

Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV

Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Tel.: 0255 564646
Fax.: 0255 564644
E-mail: visserijonderzoek.asg@wur.nl
Internet: www.rivo.wageningen-ur.nl

Centrum voor
Schelpdier Onderzoek
Postbus 77
4400 AB Yerseke
Tel.: 0113 672300
Fax.: 0113 573477

Rapport

Nummer: C077/05

Analyse van natuurlijke stoffen in sediment en baggerslib

Pim Leonards, Afke Stein, Sicco Brandsma en Christiaan Kwadijk

Opdrachtgever: RIKZ
Contactpersoon: Drs. J.C. Klamer
Postbus 207
9750 AE Haren

Project nummer: 344.1228013

Akkoord: Prof.Dr. J. de Boer
Milieu en Voedselveiligheid

Handtekening: _____

Datum: 1 december 2005

Aantal exemplaren: 10
Aantal pagina's: 10
Aantal tabellen: 6
Aantal figuren: -
Aantal bijlagen: -

In verband met de
verzelfstandiging van de
Stichting DLO, waartoe tevens
RIVO behoort, maken wij sinds 1
juni 1999 geen deel meer uit van
het Ministerie van Landbouw,
Natuur en Voedselkwaliteit. Wij
zijn geregistreerd in het
Handelsregister Amsterdam nr.
34135929
BTW nr. NL 811383696B04.

De Directie van het Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV; opdrachtgever vrijwaart het Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets van dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	2
Samenvatting.....	3
1. Inleiding	3
2. Doelstelling	3
3. Materialen en methoden	4
3.1 Zuivering.....	5
3.2 Extractie.....	6
3.3 LC-MS	6
3.4 Analyse monsters baggerslib/sediment.....	7
4. Resultaten en discussie	7
4.1 Extractie en zuivering	7
5. Conclusies	9
6. Referenties.....	10

Samenvatting

Een validatieonderzoek naar het voorkomen van vier groepen van natuurlijke stoffen (isoflavonen, flavaononen, en fenolcarboxylzuren en anthoraquinonen) in sediment werd uitgevoerd waarbij gebruik werd gemaakt van een analysemethode die voor dioxine-achtige stoffen en endocrien werkende stoffen eerder werd gevalideerd. Het doel van het onderzoek was na te gaan of de natuurlijke stoffen met een dergelijke methode konden worden geanalyseerd. Hiervoor werd de opwerkingsmethode van sedimenten met analytische standaarden en gespiked sediment onderzocht gebruikmakend van het gevalideerde extractie- (ASE) en zuiveringsprotocol voor dioxine-achtige en endocrien werkende stoffen. De gegevens laten zien dat alleen de anthoraquinonen worden teruggevonden na uitvoering van de zuiveringstap met gelpermeatie chromatografie (GPC). De stofgroepen worden echter slecht geëxtraheerd met het extractiemengsel dichloormethaan:aceton (3:1, v/v) wat mogelijk toe te schrijven is aan het ontbreken van een kleine hoeveelheid zuur tijdens de extractie. In geen van de onderzochte sedimentmonsters werden isoflavonen, flavaononen, fenolcarboxylzuren en anthoraquinonen boven de detectielimiet aangetroffen maar in een zogenaamd "silicone" sheet extract, dat alleen een GPC zuivering had ondergaan, werd alizarine (een anthoraquinone) aangetroffen.

1. Inleiding

Aanleiding tot dit onderzoek zijn de resultaten van recente TIE-studies naar dioxine-achtige toxiciteit in sediment en baggerslib waarbij de DR-CALUX als bioassay werd gebruikt om de dioxine-achtige toxiciteit te bepalen. De gevonden activiteiten in de sedimenten konden voor een groot deel niet verklaard worden aan de hand van chemische metingen van gechloroerde dioxinen, furanen, PCB's en N-PAK's (Stronkhorst et al., 2002; Klamer et al., 2004, 2005; Leonards et al., 2002). Deze resultaten duiden op de aanwezigheid van onbekende stoffen met een dioxine-achtige werking. Een recente studie heeft aangetoond dat een reeks van natuurlijke stoffen (isoflavonen, flavaononen, phenolcarboxylzuren en anthoraquinonen) DR-CALUX activiteiten bezitten (Amakura et al., 2003). In het huidige onderzoek werd nagegaan of deze stoffen aanwezig konden zijn in sediment/baggerslib na extractie en zuivering volgens een eerder ontwikkelde analytische methode voor dioxine-achtige en endocrien werkende stoffen.

