

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



Marc Raemaekers en Rudy De Clerck

CLO-Gent, Departement voor Zeevisserij

1. INLEIDING

Vluchtige organische verbindingen (VOC's) zoals chloroform, tetrachloorethyleen, benzeen en toluen worden op grote schaal door de mens geproduceerd en zijn door hun vluchtigheid alomtegenwoordig in het Westerse milieu. Deze toxische verbindingen worden, zij het in meestal lage concentraties, aangetroffen in lucht, water, bodem en levende organismen. De algemene aanwezigheid van VOC's in de weefsels van diverse organismen uit de verschillende trofische niveaus [1] zijn niet volledig te verklaren op basis van hun octanol-water partiticoëfficiënten (K_{ow}). Nochtans werd voorheen de bioconcentratie van VOC's op basis van deze lage K_{ow} -coëfficiënten als onbelangrijk beschouwd [2].

Daarom verdient het aanbeveling om deze verontreiniging verder in kaart te brengen. De concentratieniveaus aan VOC's in mariene organismen liggen tot 1000 maal hoger dan in het omringende water, zodat concentraties die in water onder de detectielimiet liggen, toch kunnen gemeten worden wanneer mariene dierlijke organismen worden bemonsterd.

De analyse van deze lage gehalten van VOC's in dierlijke matrices stelt echter hoge technische eisen qua robuustheid en reproduceerbaarheid. Ook de ideale manier van monsternamen en -bewaring is nog onduidelijk. Daarom werden in het project volgende doelstellingen nagestreefd:

1. Verbeteren van de betrouwbaarheid van de analytische techniek
2. Ontwikkelen van een referentiemateriaal (RM) met gekende gehalten aan VOC's
3. De stabiliteit en de integriteit van het RM onder verschillende bewaarcondities bestuderen
4. Evaluatie en verfijning van de procedures voor staalname en bewaring van de stalen.

In deze publicatie zal dieper ingegaan worden op doelstelling 2. Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van standaarden en van een referentiemateriaal zullen vergeleken worden. Dit RM werd bereid op basis van een visolie gedopeerd met een aangekochte VOC-standaard. De recovery van de VOC's in de gedopeerde visolie zullen eveneens besproken worden.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Standaarden en stalen

Als inwendige standaard wordt een verdunning van trifluorotolueen (12 ng/ μ l) in methanol gebruikt. Een blanco staal wordt bereid door aan 20 ml Spa-water in een purgeerflesje 1 μ l inwendige standaard toe te voegen.

Een ijkcurve wordt bekomen met behulp van een standaardreeks met 10, 20, 30, 40 en 50 ng/ μ l aan VOC-verbinding en 12 ng/ μ l inwendige standaard in methanol. Hiervan wordt 1 μ l aan een purgeerflesje met 20 ml Spa-water toegevoegd. De standaardreeks wordt aangemaakt op basis van een aangekochte standaardoplossing (AccuStandard).

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

De purgeerflesjes worden gesloten met een open-hole schroefdop met septum en teflon liner.

2.2. Bereiding van een referentiemateriaal voor VOC's

Visolie wordt vooraf "blanco" gemaakt bij 50°C door overnacht te purgeren met helium op een magnetische roerder. Een 500 ml Hamilton syringe wordt gevuld met 95 gram gepurgeerde visolie. Hieraan wordt 12,5 µl van de standaardstockoplossing (2,00 mg/ml per VOC) toegevoegd. De gedopeerde olie wordt op de magnetische roerder gemengd. Gesilaniseerde Certanflesjes werden rechtstreeks uit de 500 ml Hamilton syringe afgevuld. De flesjes werden gedurende enkele weken bij kamertemperatuur bewaard.

Voor de analyse van VOC's in visolie wordt eerst een reeks purgeerflesjes met 20 ml Spa-water en 1 µl inwendige standaard aangemaakt. Vlak voor het purgeren wordt met een Hamilton syringe 100 mg visolie uit het Certanflesje genomen en via het septum in het purgeerflesje gebracht.

2.3. Beschrijving van het purge&trap-GC-MS systeem

2.3.1. Purge & Trap (P&T) systeem

Het purgeren van blanco's, standaarden en stalen gebeurt met behulp van een Tekmar LSC 2000, voorzien van een Vocarb 4000 trap. 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; purgeerdebiet: 60 ml/min.

2.3.2. Gaschromatografie

De scheiding van de VOC's 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: dragergas helium; kolomdruk 19 psi; temperatuurprogramma: 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.

