtergrondwaarden van de blanco. Beslissingsgrenzen ( $CC\alpha$  met  $\alpha = 0,01$ ) en detectiegrenzen ( $CC\beta$  met  $\beta = 0,05$ ) varieerden van 0,4 en 1,1 ng respectievelijk voor ethylbenzeen, tot 9,7 en 11,3 ng respectievelijk voor tetrachloormethaan.

#### *Ontwikkeling van VOS-gedopeerd referentiemateriaal voor biota*

Om praktische redenen werd uitgegaan van een kabeljauwleverolie als matrix die het best de eigenschappen van visweefsel met betrekking tot VOS-analyse benadert. Vooreerst werd de visolie verwarmd en doorborreld met helium om de reeds aanwezige VOS te verwijderen. Daarna werd de visolie in een 500 ml syringe overgebracht en gedopeerd met een VOS standaard (260 ng/g visolie) die 60 verbindingen bevat. Eerst diende een goede analysetechniek gevonden te worden met betrekking tot de introductie in het P&T-systeem. Het toevoegen van emulgeermiddelen, zoals lecithine en/of stabilisatoren, zoals arabische gom, om een olie-in-water emulsie te verkrijgen, gaf niet de verhoopte resultaten qua herhaalbaarheid. Optimale P&T-condities waren een staalbreng van 0,10 gram visolie in 20 ml water en 30 minuten purgeertijd. De visolie werd toegevoegd na de IS (1  $\mu$ l), via



doorprikken van het septum van het flesje. Het purgeren dient onmiddellijk hierop te starten. Daarom werd de gedopeerde visolie vooraf overgebracht in een gesilaniseerd Certanflesje (1 ml).

Na GC-MS-analyse bleek dat een verbinding aanwezig in de visolie aanleiding gaf tot een massafragment 96, met retentietijd overlappend met dat van de IS. Het weglaten van massafragment 96 voor de berekening van de VOS-concentraties bleek daarom een duidelijke verbetering qua precisie. Dataverwerking gebeurde vanaf dan uitsluitend op basis van massafragmenten 127 en 146.

De recoveries (terugvindingsrendementen) van de geaddeerde VOS liepen van 54% (trichlooretheen) tot 98% (benzeen). De herhaalbaarheid van de recovery van de VOS-analyse bij een doperingsniveau van 260 ng/g varieerde tussen 1,1% (tolueen) en 4,8% (1,2-dichloorethaan). In een periode van 22 dagen werd een reproduceerbaarheid van de recovery gemeten van 1,1% (ethylbenzeen) à 6,6% (benzeen). Gebaseerd op de gemiddelde VOS-gehalten waargenomen in filet van schar en wijting in de periode 1993 – 1994 in het zuidelijk deel van de Noordzee (Belgisch continentaal plat), en gebaseerd op de detectiegrenzen van de analytische methode werden doperingsgehalten van VOS voor een referentiemateriaal vooropgesteld. Gehalten van VOS varieerden tussen 19 ng/g (1,1,1-trichloorethaan) en 330 ng/g visolie (m- en p-xyleen). Recoveries varieerden van 46% (trichlooretheen, 50 ng/g gedopeerd) tot 172% (benzeen, 84 ng/g gedopeerd). De hoge benzeenwaarde is waarschijnlijk te wijten aan benzeen reeds aanwezig in de visolie, die moeilijk door purgeren te verwijderen bleek. De beste herhaalbaarheid van bedroeg 4,0% recovery (tetrachlooretheen en chloroform, respectievelijk 38 en 82 ng/g geaddeerd). De slechtste herhaalbaarheid bedroeg 8,8% recovery (tetrachloormethaan).

#### *Stabiliteit en integriteit van het bereide referentiemateriaal*

##### *In Certanflesjes*

De gedopeerde visolie werd bewaard in gesilaniseerde Certanflesjes bij kamertemperatuur, in de koelkast (4°C), in de diepvries (-18°C) en bij -80°C (ULT-vriezer). Gedurende 44 weken konden geen beduidende ( $p < 0,05$ ) verschillen gevonden worden tussen de gekoelde en diepgevroren bewaaromstandigheden, voor alle recoveries van VOS. Een gedopeerde visolie kan dus minstens 44 weken bewaard worden in Certanflesjes in gekoelde of diepgevroren omstandigheden. Bij kamertemperatuur werden beduidende dalingen gevonden voor 1,1,1-trichloorethaan, chloroform,

tetrachloormethaan, trichlooretheen en toluen. Benzeen kende een duidelijke toename tijdens de bewaring bij kamertemperatuur.

#### *In ampullen*

Meer dan 140 ampullen werden elk gevuld met 1 ml van de gedopeerde visolie door het Instituut voor ReferentieMaterialen en Metingen te Geel (IRMM). Ampullen nr 11, 81 en 141 werden gemeten ter controle van de homogeniteit van de batch. Standaardafwijkingen op de recoveries gingen van 3,7% (ethylbenzeen) tot 42% (1,1,1-trichloorethaan). Met uitzondering van deze laatste, kon voor geen enkele VOS een beduidend verschil ( $p < 0,05$ ) tussen de drie ampullen aangetoond worden. De batch werd daarom als homogeen beschouwd.

#### *Bewaarexperimenten in SPMD*

Semi-permeabele buisvormige membranen bestaande uit low-density polyethyleen (6 cm omtrek) werden gevuld met 5 ml gedopeerde visolie over een lengte van 6 cm. Beide einden werden dichtgelast met behulp van een keukenapparaat voor het toelassen van vacuümzakjes. Deze SPMD's (semi-permeable membrane device) werden in aluminiumfolie gewikkeld en respectievelijk bewaard bij kamertemperatuur, in de koelkast (4°C) en in de diepvries (-18°C). Na drie weken bij kamertemperatuur bleken alle VOS praktisch volledig verdwenen te zijn. Het hoogst overgebleven gehalte was 18% recovery (tolueen). Na 11 weken koele bewaring bleek praktisch 100% van het 1,2-dichloorethaan en trichlooretheen verdwenen te zijn. Bovendien was de piek van benzeen verstoord door een verbinding die uit de lucht door het SPMD werd opgenomen. Bewaring bij -18°C gedurende 11 weken bleek nauwelijks een negatief effect te hebben. Na 5 maanden werd een toename van tetrachloormethaan, tetrachlooretheen, ethylbenzeen en toluen in het SPMD waargenomen. Inpakken in aluminiumfolie bleek dus onvoldoende om de VOS-gehalten te behouden in diepgevroren omstandigheden.

In een tweede bewaarproef bij kamertemperatuur werden SPMD's verpakt in twee verschillende verpakkingsfilms met behulp van een industrieel vacuümlastoestel (Multivac®). Door de korte periode waarin het vacuüm werd toegepast, werden geen verschillen gevonden tussen vóór en na dichtlassen van de film. Een transparante kunststoffilm en een niet-transparante kunststoffilm met aluminiumlaag werden uitgetest. Benzeen steeg significant enkel in de SPMD's verpakt met de meer doorlaatbare doorzichtige film. Na 6 weken bleken enkel de gehalten chloroform,

tetrachlooretheen, ethylbenzeen, m- en p-xyleen en o-xyleen onveranderd ten opzichte van de oorspronkelijke visolie in beide types verpakkingfilm. De ondoorzichtige verpakkingfilm bleek iets effectiever in het behoud van de oorspronkelijke VOS-gehalten.

In een derde bewaarexperiment met SPMD's werden vijf verschillende bewaarcondities uitgetest: SPMD's werden ingepakt in ondoorzichtige verpakkingfilm met het vacuümlastoestel en bewaard bij kamertemperatuur, in de koelkast (4°C), in de diepvries (-18°C) en bij -80°C (ULT-vriezer). Een vijfde reeks SPMD's werd in een gesloten polyethyleenpotje (30 ml) bewaard bij -18°C.

Na 11 maanden werden voor praktisch geen enkele VOS beduidende verschillen gevonden tussen de gekoelde en diepgevroren SPMD's. Bijna alle beduidende verschillen werden gevonden in SPMD's bewaard bij kamertemperatuur. Met uitzondering van 1,1,1-trichloorethaan, tetrachlooretheen en toluen daalden de VOS-gehalten tijdens de bewaring bij kamertemperatuur. Er werd besloten dat VOS niet verdwijnen in SPMD's verpakt in ondoorlaatbare film en bewaard bij temperaturen niet hoger dan 4°C. Een luchtdichte container bleek een evenwaardig alternatief voor de verpakkingfilm. Echte visstalen worden best diepgevroren bewaard om de staalintegriteit te verzekeren tot aan de VOS-analyse.

### 3 INLEIDING

Uit de resultaten van het project Intercompartimentele distributie van monocyclische aromatische koolwaterstoffen en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> organochloorverbindingen, in het Noordzeemilieu in het kader van het Impulsprogramma Zeewetenschappen ("project VOC", 1992 - 1996) bleek de algemene aanwezigheid van een aantal belangrijke vluchtige organische stoffen (VOS) in de weefsels van diverse organismen uit de verschillende trofische niveaus (Van Langenhove et al., 1996). Dit ondanks hun lage octanol-water partiticoëfficiënten ( $K_{ow}$ ) waardoor er algemeen werd aangenomen dat bioconcentratie als onbelangrijk kan beschouwd worden (Howard, 1991). Deze problematiek werd voorheen slechts door een beperkt aantal auteurs bestudeerd, waardoor er weinig of geen recente resultaten in de literatuur aangetroffen worden. De beschouwde VOS zijn nochtans belangrijke atmosferische pollutanten en worden daarom door een aantal internationale instanties erkend als prioritair te onderzoeken verbindingen (Ministerial declaration of the Third International Conference on the Protection of the North Sea, Den Hague, 1990; FAO, 1990; Dons en Beck). De aanzienlijke analytische complicaties bij de bepaling van deze verbindingen in biologische stalen en in milieustalen in het algemeen kan als een van de redenen voor het beperkte aantal gegevens beschouwd worden. Nochtans werd tijdens het bovenvermelde project aangetoond dat de analyse van deze verbindingen mogelijk is, binnen de gewenste grenzen van betrouwbaarheid en nauwkeurigheid, met commercieel beschikbare apparatuur (Roose en Brinkman, 1998). De concentraties die hierbij werden vastgesteld in de organismen lagen tot duizend keer hoger dan die in het omringende water. De bioconcentratiefactoren die daaruit berekend werden, waren bovendien gemiddeld hoger dan deze gerapporteerd in de literatuur (Van Langenhove et al., 1996). Een verklaring hiervoor kan gevonden worden in de continue blootstelling van organismen aan deze verbindingen. De meeste vertegenwoordigers van de groep worden immers op grote schaal geproduceerd en gebruikt, voornamelijk als solvent (Howard, 1991; Roose, 1995a, Roose, 1995b). Daardoor bestaat de kans dat ondanks de eerder vermelde lage  $K_{ow}$  de concentraties in de organismen, door continue blootstelling via lage of zelfs niet detecteerbare concentraties in de waterkolom, toch voldoende hoog worden om aanleiding te geven tot schadelijke effecten. Bepalingen in de waterkolom alleen volstaan daarom niet. De talrijke bepalingen in organismen die uitgevoerd werden tijdens het

'project VOC' toonden bovendien dat de concentratieniveaus van dezelfde grootteorde waren als deze van gepolychloreerde bifenylen (Van Langenhove et al., 1996). Het voorkomen en de concentratieniveaus in dit gebied roepen daarom vragen op omtrent de algemene omvang van het fenomeen. Monitoring van deze verbindingen in organismen, zo mogelijk in internationaal verband, kan daarom een belangrijke bijdrage leveren tot het inschatten van deze problematiek. Een belangrijk bijkomend voordeel van het analyseren van zeevisserijproducten is de informatie die hierbij verkregen wordt omtrent de kwaliteit van het product voor menselijke consumptie.

De haalbaarheid van een routinematige bepaling van VOS in mariene organismen is afhankelijk van een aantal factoren. In eerste instantie moet er een geschikte analytische methodologie voorhanden zijn. In tweede instantie moet die methodologie gekoppeld zijn aan een goed uitgebouwd systeem van kwaliteitscontrole en -borging (QA), waarbij alle stappen, vanaf de staalname tot de analyse, in beschouwing genomen worden. Tijdens het 'project VOC' werd aangetoond dat de analyse van VOS in biologische stalen mogelijk is met commercieel beschikbare apparatuur en werd reeds ruim aandacht besteed aan QA procedures voor het analytische gedeelte (Van Langenhove et al., 1996). Toch werden een aantal onvolmaaktheden en tekortkomingen geïdentificeerd, zowel voor de analyse als voor de QA procedures.

Bij de analyse kunnen voor een aantal VOS de vereiste detectielimieten maar net bereikt worden, voornamelijk door te hoge achtergrondwaarden en een te kleine staalinbreng. De huidige opstelling is bovendien niet robuust genoeg voor een routinematige analyse en de totale analysetijd is lang. Een van de belangrijkste tekortkomingen voor de QA procedures is de afwezigheid van een goed referentiemateriaal (RM). Het gebruik van een RM, bij voorkeur met dezelfde eigenschappen als de stalen, is algemeen aanvaard als een essentieel onderdeel van analytische QA procedures (Topping et al., 1992). Het doel is enerzijds de bepaling van de accuraatheid van de methode (door middel van een gecertificeerd referentiemateriaal (CRM)) en anderzijds het bepalen van de precisie van de methode en het opstellen van een kwaliteitscontrolegrafiek. Voor het bepalen van VOS in mariene organismen zijn geen commerciële CRM's beschikbaar. In dat geval wordt het gebruik van een intern referentiemateriaal (IRM), ontwikkeld door het betrokken laboratorium, aangeraden (Topping et al., 1992). Tijdens het 'project VOC' werd er om redenen van tijdsdruk en werklast niet begonnen met de

ontwikkeling van een IRM. Studie van de literatuur gaf bovendien geen indicaties van de ontwikkeling of het gebruik van IRM's voor de analyse van biologische stalen. Het gebrek aan een IRM werd daarom opgevangen door een standaardoplossing te behandelen als staal en dus als referentiemateriaal. Hoewel dit een tijdelijke oplossing bood voor het probleem, kan het gedrag van VOS in een standaardoplossing slechts beperkt vergeleken worden met het gedrag in een staal. De ontwikkeling van een goed gekarakteriseerde IRM moet dus als essentieel beschouwd worden indien de bepaling op routinematige basis uitgevoerd wordt in het kader van een monitoringprogramma.