2. Doelstelling

Doel van het onderzoek was de validatie van een extractie- en zuiveringmethode voor isoflavonen, flavaononen, fenolcarboxylzuren en anthoraquinone in sediment.

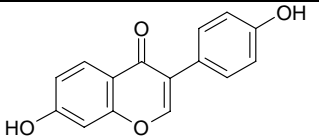
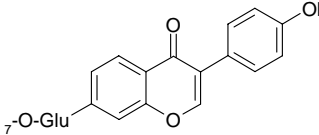
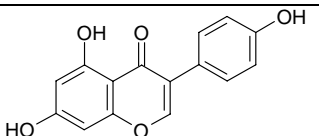
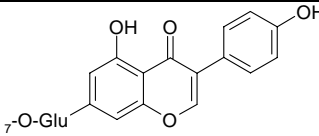
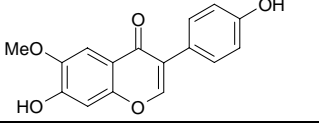
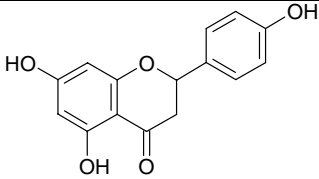
3. Materialen en methoden

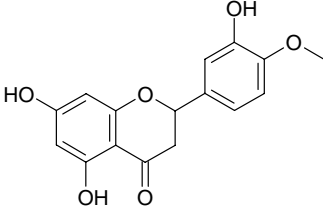
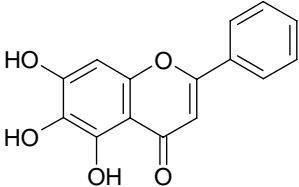
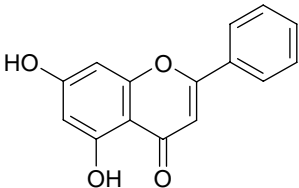
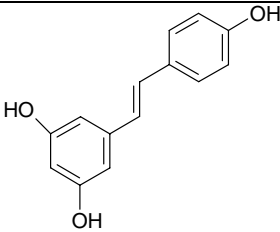
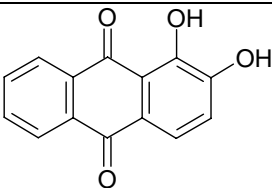
De werkzaamheden werden gesplitst in een validatie studie en de analyse van de natuurlijke stoffen in een vijftal sediment en silicone extract monsters. De methode werd gevalideerd voor 11 natuurlijke stoffen (isoflavonen, flavaononen, fenolcarboxylzuren en anthoraquinonen), zie tabel 1.

Validatie analysemethode

Als extractie- en zuiveringmethode werd gebruik gemaakt van procedure die eerder voor het RIKZ voor dioxine-achtige en endocrien versturende stoffen werd ontwikkeld (Leonards et al., 2001). Deze methode maakt gebruik van een accelerated solvent extraction (ASE) met dichloormethaan (DCM) en aceton en een zuivering van het extract met gel permeatie chromatografie (GPC).

Tabel 1: Geselecteerde en geanalyseerde natuurlijke stoffen.

Stof(groep)	CAS nr.	Structure	IEF*	Log Kow (Kowwin)
Isoflavonen				
Daidzeine	486-66-8		$4.3 \cdot 10^{-6}$	2.55
Daidzine	552-66-9		$1.1 \cdot 10^{-6}$	2.84
Genisteine	446-72-0		$5.4 \cdot 10^{-6}$	
Genistine	529-59-9		$3.1 \cdot 10^{-6}$	0.83
Glyciteine	40957-83-3		$3.1 \cdot 10^{-6}$	
Flavaononen				
Naringenine	480-41-1		$2.5 \cdot 10^{-7}$	0.43

Hesperetine	520-33-2		$3.4 \cdot 10^{-7}$	2.44
Flavonen				
Baicaleine	491-67-8		$4.6 \cdot 10^{-6}$	0.85
Chrysin	480-40-0		$9.3 \cdot 10^{-7}$	1.74
Phenolcarboxylzuren				
Resveratrol	501-36-0		$1.8 \cdot 10^{-6}$	3.08
Anthraquinonen				
Alizarine	72-48-0		$4.2 \cdot 10^{-6}$	1.49

