

**Eerste wetenschappelijke plan ter ondersteuning van een
duurzaam ontwikkelingsbeleid (PODO I)**

Programma "Duurzaam beheer van de Noordzee"

**Ontwikkeling van analysemethoden voor koolwaterstoffen en
organische micropolluenten in het mariene milieu**

Samenvatting van het onderzoek

Edwin De Pauw

*Laboratorium massaspectrometrie
Université de Liège, B6c
4000 Luik, België*

Inleiding

De voorbije jaren werd een aanzienlijke vooruitgang geboekt in de analyse van dioxines. Door de combinatie van nieuwe extractie- [1] en zuiveringstechnieken[2,3] en de recente ontwikkelingen op gebied van massaspectrometrie [4] kunnen er geïntegreerde strategieën ontwikkeld worden. De referentiemethoden vereisen nog steeds arbeidsintensieve preparatie van de stalen en dure hogeresolutiemassaspectrometers (HRMS) die alleen beschikbaar zijn in enkele zeer gespecialiseerde laboratoria. Dit beperkt het aantal stalen dat tegen een aanvaardbare prijs gebruikt kan worden voor monitoring [5]. Om een hoger aantal stalen te kunnen verwerken, moeten de procedures (protocollen) vereenvoudigd worden of moeten er andere methoden gevalideerd worden. In dit verband zijn de voornaamste criteria 1) snel, 2) screening en 3) goedkoop.

Voor mogelijke hulpmiddelen voor de screening ging de voorbije jaren de aandacht uit naar biologische assays (gebaseerd op antilichamen of celrespons), met het verschijnen van een reeks bio- en immunologische analyses met voor- en nadelen [6]. De voordelen van deze analysemethoden liggen niet alleen in de lage prijs (meestal 5 keer goedkoper dan klassieke HRMS), maar ook in de mogelijkheid om een groot aantal stalen tegelijk te verwerken. Aangezien de assays echter ook geactiveerd kunnen worden door andere chemische stoffen in het mengsel, die vaak in hogere concentraties aanwezig zijn dan de onderzochte analyten, zijn er bijkomende voorbereidende stappen nodig om de kans op valse positieven te verminderen en deze zijn nu de flessenhals in de procedure. Bovendien houden deze delicate solventuitwisselingen in, omdat de analyses in waterig milieu uitgevoerd moeten worden [7]. Cross-reactivity van de verschillende congenere (op basis van 2,3,7,8-TCDD) kunnen de TEF-waarden aanzienlijk beïnvloeden. Als we weten dat de schatting van de TEQ voor vele matrices voornamelijk berust op de relatieve bijdrage van een paar congenere, kunnen deze afwijkingen in de TEF onzekerheden veroorzaken bij de schatting van de TEQ.

Naast de ontwikkeling van deze biologische methoden, hebben de fysisch-chemische analysemethoden ook een interessant niveau bereikt [8]. Een evaluatie van hun mogelijkheden leek daarom de moeite waard voor de screening van dioxines op basis van een aantal geselecteerde congenere [9].

Bespreking

In een overzicht van de recent beschikbare literatuur over de spreiding van congenere in voedsel en menselijke matrices tekenen zich een aantal trends af.

Tabel 1: Relatieve bijdragen (%) van geselecteerde pentacongenere.

	Gemiddelde 1,2,3,7,8-PeCDD	Gemiddelde 2,3,4,7,8-PeCDF	Som	SD	Range	Referenties
Voedsel						
Rund	26	45	71	3	[68-74]	10-12
Kalf	39	35	74	n.v.t	n.v.t	10
Varken	39	36	75	11	[68-83]	10-12
Lam	47	34	77	9	[71-84]	10,12
Paard	29	36	65	9	[56-73]	10-12
Kip	21	46	67	2	[65-69]	10-12
Eieren	22	43	65	n.v.t	n.v.t	11
Kaas	23	50	73	n.v.t	n.v.t	11
Room	62	16	78	n.v.t	n.v.t	12
Boter	19	59	78	1	[77-78]	11,12
Melk	25	43	68	10	[51-79]	11-18
Garnalen	13	42	55	n.v.t	n.v.t	12
Forel	16	41	57	n.v.t	n.v.t	12
Zalm	21	41	62	n.v.t	n.v.t	19
Makreel	13	30	43	1	[42-44]	11,15
Haring	28	46	74	n.v.t	n.v.t	15
Pladijs	24	49	73	n.v.t	n.v.t	15
Rijst	26	11	37	n.v.t	n.v.t	20
Gerst	28	19	47	n.v.t	n.v.t	20
Bonen	32	8	40	n.v.t	n.v.t	20
Spinazie	36	22	58	6	[54-62]	21
Mens						
Bloed	29	26	55	10	[37-70]	11,22-37
Borstvoeding	32	31	63	11	[45-78]	13,23,24,31,32,38