Zoals eerder vermeld werd, hebben QA procedures niet enkel betrekking op het analytische aspect van het werk. Staalname en bewaren van de stalen moeten eveneens aan een QA schema onderworpen worden. Het is essentieel dat de integriteit van stalen, zowel tijdens de staalname zelf als tijdens het bewaren van de stalen, voldoende getest wordt, vooraleer wordt overgegaan op routinematige bepalingen (Topping et al., 1992). Tijdens het 'project VOC' werden mogelijke verliezen of contaminatie reeds bestudeerd voor de lucht- en waterstalen (Van Langenhove et al., 1996). De integriteit van biologische stalen, tijdens de bemonstering en bewaring, kwam tijdens het eerder vermeld project minder aan bod. Theoretische beschouwingen op basis van de concentraties in lucht aan boord en tijdens bewaring in het laboratorium lieten in elk geval vermoeden dat er geen wezenlijke contaminatie te verwachten was door de aanwezigheid van VOS in de omgevingslucht. Diverse bronnen in de literatuur wijzen op een aantal maatregelen die zowel verliezen als contaminatie vermijden, maar het gaat daarbij in hoofdzaak over de handelingen vanaf het moment van aankomst in het laboratorium (Van Langenhove et al., 1996). Er werden geen referenties gevonden die het probleem van de staalname aan boord of de bewaring beschrijven. Tijdens het 'project VOC' werden bovendien geen experimentele bepalingen van verliezen of contaminatie in biologische stalen uitgevoerd. De reden hiervoor was opnieuw het gebrek aan een duidelijk gekarakteriseerd referentiemateriaal. De integriteit van stalen kan bestudeerd worden door een RM aan dezelfde handelingen te onderwerpen en het onder identieke voorwaarden te bewaren. Bovendien kunnen er op die manier diverse recipiënten voor de stalen getest worden en kunnen de optimale voorwaarden van bewaring vastgesteld worden.

Tot besluit kan gesteld worden dat de haalbaarheid van een routinematige bepaling van VOS in zeevisserijproducten in eerste instantie afhangt van een

aantal nader te bepalen hiaten in de huidige kennis, zowel wat de analyses betreft als de QA procedures. Het invullen hiervan laat in elk geval een voorspelling toe van de haalbaarheid van monitoring van VOS in mariene organismen. Het kan bovendien resulteren in een duidelijk omschreven methodologie voor de analyse van deze verbindingen, inclusief QA procedures, vanaf het moment van de staalname. De verworven kennis kan dan aangewend worden om de haalbaarheid van de routinematige monitoring, in een internationaal verband, te evalueren.

De volgende doelstellingen werden daarom in dit project vooropgesteld:

Verfijning van de huidige analytische methodologie en ontwikkeling van een geschikt referentiemateriaal.

1. Verfijning van de huidige analytische methodologie.
  - 1.2. Keuze en ontwikkeling van een referentiemateriaal.
  - 1.3. Studie van de stabiliteit en de integriteit van het referentiemateriaal tijdens bewaring.
2. Evaluatie en verfijning van de procedures voor staalname en bewaring van de stalen met inbegrip van de QA procedures.
  - 2.2. Studie van de integriteit van de stalen tijdens bewaring in het laboratorium en aan boord van een schip.
  - 2.3. Studie van de integriteit van de stalen tijdens de bemonstering aan boord van een schip en toepassing van de procedures op milieustalen.
3. Evaluatie van de haalbaarheid van monitoring van vluchtige organische verbindingen in samenwerking met QUASIMEME en/of de werkgroep Mariene Chemie van de Internationale Raad voor het Onderzoek van de Zee (ICES).
  - 3.2. Enquête in samenwerking met QUASIMEME naar de haalbaarheid van de bepaling van vluchtige organische verbindingen in mariene organismen in een breder (internationaal) kader.
  - 3.3. Voorbereiding van interkalibratieoefeningen als pilootlaboratorium.

## 4 MATERIAAL EN METHODEN

### 4.1 Analyse van standaarden, stalen en blanco

Als inwendige standaard (IS) werd een verdunning van trifluortolueen (12 ng/ $\mu$ l) in methanol gebruikt. Een blanco staal werd bereid door 1  $\mu$ l IS aan 20 ml water (Spa Reine) toe te voegen in een purgeerflesje.

Ijkcurven werden in het begin opgesteld aan de hand van een zelf bereide stockoplossing die een  $10^5$ -voudige verdunning van elke zuivere VOS-verbinding bevatte. Er werd hiervan 1, 2, 3, 4 en 5  $\mu$ l in het purgeerflesje van het P&T-GC-MS-systeem ingebracht voor het opstellen van de ijkcurve.

Later in het project werd een ijkcurve opgesteld met behulp van een standaardreeks met 10, 20, 30, 40 en 50 ng/ $\mu$ l aan VOS-standaard en 12 ng/ $\mu$ l IS in methanol. Hiervan werd 1  $\mu$ l aan een purgeerflesje met 20 ml water toegevoegd. De standaardreeks werd aangemaakt op basis van een aangekochte standaardoplossing (AccuStandard M-502A-R-10X; 2,00 mg/ml per VOS) met behulp van microsyringes.

De bewaring van de stockoplossingen en verdunningen van interne en externe standaarden (1 ml) gebeurt in gesilaniseerde Certanflesjes bij kamertemperatuur.

Purgeerflesjes met blanco en standaarden worden quasi gelijktijdig aangemaakt, zodat achtergrondconcentraties in alle purgeerflesjes gelijk zijn. De flesjes worden gesloten met "open hole" schroef doppen met teflon liner. Ze worden in een waterbad bij 70°C geplaatst en doorprikt met de in- en uitgaande holle naalden waardoor helium werd gepurgeerd. De overige purgeerflesjes worden in de koelkast bewaard.

### 4.2 Bereiding en analyse van een referentiemateriaal voor VOS

Visolie (kabeljauwlevertraan, type A, VEL 0286, VWR) werd vooraf "blanco" gemaakt bij 90°C door overnacht te purgeren met helium op een magnetische roerplaat. Een 500 ml Hamilton syringe, voorzien van een 3-wegskraan en holle naald, werd langs de achterzijde gevuld met gepurgeerde visolie (en roervlo). Per 100 gram visolie werd 0,02 gram BHT als antioxidans toegevoegd. Via de spuituitgang werd per 100 gram visolie 12,5  $\mu$ l van een VOS stockoplossing toegevoegd. In de eerste experimenten (visolie 1) werd de AccuStandard stockoplossing (2,00 mg/ml van elke VOS) gebruikt, zodat een doperingsniveau van ongeveer 250 ng/g visolie per VOS bekomen werd. In latere experimenten (visolie 2, 3 en 4) werd gebruik gemaakt van een zelf samengestelde VOS-stockoplossing (tabel 4.1). De



gedopeerde olie werd overnacht op de magnetische roerplaat gemengd. Via de holle naald werden Certanflesjes (1 ml) en semi-permeabele membranen (5 ml) afgevuld. Voor de analyse van VOS in visolie werd eerst een reeks purgeerflesjes met 20 ml Spawater en 1  $\mu$ l IS aangemaakt, zowel voor de blanco als voor de visoliestalen (3 tot 5 herhalingen). De purgeerflesjes werden afgesloten met een "open hole" schroefdop met septum. Vlak voor het purgeren werd met een microsyringe 100  $\mu$ l visolie uit het Certanflesje genomen en via het septum in het purgeerflesje gebracht. Het purgeren gebeurt eveneens in een waterbad bij 70°C.

Tabel 4.1. Samenstelling van VOS-gedopeerde visolie (ng/g visolie).

VOS	Visolie 1	Visolie 2	Visolie 3	Visolie 4
1,2-Dichloorethaan	264	59	58	56
1,1,1-Trichloorethaan	262	19	19	18
Chloroform	264	189	187	180
Tetrachloormethaan	264	143	142	137
Trichlooretheen	263	50	50	48
Tetrachlooretheen	263	38	38	37
Benzeen	264	84	83	80
Tolueen	263	95	94	91
Ethylbenzeen	261	281	279	269
m- en p-Xyleen	527	327	324	312
o-Xyleen	261	160	159	153

Visolie 1 werd gebruikt voor validatie van de analyse van gedopeerde visolie. Visolie 2 werd gebruikt in bewaarproeven 1 en 2 met semi-permeabele membranen (SPMD's). Visolie 3 werd gebruikt in bewaarproef 3 met SPMD's en de bewaarproef in Certanflesjes. Visolie 4 werd verstuurd naar het Instituut voor ReferentieMaterialen en Metingen (IRMM, Geel) en werd daar afgevuld in 147 ampullen (1 ml) onder inerte atmosfeer.

#### 4.3 Beschrijving van het purge&trap-GC-MS systeem

De vluchtige verbindingen worden door de opwarming en het purgeren met helium uit het purgeerflesje verdreven. De VOS worden verzameld op een adsorptietrap bij 35°C. Na het purgeren wordt deze snel opgewarmd waardoor de VOS gedesorbeerd worden via een transferlijn naar de gaschromatograaf worden gevoerd. Hier worden de VOS gescheiden op een capillaire kolom, waarna ze in de ion-trap-massaspectrometer terechtkomen.

Hier worden de VOS door elektronen gefragmenteerd en geïoniseerd. De ionen worden opgevangen en omgezet in een elektronisch signaal door een multiplier. Hieronder volgt de beschrijving van het systeem zoals het in gebruik was na het aanbrengen van de verbeteringen.

#### 4.3.1 Purge&Trap-fase

Het purgeren gebeurt met behulp van een Tekmar LSC 2000 Purge&Trap toestel, voorzien van een Vocarb 4000 adsorptietrap (Supelco). De stalen worden opgewarmd in een waterbad bij 70°C gedurende het purgeren. De meegevoerde waterdamp wordt gecondenseerd in een gekoeld flesje (-10°C) dat in een cryostaat hangt. De Purge&Trap parameters worden als volgt ingesteld: transferlijn (tussen Tekmar en GC) 250°C; valve 250°C; mount 40°C; standby 40°C; purge 30 min; dry purge 6 min; desorb preheat 225°C; desorptie 5 min, 250°C; uitbakfase 5 min, 260°C; BGB on; BGB delay 10 sec; runs per sample 1; bakeout: off; sample transfer 0 sec; purge flow: 60 ml/min.

#### 4.3.2 Gaschromatografie

De scheiding van de VOS gebeurt aan de hand van een Varian 3400 gaschromatograaf voorzien van een capillaire kolom (DB-VRX 60 m x 0,32 mm; 1,8 µm filmdikte). Andere scheidingscondities zijn als volgt: dragergas helium; kolomdruk 19 psi; debiet 2,56 ml/min (25°C, 1 atm); temperatuursprogramma: 40°C gedurende 5,88 min; van 40°C naar 200°C met 17,1°C/min; 200°C gedurende 3,50 min. De transferlijn naar de massaspectrometer staat op 260°C.

#### 4.3.3 Massaspectrometrie

Massaspectrometrie wordt uitgevoerd door middel van een ion trap MS systeem Magnum (Finnigan). De MS-parameters zijn ingesteld als volgt: scan range 50-300 amu; 1 seconde per scan (5 µscans); filament/multiplier delay 400 s; peak threshold 0 counts; mass defect 50 mu/100amu; background mass 50 amu; electron impact ionisation; auto ion control on; manifold temperatuur 221°C; multiplier voltage 1800 V; emission current 13 µA; axial modulation amplitude 4,0 V.

De kwantificering van 12 VOS gebeurde aan de hand van de selectie van retentietijden en ionmassa's weergegeven in tabel 4.2. Voor de kwantificering worden de piekoppervlakten van de analyten gedeeld door die

van de IS. De ijkcurve wordt manueel berekend in Excel aan de hand van de 5 standaardoplossingen, zonder rekening te houden met de blanco.

Tabel 4.2: Retentietijden en geselecteerde ionmassa's van de geanalyseerde VOS.

VOS	Retentietijden (min:s)	Massa's (m/z) voor kwantificering
1,1,1-Trifluortolueen (IS)	12:11	127, 146
Chloroform	9:54	83, 85
1,2-Dichloorethaan	10:40	62, 64
1,1,1-Trichloorethaan	10:46	97, 99
Tetrachloormethaan	11:11	117
Benzeen	11:13	78
Trichlooretheen	11:55	130, 132
Tolueen	13:31	91
Tetrachlooretheen	14:18	166, 164
Ethylbenzeen	15:10	91
m- en p-Xyleen*	15:22	91
o-Xyleen	15:49	91

\* m- en p-xyleen kunnen met deze kolom niet gescheiden worden.

#### 4.4 Bewaarproeven met VOS-gedopeerde visolie

##### 4.4.1 Bewaarproeven met VOS-gedopeerde visolie in Certanflesjes en ampullen

De gedopeerde visolie 3 (tabel 4.1) werd uit de 500 ml Hamilton syringe overgebracht in gesilaniseerde Certanflesjes en bewaard bij kamertemperatuur, in de koelkast (4°C), in de diepvries (-18°C) en bij -80°C (ULT-vriezer). Stalen werden genomen op dag 0 en na 2, 6, 10, 18 en 44 weken en onmiddellijk geanalyseerd.

147 ampullen werden op 15 november 2002 afgevuld met 1 ml van de visolie 4 (tabel 4.1) door het Instituut voor ReferentieMaterialen en Metingen te Geel (IRMM). Ampullen werden genummerd naar de volgorde van afvullen. Ampullen nr 11, 81 en 141 werden 10 weken na afvullen en bewaring in de koelkast (4°C) gemeten ter controle van de homogeniteit van de batch. Na 35 weken in de koelkast werd ampul 99 bemonsterd. Ook werd het VOS-gehalte gemeten in visolie 4 die bewaard werd in een certanflesje en in de 500 ml Hamilton syringe bij kamertemperatuur.

