

Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV

Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Tel.: 0255 564646
Fax.: 0255 564644
Internet:postkamer@rivo.dlo.nl

Postbus 77
4400 AB Yerseke
Tel.: 0113 572781
Fax.: 0113 573477

RIVO Rapport

Nummer: C076/04

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

Pim E.G. Leonards, Ike van der Veen en Judith M. van Hesselingen

Opdrachtgever: RIKZ
Postbus 8039
4330 EA Middelburg
mevr. Drs. M. van den Heuvel

Project nummer: 3441228037

Akkoord: dr. J. de Boer
Afdelingshoofd Milieu en Voedselveiligheid

Handtekening: _____

Datum: 29 oktober 2004

Aantal exemplaren: 10
Aantal pagina's: 12
Aantal tabellen: 5
Aantal figuren: 3
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,
Natuurbeheer en Visserij. Wij zijn
geregistreerd in het
Handelsregister Amsterdam
nr. 34135929
BTW nr. NL 808932184B09.

De Directie van het RIVO is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het RIVO; opdrachtgever vrijwaart het RIVO 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 Extractie, zuivering en fractionering	4
3.2 GC-ToF-MS screening	5
3.3 DR-CALUX analyse	6
4. Resultaten en discussie	6
4.1 DR-CALUX	6
4.2 GC-ToF-MS screening	8
5. Conclusies en aanbevelingen	11
6. Referenties.....	11

Samenvatting

In dit onderzoek werd de toxiciteit van dioxine-achtige stoffen met behulp van de DR-CALUX assay van zwevend stof en sediment monsters bepaald. De activiteit van de monsters bewerkt met een totale extractie en niet-destructieve methode (GPC) was 2,5 tot 4 maal lager dan het extract dat met HPLC werd gefractioneerd (som van vier fracties). Dit duidt op de aanwezigheid van stoffen met een antagonistische werking van de dioxine-achtige toxiciteit. In de tweede fractie werd de meeste activiteit gevonden (70% tot 80%). Deze fractie bevat voornamelijk homo- en heteropolycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs, N-, O- en S-PAKs). De derde en vierde fractie hadden een bijdrage van 5% tot 14% in de totale activiteit en werden gekenmerkt door de aanwezigheid van N-PAKs, O-PAKs en fenolen. De eerste fractie, die de PCBs, PCNs en HCB bevatten, had de laagste activiteit (3% tot 7%).

1. Inleiding

Zwevend stof en sediment monsters zijn onderzocht op de aanwezigheid van dioxine-achtige stoffen met behulp van de DR-CALUX assay. De monsters ondergingen een totale extractieprocedure en niet-destructieve opwerkmethode voordat met HPLC werd gefractioneerd. Een fractionering werd uitgevoerd om het complexe mengsel van stoffen uit elkaar te rafelen en daardoor meer inzicht te krijgen in de identiteiten van de stoffen die mogelijk verantwoordelijk zijn voor de DR-CALUX activiteit. De fracties die de hoogste activiteiten bezitten zijn onderzocht met behulp van gaschromatografie gekoppeld aan time-of-flight massaspectrometrie (GC-ToF-MS) om de identiteiten van de onbekende stoffen te achterhalen. Op deze wijze werd een eerste aanzet gegeven tot het achterhalen van de stoffen die de dioxine-achtige toxiciteit veroorzaakte.

2. Doelstelling

Doel van het onderzoek was het bepalen van:

- i) de DR-CALUX activiteit van een drietal zwevend stof/sediment monsters na fractionering met HPLC,
- ii) het analyseren van een zestal fracties met de hoogste dioxine-achtige activiteit met behulp van GC-ToF-MS om de identiteit van de onbekende stoffen te achterhalen.