* Amakura et al., 2003

3.1 Zuivering

GPC werd als zuiveringmethode gebruikt voor sedimentextracten volgens het protocol beschreven in Leonards en van der Veen (2001). De methode werd gevalideerd door in drievoud een analytische standaard van de natuurlijke stoffen (1 µg/ml) met het GPC-systeem (Polymer Laboratories, PL Gel kolom, L 600 mm x ID 25 mm, porie type 50 Å) te fractioneren. Met een fractieverzamelaar werd de fractie tussen 16.5 en 24 minuten opgevangen. Als elutiemiddel werd DCM met een snelheid van 10 ml/min gebruikt. De fracties werden voorzichtig ingedampt en 1 ml methanol werd toegevoegd. De extracten werden met LC-MS geanalyseerd.

3.2 Extractie

Voor validatie van de extractiemethode werd een ASE apparaat (ASE300, Dionex) met 34 ml cellen gebruikt welke eerder voor het RIKZ voor dioxine-achtige en endocrien versturende stoffen werd gevalideerd (Leonards et al., 2001). Als extractiemiddel werd een mengsel van DCM:aceton (3:1, v/v) gebruikt. Recoveries van de afzonderlijke stoffen van een analytische standaard (n=3), gespiked (n=3) en ongespiked (n=3) sediment na ASE extractie en GPC zuivering werden bepaald. Voor het onderzoek werd gebruik gemaakt van gevriesdroogd sediment afkomstig van het Zeehavenkanaal te Delfzijl. De gezuiverde extracten werden met LC-MS geanalyseerd.

3.3 LC-MS

Een LC-MS methode werd ontwikkeld voor de analyse van de stoffen in de extracten en monsters. Een LC-MS ion trap system (Advantage, Thermo-Finnigan) in de electrospray mode werd geoptimaliseerd. Scheiding van de stoffen vond plaats met een C18 HPLC kolom (Phenomenex, Luna 250 mm x 3.0 mm x 5 µm) en een mobiele fase van methanol:water (0.1% mierenzuur) met een gradiënt van 45% methanol naar 100% methanol in 15 minuten. Identificatie van de stoffen vond plaats aan de hand van de retentietijd en specifieke m/z waarden, waarbij de MS/MS mode voor glyciteine, naringenine, hesperetine, chrysine werden gebruikt (tabel 2).

Tabel 2: LC-MS ionen gebruikt voor analyse van de stoffen.

	Moeder ion (m/z waarde)	Dochter ion (m/z waarde)
Daidzeine	253.3	
Glyciteine	283.1	268.1
Genisteine	269.2	
Daidzine	461.1	
Genistine	477.0	
Naringenine	271.2	151.0
Hesperetine	301.2	286.0
Chrysine	253.3	209.1
Resveratrol	272.9	
Baicaleine	269.3	
Alizarine	239.3	

3.4 Analyse monsters baggerslib/sediment

Drie gevriesdroogde baggerspeciemonsters die aangeleverd werden door RIKZ of die op het RIVO aanwezig waren werden geanalyseerd (tabel 3). Tevens werd een zogenaamd “silicone sheet” extract (RIKZ code 10049114) van het Zeehavenkanaal sediment, bereid door het RIKZ, geanalyseerd. Het silicone sheet extract wordt als passieve sampler gebruikt. Voor de extractie van het silicone sheet wordt hexaan:aceton gebruikt. De silicone-methode geeft inzicht in de biologische beschikbaarheid van stoffen. Het silicone extract werd alleen gezuiverd met GPC.

Aan de hand van de validatie gegevens van de analytische standaarden werd besloten om een deel van het silicone extract te behandelen met zuur water (pH=2) voordat de GPC fractionering werd uitgevoerd. Deze extra stap werd uitgevoerd om na te gaan of de stoffen niet in gedissocieerde vorm aanwezig waren.

Tabel 3: Geanalyseerde sediment/baggerslib monsters, locatie, datum bemonstering en zuiveringmethode.