#### 4.4.2 Bewaarprouven met VOS-gedopeerde visolie in semi-permeable membranen (SPMD)

Semi-permeabele buisvormige membranen bestaande uit low-density polyethyleen (6 cm omtrek, 75-90  $\mu\text{m}$  dikte, 100 nm poriëndiameter) aangekocht bij EST laboratories, USA ([www.spmlds.com](http://www.spmlds.com)) werden gevuld met 5 ml gedopeerde visolie over een lengte van 6 cm vanuit de 500 ml Hamilton syringe.

In bewaarproef 1 werden beide einden dichtgelast met behulp van een keukenapparaat voor het toelassen van vacuümzakjes (Krups Vacupack plus). Deze SPMD's werden in aluminiumfolie gewikkeld en respectievelijk bewaard bij kamertemperatuur, in de koelkast (4°C) en in de diepvries (-18°C). Staalname en analyse gebeurde na 3 weken (kamertemperatuur), 11 weken (koelkast en diepvries), 23 en 29 weken (diepvries).

In een tweede bewaarproef werden SPMD's verpakt in twee verschillende verpakkingsfilms. Tabel 4.3 toont de eigenschappen van de twee verpakkingsfilms. Zowel de SPMD's als de verpakkingsfilm werden dichtgelast met behulp van een industrieel vacuümlastoestel (Multivac<sup>®</sup> A300/16). Het dichtlassen gebeurde onder verlaagde druk gedurende een tiental seconden. Staalname en analyse gebeurde na 3 weken bij (kamertemperatuur), 11 weken (koelkast en diepvries), 23 en 29 weken (diepvries).

In een derde bewaarexperiment met SPMD's werden vijf verschillende bewaarcondities uitgetest: SPMD's werden ingepakt in de ondoorzichtige verpakkingsfilm (film 2) met het vacuümlastoestel (Multivac<sup>®</sup> A300/16) en bewaard bij kamertemperatuur, in de koelkast (4°C), in de diepvries (-18°C) en bij -80°C (ULT-vriezer). Een vijfde reeks SPMD's werd in een gesloten polyethyleenpotje (30 ml) bewaard bij -18°C. Er werd bemonsterd na 0, 2, 4, 8, 12, 22 en 48 weken bewaring.

Tabel 4.3. Karakteristieken van de gebruikte verpakkingfilms voor bewaarproeven met SPMD's.

Parameter	Film 1	Film 2
Leverancier	Danisco Flexible Belgium	Verpakkingcenter Vismijn Oostende
Transparant	Nee	Ja
Samenstelling*	OPA 15 + ALU 9 + OPA 15 + PE 100	PE 35 + PA 25 + PE 35
Waterdampdoorlaatbaarheid (g/m <sup>2</sup> /24h bij 23°C en 85% RV, DIN 53380)	< 0,1	1,0
Zuurstofdoorlaatbaarheid (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /24h/atm bij 23°C en 85% RV, DIN 53112)	< 0,1	31

\* afmetingen in  $\mu\text{m}$ ; PE = polyethyleen; OPA = biaxiaal georiënteerd polyamide; ALU = aluminiumfolie; PA = polyamide; RV = relatieve vochtigheid

De staalname gebeurde door openknippen van de verpakkingfilm en doorprikken van de SPMD met een syringe. Met de syringe werd ongeveer 1 ml in een certanflesje overgebracht. Dit werd maximum enkele dagen bewaard alvorens te analyseren.

#### 4.5 Silanisering van Certanflesjes

Om de doorlaatbaarheid van glas voor monocyclische aromatische koolwaterstoffen te verminderen, werden de Certanflesjes gesilaniseerd. Deze Certanflesjes werden gebruikt voor de bewaring van de stockoplossingen van standaarden en de bewaarproef met gedopeerde visolie als intern referentiemateriaal.

De Certanflesjes werden gevuld met een 5% oplossing van dimethyldichloorsilaan (Alltech) in dichloormethaan gedurende 15 minuten. Na het verwijderen van de oplossing werd nagespoeld met methanol (Promochem, picograde). Een tweede naspoeling gebeurde met methanol "purge & trap" kwaliteit (Labscan). De flesjes werden gedroogd bij 50°C overnacht.

#### 4.6 Statistiek

IJkcurven werden opgesteld en VOS-gehalten werden berekend via lineaire regressie gebruik makend van de software van MS- Excel. Voor de berekening van vertrouwensintervallen van de gemiddelde recoveries werd gebruik gemaakt van een Statistica (versie 6.0) softwarepakket. Dit pakket werd ook gebruikt voor de berekening van significanties tussen gemiddelden. De HSD (Honest Significant Difference) methode van Tukey voor ongelijke aantallen werd hiervoor toegepast.

## 5 RESULTATEN

### 5.1 Verfijning van de huidige analytische methodologie

Tijdens het project Intercompartimentele distributie van monocyclische aromatische koolwaterstoffen en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> organochloorverbindingen, in het Noordzeemilieu in het kader van het Impulsprogramma Zeewetenschappen (alias "project VOC", Van Langenhove et al., 1996) werd aangetoond dat de analyse van deze verbindingen mogelijk is. Toch werden een aantal onvolmaaktheden en tekortkomingen geïdentificeerd.

Daarom volgende doelstellingen nagestreefd:

- Verhogen van de robuustheid
- Verkorten van de analysetijd
- Verlagen van de detectiegrenzen

#### 5.1.1 Verhogen van de robuustheid

De opstelling van het purge&trap-systeem ten tijde van het "project VOC" werd grondig bestudeerd en aangepast. Volgende aanpassingen werden doorgevoerd om de opstelling minder onderhevig te maken aan lekken en contaminatie door de omgeving. Het condenseervaatje om waterdamp uit de gasstroom te halen, werd vervangen door een 50 ml flesje met teflon dop en dito slangen. Deze opstelling laat toe het flesje rechtstreeks onder te dompelen in de koelvloeistof van de cryostaat. De cryostaat werd naast het purge&trap toestel geplaatst, zodat de slangen konden ingekort worden. Het risico op oversleep vermindert daardoor ook. Het Wheatonflesje, dat ervoor moest zorgen dat er geen extract door het purge&trap toestel zou worden opgezogen, werd vervangen door 2 teflon terugslagkleppen.

#### 5.1.2 Verkorten van de analysetijd

De totale analysetijd kan opgesplitst worden in 2 grote blokken: de purge&trap-fase en de gaschromatografische cyclus. Op zijn beurt bestaat de purge&trap cyclus uit volgende fasen: purge&trap, dry purge, voorverwarmen, desorptie en uitbakken. De desorptie werd in het "project VOC" gevolgd door een cryofocusing fase met een cryofocusing module, geplaatst voor de GC-kolom.

Het bleek mogelijk de purge&trap cyclus van 34 minuten gevoelig in te korten naar 20 minuten door het purgeerdebiet te verhogen van 20 naar 40 ml/min. Nochtans was een purgeertijd van 30 minuten nodig voor een gehomogeniseerd visstaal.

De desorptietijd werd teruggebracht van 10 naar 5 minuten, voorafgegaan door een dry-purge fase van slechts 5 minuten (om overtollig water van de adsorptietrap te verwijderen). De cryofocusing fase kon worden weggelaten, door het gebruik van een capillaire GC-kolom met aangepaste stationaire fase (DB-VRX, 60 m x 0,32 mm i.d., 1,8  $\mu$ m filmdikte), met voldoende hoge resolutie.

Met deze kolom werd het ook mogelijk de gaschromatografische run in te korten van 23 naar 17 minuten door de kolomdruk en het temperatuurprogramma aan te passen.

### 5.1.3 Verlagen van de detectiegrenzen

De gevoeligheid van de analyse kan op twee manieren verhoogd worden: verhogen van de responsfactor van de massaspectrometer en verhogen van de hoeveelheid staal in de purgeereenheid.

De massaspectrometer werd tot nu toe automatisch "getuned" door de software. Dit wil zeggen dat parameters zoals filamentstroom, multiplervoltage en targetwaarde worden ingesteld zodat een optimale signaal/ruis-verhouding, gecombineerd met een zo groot mogelijk dynamisch (massa-) bereik, verkregen worden. Door het combineren van manuele en softwarematige instellingen, zouden het dynamisch bereik verkleind, en de gevoeligheid verhoogd kunnen worden. In een eerste experiment werden multiplervoltage en targetwaarde handmatig gevarieerd. Enkel een verhoging van het multiplervoltage bleek een verhoogde respons tot gevolg te hebben. De signaal/ruis-verhouding verslechterde echter, zodat dit eigenlijk niet tot een effectieve verhoging van de gevoeligheid leidde.

Het tweede alternatief werd niet bestudeerd daar de analysegevoeligheid voldoende hoog was voor de analyse van visweefsel.

### 5.1.4 Validatie van de analysemethode voor VOS in standaardoplossingen

Lineariteit, kalibratiefactoren, beslissings- en detectiegrenzen, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid werden nauwgezet bepaald.

#### 5.1.4.1 Herhaalbaarheid

Onder herhaalbaarheid wordt in dit project verstaan de mate waarin de respons varieert tussen meerdere purge&trap cycli uitgevoerd tijdens dezelfde dag. In deze tijdspanne kunnen maximum een 7-tal analyses uitgevoerd worden.



In eerste instantie werd de herhaalbaarheid van de respons van de inwendige standaard (IS) nagegaan. Er werd een hoeveelheid van 13 ng (1  $\mu$ l) in een purgeerflesje met 35 ml water gebracht en geanalyseerd. Deze proeven lieten duidelijk blijken dat de respons zeer afhankelijk is van het precieze gebruik en type van microsyringe. Het bleek dat de plunger-in-needle syringes (1  $\mu$ l) weinig herhaalbare resultaten opleverden. Een klassieke 5 of 10  $\mu$ l microsyringe (bvb. Hamilton) in goede staat, met of zonder Chaney adapter, leverde goede herhaalbaarheden op (relatieve standaardafwijking lager dan 3,6%, n = 7).

De herhaalbaarheid van de analyse van de standaardoplossing met laagste concentratie (1  $\mu$ l van een 100.000-voudige verdunning VOS als zuivere vloeistof) werd ook onderzocht. Aan de purgeerflesjes werd naast de IS ook een (externe) standaardoplossing van de 12 VOS standaarden toegevoegd. Het toevoegen van de uitwendige standaard bleek het best uitgevoerd te worden via doorprikken van het teflon septum door middel van de syringe, nadat aan het water de IS werd toegevoegd en het purgeerflesje gesloten werd met een "open hole" schroefdop met septum. Daar de achtergrondwaarde voor de verschillende componenten, aanwezig in de lucht, zeer bepalend is voor de globale respons bleek het aangewezen de analyseflesjes op hetzelfde moment te sluiten, zodat deze achtergrondwaarde constant kan beschouwd worden gedurende dezelfde dag. De bereide analyseflesjes worden dan best bewaard in de koelkast (4°C), tot vlak voor de analyse. Het bleek ook aangewezen de purgeerflesjes op de dag van bereiden te analyseren, daar toch beduidende verliezen na 24 uur bewaren in de koelkast, werden vastgesteld. De herhaalbaarheid (relatieve standaardafwijking) van de piekoppervlakten van de 12 componenten voor een inbreng van 1  $\mu$ l van een 10<sup>5</sup>-voudige verdunning was maximaal 6% (n = 6). Voor de relatieve piekoppervlakten (ten opzichte van de IS) bedroeg deze ten hoogste 7%. Voor een inbreng van 5  $\mu$ l bedroeg de herhaalbaarheid maximaal 3% (absolute piekoppervlakten), respectievelijk 6% (n = 6) (relatieve piekoppervlakten).

#### 5.1.4.2 Lineariteit van de respons

De respons van het purge&trap-systeem bleek lineair tot de waarden weergegeven in tabel 5.1. Indien stalen aanleiding zouden geven tot hogere waarden, dan zal de hoeveelheid ingebracht staal of referentiemateriaal moeten aangepast worden, zodat geen enkele waarde buiten het lineair bereik valt.

Tabel 5.1. Lineair bereik van de onderzochte componenten

Component	Lineair bereik (ng)
1,2-Dichloorethaan	65
1,1,1-Trichloorethaan	68
Chloroform	76
Tetrachloormethaan	82
Trichlooretheen	76
Tetrachlooretheen	82
Benzeen	46
Tolueen	44
Ethylbenzeen	44
m- en p-Xyleen *	86
o-Xyleen	44

\*m- en p-xyleen zijn chromatografisch en massaspectrometrisch niet van elkaar te onderscheiden, en worden daarom als som beschouwd.

#### 5.1.4.3 Opstellen van controlegrenzen voor de respons van de standaardoplossingen

In het voorgaande "project VOC" werd de respons van stalen verwerkt aan de hand van een tweepuntskalibratie (1 standaard en 1 blanco), uitgevoerd op dezelfde dag als de stalen. De standaard en de stalen werden voor de achtergrondwaarden van de blanco gecorrigeerd, waarna met de bekomen responsfactoren de respectievelijke concentraties in de stalen werden berekend. Deze aanpak was vooral praktisch gericht, zodat met een minimum aan inspanning voor de kalibratie toch een drie à vier stalen per dag konden geanalyseerd worden.

Door het geringe aantal punten in de kalibratie is de onzekerheid van de gebruikte responsfactoren vrij hoog. In dit project wordt daarom getracht een andere aanpak te volgen, op basis van de richtlijn ISO 11095. Deze richtlijn beschrijft hoe men op basis van een opgestelde ijkcurve controlegrenzen kan opstellen. Zo kunnen er meerdere ijkpunten beschouwd worden, zodat de onzekerheid omtrent de kalibratiefactoren afneemt. Op deze manier is het niet nodig om elke dag nieuwe kalibratiecurven op te stellen. Wel kunnen op basis van de ijkcurve controlegrenzen opgesteld worden, die dan gelden voor standaarden die als onbekende worden verwerkt. Wanneer deze controlegrenzen worden overschreden, dient een nieuwe ijkcurve te worden opgesteld. Indien de standaarden binnen deze controlegrenzen vallen, kunnen de voordien berekende kalibratiefactoren gebruikt worden.