n.v.t. : niet van toepassing wegens het beperkte aantal gegevens beschikbaar voor de spreiding van congenere.

Het blijkt dat voor honderden bestudeerde stalen 1,2,3,7,8-PeCDD en 2,3,4,7,8-PeCDF de sterkste bijdrage leveren tot de WHO-TEQ (Tabel 1). Deze relatieve bijdragen zijn vrij constant over verschillende types matrices.

De standaardafwijkingen zijn relatief laag voor alle typen matrices, waaruit blijkt dat de verhoudingen van de bijdragen representatief zijn voor de algemene toestand. Deze vaststelling heeft verschillende gevolgen: 1) een hulpmiddel voor screening moet absoluut deze twee congenen zo precies mogelijk kunnen waarnemen, 2) deze twee congenen kunnen gebruikt worden als "screeningcongenen" voor de eerste sortering van stalen alvorens over te gaan tot de betreffende HRMS-analyse. Aangezien biologische hulpmiddelen soms relatieve responsfactoren hebben (vooral voor deze twee congenen) die niet overeenkomen met de WHO-TEF-waarden [39] en deze analyses soms een globaal resultaat geven, zou een ander hulpmiddel aangewezen zijn. Als we weten dat er zelfs voor analyses een relevante zuiveringsmethode vereist is, valt GC te overwegen om de betreffende congenen te scheiden en een gevoelige MS detector voor de screening. Vierpolige ionopslagtandemmassaspectrometers (QISTMS) zijn waardevolle detectors geworden door de recente verbetering van hun gevoeligheid [40,41,42]. Ze zijn makkelijk te bedienen, de prijs is aanvaardbaar, er hebben een lage (picogram) detectiegrens in isotopische verdunningen en men kan er recuperatiesnelheden mee berekenen zonder de gebruikelijke compatibiliteitsproblemen. Met de geschikte parameters en als de GC-analyse in tijd verkort wordt, kunnen de analyses zeer snel uitgevoerd worden. Fig. 1 illustreert een voorbeeld van een snelle analyse (cyclustijd minder dan 10 min) verkregen met een tafelionenvalmassaspectrometer gekoppeld aan een klassieke GC (A:1,2,3,7,8-PeCDF, B:2,3,4,7,8-PeCDF, C:1,2,3,7,8-PeCDD).

Om de productie van valse negatieven te vermijden, is een veilige screeningvoorwaarde de gemiddelde waarde voor de som van beide PeCDD/F's als representatieve waarde voor elk type matrix met een betrouwbaarheid van 20 %. Berekeningen met de verkregen hoeveelheden leiden dan tot een schatting van de totale WHO-TEQ en uiteindelijk de complementaire analyse met HRMS. Een cruciaal punt is hier dat de stalen die opnieuw op de HRMS gezet moeten worden, al beschikbaar zijn en geen bijkomende voorbereiding vereisen voor injectie, wat de algemene snelheid en kost van het proces ten zeerste ten

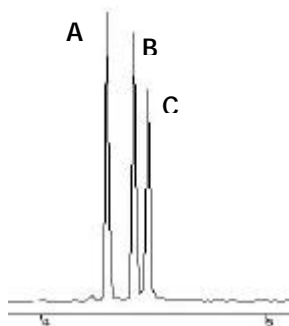


Fig. 1: PeCDD/Fs (min)

goede komt. Als we de globale controle beschouwen over de aanpak van de screening, kunnen net als bij de analyse [43] bepaalde hoeveelheden (10%) van de negatief blijkende stalen systematisch bevestigd worden door HRMS. De soliditeit van deze aanpak wordt momenteel bestudeerd en het wordt al duidelijk dat een dergelijke strategie geen groter aantal valse negatieven zou opleveren dan andere screeningprocessen.