Code	Matrix	Locatie	Bemonstering (jaar)	Zuiveringmethode
1028887	Sediment	Zeehavenkanaal	2002	GPC
10049111	Sediment	Zeehavenkanaal	2005	GPC
10049112	Sediment	Zeehavenkanaal	2005	GPC
10049114	Silicone-extract	Zeehavenkanaal	2005	GPC
10049114	Silicone-extract	Zeehavenkanaal	2005	pH=2, GPC

4. Resultaten en discussie

4.1 Extractie en zuivering

Recoveries van de stoffen van een analytische standaard zijn weergegeven in tabel 4. De meeste natuurlijke stoffen hebben een GPC retentietijd korter dan 16.5 minuten. Dit betekent dat het grootste aantal stoffen verloren gaat tijdens de GPC behandeling. Hesperetine komt voor een klein deel terecht in de 16.5 – 24 fractie (recovery circa 10%). Alizarine is de enige onderzochte verbinding die volledig in de GPC 16.5 – 24 min fractie terecht komt (recovery ca. 100%, de lage recovery van #3 kan niet worden verklaard). Deze verbinding heeft de kleinste molecuul grootte en werd daarom ook in de 16.5 – 24 minuten fractie verwacht.

Tabel 4: Recoveries (%) van een analytische standaard (n=3) van natuurlijke stoffen na fractionering met GPC (GPC fractie 16.5 tot 24 minuten).

	#1	#2	#3
Daidzeine	<1	<1	<1
Glyciteine	<1	<1	<1
Genisteine	<1	<1	<1
Daidzine	<1	<1	<1
Genistine	<1	<1	<1
Naringenine	<1	<1	<1
Hesperetine	4	10	10
Chrysin	<1	<1	<1
Resveratrol	<1	<1	<1
Baicaleine	<1	<1	<1
Alizarine	122	108	32*

* De relatief lage recovery kan niet worden verklaard.

Indien een analytische standaard of gespiked sediment met de ASE (DCM:aceton, 3:1, v/v) wordt geëxtraheerd en vervolgens gefractioneerd met GPC dan wordt er geen enkele verbinding teruggevonden (tabel 5). Dit duidt op een slecht extractierendement van anthoraquinonen en flavaononen (de overige verbindingen kunnen tijdens de GPC zuivering verloren zijn gegaan). In de literatuur wordt voor de extractie van (iso)flavonoiden uit een vaste matrix meestal een polair oplosmiddel (bijv. methanol of ethanol in combinatie met water) met een kleine hoeveelheid zuur gebruik (bijv. Fiamegos et al., 2004; Lai et al., 2003). Aangenomen wordt dat het extractiemengsel (DCM:aceton) wel geschikt is om de natuurlijke stoffen te extraheren maar dat de verbindingen veelal in gedissocieerde vorm aanwezig zijn en daarom niet volledig geëxtraheerd worden. Het toevoegen van een extra zure extractie stap (bijv. methanol:water (pH=2), na extractie met DCM:aceton, lijkt daarom essentieel.

Tabel 5: Recoveries (%) van natuurlijke stoffen (analytische standaard en gespiked sediment) na extractie met ASE (DCM:aceton, 3:1, v/v) en zuivering met GPC.

	Analytische standaard (n=3)	Gespiked sediment (n=3)
Daidzeine	<1	<1
Glyciteine	<1	<1
Genisteine	<1	<1
Daidzine	<1	<1
Genistine	<1	<1
Naringenine	<1	<1
Hesperetine	<1	<1
Chrysin	<1	<1
Resveratrol	<10	<10
Baicaleine	<1	<1
Alizarine	<1	<1

Baggerslib/sediment

Een drietal monsters sediment/baggerslib werd volgens bovenstaande methode zonder zuur opgewerkt (ASE en GPC). Het siliconen extract werd alleen met GPC gezuiverd. Een overzicht van de resultaten wordt weergegeven in tabel 6. Een grote spreiding in detectielimiet tussen de stoffen wordt waargenomen (<0.5 tot <11 ng/g dw). Dit werd veroorzaakt door grote verschillen in respons van de MS detector tussen de stoffen. Geen van de natuurlijke stoffen werd teruggevonden in de sedimentmonsters, echter in het silicone sheet extract werd alizarine aangetroffen (ca. 150 ng/ml sheet extract). Het aanzuren van het silicone extract had geen invloed op de resultaten. Het niet aanwezig zijn van alizarine in de sedimentmonsters maar wel in het silicone extract is te verklaren door de slechte rendementen van alizarine tijdens ASE extractie, zoals boven beschreven. Geconcludeerd wordt dat alleen alizarine in het silicone extract werd aangetroffen en dat de huidige ASE en GPC methode niet geschikt is voor het analyseren van de onderzochte natuurlijke stoffen.