Tabel 5.2. Vertrouwensintervallen (95%) voor de laagste standaard (1  $\mu$ l van een  $10^5$ -voudige verdunning van de zuivere VOS-verbinding).

VOS	Nominaal (ng)	Ondergrens (ng)	Bovengrens (ng)
1,2-Dichloorethaan	12,9	11,1	14,8
1,1,1-Trichloorethaan	13,7	11,9	15,4
Chloroform	15,2	12,7	17,7
Tetrachloormethaan	16,3	14,8	17,9
Trichlooretheen	15,3	12,4	18,2
Tetrachlooretheen	16,5	14,9	18,0
Benzeen	9,1	7,7	10,6
Tolueen	8,8	7,4	10,3
Ethylbenzeen	8,8	6,9	10,8
m- en p-Xyleen	17,2	14,8	19,6
o-Xyleen	8,8	7,5	10,0

Tabel 5.3. Vertrouwensintervallen (95%) voor de hoogste standaard (5  $\mu$ l van een  $10^5$ -voudige verdunning van de zuivere VOS-verbinding).

Component	Nominaal (ng)	Ondergrens (ng)	Bovengrens (ng)
1,2-Dichloorethaan	64,7	55,6	73,8
1,1,1-Trichloorethaan	68,3	59,5	77,1
Chloroform	76,0	63,5	88,5
Tetrachloormethaan	81,7	73,8	89,5
Trichlooretheen	76,4	61,8	91,0
Tetrachlooretheen	82,3	74,4	90,1
Benzeen	45,5	38,3	52,8
Tolueen	44,2	36,9	51,4
Ethylbenzeen	44,2	34,5	53,8
m- en p-Xyleen	86,1	73,9	98,2
o-Xyleen	43,8	37,5	50,0

Er werden controlegrenzen opgesteld voor de hoogste en laagste standaardconcentratie. Eerst werd onderzocht of de standaardafwijking van de respons (i.e. de relatieve piekoppervlakte) constant dan wel proportioneel is in het onderzochte gebied. Voor de meerderheid van de componenten bleek deze significant ( $p < 0,05$ ) proportioneel te zijn. Op basis van zes herhalingen van de laagste standaard (1  $\mu$ l van een  $10^5$ -voudige verdunning)

en zes herhalingen van de hoogste standaard (5  $\mu$ l van een  $10^5$ -voudige verdunning) werden via lineaire regressie intercept en helling bepaald. Vertrouwensintervallen (95%) voor deze standaarden werden berekend op basis van ISO 11095 en zijn weergegeven in tabellen 5.2 en 5.3.

#### 5.1.4.4 Beslissingsgrens ( $CC\alpha$ ) en detectiegrens ( $CC\beta$ )

Op basis van de waarde van het intercept, de helling, de standaardfout van de regressie en 11 achtergrondwaarden (verkregen op 11 verschillende dagen), werden beslissingsgrens en detectiegrens opgesteld (Klaessens & van Leeuwen, 1996). De beslissingsgrens ( $CC\alpha$ , met  $\alpha = 0,01$ ) werd gedefinieerd als de laagste meetwaarde die men kan bekomen in 1% van de gevallen wanneer de component toch niet aanwezig is in het staal (type I-fout: vals positief resultaat). De detectiegrens ( $CC\beta$ , met  $\beta = 0,05$ ) werd gedefinieerd als de nominale waarde die aanleiding zou geven in 5% van de gevallen tot een meetwaarde lager dan de detectiegrens (type II-fout: vals negatief resultaat).

Tabel 5.4. Beslissingsgrens ( $CC\alpha$ ) en detectiegrens ( $CC\beta$ ) voor de 12 componenten

Component	Beslissingsgrens ( $\alpha = 0,01$ ) (ng)	Detectiegrens ( $\beta = 0,05$ ) (ng)
1,2-Dichloorethaan	4,2	6,2
1,1,1-Trichloorethaan	5,0	6,8
Chloroform	2,4	4,5
Tetrachloormethaan	9,7	11,3
Trichlooretheen	4,2	5,6
Tetrachlooretheen	3,1	3,7
Benzeen	2,4	3,3
Tolueen	1,2	2,2
Ethylbenzeen	0,4	1,1
m- en p-Xyleen	0,6	2,3
o-Xyleen	1,1	2,2

Wanneer men de beslissings- en detectiegrenzen uit tabel 4 vergelijkt met de detectiegrenzen (limit of detection, LOD) uit het "project VOC" merkt men dat de LOD-waarden een factor tien tot honderd lager zijn. Nochtans beweren beide grenzen een  $\alpha$ -waarde van 0,01 te hebben. De LOD-waarden

werden berekend op basis van de gemiddelde achtergrondwaarde, vermeerderd met drie maal de standaardafwijking, bekomen op dezelfde dag. Indien men deze methode toepast op de huidige metingen, bekomt men zeer gelijkaardige LOD-waarden. Deze berekeningswijze houdt echter geen rekening met de variabiliteit die men introduceert door het gebruik van lineaire regressie. De berekende beslissings- en detectiegrenzen in tabel 5.4 houden hier wel rekening mee, en zijn daarom betrouwbaarder (conservatiever). Of men nu achtergrondwaarden neemt van dezelfde dag, of achtergrondwaarden van verschillende dagen, bleek weinig effect te hebben op de berekende beslissings- en detectiegrenzen.

De hoge detectiegrens van tetrachloormethaan is opvallend en is toe te schrijven aan de purgeercondities die voor tetrachloormethaan niet optimaal zijn. Waarschijnlijk wordt een aanzienlijke fractie gedesorbeerd van de adsorptietrap (doorbraak) in de laatste 10 minuten van de purgeerfase, zodat lage gehalten niet kunnen worden aangetoond.

#### 5.1.4.5 Reproduceerbaarheid van standaarden

Op drie verschillende dagen werden een lage ( $1 \mu\text{l } 10^5$  verdunning) en een hoge standaard ( $5 \mu\text{l}$ ) ingebracht en geanalyseerd. Slechts één (m- en p-xyleen) van de 66 metingen viel buiten de opgestelde controlegrenzen (95%), wat zeer aanvaardbaar is. In tabel 5.6 is de reproduceerbaarheid uitgedrukt als procentuele standaardafwijking (variatiecoëfficiënt, VC). Met uitzondering van m- en p-xyleen is de reproduceerbaarheid van de standaarden met het oog op verdere proeven zeer aanvaardbaar.

Tabel 5.7 toont de reproduceerbaarheid van de relatieve piekoppervlakten voor de standaardoplossing waarin 50 ng van elke VOS aanwezig is. Er werden in een periode van 80 dagen 53 runs uitgevoerd. De laagste relatieve piekoppervlakte en standaardafwijking werden waargenomen bij tetrachloormethaan, de hoogste standaardafwijking bij toluen. De beste reproduceerbaarheid werd bekomen voor benzeen (2,9% variatiecoëfficiënt), de slechtste reproduceerbaarheid werd opgetekend voor toluen (9,6%). Deze hoge waarde is vermoedelijk toe te schrijven aan het "lekker" van toluen uit de Vocarb adsorptietrap, op zijn beurt te wijten aan degradatie van het adsorptiemateriaal. Een overzicht van de reproduceerbaarheid van de absolute piekoppervlakten van de 50 ng standaardoplossing wordt getoond in tabel A.1 in bijlage.

Tabel 5.6. Reproduceerbaarheid (n = 3) van een lage en een hoge standaard, uitgedrukt als variatiecoëfficiënt (VC)

VOS	Lage standaard		Hoge standaard	
	Gemiddelde (ng)	VC (%)	Gemiddelde (ng)	VC (%)
1,2-Dichloorethaan	13,4	7	63,8	6
1,1,1-Trichloorethaan	13,7	3	64,6	6
Chloroform	14,4	12	75,2	2
Tetrachloormethaan	17,5	8	79,8	1
Trichlooretheen	16,4	2	77,5	1
Tetrachlooretheen	16,6	4	80,4	2
Benzeen	9,1	2	44,4	6
Tolueen	8,7	6	43,1	1
Ethylbenzeen	8,4	4	42,1	0,2
m- en p-Xyleen	15,1	22	83,5	1
o-Xyleen	8,4	7	42,7	1

In de loop van het project werd overgeschakeld van een zelf bereide VOS standaardstockoplossing, naar een aangekochte standaardstockoplossing van AccuStandard, voor de kalibratie van het P&T-GC-MS-systeem.

Tabel 5.7. Reproduceerbaarheid van relatieve piekoppervlakten van de 50 ng standaard ten opzichte van de IS (n = 53).

VOS	Gemiddelde	Standaardafwijking	Variatiecoëfficiënt (%)
1,2-Dichloorethaan	2,61	0,09	3,3
1,1,1-Trichloorethaan	4,13	0,19	4,7
Chloroform	3,85	0,29	7,6
Tetrachloormethaan	1,61	0,05	3,0
Trichlooretheen	3,11	0,20	6,6
Tetrachlooretheen	2,44	0,14	5,8
Benzeen	5,13	0,15	2,9
Tolueen	6,20	0,59	9,6
Ethylbenzeen	4,80	0,33	6,9
m- en p-Xyleen	6,89	0,38	5,6
o-Xyleen	4,00	0,12	3,0

Van de gechloreerde koolwaterstoffen geeft chloroform de slechtste reproduceerbaarheid. Dit is zeer waarschijnlijk te wijten aan de zeer variabele en meestal zeer hoge achtergrondwaarde in de blanco. De reden hiervan is het gebruik als extractiemiddel in andere analyses (o.a. PCB-analyse). Deze extractie gebeurt in een andere ruimte. Door het ontbreken van andere voorzorgsmaatregelen kan niet vermeden worden dat chloroform in het lokaal waar de P&T-GC-MS-systeem staat, binnendringt.

## 5.2 Ontwikkelen van intern referentiemateriaal voor VOS-analyse

### 5.2.1 Precisie en recovery van analyse van VOS-gedopeerde visolie 1

Voor het bepalen van VOS in mariene organismen zijn geen gecertificeerde referentiematerialen (CRM's) beschikbaar. In dat geval wordt het gebruik van een intern referentiemateriaal (IRM), aangeraden. Een ideaal RM heeft dezelfde of een vergelijkbare matrix als de stalen en bovendien concentratieniveaus die in dezelfde grootteorde liggen (Howard, 1991). In het geval van visserijproducten kan dus het product zelf, m.a.w. het visvlees of het orgaan, als referentiemateriaal gebruikt worden. Om praktische redenen wordt echter vaak gebruik gemaakt van een visolie (Griepink et al., 1988). Gezien de bijzondere aard van de VOS wordt in eerste instantie aan een visolie gedacht als referentiemateriaal. Het gebruik van weefsel zelf zou onvermijdelijk een conserveringsproces inhouden met, naar alle waarschijnlijkheid, een verlies van de VOS.

Het is te verwachten dat VOS in een visweefsel zich in de buurt van de lipiden (membraanlipiden in filet, reservelipiden in leverweefsel) zullen bevinden. Daardoor zal de purgeerefficiëntie (d.i. de mate waarin de VOS vrijkomen uit het weefsel door purgeren) in grote mate afhangen van de transfersnelheid tussen lipidefase enerzijds en water- en gasfase anderzijds. Redelijkerwijs werd ervan uitgegaan dat VOS in visweefsel en in visolie zich gelijkaardig gedragen. Omdat VOS-gehalten per gram visolie 100 maal hoger kunnen zijn dan per gram visweefsel, moet rekening gehouden worden met het volume visolie dat in het purgeerflesje wordt gebracht, en dus ook met het dopeerniveau. Met de huidige opstelling kan ongeveer 15 gram visweefsel ingebracht worden. Het toedienen van een hoeveelheid in de orde van 0,1 gram visolie leek daarom aangewezen. De ruwe visolie bleek aanzienlijke gehalten aan MAK's, zoals benzeen en toluen, te bevatten. Daarom werd de visolie eerst off-line gepurgeerd onder verhoogde temperatuur. In de eerste proeven werd de olie gedopeerd met een niveau

aan VOS zodat de respons in het midden van de ijklijn zou uitkomen bij een staalinbreng van 0,1 gram, op voorwaarde dat de recovery 100% bedraagt.

De fase van de staalinbreng en het toevoegen van de IS bleek in het begin problematisch. Zo werd eerst getracht om een olie-in-water-emulsie te bereiden met behulp van emulgatoren en verdikkingsmiddelen (zoals lecithine en arabische gom). Deze aanpak werd verlaten omdat de respons van de IS zeer weinig herhaalbaar kon worden gemaakt. Ook werden verschillende dopeerniveaus, staalinbrengniveaus (0,1 tot 1,5 gram) en watervolumes (20 en 35 ml) uitgeprobeerd. Een staalinbreng van 0,1 gram bleek de beste herhaalbaarheid op te leveren. Een watervolume van 20 ml werd verkozen omdat zo de visolie, die aan het wateroppervlak blijft, het beste contact heeft met de warmtebron tijdens de purgeerfase (70°C).

De beste herhaalbaarheid van de resultaten werden bekomen door het inbrengen van de IS vlak voor de purgeerfase, tussen de oliedruppels in, zodat het trifluortolueen praktisch niet wordt opgenomen door de visolie en kwantitatief wordt gepurgeerd. Het doorprikken van het septum gebeurt ook op dit moment.

Verder bleek dat tijdens de detectie van de IS ionmassa 96 in de MS werd gevormd door een verbinding uit de visolie die bijna gelijktijdig elueert. Deze ionmassa werd normaal ook gebruikt voor de kwantificering, samen met ionmassa 127 en 146. Door enkel gebruik te maken van deze laatste twee massa's werd een grote winst aan precisie van de meetresultaten bekomen.

Tabellen 5.8 en 5.9 tonen de recoveries (terugvindingsrendementen) en de precisie van de metingen in visolie 1 met een doperingsniveau van 260 ng/gram visolie.