3. Materialen en methoden

3.1 Extractie, zuivering en fractionering

De volgende drie monsters werden onderzocht:

- 10041792zs, zwevend stof; in dit rapport aangeduid als monster 792
- 10041795zs, zwevend stof; in dit rapport aangeduid als monster 795
- 10041798sed, sediment; in dit rapport aangeduid als monster 798

Na vriesdrogen van het natte monster werd een extractie met Accelerated Solvent Extraction (ASE, Dionex) uitgevoerd (RIKZ). Het extract werd met gel permeatie chromatografie (GPC, PL gel kolom) met dichloormethaan als eluatiemiddel gezuiverd (RIKZ). Het gezuiverde extract werd gefractioneerd met normal phase HPLC (Waters, μ Porasil, ID: 7.8 mm, L: 300 mm) waarbij een gradiënt van hexaan, dichloormethaan en acetonitril met een flow van 5 ml/min werd gebruikt (tabel 1). Vier fracties werden opgevangen (tabel 2). In de 1^e fractie zijn voornamelijk PCBs aanwezig, in de 2^e fractie PAKs, in de derde fractie N-PAKs en O-PAKs, en in de 4^e fractie meer polaire verbindingen.

Tabel 1: HPLC gradiënt gebruikt voor de fractionering van de zwevend stof/sediment extracten.

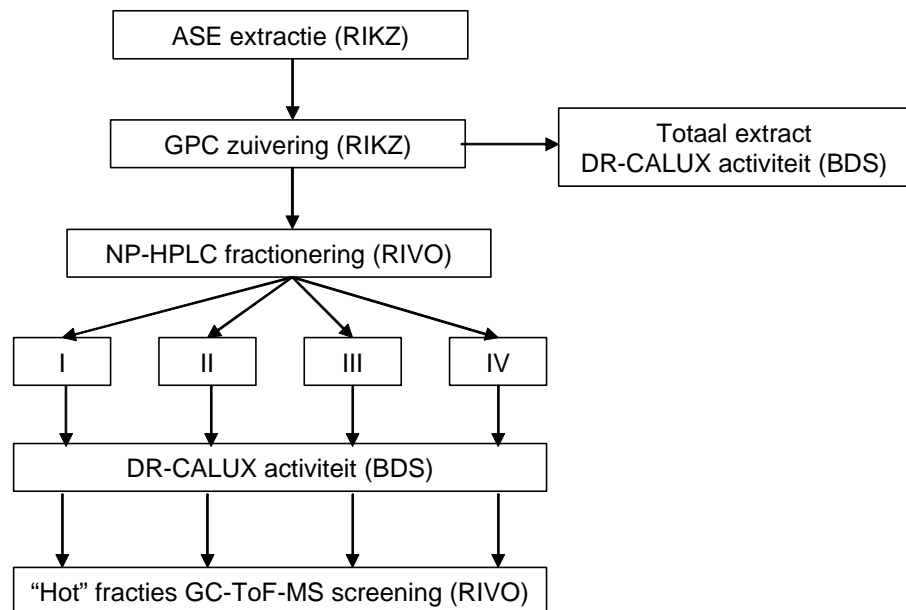
Tijd (min)	Hexaan	DCM	Acetonitrile
0	100	0	0
5	100	0	0
10	95	5	0
35	0	100	0
45	0	100	0
55	0	0	100
60	0	0	100
65	0	100	0
70	100	0	0
85	100	0	0

Tabel 2: Fractioneringschema.

Fractie no.	Begintijd	Eindtijd	Volume ml
I	0	4	20
II	4	22	90
III	22	40	90
IV	40	70	150

De fracties werden ingedampt en verdeeld: één deel voor DR-CALUX analyse en één deel voor screening met GC-ToF-MS. De extracten voor DR-CALUX analyse werden bijna drooggedampt en overgebracht in DMSO en geanalyseerd. Aan het deextract voor GC-ToF-MS analyse werd een interne standaard (CB 112) toegevoegd. Het extract werd ingedampt tot circa 1 ml en overgebracht in ethylacetaat.

Het eindextract werd ingedampt tot circa 200 µl en geanalyseerd met GC-ToF-MS. In figuur 1 wordt een overzicht van de extractie-, zuivering-, fractionering- en detectiemethoden weergegeven.



Figuur 1: Opwerkingsprocedure van de zwevend stof/sediment monsters en de uitvoerende instituten. ASE: accelerated solvent extraction; GPC: gel permeatie chromatografie; NP-HPLC: normal phase vloeistof chromatografie.

