

Projectnr.: 71.666.01

Simultaan bepalen van organochloorbestrijdingsmiddelen en polychloorbifenylen

Projectleider: W.A. Traag

Dit project kon gerealiseerd worden dankzij een financiële bijdrage uit het LNV programma 378.

Rapport 2003.010

Juli 2003

Ontwikkelen van een bevestigingsmethode voor de simultane bepaling van polychloorbifenylen (pcb's) en organochloorbestrijdingsmiddelen (oc's) in dierlijke vetten, plantaardige vetten/oliën, vetzuren en diervoeders

G. van der Weg en W.A. Traag

Business Unit: Analyse & Ontwikkeling

Cluster: Bestrijdingsmiddelen en Contaminanten

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2003, RIKILT – Instituut voor Voedselveiligheid
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

business unit managers (2x)

programmaleiders (4x)

marketing & communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Ministerie LNV, Directie Landbouw, (drs. J. Verkerk)

Ministerie LNV, VVA, (drs. M.E. Siemelink, dr. R.M.C. Theelen)

Rijksdienst voor keuring van Vee en Vlees (ing. J.H. Drenth)

Algemene Inspectie Dienst (drs. M. Jansen, G. Kolkman)

	Blz.
INHOUD	1
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODE	5
3 UITGEVOERD ONDERZOEK	6
3.1 Bestaande methode, on-line silica zuivering, uitbreiden	6
3.2 Verkleinen van de LC fractie door gebruik te maken van een universelere on-line zuivering	6
<i>3.2.1 Uitbreiding van het LC systeem met een tweede GPC kolom</i>	6
<i>3.2.2 Uitbreiding van het LC systeem met een korte silica kolom</i>	7
3.3 Off-Line GPC voorzuivering	7
3.4 Off-line opzuivering met behulp van zure silica en in-line opzuivering met twee GPC kolommen	7
3.5 Off-line opzuivering met behulp van zure silica en in-line opzuivering met één GPC kolom	9
3.6 Extractie en opzuivering van diervoeders en diervoedingrediënten	11
4 DATAVERWERKING	13
5 CONCLUSIES	14
6 AANBEVELINGEN	15
 BIJLAGE	
A METHODE 1, METHODE 2, METHODE 3	

SAMENVATTING

Algemeen.

Er is onderzoek uitgevoerd om na te gaan of de in 2000 ontwikkelde methode voor de automatische bepaling van de zeven indicator PCB's in dierlijke vetten en plantaardige vetten en oliën uit te breiden is zodat naast de indicator PCB's ook een aantal organochloorverbindingen in dezelfde analysegang gemeten konden worden. (zie tabel 1) De methode is voor een groot aantal van de organochloorverbindingen toepasbaar, uitzonderingen zijn de dieldrin groep (aldrin, endrin, en dieldrin), de Endosulfan groep (α -Endosulfan, β -Endosulfan en Endosulfan-sulfaat), Methocychloor en β -Heptachloorepoxide. De detectiegrenzen voor de methode zijn afhankelijk van component 0,5 to 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. De methode is geschikt voor dierlijke vetten, plantaardige vetten/oliën en vetzuren.

Technische beschrijving.

Het zonder meer uitbreiden van de nieuwe methode bleek niet goed mogelijk. De gebruikte silica kolom levert een fractie op van ongeveer 1 ml waarin zich alle PCB's bevinden. Om er voor te zorgen dat de van belang zijnde bestrijdingsmiddelen gemeten worden moet de fractie vergroot worden naar enkele ml's. De capaciteit van de groot volume injector is helaas begrenst. Het maximale volume is onder meer afhankelijk van het oplosmiddel, flow etc en ligt op 1,5 tot 2 ml. Het uitgevoerde onderzoek heeft zich gericht op twee aspecten namelijk hardwarematige aanpassing van het meetsysteem en verwerking van de verkregen data.

Uitgaande van de bestaande procedure is nagegaan hoe groot de uiteindelijke fractie zou worden. Dit bleek minstens 3-5 ml te bedragen hetgeen te groot is. Bij het minimaliseren van de kolom werd de te transporteren fractie weliswaar kleiner echter de capaciteit (hoeveelheid op te brengen monster) nam drastisch af. Het toevoegen van een modifier (oplosmiddel met sterker eluerend vermogen) leverde een verkleining van de fractie tot circa 1 ml op, echter er trad ook doorslag van vet op m.a.w. het scheidend vermogen bleek te beperkt. Vervolgens is overgestapt naar een kolom met een universeel karakter namelijk scheiding op basis van molecuul grootte, te weten Gel Permeatie Chromatografie (GPC). Bij het toepassen van GPC is de uit te vangen fractie relatief klein en bevat bijna alle moleculen met een gelijke massa. De uit te vangen fractie is recht evenredig met de kolom diameter. Bij de geteste kolom (diameter 4,6 mm) is deze fractie 1.5 ml. Helaas is de capaciteit van een dergelijke kolom vrij klein namelijk maximaal 1 mg vet. Hierdoor kunnen de gewenste detectiegrenzen niet behaald worden. Het is derhalve nodig om een primaire "off-line" opzuivering toe te passen. Een bestaande en geautomatiseerde methode maakt gebruik van een middelgrote GPC kolom. Bij dit systeem wordt 100 mg vet gezuiverd en de PCB en bestrijdingsmiddelen bevattende fractie wordt na concentreren geïnjecteerd op het groot volume systeem welke voorzien is van, de eerder beschreven kleine GPC kolom. Deze methode werkt voor relatief schone monsters (melkvet, kippenvet etc) goed. In full scan kunnen de monsters geanalyseerd worden. Helaas werkt dit systeem niet voor vetzuren en andere vetten van slechte kwaliteit, dit zijn namelijk net als PCB's en bestrijdingsmiddelen relatief kleine moleculen. Vervolgens is voor de primaire opzuivering gekozen voor een kolom op basis van zure silica. Op deze kolom wordt 50 mg vet of vetzuur gebracht. Het aanwezige vet wordt verbrand en de te bepalen componenten worden van de kolom geëluëerd. De uitgevangen fractie wordt vervolgens na concentreren op het groot volume systeem met in-line GPC opzuivering. Voor de dataverwerking is een nieuwe methode geïntroduceerd Met de ontwikkelde methode kunnen zowel

de PCB's als de organochloor bestrijdingsmiddelen simultaan, in full scan gemeten worden. De primaire opzuivering kan gemakkelijk geautomatiseerd worden. In Tabel 1 zijn de onderzochte componenten weergegeven met hun toepasbaarheid met de beschreven methode. Hieruit blijkt dat een aantal componenten niet met deze methode te analyseren zijn, hetgeen samenhangt met hun gedrag in zuurmilieu (afbraak).