De recoveries werden berekend via het intercept en de helling van de ijkcurven, voor elke VOS-verbinding. De recovery was algemeen hoger bij de MAK's dan bij de CK's, te wijten aan het verschil in vluchtigheid. De recovery varieerde tussen 53% (trichlooretheen) en 107% (benzeen). Alle recoveries waren beduidend lager dan 100%, met uitzondering van benzeen. Na berekening van de reproduceerbaarheid bleek enkel benzeen voor 100% teruggevonden. Tabel 5.10 toont de resultaten volgens Roose en Brinkman (1998) waarin een visstaal werd gedopeerd met ongeveer 10 ng VOS (het doperingsniveau voor visolie 1 is 26 ng). De recoveries waren daar dikwijls lager dan bij visolie 1, met uitzondering van 1,2-dichloorethaan, chloroform, trichlooretheen en toluen.



Tabel 5.8. Herhaalbaarheid (n = 5) van VOS-analyse: gemiddelden, recoveries (terugvindingsrendementen), standaardafwijkingen op de recoveries en variatiecoëfficiënten (VC) van gedopeerde visolie 1.

VOS	Gemiddelde (ng/g)	Recovery (%)	Standaard- afwijking (%)	VC (%)
1,2-Dichloorethaan	230	87 <sup>a</sup>	4,8	5,5
1,1,1-Trichloorethaan	209	80 <sup>a</sup>	3,0	3,7
Chloroform	241	91 <sup>a</sup>	2,3	2,5
Tetrachloormethaan	218	83 <sup>a</sup>	1,8	2,2
Trichlooretheen	140	53 <sup>a</sup>	1,8	3,3
Tetrachlooretheen	236	90 <sup>a</sup>	2,2	2,5
Benzeen	283	107 <sup>b</sup>	1,6	1,5
Tolueen	229	87 <sup>a</sup>	1,1	1,2
Ethylbenzeen	249	95 <sup>a</sup>	1,9	2,0
m- en p-Xyleen	468	89 <sup>a</sup>	3,1	3,5
o-Xyleen	234	90 <sup>a</sup>	3,3	3,7

a: significant lager dan 100%, b: significant hoger dan 100%

De herhaalbaarheid werd verkregen door 5 metingen op dezelfde dag uit te voeren en varieert tussen 1,2% VC (tolueen) en 5,5% (1,2-dichloorethaan). De herhaalbaarheid is zeer vergelijkbaar met die van de lage standaard (tabel 5.6). Voor 1,2-dichloorethaan, chloroform, tetrachloormethaan, tetrachlooretheen, benzeen, m- en p-xyleen en o-xyleen werden zelfs lagere variatiecoëfficiënten verkregen in visolie 1.

De reproduceerbaarheid werd verkregen met 4 of 5 metingen op 6 verschillende dagen, in een periode van 22 dagen. De gemiddelden van elke dag werden gebruikt om het eindgemiddelde en de VC te berekenen. De VC schommelde tussen 1,2% (ethylbenzeen) en 8,1% (1,1,1-trichloorethaan). Voor trichlooretheen, ethylbenzeen, m- en p-xyleen en o-xyleen was de reproduceerbaarheid beter (lagere VC) dan de herhaalbaarheid. Dit wijst op variaties van de respons van deze verbindingen gedurende de dag, die groter zijn dan de variaties op de gemiddelden van de 6 beschouwde dagen. De respons van deze VOS is dus minder stabiel gedurende de dag, zodat een enkele meting niet voldoende is om het VOS-gehalte met voldoende precisie te bepalen. Voor andere VOS was de herhaalbaarheid veel beter dan de reproduceerbaarheid. Dit wijst op variaties te wijten aan externe factoren, zoals fluctuerende achtergrondconcentraties, die van dag tot dag wijzigen. Voorbeelden hiervan zijn benzeen, 1,1,1-trichloorethaan, 1,2-dichloorethaan

en chloroform. Deze laatste bleek in de gegeven periode (22 dagen) goed reproduceerbaar (2,5%), maar in andere perioden minder (zie verder).

Tabel 5.9. Reproduceerbaarheid (n = 6) van VOS-analyse: gemiddelden, recoveries (terugvindingsrendementen), standaardafwijkingen op de recoveries en variatiecoëfficiënten (VC) van gedopeerde visolie 1.

VOS	Gemiddelde (ng/g)	Recovery (%)	Standaard- afwijking (%)	VC (%)
1,2-Dichloorethaan	228	86 <sup>a</sup>	6,5	7,6
1,1,1-Trichloorethaan	202	77 <sup>a</sup>	6,3	8,1
Chloroform	237	90 <sup>a</sup>	2,2	2,5
Tetrachloormethaan	214	81 <sup>a</sup>	5,5	6,8
Trichlooretheen	141	54 <sup>a</sup>	0,9	1,8
Tetrachlooretheen	227	86 <sup>a</sup>	2,6	3,0
Benzeen	259	98 <sup>b</sup>	6,6	6,7
Tolueen	224	85 <sup>a</sup>	1,4	1,6
Ethylbenzeen	246	94 <sup>a</sup>	1,1	1,2
m- en p-Xyleen	457	87 <sup>a</sup>	1,8	2,0
o-Xyleen	229	88 <sup>a</sup>	1,8	2,1

a: significant lager dan 100%, b: niet significant verschillend van 100%

Tabel 5.10. Recoveries en variatiecoëfficiënten (n = 5) volgens Roose en Brinkman (1998) na standaardadditie van een visstaal, doperingsniveau ca 10 ng.

VOS	Recovery (%)	VC (%)
1,2-Dichloorethaan	115	25
1,1,1-Trichloorethaan	66	24
Chloroform	95	36
Tetrachloormethaan	70	24
Trichlooretheen	63	17
Tetrachlooretheen	74	11
Benzeen	80	18
Tolueen	115	11
Ethylbenzeen	72	15
m- en p-Xyleen	69	15
o-Xyleen	77	25

Wanneer de precisie van de metingen op visolie 1 vergeleken werden met die gevonden door Roose en Brinkman (1998), dan vallen de hoge variatiecoëfficiënten bij deze laatste op (tabel 5.10). Deze lagen tussen 11 en 36%. Deze hoge waarden zijn vermoedelijk te wijten aan praktische moeilijkheden bij het analyseren van visweefsel (homogeniteit van het staal, verliezen tijdens staalvoorbereiding,...).

Bovenstaande resultaten tonen aan dat het P&T-GC-MS systeem voldoende onder controle kan gehouden worden zodat het mogelijk is een referentiemateriaal voor de analyse van vluchtige organische verbindingen op basis van visolie te ontwikkelen. Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid zijn ruim voldoende voor het opzetten van verdere experimenten om de homogeniteit en stabiliteit van het RM te onderzoeken. Vooraf dienen echter de concentratieniveaus van de afzonderlijke VOS aangepast te worden aan de gemiddelde niveaus die men in visweefselstalen aantreft. Hier dient men ook rekening te houden met de lineariteit van de ijkcurven en de detectielimieten van de respectievelijke VOS.

De recoveries van sommige VOS in visolie zijn vrij laag, maar voldoende hoog om reproduceerbare metingen te verkrijgen. Het verhogen van deze recoveries is waarschijnlijk technisch gezien niet mogelijk, daar verandering van de purgeercondities de rendementen van de andere VOS negatief zal beïnvloeden.

### 5.2.2 Precisie en recovery van analyse van VOS-gedopeerde visolie 2

Op basis van het lineair bereik, de detectiegrenzen en de te verwachten gehalten in de stalen werd een intern referentiemateriaal samengesteld. De te verwachten waarden waren gebaseerd op de gemiddelde metingen volgens Roose en Brinkman (2000) in filet van wijting. De detectiegrenzen ( $CC\beta$ ) voor 1,1,1-trichloorethaan en tetrachloormethaan lagen respectievelijk 6 en 14 hoger dan de te verwachten respons van een staalinbreng die zou overeenkomen met 100 mg visolie. Voor 1,1,1-trichloorethaan werd een doperingsniveau gekozen van een derde van de detectiegrens (1,9 ng). Voor tetrachloormethaan werd een doperingsniveau gekozen van 1,5 maal de detectiegrens (15 ng). De samenstelling van visolie 2 wordt in tabel 4.1 getoond. Tabel 5.11 toont de herhaalbaarheid van de analyse voor 5 herhalingen uit een Certanflesje. De berekening gebeurde aan de hand van het intercept en de helling van de ijkcurven voor de MAK's en chloroform. De berekening van de overige VOS gebeurde met behulp van een responsfactor

verkregen via tweepuntskalibratie. Deze laatste werd opgesteld aan de hand van de blanco en de laagste standaard (10 ng). Deze benadering is vergelijkbaar met die van Roose en Brinkman (2000) en was nodig omdat de meeste ijkcurven afwijken van de oorsprong.

Tabel 5.11. Herhaalbaarheid van VOS-analyse: gemiddelden (ng/g), recoveries, standaardafwijkingen en VC's van gedopeerde visolie 2 uit een Certanflesje (n = 5).

VOS	Gemiddelde (ng/g)	Recovery (%)	Standaard- afwijking (%)	VC (%)
1,2-Dichloorethaan	47	80 <sup>a</sup>	4,9	6,1
1,1,1-Trichloorethaan	17	87 <sup>a</sup>	3,7	4,3
Chloroform	155	82 <sup>a</sup>	4,0	4,9
Tetrachloormethaan	114	79 <sup>a</sup>	8,8	11,1
Trichlooretheen	23	46 <sup>a</sup>	1,8	3,9
Tetrachlooretheen	32	82 <sup>a</sup>	4,0	4,9
Benzeen	144	172 <sup>a</sup>	6,3	3,7
Tolueen	87	92 <sup>a</sup>	3,8	4,1
Ethylbenzeen	273	97 <sup>b</sup>	6,0	6,2
m- en p-Xyleen	319	98 <sup>b</sup>	4,5	4,6
o-Xyleen	141	88 <sup>a</sup>	4,4	5,0

a: significant verschillend van 100%, b: niet significant verschillend van 100%

Enkel de recoveries van ethylbenzeen en m- en p-xyleen waren niet verschillend van 100%. Benzeen gaf een significant hogere recovery, waarschijnlijk toe te schrijven aan een onvoldoende verwijdering van het initieel aanwezige benzeen in de ruwe visolie. Voor het overige waren de recoveries gelijkaardig aan die van visolie 1 (tabellen 5.8 en 5.9).

Variatiecoëfficiënten waren voor alle VOS hoger in visolie 2 dan visolie 1 en varieerden tussen 3,7% (benzeen) en 11,1% (tetrachloormethaan). Dit werd toegeschreven aan de lage doperingsniveaus zodat de onzekerheid op de meting toeneemt.

### 5.3 Bewaarproef met gedopeerde visolie als IRM in certanflesjes

Bewaarproeven werden uitgevoerd om na te gaan in welke mate de omstandigheden waaronder een intern referentiemateriaal (IRM) wordt bewaard, verbeterd kunnen worden.

De stabiliteit en de integriteit van het IRM wordt bestudeerd door op verschillende tijdstippen een aantal RM-stalen die onder verschillende temperatuurcondities bewaard werden, te analyseren.

Tabel 5.12 toont de gemiddelde recoveries van alle 88 metingen. Tabellen 5.13 en 5.14 tonen de recoveries uitgemiddeld als functie van de bewaarduur respectievelijk bewaaromstandigheden. Recoveries waren steeds beduidend hoger dan 100% in de eerste 10 weken. Enkel voor tetrachloormethaan, tetrachlooretheen, ethylbenzeen, m- en p-xyleen en o-xyleen werd een beduidende stijging waargenomen na 10 weken. Andere VOS-gehalten bleven onveranderd. Na 18 weken bleek er een significante daling opgetreden voor alle VOS met uitzondering van ethylbenzeen. Tussen 18 en 44 weken waren de gehalten echter niet veranderd (tabel 5.13), met uitzondering van trichlooretheen (daling), benzeen (stijging) en ethylbenzeen (stijging). Er werd besloten dat de hogere waarden tijdens de eerste 10 weken dienen toegeschreven te worden aan een systematische afwijking van de meting. Er werd geen echte verklaring gevonden voor deze systematische afwijking. Mogelijk was er een verontreiniging van de purgeerleidingen opgetreden, die in de tweede periode van de proef opgeheven werd.

Tabel A.2 in bijlage toont de gemiddelde recoveries en hun precisie voor de metingen op 18 en 44 weken. De recoveries van 1,2-dichloorethaan, 1,1,1-trichloorethaan en chloroform waren niet beduidend verschillend van 100%. Initiële gehalten aan benzeen en ethylbenzeen waren waarschijnlijk nog gedeeltelijk afkomstig uit de ruwe visolie. De andere VOS vertoonden lagere recoveries dan 100%, met trichlooretheen als laagste (82%).

Uit tabel 5.14 blijkt dat er voor geen enkele VOS een beduidend verschil is tussen bewaren in de koelkast, diepvries en ULT.

Bij kamertemperatuur werden beduidende dalingen gevonden voor 1,1,1-trichloorethaan, chloroform, tetrachloormethaan, trichlooretheen en toluen. Verliezen aan VOS tijdens de bewaring zijn te wijten aan een migratie door het glas en/of absorptie door de liner van het Certanflesje. Benzeen kende een duidelijke toename tijdens de bewaring bij kamertemperatuur. Deze toename zou door migratie van buitenuit het flesje kunnen verklaard worden.

Tabel 5.12. Gemiddelden, standaardafwijkingen en 95%-vertrouwensintervallen van de recovery van VOS in gedopeerde visolie in Certanflesjes, bewaard onder verschillende omstandigheden en gemeten na verschillende perioden (n = 88).

VOS	Recovery (%)	Standaard- afwijking (%)	95% VI ondergrens	95% VI bovengrens
1,2-Dichloorethaan	113	11	110	115
1,1,1-Trichloorethaan	112	13	110	115
Chloroform	112	11	110	115
Tetrachloormethaan	103	12	100	105
Trichlooretheen	102	19	98	106
Tetrachlooretheen	104	13	101	106
Benzeen	138	46	128	148
Tolueen	112	19	108	116
Ethylbenzeen	118	11	116	120
m- en p-Xyleen	129	18	125	133
o-Xyleen	119	13	116	122

VI = vertrouwensinterval

Tabel 5.13. Recoveries (%) van VOS in gedopeerde visolie bewaard in Certanflesjes onder verschillende omstandigheden als functie van de bewaarduur.