3.2 GC-ToF-MS screening

De extracten werden met een Trace GC (Thermo-Finnigan) op een VF-5 15 m x 0.25 mm x 0.1 µm (Varian) GC kolom geanalyseerd. Van het extract werd 1 µl in een PTV injector geïnjecteerd bij een temperatuur van 250°C. De GC oven werd als volgt geprogrammeerd: 90°C voor 2 minuten gevolgd door een temperatuurstijging van 5°C/min naar 310°C met een hold time van 15 min. De interface temperatuur was 300°C. Als massaspectrometer werd een Tempus update (Thermo Finnigan) ToF-MS systeem gebruikt. Brontemperatuur was 200°C in electron impact (EI) mode en 160°C in negatieve chemische ionisatie (NCI) mode. De extracten werden gemeten in de full scan mode (EI: m/z 44-1000, NCI m/z 34-1000) met 2 scans per seconde. Als ionisatie gas werd methaan gebruikt met een gassnelheid van 2 ml/min.

De chromatogrammen werden vervolgens geladen in AMDIS en na deconvolutie van de pieken werden de mogelijke kandidaten voor de onbekende pieken met behulp van de NIST98 MS bibliotheek voor EI spectra bepaald.

Voor de NCI spectra werd de RIVO NCI-MS bibliotheek en het NCI handboek van Stemmler en Hites (1988) gebruikt. Daarnaast werd voor identificatie van gechloroerde en gebromeerde

verbindingen de NIST98 EI-spectra bibliotheek gebruikt omdat voor deze verbindingen het NCI ionisatieproces via het electron capture principe verloopt en daarmee grote overeenkomsten tussen NCI- en EI-spectra oplevert.

Alle EI en NCI resultaten werden vervolgens overgebracht naar een Excel spreadsheet en alleen de kandidaten met een reverse fit waarde >70% werden in AMDIS handmatig gecontroleerd. Niet correcte identificaties werden verwijderd uit de spreadsheet. Uit eerdere studies is gebleken dat een handmatige controle van de spectra strikt noodzakelijk is omdat er relatief veel onjuiste identificaties via de automatisch functie worden gerapporteerd. Alleen voor verbindingen die een fit factor van groter dan 95% bezitten is handmatige controle niet noodzakelijk, dit betreft echter minder dan 1% van alle gerapporteerde kandidaten.

3.3 DR-CALUX analyse

De fracties werden door BioDetection Systems (BDS, Amsterdam) met de DR-CALUX assay gemeten volgens BDS protocol Pe-BDS-004e (Besselink et al., 2001). De resultaten werden uitgedrukt in pg TEQ/g droge stof. Procedurele blanco's werden ook geanalyseerd.