Tabel 1: Overzicht te meten componenten.

Naam	mogelijk met zure silica cleanup
PCB-28	Ja
PCB-52	Ja
PCB-101	Ja
PCB-118	Ja
PCB-138	Ja
PCB-153	Ja
PCB-180	Ja
Pentachloorbenzeen	Ja
Hexachloorbenzeen	Ja
α -HCH	Ja
β -HCH	Ja
γ -HCH	Ja
Heptachloor	Ja
Aldrin	Nee
Endrin	Nee
Dieldrin	Nee
oxy-Chloordaan	Ja
α -Chloordaan	Ja
γ -Chloordaan	Ja
β -Heptachloorepoxide	Nee
tr-Nonachloor	Ja
p,p-DDE	Ja
o,p-DDT	Ja
p,p-DDT	Ja
p,p-TDE	Ja
Methoxychloor	Nee
Toxafeen	Ja
α -Endosulfan	Nee
β -Endosulfan	Nee
Endosulfan-sulfaat	Nee

1 INLEIDING

Tot nu toe werden voor de bepaling van PCB's en een aantal organochloorbestrijdingsmiddelen in het kader van monitoringsprogramma's twee methoden gebruikt. Bij de eerste methode wordt na een extractie en een clean-up de meting uitgevoerd met behulp van gaschromatografie en electron capture detectie (GC-ECD). Met deze methode kunnen de belangrijkste organochloorbestrijdingsmiddelen alsmede twee van de zeven indicator PCB's gemeten worden. Voor de bepaling van de zeven indicator PCB's is in 2000 door het RIKILT een methode ontwikkeld waarbij na een zeer beperkte voorbewerking de monsters on-line opgezuiverd en gemeten worden. Bij deze tweede methode worden diervoeders geëxtraheerd en vetten direct opgelost, een aliquot wordt op een vloeistofchromatograaf (LC) waarin een silica kolom is geplaatst geïnjecteerd. De silica-kolom wordt geëluëerd en de PCB bevatten fractie (circa 1 ml) wordt via de groot volume injector (LVI) getransporteerd naar de gaschromatograaf-massaspectrometer (GC-MS). De massaspectrometer is afgeregeld zodat slechts naar, voor de zeven PCB's, specifieke ionen wordt gekeken. Op deze wijze kan bijzonder gevoelig gemeten worden. Detectiegrenzen zijn ongeveer 0.5 µg/kg (voor PCB's, voor organochloorbestrijdingsmiddelen zijn de detectiegrenzen variërend van 0.5 tot 20 µg/kg). Een groot voordeel van deze geautomatiseerde nieuwe methode is dat detectie plaatsvindt met massaspectrometrie m.a.w. de identiteit van de gemeten analyten is éénduidig. Uit efficiency overwegingen is het wenselijk om deze nieuwe methode uit te breiden met de van belang zijnde organochloor bestrijdingsmiddelen. Het uiteindelijke doel is natuurlijk om in één analysegang de mogelijke aanwezigheid van een groot scala aan mogelijke contaminanten te onderkennen. Niet alleen PCB's en bestrijdingsmiddelen maar b.v. ook PAH's, vlamvertragers etc.

2 MATERIAAL EN METHODE

Het monster materiaal waarvoor de methode toegepast dient te worden bestaat uit de zogenaamde technische vetten afkomstig van RVV diervoeder project (71.578.00). Dit kunnen dierlijke of plantaardige vetten of oliën zijn of residuen uit de raffinage van de plantaardige oliën, vaak worden ook mengsels aangeboden voor onderzoek. Aangeboden monsters vet worden eerst door middel van filtratie over natriumsulfaat gedroogd alvorens in bewerking genomen te worden voor het onderzoek.

De te analyseren componenten zijn: 7 indicator PCB's (CB 28; CB 52; CB 101; CB 118; CB 138; CB 153 en CB 180) en 9 indicator OC's (HCB; γ -HCH; β -HCH; γ -Chloordaan; α -Chloordaan; p,p-DDE; p,p-TDE; o,p-DDT en p,p-DDT) aangevuld met een aantal componenten welke voor bijvoorbeeld voor Het Nationaal Plan en RVV Diervoeder project gemeten dienen te worden (α -HCH; Methoxychlor; oxy-chloordaan; Pentachloorbenzeen; heptachloor; tr-Nonachloor; β -Heptachloorepoxide; Aldrin; Endrin; Dieldrin; Toxafeen; α -Endosulfan; β -Endosulfan en Endosulfan-sulfaat). Analyse van andere PCB's en bestrijdingsmiddelen dient voor toepassing getest te worden. De toe te passen methoden bestaan in grootte lijnen uit een opzuivering van het monstermateriaal, al dan niet in-line gevolgd door een transfer van de LC fractie naar een capillaire gaschromatografische kolom. Voor de detectie wordt gebruik gemaakt van een massaspectrometer.

3 UITGEVOERD ONDERZOEK

De voorkeur gaat uit naar het rechtstreeks in bewerking nemen van het monstermateriaal of te wel directe injectie van een onbehandeld vet extract. Als basis voor de methode wordt uit gegaan van analyse d.m.v. LVI LC-GC-MS conform huidige PCB methode (concept RSV A0917) in vetten en oliën. Een aantal variabelen zijn getest, welke hieronder zijn beschreven het betreft:

3.1 Bestaande methode, on-line silica zuivering, uitbreiden

Bij de huidige methode PCB's wordt 10 mg vet opgelost in 50 µl hexaan en geïnjecteerd. Het LC systeem bestaat uit een kolom van 100 * 2.0 mm kolom met 100 % n-hexaan als mobiele fase. De fractie welke alleen de zeven indicator PCB's bevat is ongeveer 1000 µl groot. De van interesse zijnde organochloorbestrijdingsmiddelen elueren later van de silica kolom. Dit resulteert in een fractie van enkel ml's. Bij injectie op het groot volume systeem bleek dat dit praktisch niet uitvoerbaar is. De maximaal over te brengen fractie bedraagt circa 2 ml. Grotere fracties geven een aanzienlijk verlies van de te bepalen analyten, met name geldt dit voor de meest vluchtige. Daarnaast ontstaat bij de overdracht van grote fractie een onacceptabele piekverbreding