VOS	Duur (weken)					
	0	2	6	10	18	44
1,2-Dichloorethaan	116 <sup>a</sup>	116 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	120 <sup>a</sup>	97 <sup>b</sup>	110 <sup>a</sup>
1,1,1-Trichloorethaan	116 <sup>ab</sup>	114 <sup>b</sup>	121 <sup>ab</sup>	126 <sup>a</sup>	102 <sup>c</sup>	96 <sup>c</sup>
Chloroform	115 <sup>ab</sup>	118 <sup>a</sup>	114 <sup>ab</sup>	119 <sup>a</sup>	107 <sup>bc</sup>	99 <sup>c</sup>
Tetrachloormethaan	104 <sup>b</sup>	105 <sup>b</sup>	111 <sup>a</sup>	117 <sup>a</sup>	92 <sup>c</sup>	86 <sup>c</sup>
Trichlooretheen	108 <sup>ab</sup>	107 <sup>b</sup>	110 <sup>ab</sup>	118 <sup>a</sup>	91 <sup>c</sup>	73 <sup>d</sup>
Tetrachlooretheen	103 <sup>bc</sup>	104 <sup>bc</sup>	111 <sup>ab</sup>	118 <sup>a</sup>	91 <sup>d</sup>	95 <sup>cd</sup>
Benzeen	130 <sup>b</sup>	132 <sup>ab</sup>	140 <sup>ab</sup>	141 <sup>ab</sup>	116 <sup>b</sup>	174 <sup>a</sup>
Tolueen	122 <sup>b</sup>	108 <sup>ac</sup>	128 <sup>a</sup>	124 <sup>ab</sup>	98 <sup>cd</sup>	90 <sup>d</sup>
Ethylbenzeen	113 <sup>d</sup>	119 <sup>c</sup>	129 <sup>b</sup>	135 <sup>a</sup>	107 <sup>d</sup>	109 <sup>e</sup>
m- en p-Xyleen	127 <sup>b</sup>	130 <sup>b</sup>	146 <sup>a</sup>	151 <sup>a</sup>	116 <sup>c</sup>	107 <sup>c</sup>
o-Xyleen	115 <sup>b</sup>	117 <sup>b</sup>	130 <sup>a</sup>	135 <sup>a</sup>	110 <sup>b</sup>	109 <sup>b</sup>

Superscripts a, b, c, d,... geven groepen van niet-significantie weer. Gemiddelden met een gemeenschappelijke superscript zijn niet significant verschillend van elkaar.

Tabel 5.14. Recoveries (%) van VOS in gedopeerde visolie bewaard in Certanflesjes als functie van de bewaaromstandigheden.

VOS	Dag 0	Kamer	Koelkast	Diepvries	ULT (-80°C)
1,2-Dichloorethaan	116 <sup>a</sup>	110 <sup>a</sup>	109 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	112 <sup>a</sup>
1,1,1-Trichloorethaan	116 <sup>a</sup>	105 <sup>b</sup>	109 <sup>ab</sup>	116 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>
Chloroform	115 <sup>a</sup>	106 <sup>b</sup>	117 <sup>a</sup>	111 <sup>ab</sup>	110 <sup>ab</sup>
Tetrachloormethaan	104 <sup>a</sup>	93 <sup>b</sup>	102 <sup>a</sup>	106 <sup>a</sup>	106 <sup>a</sup>
Trichlooretheen	108 <sup>a</sup>	82 <sup>c</sup>	100 <sup>b</sup>	107 <sup>ab</sup>	106 <sup>ab</sup>
Tetrachlooretheen	103 <sup>a</sup>	102 <sup>a</sup>	101 <sup>a</sup>	106 <sup>a</sup>	105 <sup>a</sup>
Benzeen	130 <sup>b</sup>	195 <sup>a</sup>	126 <sup>b</sup>	125 <sup>b</sup>	125 <sup>b</sup>
Tolueen	122 <sup>a</sup>	97 <sup>c</sup>	109 <sup>bc</sup>	112 <sup>ab</sup>	116 <sup>ab</sup>
Ethylbenzeen	113 <sup>b</sup>	114 <sup>b</sup>	120 <sup>a</sup>	121 <sup>a</sup>	120 <sup>a</sup>
m- en p-Xyleen	127 <sup>ab</sup>	124 <sup>b</sup>	132 <sup>ab</sup>	126 <sup>ab</sup>	135 <sup>a</sup>
o-Xyleen	115 <sup>bc</sup>	112 <sup>c</sup>	122 <sup>ab</sup>	117 <sup>abc</sup>	125 <sup>a</sup>

Superscripts a, b, c, d,... geven groepen van niet-significantie weer. Gemiddelden met een gemeenschappelijke superscript zijn niet significant verschillend van elkaar.

Er werd besloten dat een VOS-gedopeerde visolie als IRM minstens 44 weken bewaard kan worden in Certanflesjes in gekoelde of diepgevroren omstandigheden.

#### 5.4 Bewaarproef met gedopeerde visolie als IRM in ampullen

Ampullen nr 11, 81 en 141 werden gemeten ter controle van de homogeniteit van de batch (tabel 5.15). Recoveries van 1,1,1-trichloorethaan, tetrachlooretheen, benzeen, ethylbenzeen, m- en p-xyleen en o-xyleen (nauwelijks) waren niet beduidend verschillend van 100%. De laagste recovery werd voor trichlooretheen gevonden.

Standaardafwijkingen op de recoveries gingen van 3,7% (ethylbenzeen) tot 42% (1,1,1-trichloorethaan). Met uitzondering van deze laatste, kon voor geen enkele VOS een beduidend verschil ( $p < 0,05$ ) tussen de drie ampullen aangetoond worden (tabel 5.16). Er mag besloten worden dat alle ampullen dezelfde samenstelling hebben.

Na 35 weken werd ampul 99 geanalyseerd. 1,2-dichloorethaan en chloroform waren beduidend hoger dan in de andere 3 ampullen. Voor de eerste kon geen verklaring gevonden worden. Zoals reeds vermeld wordt chloroform gebruikt tijdens de extractie van PCB's en kan contaminatie via de lucht, en dus verstoring van de analyse moeilijk vermeden worden. Vergelijkbare metingen werden gevonden voor het Certanflesje en de 500 ml

Hamilton syringe waarin visolie 4 werd bewaard (37 weken). Chloroform gaf hier zelfs nog hogere waarden te zien. Benzeen bleek in het Certanflesje en in de Hamilton syringe ook toegenomen te zijn. Mogelijk ligt eenzelfde oorzaak als chloroform, namelijk atmosferische contaminatie via de buitenlucht (aanwezig in uitlaatgassen van auto's), aan de basis hiervan. Voor de stijging van tetrachloormethaan en trichlooretheen in de Hamilton syringe kon geen directe verklaring gegeven worden. Mogelijk migreren deze VOS door de kunststoffen wand en/of de rubber afdichtingen van de syringe.

Op basis van deze resultaten kon geen effect van het afvullen van de visolie in ampullen op de recovery en de homogeniteit van de batch stalen voor de VOS analyse aangetoond worden.

Na vergelijken van de 95%-vertrouwensintervallen van de recoveries van de bewaarproef in ampullen en van de bewaarproef met Certanflesjes, enkel de periode 18 – 44 weken beschouwend, werd opgemerkt dat de beide proeven resulteerden in niet-significant verschillende recoveries voor 1,1,1-trichloorethaan, tetrachlooretheen, toluen en ethylbenzeen (tabellen 5.15 en A.2, respectievelijk). De recoveries van de andere VOS waren beduidend lager in de ampullen. Dit zou er op kunnen wijzen dat er enig verlies opgetreden was tijdens het transport naar het IRMM en/of het afvulproces in ampullen aldaar. De grootste "verliezen" werden waargenomen voor tetrachloormethaan en trichlooretheen. Dit zijn ook de VOS met voor alle proeven de laagste recoveries.



Tabel 5.15. Gemiddelden, standaardafwijkingen, 95%-vertrouwensintervallen van recoveries van VOS in gedopeerde visolie als IRM bewaard in ampullen 11, 81 en 141 (n = 14).

VOS	Gemiddelde (%)	Standaard- afwijking (%)	95% VI ondergrens	95% VI bovengrens
1,2-Dichloorethaan	87	8,7	82	92
1,1,1-Trichloorethaan	77	42,5	52	101
Chloroform	87	6,0	83	90
Tetrachloormethaan	69	7,9	64	73
Trichlooretheen	48	7,8	44	53
Tetrachlooretheen	92	7,5	88	97
Benzeen	100	5,2	97	103
Tolueen	89	10,2	83	95
Ethylbenzeen	98	3,7	96	100
m- en p-Xyleen	100	6,0	96	103
o-Xyleen	96	5,1	93	99

VI = vertrouwensinterval

Tabel 5.16. Recoveries (%) van VOS in gedopeerde visolie als IRM bewaard in ampullen, Certanflesje of 500 ml Hamilton syringe als intern referentiemateriaal.

VOS	ampul				Certan	Hamilton
	N° 11	N° 81	N° 141	N° 99		
1,2-Dichloorethaan	85 <sup>b</sup>	89 <sup>ab</sup>	87 <sup>b</sup>	109 <sup>a</sup>	100 <sup>ab</sup>	100 <sup>ab</sup>
1,1,1-Trichloorethaan	43 <sup>b</sup>	91 <sup>ab</sup>	114 <sup>a</sup>	83 <sup>ab</sup>	83 <sup>ab</sup>	96 <sup>a</sup>
Chloroform	86 <sup>d</sup>	85 <sup>d</sup>	89 <sup>d</sup>	150 <sup>c</sup>	194 <sup>b</sup>	281 <sup>a</sup>
Tetrachloormethaan	67 <sup>b</sup>	75 <sup>ab</sup>	66 <sup>b</sup>	76 <sup>ab</sup>	70 <sup>b</sup>	89 <sup>a</sup>
Trichlooretheen	46 <sup>b</sup>	47 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>	44 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>	76 <sup>a</sup>
Tetrachlooretheen	95 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>
Benzeen	97 <sup>c</sup>	101 <sup>c</sup>	104 <sup>c</sup>	98 <sup>c</sup>	176 <sup>b</sup>	337 <sup>a</sup>
Tolueen	86 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>
Ethylbenzeen	99 <sup>b</sup>	95 <sup>b</sup>	100 <sup>ab</sup>	100 <sup>ab</sup>	112 <sup>a</sup>	102 <sup>ab</sup>
m- en p-Xyleen	100 <sup>ab</sup>	96 <sup>b</sup>	105 <sup>ab</sup>	104 <sup>ab</sup>	106 <sup>ab</sup>	108 <sup>a</sup>
o-Xyleen	94 <sup>c</sup>	95 <sup>c</sup>	100 <sup>bc</sup>	109 <sup>ab</sup>	105 <sup>abc</sup>	112 <sup>a</sup>

Superscripts a, b, c, d,... geven groepen van niet-significantie weer. Gemiddelden met een gemeenschappelijke superscript zijn niet significant verschillend van elkaar.

## 5.5 Bewaarproeven met gedopeerde visolie in semi-permeabele membranen

Bewaarproeven werden uitgevoerd om na te gaan in welke mate de omstandigheden waaronder stalen worden genomen en bewaard, verbeterd kunnen worden. Tijdens de bewaring van stalen moeten zowel contaminatie als verliezen aan VOS beperkt worden. Verschillende bewaarcondities (verpakkingswijze, tijd en temperatuur) werden uitgetest. Een semi-permeabel membraan (SPMD) gevuld met gedopeerde visolie diende als model voor het weefsel van het mariene organisme (vis) dat bewaard werd.

### 5.5.1 Bewaarproef 1

De SPMD's werden in aluminiumfolie gewikkeld en respectievelijk bewaard bij kamertemperatuur, in de koelkast en de diepvries (tabel 5.17). Na drie weken bij kamertemperatuur bleken 1,2-dichloorethaan en trichlooretheen volledig verdwenen te zijn. De hoogste recovery bedroeg 18% voor toluen. Na 11 weken koude bewaring bleken 1,2-dichloorethaan en trichlooretheen nauwelijks nog aantoonbaar. Bovendien was de piek van benzeen verstoord door een verbinding die uit de lucht door het SPMD werd opgenomen, zodat de meting van benzeen onbetrouwbaar werd.

Tabel 5.17. Recoveries (%) van VOS in gedopeerde visolie 2 in SPMD, verpakt in aluminiumfolie en bewaard onder verschillende omstandigheden.

Duur (weken):	Hamilton	Diepvries	Diepvries	Diepvries	Koelkast	Kamer
	0	11	23	29	11	3
1,2-Dichloorethaan	80 <sup>b</sup>	85 <sup>ab</sup>	88 <sup>ab</sup>	91 <sup>a</sup>	2 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
1,1,1-Trichloorethaan	87 <sup>b</sup>	75 <sup>c</sup>	47 <sup>d</sup>	117 <sup>a</sup>	32 <sup>e</sup>	14 <sup>f</sup>
Chloroform	82 <sup>bc</sup>	82 <sup>bc</sup>	71 <sup>c</sup>	89 <sup>b</sup>	121 <sup>a</sup>	9 <sup>d</sup>
Tetrachloormethaan	79 <sup>c</sup>	36 <sup>d</sup>	226 <sup>a</sup>	219 <sup>a</sup>	119 <sup>b</sup>	5 <sup>e</sup>
Trichlooretheen	46 <sup>c</sup>	56 <sup>b</sup>	67 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	4 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>
Tetrachlooretheen	82 <sup>c</sup>	81 <sup>c</sup>	120 <sup>b</sup>	147 <sup>a</sup>	51 <sup>d</sup>	15 <sup>e</sup>
Benzeen	172 <sup>b</sup>	176 <sup>b</sup>	192 <sup>b</sup>	199 <sup>b</sup>	3700 <sup>*a</sup>	11 <sup>b</sup>
Toluene	92 <sup>d</sup>	120 <sup>c</sup>	140 <sup>b</sup>	169 <sup>a</sup>	43 <sup>e</sup>	18 <sup>f</sup>
Ethylbenzeen	101 <sup>c</sup>	95 <sup>c</sup>	110 <sup>b</sup>	121 <sup>a</sup>	18 <sup>d</sup>	7 <sup>e</sup>
m- en p-Xyleen	107 <sup>b</sup>	104 <sup>b</sup>	115 <sup>a</sup>	118 <sup>a</sup>	26 <sup>c</sup>	11 <sup>d</sup>
o-Xyleen	92 <sup>bc</sup>	91 <sup>c</sup>	98 <sup>b</sup>	107 <sup>a</sup>	31 <sup>d</sup>	15 <sup>e</sup>

Superscripts a, b, c, d,... geven groepen van niet-significantie weer. Gemiddelden met een gemeenschappelijke superscript zijn niet significant verschillend van elkaar.