4. Resultaten en discussie

4.1 DR-CALUX

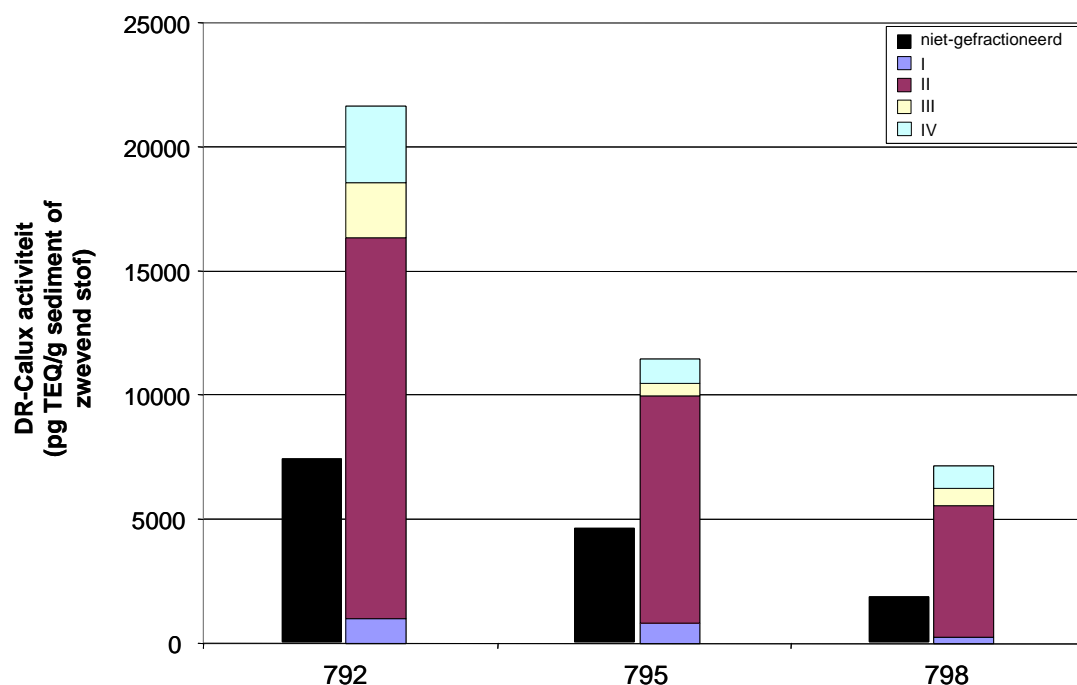
De DR-CALUX activiteiten van de niet-gefractioneerde (Linden en Besselink, 2004) en gefractioneerde extracten zijn weergegeven in tabel 3. De hoogste activiteit wordt aangetroffen in monster 792 (21648 pg TEQ/g) gevolgd door monster 795 (11461 pg TEQ/g) en de laagste activiteit in monster 798 (7143 pg TEQ/g). Opvallend is dat de activiteiten van de gefractioneerde monsters, som van de vier fracties, 2,5 tot 4 maal hoger zijn dan de activiteiten van de niet-gefractioneerde monsters, figuur 2. Dit duidt op de aanwezigheid van stoffen met een antagonistische werking die de dioxine-achtige toxiciteit remmen. Recent werd aangetoond dat polybroomdifenyl ethers (PBDEs) de EROD activiteit van TCDD sterk kunnen verlagen (Kuiper et al., 2004); reducties met een factor 25 van de oorspronkelijke activiteit werd waargenomen. Ook voor andere stoffen, zoals PCB153, zijn antagonistische effecten op de dioxine-achtige toxiciteit aangetoond (Besselink et al., 1998).

De hoogste activiteit wordt voor alle monsters in fractie II gevonden (71% tot 80%). Fractie III en IV leveren een bijdrage van 5% tot 14% aan de totale activiteit. De laagste activiteit wordt in de eerste fractie (3% tot 7%) gevonden die gekenmerkt wordt door PCBs. Een zestal fracties werd geselecteerd voor screening met GC-ToF-MS. Dit betrof de fracties 792 II, 792 III, 795 II, 798 II, 798 III, 798 IV.

Tabel 3: Gemiddelde en relatieve standaarddeviatie (RSD) van de DR-CALUX activiteit (pg TEQ/g sediment of zwevend stof) van de vier fracties per monster en de relatieve activiteit per fractie. Tevens zijn de DR-CALUX activiteit van het niet-gefractioneerde monster (Linden en Besselink, 2004) en de monsters voor GC-ToF-MS analyse weergegeven.

RIKZ/RIZA code	DR-CALUX activiteit (pg TEQ /g sediment)	RSD (%)	Relatieve activiteit (%) per fractie	GC-ToF-MS screening
792 niet-gefractioneerd*	7354	3.2		
792 I	989	2.5	5	
792 II	15360	10.3	71	X
792 III	2194	3	10	X
792 IV	3106	5.7	14	
Som fracties I,II,III,IV	21648			
795 niet-gefractioneerd*	4555	5.7		
795 I	816	10.5	7	
795 II	9143	7.6	80	X
795 III	529	2.4	5	
795 IV	973	4.9	8	
Som fracties I,II,III,IV	11461			
798 niet-gefractioneerd*	1826	7.2		
798 I	233	0.2	3	
798 II	5317	4.4	74	X
798 III	676	7.7	9	X
798 IV	917	12.8	13	X
Som fracties I,II,III,IV	7143			

*Linden en Besselink, 2004



Figuur 2: DR-CALUX activiteiten in de niet-gefractioneerde en de gefractioneerde (I, II, III, IV) monsters.