Behalve de korte tijd voor de GC-MS-analyse, kunnen er in korte tijd veel stalen voorbereid worden door de automatische zuivering. Zo kan bijvoorbeeld het globale proces voor melkstalen in een paar uur afgewerkt worden voor 10 stalen, waarbij de PCB's en persistente pesticiden ook geïsoleerd kunnen worden.

Wij willen deze strategie aanpassen voor mariene matrices. De zuivering is uiteraard de belangrijkste stap: de inspanningen moeten hiernaar uitgaan, want de screeningkosten hangen hiervan af. Een veelbelovend alternatief is voor ons het gebruik van voorverpakte wegwerppatronen voor extractie in vaste fase (SPE, solid phase extraction) die makkelijk gecombineerd kunnen worden om zuivere extracten te produceren [44]. De optimalisatie en de transitie hiervan naar geautomatiseerde systemen met de nieuwe 96-well SPE technologie voor de bereiding van stalen voor snelle verwerking kan dan ook echt

aangepast worden voor bioanalyses met microplaten voor screening van een groot aantal stalen tegelijk.

Besluit

Eén van de belangrijkste criteria voor analyse van een groot aantal stalen is het screeningvermogen. Het moet mogelijk zijn om de tijd te beperken die besteed wordt aan de verwerking van stalen met verwaarloosbare concentraties analyten. Aangezien echter de analyse van sporen van dioxinen een complexe zuiveringsprocedure vereist, worden biologische hulpmiddelen, tegenwoordig, voor verwerking van een groot aantal stalen nog niet optimaal gebruikt. Voor de productie van zoveel stalen zijn er eenvoudige en/of geautomatiseerde processen nodig, die extracten produceren met zuiverheidsgraden die verenigbaar zijn met GC. De aanpak die hier voorgesteld wordt, berust op het uitscreenen van negatieve stalen, voor de GC-HRMS analyse, met kwantificering van representatieve geselecteerde congenere geïsoleerd door een geautomatiseerde zuivering en geanalyseerd door FGC-QISTMS. Deze methode is veelzijdig, de "gescreende congenere" zijn nog steeds representatief voor verschillende types contaminatie (TCDD kan zo nodig toegevoegd worden) en de correlatie tussen hun concentratie en de TEQ is makkelijker dan bij de analyse van merker PCB's voor de schatting van de dioxines.

Deze strategie kan beschouwd worden als een kostenefficiënte "dioxine-specifieke" fysisch-chemische screeningmethode die een krachtig biologisch hulpmiddel aanvult waarmee de totale toxiciteit van complexe mengsels van grote aantallen verschillende gehalogeneerde koolwaterstoffen in stalen geschat kan worden.

Dankwoord

Dit werk werd financieel ondersteund door het "Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture" (F.R.I.A.) en het Waalse Gewest, het departement onderzoek (DG TRE) en de DWTC (Noordzeeprogramma).

Referenties

- 1 Dean, J.R., Xiong, G., *Trends in Anal. Chem.*, **2000**, 19 (9), 553.
- 2 Turner, W.E., Isaacs, S.G., Patterson Jr., D.G. and Needham, L.L., in *Environmental Carcinogens Methods of Analysis and Exposure Measurement*, Rappe, C., Buser, H.R., Dodet, B. and O'Neill, I.K. Editors, IARC Scientific Publication Vol. 11, No. 108, Lyon **1991**, pp. 343.
- 3 Focant, J.-F., Eppe, G. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 45, 49.
- 4 Brunnée, C., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 76, 125.
- 5 Erickson, B.E., *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (15), 541A.
- 6 Behnisch, P., Hosoe, K., Shiozaki, K. and Sakai, S.-I., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 45, 184.
- 7 Harrison, R.O. and Eduljee, G.H., *Sci. Total Environ.*, **1999**, 239, 1.
- 8 Holland, J.-F., Enke, C.G., Allison, J., Suits, J.T., Pinkston, J.D., Newcombe, B. and Watson, J.T., *Anal. Chem.*, 1983, 55, 997A.
- 9 Chen, C.-Y., Hass, J.R. and Albro, P.W., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 40, 5.
- 10 Malish, R., Gleadle, A. and Wright, C., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 43, 265.
- 11 Focant, J.-F., Eppe, G., Houziaux, J.-S., Xhrouet, C., André, J.-E., Dipede, D. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 312.
- 12 Focant, J.-F., Massart, A.-C., Eppe, G., Pirard, C., André, J.-E., Xhrouet, C. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2001**.
- 13 Focant, J.-F., Pirard, C., André, J.-E., Massart, A.-C. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2001**.
- 14 Concejero, M.A., Jimenez, B., Eljarrat, E., Rivera, J. and Gonzales, M.J., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 43, 271.
- 15 Startin, J.R., Rose, M., Wright, C., Parker, I. and Gilbert, J., *Chemosphere*, **1990**, 20 (7-9), 793.
- 16 Vartiainen, T., and Hallikainen, A., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1994**, 348, 150.
- 17 Ramos, L., Eljarrat, E., Hernandez, L.M., Alonso, L., Rivera, J. and Gonzales, M.J., *Chemosphere*, **1997**, 35 (10), 2167.
- 18 Zelfde auteurs als ref. 17, *Chemosphere*, **1999**, 38 (11), 2577.