Om het hierboven geschetste probleem op te lossen is getracht om de LC fractie te verkleinen zodat de transfer van de fractie welke zowel de PCB's als de organochloorbestrijdingsmiddelen bevat uitvoerbaar wordt. Door toevoeging van ethylacetaat/cyclohexaan, als modifier, aan de mobiele fase (2%) werd een werkbare LC fractie verkregen (ca 1000 µl). Bij injectie van standaard oplossingen werkte deze methode uitstekend. Problemen traden echter op bij injectie van 10 mg vet op de LC kolom. Het vet retainende karakter was verdwenen, er trad direct vetdoorslag op.

3.2 Verkleinen van de LC fractie door gebruik te maken van een universele on-line zuivering

Hiervoor is een in-line LC methode getest met een GPC kolom. Door het universele karakter van een Gel Permeatie Chromatografie kolom, scheiding op molecuulgrootte (is vergelijkbaar met het molecuulgewicht), kan een kleinere LC fractie naar de GC gestuurd worden. Hiermee werd beoogd rechtstreeks vet te kunnen introduceren waardoor een voorzuivering achterwegen kon blijven. Het systeem bestaat uit een GPC kolom; 150 * 4.6 mm MN GPC kolom, met een mengsel van dichloormethaan/n-hexaan in de verhouding 50:50 als mobiele fase. De naar de GC over te brengen fractie is bij deze methode circa 1200 µl, dus is uitstekend mogelijk. Bij injectie van 10 mg vet op dit systeem wordt echter onvoldoende scheiding verkregen tussen vet en OC/PCB fractie. Tevens komen er veel storende componenten mee.

3.2.1 Uitbreiding van het LC systeem met een tweede GPC kolom

Door combinatie van 2 identieke korte GPC kolommen (elk 150 * 4.6 mm) met als mobiele fase dichloormethaan/n-hexaan wordt een betere scheiding tussen OC/PCB fractie en vet verkregen dan bij één GPC kolom (met dezelfde totale lengte). Bij dit systeem wordt de eerste fractie (bevat het opgebrachte vet) via een kraan naar waste gestuurd. Vervolgens wordt de tweede kolom in lijn gezet en de fractie welke de bestrijdingsmiddelen en PCB's bevat wordt op de tweede kolom verder gezuiverd (Heartcutting). Uit de met deze opstelling uitgevoerde experimenten blijkt dat het systeem met standaarden prima werkt. De over te brengen LC fractie is echter vrij groot. Dit

wordt met name veroorzaakt door β -HCH welke als laatste van de kolom elueert (totale volume is ca 2260 μ l). Door aanwezigheid van storende componenten onder ander vetzuren, welke gedeeltelijk in dezelfde fractie als de te bepalen componenten elueren, treedt er een aanzienlijke interferentie op.

3.2.2 Uitbreiding van het LC systeem met een korte silica kolom

De hierboven genoemde interferenties zouden eventueel voorkomen kunnen worden door gebruik van een additionele silica kolom na de beide GPC kolommen (opstelling zoals beschreven in 3.2.1). De van de tweede GPC kolom eluerende fractie wordt dan over een silica kolom geleid. Deze additionele silica kolom (50 * 2.1 mm silica kolom) geeft echter geen verbetering. Er treedt bij het gebruik van het GPC eluens (dichloormethaan/hexaan) geen retentie voor vet/vetzuren etc. op deze kolom. De hierboven besproken methoden leveren helaas niet het gewenste effect. Geconcludeerd kan worden dat met de geteste kolommen of combinaties hiervan het niet mogelijk is om de te bepalen componenten te scheiden van de matrix en/of in een voldoende kleine fractie.