4.2 GC-ToF-MS screening

De EI- en NCI-chromatogrammen van de fracties zijn in bijlagen 1 en 2 weergegeven. In tabel 4 wordt voor identificatie met EI mode een overzicht gegeven van i) het aantal pieken dat na deconvolutie werd aangetroffen in het chromatogram, ii) het aantal pieken dat geïdentificeerd werd met de automatische zoekfunctie en de NIST98 bibliotheek, iii) het aantal pieken met een reverse fit waarde groter dan 70% en iv) het aantal juist geïdentificeerde pieken na handmatige controle. Opvallend is het grote aantal pieken dat niet juist kon worden geïdentificeerd bij de automatische zoekfunctie. Dit betreft niet alleen pieken met een lage intensiteit of een lage reverse fit waarde maar ook pieken met een hoge reverse fit waarde.

Het aantal pieken in de fracties varieerde tussen de 345 en 888. Het aantal verbindingen dat positief met EI kon worden geïdentificeerd lag tussen de 17 en 46. In bijlage 3 worden de mogelijke kandidaten voor de onbekende pieken weergegeven. Deze bijlagen bevatten alleen de kandidaten waarvoor een goede overeenkomst tussen het spectrum van de onbekende piek en de MS bibliotheek werd gevonden.

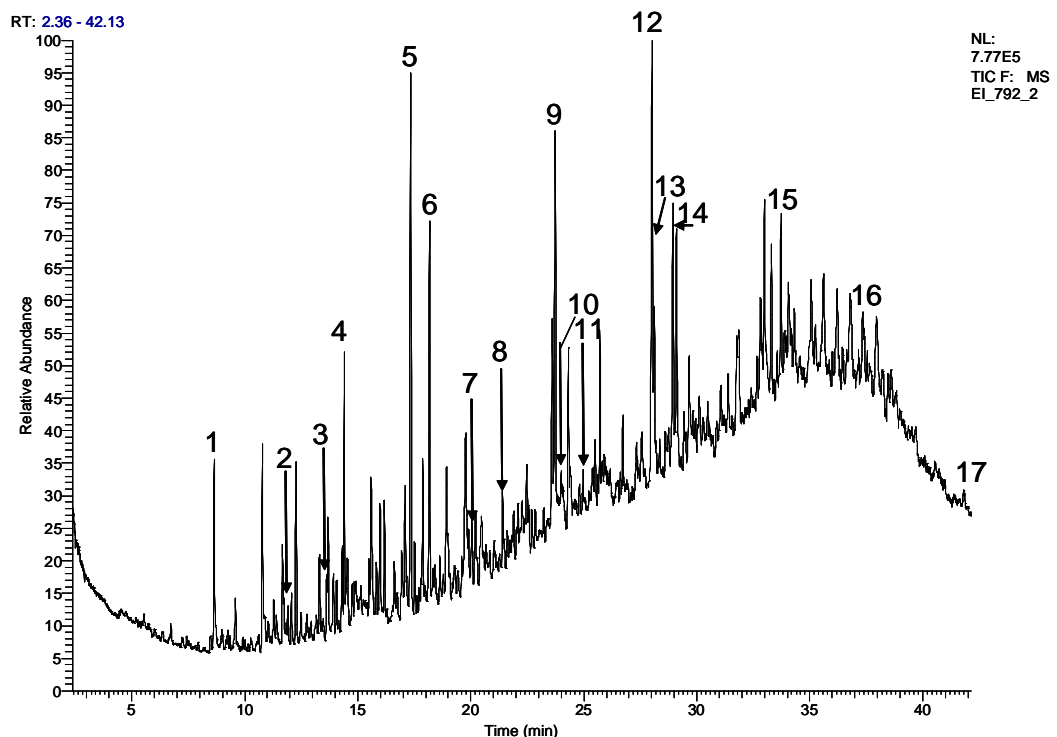
Tabel 4: Totale aantal pieken na deconvolutie met AMDIS, het aantal pieken geïdentificeerd met automatische zoekfunctie en NIST98 bibliotheek, en het aantal pieken geïdentificeerd na handmatige controle van de spectra.