Tabel 6: Concentraties (ng/g drooggewicht of ng/ml sheet extract) natuurlijke stoffen in sediment/baggerslib (RIKZ codes per monster zijn aangeven).

Stofnaam	10049114 ng/ml sheet extract	10049114, pH=2 ng/ml sheet extract
Extractiemethode	LLE silicone sheet, Hexaan:aceton	LLE silicone sheet, Hexaan:aceton
Zuiveringmethode	GPC	GPC
Hesperetine	<30	<30
Alizarine	150	150

5. Conclusies

- Isoflavonen, flavaononen, en fenolcarboxylzuren komen in de GPC fractie 0 - 16.5 minuten terecht en gaan daarom verloren tijdens de opwerkingsmethode. De meeste milieucontaminanten worden in de 16.5 – 24 min. fractie aangetroffen.
- Anthoraquinonen komen na GPC fractionering in de 16.5 – 24 min. fractie terecht. Deze groep van verbindingen wordt echter niet uit sediment geëxtraheerd indien een ASE extractie met DCM:aceton, 3:1, v/v wordt uitgevoerd. Dit is mogelijk het gevolg van het ontbreken van een zure extractiestap.
- Geconcludeerd wordt dat isoflavonen, flavaononen, en fenolcarboxylzuren en anthoraquinonen geen belangrijke bijdrage kunnen leveren aan het verklaren van de DR-CALUX activiteit van sedimenten indien gebruik wordt gemaakt van het huidige extractie- en zuiveringsprotocol omdat deze stoffen verloren gaan tijdens de opwerkingsmethode.

6. Referenties

- Amakura, Y., T. Tsutsumi, M. Nakamura, H. Kitagawa, J. Fujino, K. Sasaki, M. Toyoda, T. Yoshida., T. Maitani. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using in vitro reporter gene assay. *Biol. Pharm. Bull.*, 26 (4), 532-539.
- Fiamegos, Y.C., C. G. Nanos, J. Vervoort, C.D. Stalikas. 2004. *J. Chromatogr. A*1041, 11-18.
- Klamer H.J.C., Leonards P.E.G., Lamoree M.H., Villerius L.A., Akerman J.E., Bakker J.F. 2005. *Chemosphere* 58 (11): 1579-1587 MAR 2005. A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments.
- Klamer, H.J.C., J. Jorritsma, L. van Vliet, F. Smedes, J.F. Bakker. 2004. Dioxine-achtige toxiciteit in baggerslib van het zeehavenkanaal, Delfzijl : Toxiciteit Identificatie en Evaluatie (TIE) met DR-CALUX, RIKZ, rapport no. RIKZ/2004.013.
- Lai, S.M., R.L. Chen, S.Y. Suen. 2003. *J. Liquid Chromatogr. Rel. Techn.* 26, 2941-2960.
- Leonards P.E.G., M. Lamoree, P. Booy, A. van der Horst, en I. van der Veen. 2001. Validatie van analysemethoden in sediment voor de toepassing van de ER-CALUX en de DR-CALUX en de bepaling van milieucontaminanten in sediment. RIVO, IJmuiden, rapport no.V078/01
- Leonards P.E.G.en I. van der Veen. 2002. TIE-studie naar dioxine-achtige toxiciteit in het Zeehavenkanaal te Delfzijl. RIVO, IJmuiden, rapport no. C 060/02.
- Leonards, Pim E.G., Ike van der Veen en Judith M. van Hesselingen. 2004. TIE-studie van dioxine-achtige stoffen in zwevend stof en sediment met behulp van de DR-CALUX assay en gas chromatografie met time-of-flight massaspectrometrie. RIVO, IJmuiden, rapport no. C076/04.
- Stronkhorst, J., P. Leonards, A.J. Murk. 2002. Using the dioxin receptor-CALUX in vitro bioassay to screen marine harbor sediments for compounds with a dioxin-like mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, (12), 2552-2561.