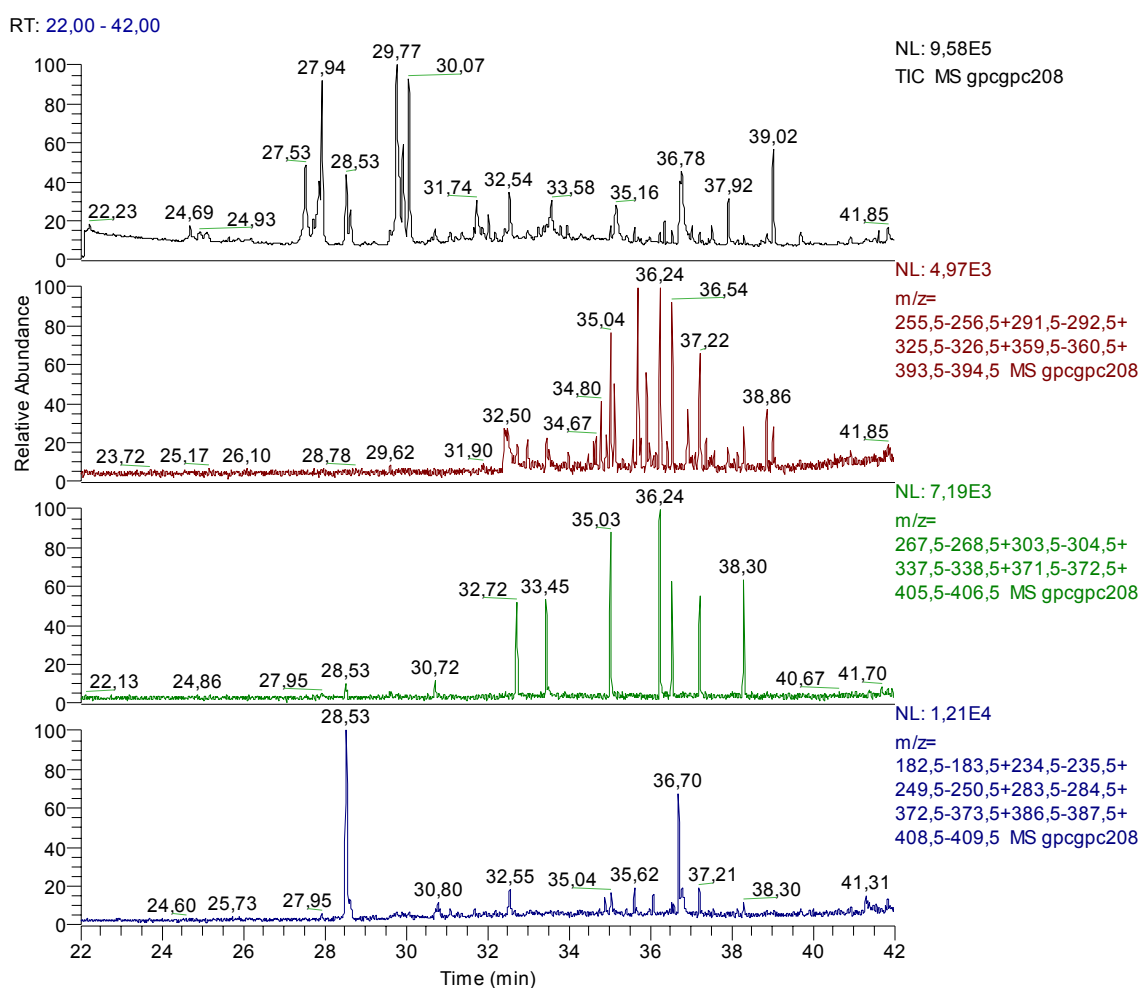
3.3 Off-line GPC voorzuivering

Uit bovenstaande (3.1 en 3.2) blijkt dat voor de gecombineerde bepaling PCB/OC in vetten een extra voorzuivering noodzakelijk is. Hierbij komen een aantal mogelijkheden in aanmerking, zoals GPC of kolom chromatografie met diverse adsorbentia. Een methode gebruikt voor onderzoek naar pesticiden en PCB's in melkvet is beschreven in concept RSV A0918. Deze methode is geschikt voor schonere matrix dan de hier beoogde matrices te weten plantaardige oliën dierlijke vetten, vetzuren en mengsels. Bij deze methode is de voorzuivering van de monsters met behulp van een off-line GPC systeem (Envicarb Waters), 100 mg vet wordt op dit systeem geïnjecteerd. Na concentrering van de uitgevangen fractie wordt het residu opgenomen in 200 μ l hexaan, hiervan wordt vervolgens 50 μ l geïnjecteerd op het LVI-LC-GC-MS systeem (injectie van equivalent van 25 mg vet, praktisch blijkt nog 1 mg vet in de geïnjecteerde hoeveelheid aanwezig). Gebruikte opstelling In-line LC Phenomenex Phenogel 300 * 4.6 mm GPC kolom met cyclohexaan/ethylacetaat (50/50) als loopvloeistof. Voor met name mengsels van vetzuren, de zogenaamde technische vetten, bleek deze methode niet te werken. Dit wordt veroorzaakt door verontreinigingen uit de matrix welke op de GPC kolom een identiek chromatografisch gedrag vertonen als de te bepalen bestrijdingsmiddelen en PCB's. Hierdoor wordt een hoge continue achtergrond in het chromatogram verkregen. Tevens werd de gaschromatograaf door de grote hoeveelheid verontreinigingen vervuild, waardoor de chromatografie sterk verslechterde. De verontreinigingen bestaan onder meer uit vrije vetzuren en sterolen. Deze vetzuren kunnen worden verwijderd door kolomchromatografie met zure silica. Hierbij treedt een destructieve zuivering van de matrix op, gebruik van deze zuivering is hierdoor niet geschikt voor minder stabiele verbindingen (denk aan polycyclische aromatische verbindingen, organofosforbestrijdingsmiddelen etc).

3.4 Off-line opzuivering met behulp van zure silica en in-line opzuivering met twee GPC kolommen

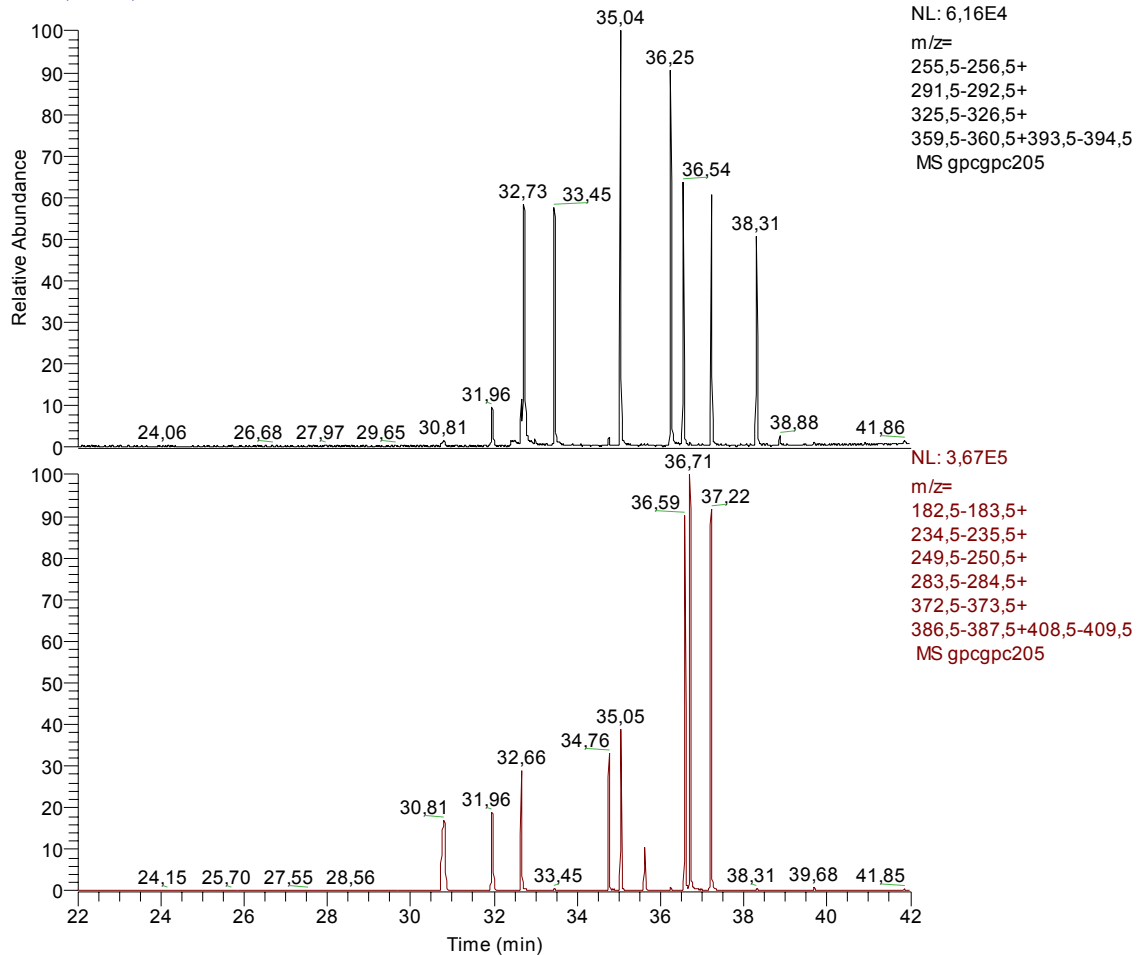
Onderzocht is of het met kolomchromatografie op zure silica mogelijk is een schoner extract te verkrijgen. Het gebruik van 2 gram zure silica bleek noodzakelijk voor de destructie van 50 mg opgebracht vet (melkvet). Hierbij verkleurde, tijdens elutie met hexaan, de silica voor ca. 80 %