Monster	Totaal aantal gevonden pieken na deconvolutie met AMDIS	Aantal geïdentificeerde pieken met automatische zoekfunctie en NIST98 bibliotheek	Aantal geïdentificeerde pieken met een reverse fit waarde van >70%	Aantal correct geïdentificeerde stoffen na handmatige controle
792 II	888	524	182	39
792 III	591	417	82	22
795 II	345	307	160	46
798 II	481	384	209	45
798 III	341	311	74	17
798 IV	708	589	107	33

Identificatie van de stoffen met NCI werd vooral gelimiteerd door het beperkt aantal massaspectra dat beschikbaar is. Er zijn geen commerciële bibliotheken voorhanden. De RIVO bibliotheek bevat vooral gechloroerde en gebromeerde verbindingen, zoals PCBs, dioxinen, PBDEs, OCPs, toxaphene etc. Veel van deze apolaire stoffen bevinden zich in fractie I, een fractie die een relatief lage DR-CALUX activiteit vertoont en die niet uitvoerig in dit project werd onderzocht. In fracties II, III en IV werden, uitgezonderd PBDEs, bijna geen gechloroerde en gebromeerde verbindingen gevonden. Met NCI konden een aantal additionele stoffen worden geïdentificeerd en konden de identificaties uitgevoerd met EI van de N-PAKs worden

geconformeerd. Om het voordeel van NCI voor identificatie van stoffen optimaal te kunnen benutten is het noodzakelijk om NCI-spectra tussen instituten uit te wisselen.

Een overzicht van de verschillende stofgroepen per monster wordt weergegeven in tabel 5. Fractie II wordt gedomineerd door de aanwezigheid van PAKs: homo- en heterocyclische (N-, O-, en S-PAKs) verbindingen. Daarnaast werden PBDEs, ftalaten en alkanen gevonden. Als voorbeeld van het belang van PAKs in fractie II is het chromatogram van monster 792 in figuur 3 gegeven.



Figuur 3: TIC-chromatogram van monster 792, fractie II. Aangegeven zijn voornamelijk de homo- en heterocyclische PAKs. 1. phytol; 2. dibenzothiophene; 3. nitrosocarbazole; 4. phthalate; 5. pyrene; 6. fluoranthene; 7. benzantraceneone; 8. benzonaphthothiophene; 9. chrysene; 10. benzocarbazole; 11. benzocarbazole; 12. benzo(a)pyrene; 13. benzoofluoranthene; 14. benzoofluoranthene; 15. indenopyrene; 16. dibenzopyrene; 17. acenaphthofluoranthene.

In de derde fractie werden N-PAKs, zoals benzacridine, dibenzophenazine, dibenzoacridine aangetroffen, maar ook O-PAKs (ketonen), fenolen, ftalaten en alkanen. Uit de literatuur is bekend dat twee van de dibenzoacridine isomeren (a,h en a,c) een hoge REP factor voor de DR-CALUX hebben, 0,0013 en 0,082 respectievelijk, zelfs na 24 uur blootstelling (Machala et al., 2001). Omdat de de DR-CALUX activiteit in fractie III veel lager is dan in fractie II kan geconcludeerd wordt dat N-PAKs een beperkte bijdragen leveren aan de totale DR-CALUX activiteit. Deze conclusie is in overeenstemming met een recent DR-CALUX onderzoek waarbij

sediment van het Zeehavenkanaal in Delfzijl werd onderzocht (Klamer et al., 2004). In deze studie werd geconcludeerd dat N-PAKs een geringe bijdrage leverde aan de activiteit.

In fractie IV van monster 798 werden fenolen,ftalaten, alkanen en alcoholen gevonden. Vermoed wordt dat deze stoffen geen bijdrage leveren aan de DR-CALUX activiteit. In fractie IV zitten de meer polaire stoffen die slecht met GC-MS kunnen worden aangetoond. Mogelijk dat identificatie met LC-MS meer informatie over deze fractie kan verschaffen.

Tabel 5: Geïdentificeerde stofgroepen aanwezig in de fracties.