\* geen benzeen

Chloroform en tetrachloormethaan bleken na 11 weken in de koelkast toegenomen, door passieve opname uit de koelkastatmosfeer.

Na 11 weken bij  $-18^{\circ}\text{C}$  werd er een daling van tetrachloormethaan en een stijging van toluen vastgesteld. De andere VOS-gehalten bleven onveranderd. Na 23 weken trad er een daling op van 1,1,1-trichloorethaan. De gehalten aan tetrachloormethaan, tetrachlooretheen, toluen, ethylbenzeen en m- en p-xyleen waren toegenomen na 23 weken in de diepvries. Na 29 weken bleken de stijgingen van tetrachlooretheen, toluen en ethylbenzeen zich door te zetten. Na de daling op 23 weken steeg het gehalte aan 1,1,1-trichloorethaan terug aanzienlijk.

Het is duidelijk dat SPMD's die onvoldoende, niet luchtdicht verpakt werden, onderhevig zijn aan sterke schommelingen, zowel positief als negatief, van de VOS-gehalten tijdens de bewaring, ongeacht de bewaar temperatuur. Er wordt aangenomen dat deze conclusie ook geldig is voor reële visstalen.

#### 5.5.2 Bewaarproef 2

In deze bewaarproef werden de SPMD's verpakt in twee verschillende luchtdichte verpakkingsfilms met behulp van een industrieel vacuümlastoestel, en bewaard bij kamertemperatuur. Met uitzondering van tetrachloormethaan (stijging) en benzeen (daling) konden geen verschillen tussen de visolie in de Hamilton syringe en de 3 weken oude SPMD's verpakt in film 1 aangetoond worden. Er werd besloten dat door de korte duur, het vacuümproces nauwelijks een nadelig effect heeft op de VOS-gehalten in de SPMD's heeft.

Na 6 weken verpakt in film 1 waren 1,2-dichloorethaan, 1,1,1-trichloorethaan, tetrachloormethaan, trichlooretheen en toluen ook licht gestegen. In de SPMD's verpakt in film 2 bleken na 3 weken 1,1,1-trichloorethaan, tetrachloormethaan en benzeen licht te zijn toegenomen. Na 6 weken stegen enkel 1,2-dichloorethaan en benzeen nog verder. Enkel chloroform, tetrachlooretheen, ethylbenzeen, m- en p-xyleen, o-xyleen en in zekere mate toluen bleven onveranderd ten opzichte van de oorspronkelijke visolie, in beide types verpakkingsfilm. De stijgingen van de andere VOS-gehalten zou kunnen verklaard worden door migratie vanuit de verpakkingsfilms. De omringende atmosfeer werd als andere oorzaak uitgesloten, daar in voorgaande proef er enkel dalingen werden vastgesteld bij bewaring bij kamertemperatuur. Verpakkingsfilm 1 met de ingebouwde aluminiumlaag bleek iets effectiever in het behouden van de oorspronkelijke VOS-gehalten dan de doorzichtige verpakkingsfilm 2. Dit is in overeenstemming met de betere doorlaatbaarheid voor zuurstof en waterdamp van deze laatste.

Tabel 5.18. Recoveries (%) van VOS in gedopeerde visolie 2 in SPMD's, verpakt in twee verschillende verpakkingfilms en bewaard bij kamertemperatuur:

Duur (weken):	Hamilton	Film 1		Film 2	
	0	3	6	3	6
1,2-Dichloorethaan	99 <sup>c</sup>	115 <sup>bc</sup>	148 <sup>a</sup>	101 <sup>c</sup>	137 <sup>ab</sup>
1,1,1-Trichloorethaan	91 <sup>c</sup>	113 <sup>c</sup>	170 <sup>a</sup>	147 <sup>ab</sup>	144 <sup>b</sup>
Chloroform	103 <sup>ab</sup>	101 <sup>b</sup>	112 <sup>ab</sup>	103 <sup>ab</sup>	115 <sup>a</sup>
Tetrachloormethaan	88 <sup>c</sup>	96 <sup>b</sup>	107 <sup>a</sup>	105 <sup>a</sup>	101 <sup>ab</sup>
Trichlooretheen	55 <sup>c</sup>	57 <sup>bc</sup>	69 <sup>a</sup>	61 <sup>bc</sup>	63 <sup>ab</sup>
Tetrachlooretheen	88 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>
Benzeen	375 <sup>c</sup>	349 <sup>d</sup>	354 <sup>d</sup>	439 <sup>b</sup>	522 <sup>a</sup>
Tolueen	90 <sup>bc</sup>	84 <sup>c</sup>	109 <sup>a</sup>	100 <sup>ab</sup>	100 <sup>ab</sup>
Ethylbenzeen	126 <sup>a</sup>	119 <sup>ab</sup>	123 <sup>ab</sup>	116 <sup>b</sup>	124 <sup>ab</sup>
m- en p-Xyleen	123 <sup>a</sup>	123 <sup>a</sup>	127 <sup>a</sup>	121 <sup>a</sup>	126 <sup>a</sup>
o-Xyleen	119 <sup>a</sup>	110 <sup>b</sup>	117 <sup>ab</sup>	113 <sup>ab</sup>	115 <sup>ab</sup>

Superscripts a, b, c, d,... geven groepen van niet-significantie weer. Gemiddelden met een gemeenschappelijke superscript zijn niet significant verschillend van elkaar.

### 5.5.3 Bewaarproef 3

Tabel 5.19 geeft een globaal beeld van de recoveries en de spreiding erop. De gemiddelde recoveries werden als functie van de bewaarduur (tabel 5.20) en van de bewaaromstandigheden (tabel 5.21) uitgezet.

Recoveries waren steeds beduidend hoger dan 100% in de eerste 12 weken (tabel 5.20). Enkel voor tolueen (stijging), ethylbenzeen, m- en p-xyleen en o-xyleen (dalingen) werden kleine verschillen tegenover dag 0 opgetekend gedurende deze periode.

Met uitzondering van ethylbenzeen en o-xyleen (lichte stijgingen!), konden geen verschillen tussen week 22 en 48 waargenomen worden. Daarom werd zoals in de bewaarproef met Certanflesjes besloten dat de metingen verstoord door een systematische afwijking in de eerst 12 weken van het experiment. Dit verklaart ook de relatief hoge standaardafwijkingen wanneer alle metingen worden beschouwd (tabel 5.19).

Voor de periode tussen 22 en 48 weken waren de gemiddelde recoveries voor 1,2-dichloorethaan, 1,1,1-trichloorethaan, chloroform en m- en p-xyleen niet significant verschillend van 100%. De laagste recovery bedroeg 64%

voor trichlooretheen, de hoogste 149% voor benzeen. Andere recoveries waren lager dan 100% (tabel A.3 in bijlage)

Voor de recoveries van 1,2-dichloorethaan, 1,1,1-trichloorethaan, trichlooretheen, tetrachlooretheen en toluen konden nauwelijks of geen beduidende verschillen tussen dag 0 en de SPMD's bewaard in de koelkast, diepvries en ULT gevonden worden (tabel 5.21). Voor de recoveries van de andere VOS konden ook geen verschillen tussen de deze bewaarmethoden gevonden worden.

Tabel 5.19. Gemiddelden, standaardafwijkingen en 95%-vertrouwensintervallen van recoveries van VOS in gedopeerde visolie 3 in SPMD, bewaard onder verschillende omstandigheden in bewaarproef 3 en gemeten na verschillende perioden (n = 122).

VOS	Gemiddelde (%)	Standaardafwijking (%)	95% VI ondergrens	95% VI bovengrens
1,2-Dichloorethaan	112	14	110	115
1,1,1-Trichloorethaan	123	64	111	134
Chloroform	114	18	111	117
Tetrachloormethaan	103	23	98	107
Trichlooretheen	80	17	77	83
Tetrachlooretheen	109	55	99	119
Benzeen	177	23	173	181
Tolueen	118	28	113	123
Ethylbenzeen	124	15	121	127
m- en p-Xyleen	142	30	137	148
o-Xyleen	131	24	127	136

VI = vertrouwensinterval

De bewaring bij kamertemperatuur gaf voor alle VOS, met uitzondering van 1,1,1-trichloorethaan, tetrachlooretheen en toluen significant lagere recoveries dan dag 0 en de andere bewaarmethoden.

Er kon daarom besloten worden dat na 11 maanden voor praktisch geen enkele VOS beduidende verschillen gevonden werden tussen de gekoelde of diepgevroren SPMD's. Er werd besloten dat VOS niet verdwijnen in SPMD's verpakt in film en bewaard bij temperaturen niet hoger dan 4°C.

Hermetisch opsluiten in een polyethyleen potje met schroefdeksel bleek een evenwaardig alternatief voor de verpakkingsfilms. Daar aangenomen wordt dat reële visstalen zich op vergelijkbare manier als de SPMD-modellen

gedragen wat betreft VOS-vrijstelling en -opname, werd besloten dat de beste en eenvoudigste bewaarmethode bestaat uit een luchtdichte container, met zo weinig mogelijk vrije ruimte rond het staal, bewaard bij lage temperatuur, bij voorkeur diepgevroren, om de staalintegriteit te verzekeren tot aan de VOS-analyse.

Tabel 5.20. Recoveries (%) van VOS in gedopeerde visolie 3 in SPMD bewaard onder verschillende omstandigheden als functie van de bewaarduur.

VOS	Duur (weken)						
	0	2	4	8	12	22	48
1,2-Dichloorethaan	118 <sup>a</sup>	113 <sup>a</sup>	123 <sup>a</sup>	114 <sup>a</sup>	120 <sup>a</sup>	101 <sup>b</sup>	97 <sup>b</sup>
1,1,1-Trichloorethaan	168 <sup>a</sup>	128 <sup>ab</sup>	143 <sup>ab</sup>	119 <sup>ab</sup>	118 <sup>ab</sup>	85 <sup>b</sup>	102 <sup>b</sup>
Chloroform	130 <sup>a</sup>	117 <sup>a</sup>	116 <sup>a</sup>	123 <sup>a</sup>	118 <sup>a</sup>	98 <sup>b</sup>	101 <sup>b</sup>
Tetrachloormethaan	121 <sup>a</sup>	107 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	111 <sup>a</sup>	108 <sup>a</sup>	77 <sup>b</sup>	84 <sup>b</sup>
Trichlooretheen	88 <sup>ab</sup>	77 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	84 <sup>ab</sup>	88 <sup>ab</sup>	65 <sup>cd</sup>	64 <sup>d</sup>
Tetrachlooretheen	132 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	129 <sup>a</sup>	108 <sup>a</sup>	109 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
Benzeen	194 <sup>a</sup>	179 <sup>ab</sup>	189 <sup>ab</sup>	193 <sup>a</sup>	190 <sup>a</sup>	145 <sup>c</sup>	153 <sup>c</sup>
Tolueen	109 <sup>bcd</sup>	112 <sup>bc</sup>	122 <sup>b</sup>	150 <sup>a</sup>	146 <sup>a</sup>	97 <sup>cd</sup>	91 <sup>d</sup>
Ethylbenzeen	144 <sup>a</sup>	123 <sup>c</sup>	125 <sup>c</sup>	130 <sup>bc</sup>	133 <sup>b</sup>	100 <sup>e</sup>	114 <sup>d</sup>
m- en p-Xyleen	179 <sup>a</sup>	163 <sup>b</sup>	142 <sup>c</sup>	151 <sup>bc</sup>	156 <sup>b</sup>	98 <sup>d</sup>	111 <sup>d</sup>
o-Xyleen	170 <sup>a</sup>	137 <sup>bc</sup>	125 <sup>cd</sup>	135 <sup>bc</sup>	143 <sup>b</sup>	98 <sup>e</sup>	116 <sup>d</sup>

Superscripts a, b, c, d,... geven groepen van niet-significantie weer. Gemiddelden met een gemeenschappelijke superscript zijn niet significant verschillend van elkaar.

Daar de VOS zich associëren met de weefsellipiden en er zeer waarschijnlijk als het ware op gebonden zijn, dienen geen bijkomende maatregelen genomen worden tussen de vangst van het staal, en het inpakken ervan. De tijd hiertussen dient evenwel zo kort mogelijk gehouden te worden om vrijstelling en/of opname van VOS door het staal toch te vermijden. Bijkomende proeven aan boord van een schip zouden dit waarschijnlijk bevestigen.

Tabel 5.21. Recoveries (%) van VOS in gedopeerde visolie 3 in SPMD als functie van de bewaaromstandigheden.