van het volume, erop wijzend dat het vet tot zover in de silica is gekomen. Verdere experimenten wezen uit dat voor volledige elutie van de te bepalen componenten 5 ml hexaan noodzakelijk was. (PCB's elueren in fractie tot 4 ml en de OC in de fractie tot 5 ml. Dit eluaat wordt ingedampt tot vrijwel droog en opgenomen in 200 μ l hexaan waaraan de recovery standaard (PCB 198) is toegevoegd. Injectie van 50 μ l van een aantal extracten op de combinatie van twee GPC kolommen (zie b1) gaven "schone" chromatogrammen. Meting is uitgevoerd in full scan (amu 70-490). Het achtergrond signaal bleek op een vergelijkbaar niveau te liggen als voor oplosmiddelen en academische standaarden. Een vetzuur extract werd op deze wijze echter nog onvoldoende gezuiverd (aan de zure silica kolom was zichtbaar dat deze volledig verkleurde terwijl de overige vetten de kolom slechts voor 80 % verkleuren). Voor het betreffende vetzuur monster werd minder materiaal in bewerking genomen namelijk 25 mg in plaats van 50 mg. Gevolg hiervan is echter wel dat een hogere bepalingsgrens dient te worden aangehouden (ca 1 μ g/kg voor PCB's en 1 tot 40 μ g/kg voor OC's).



Figuur 1: Chromatogram van een monster visolie gemeten volgens de methode beschreven onder 3.4. Het bovenste spoor van het chromatogram geeft het TIC (total ion current) van het chromatogram weer gemeten van amu 70 – 490. Het tweede spoor betreft een selectie van specifieke ionen afkomstig van PCB's, de tri; tetra; penta; hexa en hepta gechloreerde congenere. Vervolgens zijn in spoor 3 de specifieke ionen voor de koolstof 13 gelabelde interne standaarden van de PCB's weergegeven. Spoor 4 geeft vervolgens de specifieke ionen voor een aantal organochloorbestrijdingsmiddelen.