Monster	PCBs	HCB en OCB	PCNs	PAKs	N-PAKs	O-PAKs	S-PAKs	PBDEs	Ftalaten	Alkanen deriv.	Alcoholen	Phenolen	Benzofenon
Fractie I													
792 I	X	X	X										
795 I	X	X	X										
798 I	X	X											
Fractie II													
792 II				X	X	X	X	X	X	X			
795 II				X	X	X	X	X	X	X			
798 II				X	X		X	X	X	X			
Fractie III													
792 III					X	X			X	X		X	X
798 III						X							
Fractie IV													
798 IV									X	X	X	X	

In conclusie: PCBs leveren geen grote bijdrage aan de DR-CALUX activiteit van de onderzochte monsters. Aangenomen wordt dat de homo- en heterocyclische PAKs een grote bijdrage aan de DR-CALUX activiteit leveren, maar dat N-PAKs hierin een bescheiden rol spelen. Het mengsel van verbindingen in fractie II is echter te complex om uitsluitsel te geven over welke verbindingen voornamelijk verantwoordelijk zijn voor de DR-CALUX activiteit. Om meer duidelijk te krijgen welke PAKs een belangrijk bijdragen leveren aan de activiteit in fractie II is het noodzakelijk om deze fractie verder te fractioneren. Dit zou uitgevoerd kunnen worden door kleinere fracties te maken of door een ander type HPLC kolom (PYE) te gebruiken. De volgende stappen in het TIE-proces kunnen zijn verder fractioneren van fractie II, het kwantificeren met analytische standaarden van de belangrijkste verbindingen, het berekenen van de bijdrage aan de activiteit en het nagaan of deze verbindingen daadwerkelijk verantwoordelijk zijn voor de activiteit.

5. Conclusies en aanbevelingen

- ?? De totale DR-CALUX activiteit van de onderzochte zwevend stof en sediment monsters na fractionering was 2,5 tot 4 maal hoger dan in de niet-gefractioneerde monsters. Dit duidt op de aanwezigheid van stoffen met een antagonistische werking.
- ?? De hoogste activiteit werd voor alle monsters in de tweede fractie gevonden.
- ?? In de tweede fractie werden voornamelijk homo- en heterocyclische PAKs gevonden die mogelijk een deel van de dioxine-achtige toxiciteit kunnen verklaren.
- ?? Een verdere fractionering van de tweede fractie is noodzakelijk om meer duidelijk te krijgen over de identiteit van de stoffen die verantwoordelijk zijn voor het grootste deel van de dioxine-achtige toxiciteit. Hierbij zal het ook noodzakelijk zijn om de TEF-waarden van deze stoffen voor de DR-CALUX te bepalen.

6. Referenties

- Besselink, H.T., Denison, M.S., Hahn, M.E., Karchner, S.I., Vethaak, A.D., Koeman, J.H., Brouwer, A.. 1998. Low inducibility of CYP1A activity by polychlorinated biphenyls (PCBs) in flounder (*Platichthys flesus*): characterisation of the Ah receptor and the role of CYP1A inhibition. *Toxicol. Sci.* 43, 161–171.
- Besselink, H., E. Felzel, A. Jonas, S. van der Linden. 2001. Analysis of Ah-receptor mediated luciferase activity in DR-CALUX® cells. Biodetection Systems b.v. Protocol no. Pe-BDS-004^e.
- Klamer, H.J.C., J. Jorritsma, L. Van Vliet, F. Smedes, J.F. Baker. 2004. Dioxine-achtige toxiciteit in baggerspecie van het Zeehavenkanaal, Delfzijl. Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ.
- Kuiper R., Bergman A., Vos J.G., van den Berg M. 2004 Some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants with wide environmental distribution inhibit TCDD-induced EROD activity in primary cultured carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes. *Aquatic Toxicol.*, 68, 129-139.
- Linden, van der, S.C., H.T. Besselink. 2004. Bepaling van de oestrogene activiteit in watermonsters en oestrogene en dioxine activiteit in zwevend stof extracten met behulp van de ER CALUX en DR CALUX bioassay. BDS rapport nr. BDS-319-481-rap1.hb.
- Machala, M., M. Ciganek, L. Blaha, K. Minksova, J. Vondrack. 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated and estrogenic activities of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and azaarenes originally identified in extracts of river sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2736-2743.

Stemmler, A., R.A. Hites. Electron capture negative ion mass spectra of environmental contaminants and related compounds. ISBN 0-89573-708-6, VCH Publishers, Inc., New York.