2.3.3. Massaspectrometrie

Massaspectrometrie wordt uitgevoerd door middel van een Magnum ion trap MS systeem (Finnigan). MS condities: scan range 50-300 amu; 1 seconde per scan (5 µscans); filament/multiplier delay 400 s; peak threshold 0 counts; mass defect 50 mmu/100 amu; 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 kwantificatie van 12 VOC's gebeurde aan de hand van de selectie van retentietijden en de ionmassa's weergegeven in tabel 1. Voor de kwantificatie worden de piekoppervlakten van de analyten gedeeld door die van de inwendige standaard. De ijklijn wordt berekend

aan de hand van de 5 standaardoplossingen, zonder rekening te houden met de blanco-meting.

Tabel 1. Retentietijden en geselecteerde ionmassa's

Verbinding	Retentietijden (min:s)	Ionmassa's voor kwantificatie
Trifluorotolueen (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 + p)-Xyleen*	15:22	91
o-xyleen	15:49	91

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

3. RESULTATEN

3.1. Precisie van VOC-analyse van standaardoplossingen

Bij het begin van elke dag waarop analyses gebeuren, worden een blanco staal en een standaardoplossing (50 ng/ μ l) gelopen ter controle van het P&T-GC-MS systeem. Tabel 2 toont de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de controlestandaard. Voor de herhaalbaarheid werden 4 runs uitgevoerd op dezelfde dag. Voor het berekenen van de reproduceerbaarheid werden 18 opeenvolgende dagen genomen. Gedurende deze periode werden geen abnormaliteiten van het P&T-GC-MS systeem waargenomen. De herhaalbaarheid varieert van 0,3% (benzeen) tot 7,0% (trichlooretheen). De reproduceerbaarheid schommelt tussen 1,8% (benzeen) en 8,1% (1,1,1-trichloorethaan). De procentuele variatiecoëfficiënten (d. i. standaardafwijking / gemiddelde \times 100) zijn 2 à 3 maal hoger voor de reproduceerbaarheid dan voor de herhaalbaarheid. Deze gunstige resultaten zijn toe te schrijven aan het respecteren van een aantal vuistregels specifiek voor VOC-analyse:

- Het bewaken van de performantie van het P&T-GC-MS-systeem (controle op lekken of verstopen, massacalibratie,...)
- Het beperken van contact tussen (standaard)oplossingen en de omgevingslucht
- Het doorprikken van het septum vlak voor de start van de purgeefase
- Het beperken van het aantal manipulaties nodig tussen stockoplossingen en purgee & trap-fase
- Het gebruik van gesilaniseerde Certan flesjes voor de bewaring van standaarden
- Het werken met reeksen purgeeflesjes die op quasi hetzelfde tijdstip worden gesloten

Tabel 2. Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van controlestandaard 50 ng VOC's.

Verbinding	Herhaalbaarheid	N = 4	Reproduceerbaarheid	N = 18
	Gemiddelde	Variatie-coëfficiënt (%)	Gemiddelde	Variatie-coëfficiënt (%)
Chloroform*	50,4	1,5	46,6	5,1
1,2-Dichloorethaan	50,1	1,6	50,8	3,9
1,1,1-Trichloorethaan	51,9	3,4	50,9	8,1
Tetrachloormethaan	49,8	1,1	51,5	7,6
Benzeen	49,8	0,3	49,8	1,8
Trichlooretheen	49,5	7,0	50,1	6,5
Tolueen	49,9	0,2	50,0	2,0
Tetrachlooretheen	49,5	0,9	50,1	2,8
Ethylbenzeen	51,4	2,6	50,4	5,0
m- en p-Xyleen	98,9	3,7	100,0	5,1
o-Xyleen	52,5	3,8	50,3	6,7

* Gecorrigeerd voor de achtergrondwaarde

3.2. Precisie en recovery van VOC-analyse van gedopeerde visolie

Een goed referentiemateriaal moet voldoen aan twee belangrijke eisen: matrix en analytconcentraties van het RM moeten zo gelijkaardig mogelijk zijn aan die van de stalen. Wegens praktische redenen werd als matrix visolie genomen. Er werd van uitgegaan dat VOC's zich in visweefsel gelijkaardig gedragen als in visolie.

De ruwe visolie bleek aanzienlijke gehalten aan monoaromatische koolwaterstoffen te bevatten. Daarom werd deze eerst off-line gepurgeerd onder verhoogde temperatuur. Daarna werd de olie gedopeerd met een niveau aan VOC's zodat de respons in het midden van de ijklijn zou uitkomen bij een staalinbreng van 0,1 gram.

De fase van de staalinbreng en het toevoegen van de inwendige standaard bleek in het begin problematisch. Zo werd eerst getracht om een emulsie te bereiden met behulp van emulgatoren en verdikkingsmiddelen. Deze aanpak werd verlaten omdat de respons van de inwendige standaard weinig herhaalbaar kon worden gemaakt. Ook werden verschillende dopeer- en staalinbrengniveaus (0,1 tot 1,5 gram) uitgeprobeerd. Een staalinbreng van 0,1 gram bleek de beste herhaalbaarheid op te leveren.