RT: 22,00 - 42,00

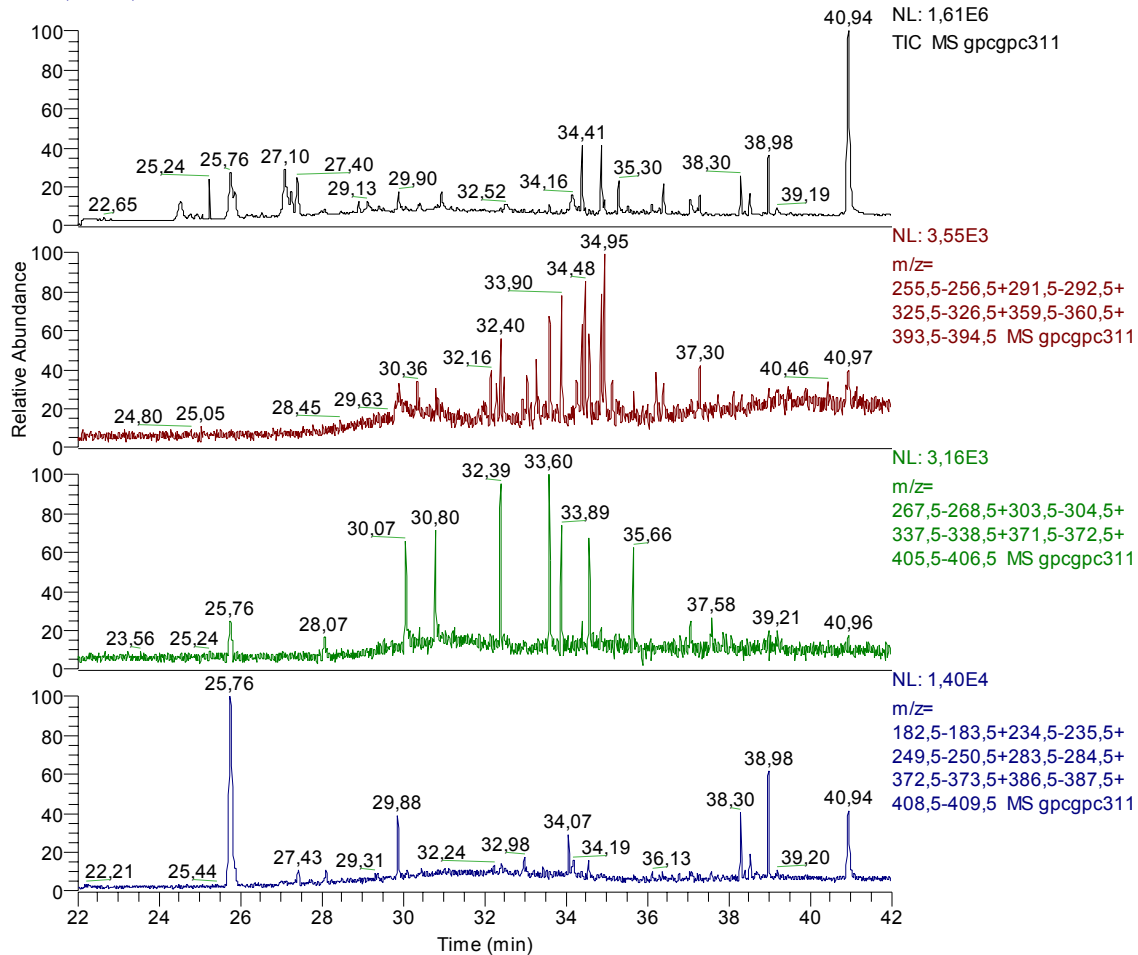


Figuur 2: Het betreft een chromatogram van een oc/pcb standaard oplossing volgens 3.4 gemeten.. Het eerste spoor betreft een specifieke selectie van ionen afkomstig van PCB's, de tri; tetra; penta; hexa en hepta gechlorideerde congenere.. Spoor 2 geeft vervolgens de specifieke ionen voor een aantal organochloorbestrijdingsmiddelen (9 indicator OC's).

3.5 Off-line opzuivering met behulp van zure silica en in-line opzuivering met één GPC kolom

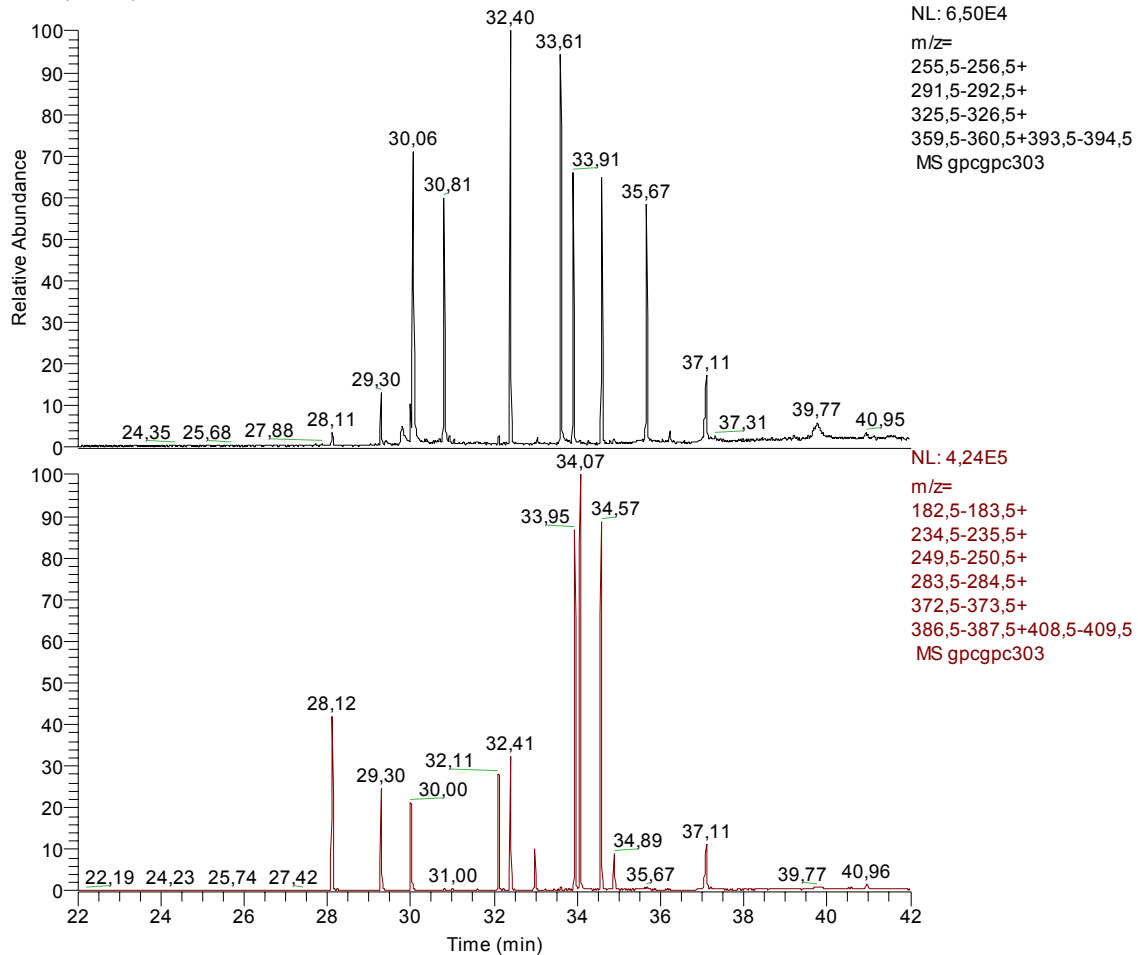
Nagegaan is of het gebruik van een voorzuivering het mogelijk maakt om in plaats van twee GPC kolommen over te gaan op één in-line GPC kolom. Het gebruik van één GPC kolom heeft als voordeel dat de LC fractie welke naar de GC gestuurd wordt kleiner is (ca 1200 µl) en dat systeem minder gecompliceerd is. Mogelijk wordt echter wel meer interferende componenten naar de GC gestuurd. Uit de metingen blijkt (zie figuur 3) dat het achtergrond signaal in de monster extracten op een vergelijkbaar niveau te liggen als bij het gebruik van twee GPC kolommen.

RT: 22,00 - 42,00



Figuur 3: Het betreft een chromatogram van een visolie volgens 3.5 gemeten. Het bovenste spoor van het chromatogram geeft het TIC (total ion current) van het chromatogram weer gemeten van amu 70 – 490. Het tweede spoor betreft een specifieke selectie van ionen afkomstig van PCB's, de tri; tetra; penta; hexa en hepta gechloroerde congenen. Vervolgens is zijn in spoor 3 de specifieke ionen voor de koolstof 13 gelabelde interne standaarden van de PCB's weergegeven. Spoor 4 geeft vervolgens de specifieke ionen voor een aantal organochloorbestrijdingsmiddelen.