VOS	Dag 0	kamer	koelkast	diepvries	Diepvries potje	ULT (-80°C)
1,2-Dichloorethaan	118 <sup>a</sup>	102 <sup>b</sup>	113 <sup>a</sup>	111 <sup>ab</sup>	114 <sup>a</sup>	116 <sup>a</sup>
1,1,1-Trichloorethaan	168 <sup>a</sup>	124 <sup>a</sup>	109 <sup>a</sup>	122 <sup>a</sup>	108 <sup>a</sup>	112 <sup>a</sup>
Chloroform	130 <sup>a</sup>	98 <sup>c</sup>	112 <sup>b</sup>	113 <sup>b</sup>	123 <sup>ab</sup>	116 <sup>b</sup>
Tetrachloormethaan	121 <sup>a</sup>	96 <sup>b</sup>	96 <sup>b</sup>	103 <sup>ab</sup>	101 <sup>b</sup>	103 <sup>ab</sup>
Trichlooretheen	88 <sup>a</sup>	66 <sup>b</sup>	79 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>	78 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>
Tetrachlooretheen	132 <sup>a</sup>	112 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	111 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	105 <sup>a</sup>
Benzeen	194 <sup>a</sup>	155 <sup>c</sup>	174 <sup>b</sup>	175 <sup>b</sup>	175 <sup>b</sup>	191 <sup>a</sup>
Tolueen	109 <sup>b</sup>	110 <sup>b</sup>	134 <sup>a</sup>	118 <sup>ab</sup>	110 <sup>b</sup>	122 <sup>ab</sup>
Ethylbenzeen	144 <sup>a</sup>	118 <sup>c</sup>	121 <sup>bc</sup>	121 <sup>bc</sup>	118 <sup>c</sup>	125 <sup>b</sup>
m- en p-Xyleen	179 <sup>a</sup>	128 <sup>c</sup>	148 <sup>b</sup>	131 <sup>c</sup>	129 <sup>c</sup>	146 <sup>b</sup>
o-Xyleen	170 <sup>a</sup>	124 <sup>b</sup>	125 <sup>b</sup>	124 <sup>b</sup>	122 <sup>b</sup>	130 <sup>b</sup>

Superscripts a, b, c, d,... geven groepen van niet-significantie weer. Gemiddelden met een gemeenschappelijke superscript zijn niet significant verschillend van elkaar.

## 6 BESLUITEN

De analytische techniek gebaseerd op P&T-GC-MS werd tijdens het project voldoende performant gemaakt voor de analyse van VOS in gedopeerde visolie. De verkregen herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid waren lager dan 15% voor de 12 geselecteerde verbindingen bij hoge doperingsniveaus en waren daarom aanvaardbaar. Bij lage doperingsniveaus (lager dan 100 ng/g visolie) kunnen er echter problemen ontstaan bij de precisie van de metingen van 1,1,1-trichloorethaan, trichlooretheen en benzeen.

De gemiddelde recoveries van 10 van de 12 VOS waren steeds boven de 85% en daarom bevredigend te noemen. Enkel trichlooretheen en tetrachloormethaan scoorden systematisch lager.

De lage waarden aan tetrachloormethaan die in reële visstalen aangetroffen worden, liggen ver onder de werkelijke detectielimiet. Dopering van tetrachloormethaan bij zulke lage gehalten werd in dit project niet onderzocht, maar zou zeker problemen opgeleverd hebben op gebied van recovery en precisie.

Verder onderzoek zal zich dus moeten richten op betere recoveries en lagere detectielimieten voor tetrachloormethaan en trichlooretheen. Alternatieve analytische technieken zoals SPME (solid-phase microextraction) of "headspace" extractie, gecombineerd met een gevoeliger MS-systeem, zouden moeten uitgetest worden.

De gunstige resultaten die tijdens dit project verkregen werden zijn toe te schrijven aan het respecteren van een aantal basisregels specifiek voor VOS-analyse:

- Het bewaken van de performantie van het P&T-GC-MS-systeem (controle op lekken of verstoppingen, massakalibratie,...)
- Het beperken van contact tussen (standaard)oplossingen en de omgevingslucht
- Het werken met reeksen purgeerflesjes die op quasi hetzelfde tijdstip worden gesloten
- Het doorprikken van het septum vlak voor de start van de purgeerfase
- Het beperken van het volume kopruimte in de recipiënten (flesjes,...)
- Het beperken van het aantal manipulaties (overbrengingen) nodig tussen stockoplossing en de purge&trap-fase
- Het gebruik van microsyringes met stompe naald (90°) voor het hanteren van microvolumes



- Het gebruik van gesilaniseerde Certanflesjes voor de bewaring van standaarden

Onbetrouwbare resultaten werden soms verkregen door achtergrondwaarden van chloroform, en in mindere mate benzeen, die zorgden voor een overschatting van de werkelijke waarde. Deze storende invloeden zouden kunnen uitgesloten worden door het nemen van een aantal maatregelen, zoals:

- Fysieke afscheiding/isolering van de ruimten waarin de staalvoorbereiding en de analyse plaatsvinden;
- Interne luchtrecirculatie in combinatie met actieve koolfilters, om de storende VOS uit de lucht te weren;
- Een sluizensysteem dat zorgt voor beperkte toevoer van gecontamineerde buitenlucht.

Het project heeft verder aangetoond dat een gedopeerde visolie kan gebruikt worden als intern referentiemateriaal met voldoende kleine vertrouwensintervallen. De analyse van dit IRM kan dan dienen om de performantie van de analysecyclus, inclusief staalvoorbereiding, op te volgen. De beperking van een IRM is dat het enkel een signaal geeft wanneer er iets misloopt met de analyse. Het opsporen van de oorzaak dient op een andere manier te gebeuren.

Het onderzoek toonde tevens aan dat het bewaren van het IRM in ampullen voor de duur van een klein jaar zeker evenwaardig is met het bewaren in gesilaniseerde Certanflesjes. Deze ampullen zouden kunnen aangeboden worden aan laboratoria die deelnemen aan ringtesten voor VOS-analyse, via organiserende instanties zoals QUASIMEME. De verkregen meetwaarden zouden dan vergeleken kunnen worden, als eerste stap in een certificatieproces, leidend tot een gecertificeerd referentiemateriaal (CRM).

De bewaarproeven van gedopeerde visolie in semi-permeabele membranen (SPMD's) toonden aan dat gekoelde of diepgevroren bewaaromstandigheden, gecombineerd met een hermetisch afgesloten verpakkingsmiddel, zoals een polyethyleen potje met schroefdeksel, voldoende zijn om de VOS-gehalten in het staal voor minstens een jaar te behouden. Het verpakken van de SPMD's in vacuümverpakkingsfilm is een volwaardig alternatief: het toepassen van een lichte onderdruk tijdens het dichtlassen van de film heeft geen aantoonbaar effect op de VOS-gehalten in de visolie. Kortdurende

manipulaties hebben dus waarschijnlijk een verwaarloosbaar effect op de VOS-gehalten in een SPMD. Daar deze SPMD's model staan voor reële visstalen, wordt er vanuit gegaan dat deze conclusies ook hiervoor gelden. Verder onderzoek aan boord van een schip naar staalname en –bewaring zou deze voorlopige conclusies moeten bevestigen.

## 7 REFERENTIES

Dons, C. en Beck, A.P. Priority hazardous substances in Norway. Norwegian Pollution Control Authority. Report 94:03, p. 114.

FAO - GESAMP (IMO/FAO/Unesco/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution). Review of potentially harmful substances (1990). Choosing priority organochlorines for marine hazard assessment. Food and Agricultural Organisation, Rome, p.10.

Griepink, B., Wells, D.E. en Frias Ferreira, M. (1988). The certification of the contents (mass fraction) of chlorobiphenyls (IUPAC Nos 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) in two fish oils. Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, EUR 11520 EN.

Howard. P.H. (1991). Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Volume 2 (solvents). Chelsea, Michigan: Lewis publishers, Ed. 3 pp 546.

International Standards Organisation. Linear calibration using reference materials. International Standard ISO 11095:1996(E), first edition 1996-02-01.

Klaessens, J.W.A. & van Leeuwen, J.A. (1996). Praktische statistiek voor het laboratorium. Uitgeverij: ten Hagen & Stam bv. ISBN 90-71694-52-6.

Ministerial declaration of the Third International Conference on the Protection of the North Sea, Den Hague, 1990.

Roose, P. (1995a). Chlorinated alkanes in the marine environment. In: Report of the Advisory Committee on the Marine Environment, Annex 4, ICES, Copenhagen, Denmark.

Roose, P. (1995b). Benzene and its C1-C2 alkyl derivates in the marine environment. In: Report of the Advisory Committee on the Marine Environment, Annex 5, ICES, Copenhagen, Denmark.

Roose, P. en Brinkman, U. A. Th. (1998). Determination of volatile organic compounds in marine biota. J. Chromatogr. A 799: 233 - 248.

Roose, P. en Brinkman, U.A.Th. (2000). Volatile organic compounds in various marine organisms from the southern North Sea. Marine Pollution Bulletin, 40, 1167-1177.

Topping, G., Wells, D.E. en Griepink, B. (1992). Quality Assurance of Information in Marine Environmental Monitoring Programmes in Europe (QUASIMEME), Guidelines on Quality Assurance for Marine Measurements, Quasimeme Project Office, Aberdeen.

Van Langenhove, H., Heireman. B., Dewulf. J., Cooreman, K., Roose, P. en Vyncke, W. (1996). Impulse Programme Marine Sciences 1992-1996: Report of project n° 4: Intercompartmental distribution of monocyclic aromatic hydrocarbons and C1-C2 organochlorines in the North Sea environment.

## 8 DANKWOORD

De uitvoerders van het project zijn dank verschuldigd aan Pascale Driesens en Nancy De Saeyer voor hun actieve medewerking tijdens de opstartfase van het project.

Een speciaal woord van dank gaat naar Bruno Devisscher en Nancy Tyberghein voor de praktische uitvoering van het onderzoek.

Verder is dank verschuldigd aan Dr. G. Van Ermen en Dr. R. van Cleuvenbergen van het Vlaams Instituut voor Technologisch Onderzoek (VITO) voor hun praktische tips in verband met het analyseren van VOS in verscheidene matrices.

Dhr. Ysbrand Gjaltema van Danisco Flexible Belgium wordt vriendelijk bedankt voor het gratis leveren van de verpakkingsfilm met ingebouwde aluminiumlaag.

De firma VWR is hartelijk bedankt voor het gratis leveren van kabeljauwleverolie bestemd voor farmaceutische doeleinden.

Last but not least willen wij onze dank uitspreken tegenover Dr. Gerard Kramer en Dr. Uwe.Waetjen van het Instituut voor ReferentieMaterialen en Metingen (IRMM) te Geel voor het afvullen van de gedopeerde visolie in ampullen.

## 9 AFKORTINGEN

BHT: tert-butyl-hydroxytolueen of 2,6-di-tert-butyl-4-methylfenol

CK: gechloreerde koolwaterstoffen

CRM: certified reference material (gecertificeerd referentiemateriaal)

ICES: international Council for the Exploration of the Sea

IRM: intern referentiemateriaal

IRMM: Instituut voor ReferentieMaterialen en Metingen te Geel

IS: inwendige standaard

LOD: limit of detection (detectielimiet)

MAK: monocyclische aromatische koolwaterstoffen

P&T-GC-MS: purge&trap-systeem – gaschromatograaf – massaspectrometer

QA: quality assurance (kwaliteitsborging)

QUASIMEME: QUality ASSurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe

RM: referentiemateriaal

SPMD: semi-permeable membrane device

SPME: solid-phase microextraction

ULT: ultra-lage temperatuur (vriezer)

VC: variatiecoëfficiënt (verhouding van de standaardafwijking tegenover het gemiddelde, als percent uitgedrukt)

VI: vertrouwensinterval, waarin het gemiddelde van een aantal metingen met een zekere waarschijnlijkheid (meestal 95%) aangetroffen wordt.

VOC: volatile organic compound

VOS: vluchtige organische stof(fen)

## 10 BIJLAGEN

Tabel A.1. Reproduceerbaarheid van de absolute piekoppervlakten ( $10^6$ ) van de 50 ng standaard (n = 53).

VOS	Gemiddelde	Standaardafwijking	Variatiecoëfficiënt (%)
1,1,1-trifluortolueen	6,3	1,7	28
Chloroform	23,9	6,2	26
1,2-dichloorethaan	16,3	4,6	28
1,1,1-trichloorethaan	25,8	7,3	28
Tetrachloormethaan	10,0	2,8	27
Benzeen	31,9	8,1	25
Trichlooretheen	19,4	5,3	27
Tolueen	37,9	7,3	19
Tetrachlooretheen	15,3	4,6	30
Ethylbenzeen	29,5	6,3	21
m- en p-Xyleen	42,5	9,3	22
o-Xyleen	24,9	6,6	27

Tabel A.2. Gemiddelden, standaardafwijkingen en 95%-vertrouwensintervallen van de VOS-recoveries van in gedopeerde visolie 3 in Certanflesjes, bewaard onder verschillende omstandigheden en gemeten na 18 en 44 weken (n = 28).

VOS	Recovery (%)	Standaard- afwijking (%)	95% VI ondergrens	95% VI bovengrens
1,2-Dichloorethaan	104	14,2	98	109
1,1,1-Trichloorethaan	99	9,1	96	103
Chloroform	103	13,7	98	109
Tetrachloormethaan	89	9,5	85	93
Trichlooretheen	82	19,0	75	90
Tetrachlooretheen	93	6,6	90	95
Benzeen	145	81,3	113	177
Tolueen	94	10,1	90	98
Ethylbenzeen	108	5,0	106	110
m- en p-Xyleen	112	16,1	105	118
o-Xyleen	110	15,2	104	115

VI = vertrouwensinterval

Tabel A.3. Gemiddelden, standaardafwijkingen en 95%-vertrouwensintervallen van VOS-recoveries in gedopeerde visolie 3 in SPMD, bewaard onder verschillende omstandigheden in bewaarproef 3 en gemeten na 22 en 48 weken (n = 36).

VOS	Recovery (%)	Standaard- afwijking (%)	95% VI ondergrens	95% VI bovengrens
1,2-Dichloorethaan	99	14,5	94	104
1,1,1-Trichloorethaan	94	19,6	87	100
Chloroform	99	15,0	94	104
Tetrachloormethaan	80	7,0	78	83
Trichlooretheen	64	10,1	61	68
Tetrachlooretheen	95	8,7	93	98
Benzeen	149	14,0	144	154
Tolueen	94	7,4	92	97
Ethylbenzeen	107	8,3	104	110
m- en p-Xyleen	104	11,6	100	108
o-Xyleen	107	11,6	103	111

VI = vertrouwensinterval







FEDERAAL  
WETENSCHAPSBELEID

Wetenschapsstraat 8  
1000 Brussel

[www.belspo.be/fedra](http://www.belspo.be/fedra)