De beste herhaalbaarheid van de resultaten werden bekomen door het inbrengen van de inwendige standaard vlak voor de purgeerfase, tussen de oliedruppels in, zodat het trifluorotolueen praktisch niet wordt opgenomen door de visolie en kwantitatief wordt gepurgeerd.

Verder bleek dat tijdens de detectie van de inwendige standaard, ionmassa 96 eveneens werd gevormd uit een andere verbinding aanwezig in de visolie. Deze ionmassa werd voorheen ook gebruikt voor de kwantificatie, 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.

Tabel 3 toont de precisie van de metingen in gedopeerde visolie met een doperingsniveau van 260 ng/gram visolie. De herhaalbaarheid werd bekomen door 4 metingen op dezelfde dag en varieert tussen 1,9% (m- en p-xyleen) en 5,4% (1,1,1-trichloorethaan), uitgedrukt ten

opzichte van de gemiddelde meetwaarde. De reproduceerbaarheid werd bekomen in een periode van 22 dagen. De variatiecoëfficiënt schommelde van 4,5% (m- en p-xyleen) tot 13,3% (tetrachloormethaan).

Tabel 4 laat de recoveries zien van de VOC-analyse van de gedopeerde visolie. Het rendement varieerde van 41% voor trichlooretheen tot 92% voor 1,2-dichloormethaan. Deze waarden zijn gelijkaardig als de recoveries vermeld in Roose & Brinkman [3]. Het doperingsexperiment werd hier echter met visweefsel uitgevoerd. Enkel toluen en trichlooretheen vertonen veel lagere recoveries in visolie (resp. 41% en 65%) dan in visweefsel (resp. 63 en 115%). De variatiecoëfficiënten zijn echter 2 tot meer dan 10 maal lager (beter) in het geval van visolie.

Tabel 3. Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van VOC-analyse van gedopeerde visolie (ng/g visolie).

Verbinding	Herhaalbaarheid	N = 4	Reproduceerbaarheid	N = 26
	Gemiddelde	Variatie-coëfficiënt (%)	Gemiddelde	Variatie-coëfficiënt (%)
Chloroform	223	4,0	221	6,7
1,2-Dichloorethaan	242	2,0	227	9,6
1,1,1-Trichloorethaan	185	5,4	164	12,2
Tetrachloormethaan	157	3,0	139	13,3
Benzeen	227	2,3	227	9,0
Trichlooretheen	108	2,5	109	6,3
Toluene	172	3,2	177	5,3
Tetrachlooretheen	191	4,7	193	5,7
Ethylbenzeen	230	4,0	235	5,1
m- en p-Xyleen	448	1,9	465	4,5
o-Xyleen	206	3,9	212	5,6

* Alle waarden gecorrigeerd voor blanco

Tabel 4. Recovery van VOC-analyse van gedopeerde visolie (dag 0, N = 4).

Verbinding	Doperingsniveau (ng/g)	Gemiddelde (%)	Standaardafwijking (%)
Chloroform	264	84,4	3,4
1,2-Dichloorethaan	264	91,7	1,9
1,1,1-Trichloorethaan	262	70,5	3,8
Tetrachloormethaan	264	59,4	1,8
Benzeen	264	86,2	2,0
Trichlooretheen	263	41,1	1,0
Toluene	263	65,1	2,1
Tetrachlooretheen	263	72,7	3,4
Ethylbenzeen	261	88,2	3,5
m- en p-Xyleen	527	84,9	1,6
o-Xyleen	261	78,9	3,0

4. BESLUITEN

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.

De recoveries van sommige VOC's in visolie zijn vrij laag, maar voldoende hoog om reproduceerbare metingen te bekomen. Het verhogen van deze recoveries is technisch gezien zeer moeilijk, daar verandering van de purgeercondities de rendementen van de andere VOC's negatief zal beïnvloeden.

5. REFERENTIES

1. Roose, P., Cooreman, K., Vyncke, W., Dewulf, J., Heireman, B. & Van Langenhove, H. (1996). Intercompartment distribution of monocyclic aromatic hydrocarbons and C1-C2 organochlorines in the North Sea environment (eindverslag). DWTC Impulsprogramma Zeewetenschappen 1992-1996.
2. Howard, P.H. *Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals . Volume 2 (solvents)*, Chelsea, Michigan: Lewis publishers, 1991. Ed. 3 pp 546
3. Roose, P. & Brinkman, U.A.Th. (1998). Determination of volatile organic compounds in *marine biota*. J. Chrom. A., 799, 233-248.