RT: 22,00 - 42,00

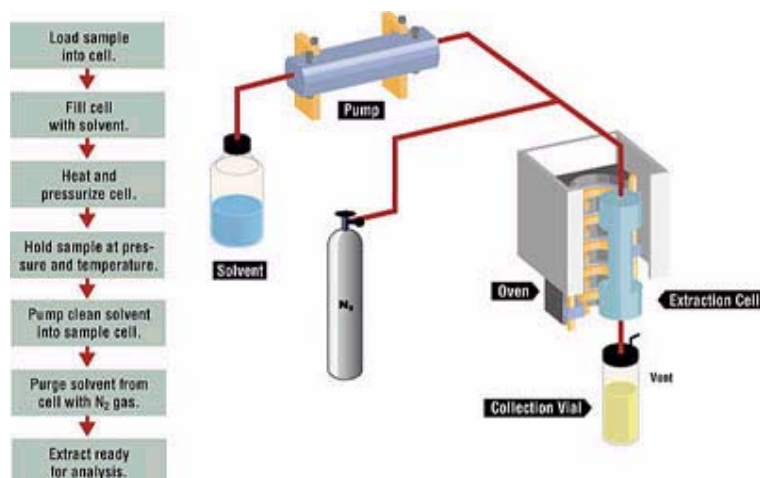


Figuur 4: Het betreft een chromatogram van een oc/pcb standaard oplossing volgens 3.5 gemeten.. Het eerste spoor betreft een specifieke selectie van ionen afkomstig van PCB's, de tri; tetra; penta; hexa en hepta gechloroerde congenere.. Spoor 2 geeft vervolgens de specifieke ionen voor een aantal organochloorbestrijdingsmiddelen (9 indicator OC's).

3.6 Extractie en opzuivering van diervoeders en diervoedingrediënten

Voor de bepaling van PCB's en organochloorbestrijdingsmiddelen werd tot nu toe gebruikt gemaakt van klassieke methoden waarbij de te onderzoeken monsters geëxtraheerd werden met een organische oplosmiddelen en vervolgens gezuiverd met behulp van kolomchromatografie. De extractie vond bij deze methode plaats via Soxhlett gedurende 16 uur of via intensief schudden gedurende eveneens 16 uur. Aansluitend werd een deel opgezuiverd over b.v. Al_2O_3 . Een nadeel van deze methode is de benodigde tijd en dat een groot deel van het extract niet gebruikt wordt. Er is een methode ontwikkeld welke berust op de hierboven genoemde meetmethode (zie 3.3, 3.4 en 3.5) in combinatie met een geautomatiseerde extractie techniek namelijk "Accelerated Solvent Extraction". Bij deze techniek wordt het monster (vast of vast gemaakt), eventueel na mengen met een inert materiaal in een cel gebracht. De cel wordt in de monster carousel

geplaatst en om beurten wordt de cel, via een HPLC pomp, gevuld met een organisch oplosmiddel, mengsels zijn via de solvent selector ook mogelijk. Vervolgens wordt de cel in een oven gebracht en op een vooraf ingestelde temperatuur gebracht. Als gevolg hiervan zal de druk in de cel dus stijgen. De druk en temperatuur worden door het systeem automatisch op de ingestelde waarden gehouden. Een volledige extractie wordt al na enkele tot maximaal 15 minuten bereikt. Het extract wordt vervolgens opgevangen in b.v. een gekalibreerde glazen buis. Hiervoor is dan, afhankelijk van het celvolume 10 tot 40 ml oplosmiddel nodig. Het extract kan vervolgens zonder toezicht gecontroleerd worden ingedampd tot 0,5 of 1,0 ml. In onderstaand figuur is de ASE schematisch weergegeven



Figuur 5 : *schematische weergave van ASE systeem*

Indien alle gewenste componenten bepaald moeten worden dan wordt uitgegaan van 5 gram diervoeder of ingrediënten. Nadat het monster in de extractie buis is geplaatst vindt de extractie conform onderstaand schema plaats. Na extractie en concentrering wordt de meting uitgevoerd conform methode 2 (zie 3.3. en bijlage 1)

Indien alleen PCB's gemeten dienen te worden dan kan er bij de ASE een in-line opzuivering plaatsvinden. In de extractiecel wordt dan eerst 6 gram zure silica geplaatst, bovenop de silica wordt een filter gebracht en vervolgens 2,5 gram monster. Extractie vindt plaats volgens onderstaand schema. Na extractie en concentrering wordt de meting uitgevoerd conform methode 3 (zie 3,4 en bijlage 2)

Extractie schema

De extractiecel wordt in de AE geplaatst en de buis wordt op druk gebracht door er hexaan in te pompen waarbij het volgende parameters werden aangehouden:

Oven temperatuur	:	100 °C
Druk	:	1500 psi
Verwarmingstijd	:	5 minuten
Statische tijd	:	5 minuten
Spoel %	:	60 %
Purge	:	90 seconds
Aantal cycles	:	3

Het verzameld extract wordt geconcentreerd in een turbovap bij 45 °C en 0.7 bar stikstof druk tpt ongeveer 0,5 ml. Na toevoeging van de interne standaard 5 ng 13C- PCB 118 wordt het extract aangevuld tot 1,0 ml

4 DATAVERWERKING

Om het analyseresultaat te kunnen interpreteren dient onder gelijke omstandigheden als de monsters de standaarden gemeten te worden. De retentietijd van iedere standaard, de spectrale informatie, onder andere een ion voor de identificatie (qualifier ion) en een ion voor de kwantificering (quantifier ion) alsmede het bijbehorende oppervlak, wordt opgeslagen in een zgn. quanfile. Aan de hand van deze quanfile vindt de dataprocessing plaats. Indien het spectrum op de juiste retentietijd in het chromatogram van het monster overeenkomstig is met het spectrum van de quanfile dan is de conclusie dat de het monster positief is voor deze component. Een groot nadeel van deze methode is dat monsters en standaarden onder exact dezelfde condities gemeten dienen te worden. Aangezien met name de retentietijd, in de loop van de tijd t.g.v. b.v. vervuiling van de kolom, veranderd dienen deze in de quanfile steeds aangepast te worden. Wanneer we slechts een beperkt aantal componenten willen onderzoeken is dit geen probleem, in de toekomst willen we ons richten op een zeer groot aantal verbindingen. Derhalve is in samenwerking met de leverancier van de gebruikte apparatuur een nieuwe dataverwerking methode geïntroduceerd. Door middel van een rekenkundige methode worden de massa spectra van co-eluerende componenten van elkaar gescheiden. Hierdoor is identificatie van deze co-eluerende componenten mogelijk. Het is een automatische methode waarbij aangenomen wordt dat onzuivere massa spectra welke niet matchen met referentie spectra worden veroorzaakt door gelijktijdig eluerende onbekende componenten.