- 19 Jacobs, M., Ferrario, J. and Byrne, C., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 47, 338.
- 20 Kim, Y., Young Lee, S. and Kim, M., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 47, 369.
- 21 Tsutsumi, T., Iida, T., Hori, T., Toshihiko, Y., Youichi, K., Hiroyasu, U. and Toyoda, M., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 47, 296.
- 22 Liao, P.-C., Kuei, C.-H., Chang, H.-Y. and Guo, Y.L., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 79.
- 23 Amirova, Z., Kruglov, E., Loshkina, E., Loshkina, E. and Chalilov, R., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 44, 75.
- 24 Iida, T., Hirakawa, H., Matsueda, T., Nakagawa, R., Hori, T. and Nagayama, J., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 44, 123.
- 25 Pöpke, O., Hermann, Th. And Schilling, B., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 44, 221.
- 26 Pöpke, O., *Environ. Health Perspect.*, **1996**, 106 (Suppl.2), 723.
- 27 Masuda, Y., Schechter, A. and Pöpke, O., *Chemosphere*, **1998**, 37, 1773.
- 28 Schechter, A., Grosheva, E.I., Pöpke, O., Ryan, J.J., Amirova, Z. and Silver, A., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 44, 243.
- 29 Wittsiepe, J., Schrey, P., Ewers, U., Selenka, F. and Wilhelm, M., *Chemosphere*, **2000**, 40, 1109.
- 30 Dolgner, R., Ranft, U., Abel, J. and Vogel, C., *Organohalogen Compounds*, **1996**, 30, 77.
- 31 Schechter, A., Pöpke, O. and Fürst, P., *Organohalogen Compounds*, **1996**, 30, 57.
- 32 Schumacher, M., Granero, S., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Lindström, G. and Wingfors, H., *Organohalogen Compounds*, **1998**, 38, 191.
- 33 Schechter, A., Pöpke, O., Ball, M. and Ryan, J.J., *Chemosphere*, **1991**, 23 (11-12), 1913.
- 34 Masuda, Y., Schechter, A. and Pöpke, O., *Organohalogen Compounds*, **1996**, 30, 147.
- 35 Fujimine, Y., Hirai, T., Usuki, Y., Kodaira, T. and Watanabe, S., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 64.
- 36 Schechter, A., Rohr, W. and Pöpke, O., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 75.
- 37 Schechter, A. and Pöpke, O., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 68.
- 38 Fréry, N., Deloraine, A., Dor, F., Zeghoun, A. and Rouvière, F., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 47.
- 39 Sugawara, Y., Saito, K., Ogawa, M., Kobayashi, S., Shan, G., Hammock, B.D., Nakazawa, H. and Matsuki, Y., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 45, 172.
- 40 Hayward, D.G., Hooper, K. and Andrzejewski, D., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 212.
- 41 Eppe, G., Focant, J.-F., Pirard, C. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2001**.
- 42 Ragsdale, J.D. and Harvey, T.M., *mondelingen mededeling Pittcon* **2001**.
- 43 Sherry, J.P., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1992**, 23, 217.
- 44 Chang, R.R., Jarman, W.M. and Hennings, J.A., *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2420.