De retentietijden van eerder opgenomen standaarden worden geïndexeerd. Door het systeem aan de hand van een beperkt aantal standaarden te calibreren kan automatische gecorrigeerd worden voor verandering in de retentietijd. De methode bestaat achtereenvolgens uit de volgende stappen, 1) ruis analyse 2) component opzoeken (aan de hand van retentie tijd / retentie index) 3) spectrale "deconvolution" 4) component identificatie.

5 CONCLUSIES

1. Voor de bepaling van de zeven indicator PCB's in dierlijke vetten en plantaardige vetten/oliën is het gebruik van de in-line opzuivering over een silica kolom de beste methode. LOQ in SIM mode bedraagt voor elke PCB congeneer 0,5 ug/kg vet. Meting in full scan mode heeft geen meerwaarde. De methode is niet geschikt voor vetzuren. (zie concept RSV 917)
2. Voor de bepaling van PCB's (o.a. de zeven indicator PCB's), vlamvertragers en bestrijdingsmiddelen in dierlijke vetten en plantaardige vetten/oliën is de methode met een opzuivering over off-line GPC gevolgd door een additionele opzuivering met behulp van in-line GPC de beste techniek. LOQ in full scan mode is afhankelijk van de component 4 tot 10 ug/kg vet. Deze methode is met name geschikt voor het opsporen van onbekende componenten. In Sim mode, alleen onderzoek naar specifieke componenten is de LOQ een factor 10 tot 20 lager dan meting in full-scan mode (0.4 tot 1 µg/kg, uiteraard per component verschillend, voor slecht ioniseerbare verbindingen hoger). De methode is niet geschikt voor vetzuren (zie concept RSV 918)
3. Voor de bepaling van de zeven indicator PCB's (CB 28; CB 52; CB 101; CB 118; CB 138; CB 153 en CB 180) alsmede een aantal gedefinieerde OC's (HCB; γ -HCH; β -HCH; α -HCH; γ -Chloordaan; α -Chloordaan; p,p-DDE; p,p-TDE; o,p-DDT; p,p-DDT; oxy-chloordaan; Pentachloorbenzeen; heptachloor; tr-Nonachloor; Toxafeen;) in dierlijke vetten en plantaardige vetten/ oliën en vetzuren is de methode met een opzuivering over off-line zure silica gevolgd door een additionele opzuivering met behulp van in-line GPC de beste techniek. Voor de volgende OC's is deze methode **niet** geschikt (Methoxychloor; β -Heptachloorepoxide; Aldrin; Endrin; Dieldrin; α -Endosulfan; β -Endosulfan en Endosulfan-sulfaat). LOQ in SIM mode is afhankelijk van de component 0,5 tot 20 ug/kg. Meting in full scan heeft nauwelijks meerwaarde.
4. Voor de bepaling van PCB's en organochloorbestrijdingsmiddelen in vaste diervoeders (ingrediënten) is extractie met behulp van "Accelerated Solvent Extraction" (ASE) de beste methode. Indien alleen de indicator PCB's en een aantal gedefinieerde OC's (HCB; γ -HCH; β -HCH; α -HCH; γ -Chloordaan; α -Chloordaan; p,p-DDE; p,p-TDE; o,p-DDT; p,p-DDT; oxy-chloordaan; Pentachloorbenzeen; heptachloor; tr-Nonachloor; Toxafeen bepaald dienen te worden kan een in-line opzuivering met behulp van zure silica uitgevoerd worden. Indien alle organochloorbestrijdingsmiddelen bepaald moeten worden dan kan deze in-line opzuivering niet toegepast worden en dienen de extracten off-line opgezuiverd te worden met behulp van GPC

6 AANBEVELINGEN

1. De ontwikkelde methode voor de bepaling van van de zeven indicator PCB's alsmede een aantal gedefinieerde OC's in dierlijke vetten en plantaardige vetten/ oliën, vetzuren en diervoeders dient vastgelegd te worden in een RSV.
2. Afhankelijk van de aangeboden matrix en de vraagstelling dient er een keuze gemaakt te worden uit de hierboven genoemde methoden.
3. De hierboven genoemde drie methoden dienen gevalideerd te worden conform EU richtlijnen voor de volgende matrices:

Methode 1: melkvet

Methode 2: melkvet

Methode 3: mengsel vetzuren en een plantaardige olie (b.v. zonnebloem), diervoeders.

Opmerking : de methoden worden niet gevalideerd voor andere matrices. Bij de analyse van andere matrices zal de functionaliteit van de methoden bewezen worden aan de hand van interne standaarden

(Het principe van flexible scope wordt derhalve gehanteerd)

4 De methode voor de dataverwerking dient in de praktijk getoetst te worden.

5 Het wordt aanbevolen om onderzoek uit te voeren naar een universele in-line opzuivering waarbij de volgende randvoorwaarden gelden:

- Capaciteit dient voldoende groot te zijn om gewenst LOQ te halen (minimale introductie van 25 mg vet).
- De uit te vangen fractie dient alle van interesse zijnde componenten te bevatten.
- De uit te vangen fractie dient niet groter te zijn dan 1500 ul.

BIJLAGE A:

	METHODE 1	METHODE 2 ¹	METHODE 3 ²
Matrix	Dierlijke vetten Plantaardige vetten/oliën Diervoeders	Dierlijke vetten Plantaardige vetten/oliën Diervoeders	Vetzuren (mengsels) Diervoeders
Componenten	PCB's	PCB's hcb, hch's, aldrin, dieldrin, endrin, heptachloor, b-heptachloor-epoxide, chloordaan, DDT's, methoxychloor, oxychloordaan, nonachloor, pentachloorbenzeen α -endosulfan; γ -endosulfan, , endosulfan-sulfaat, toxafeen overige componenten niet getest	PCB's hcb, hch's, heptachloor chloordaan, DDT's, oxychloordaan, nonachloor, pentachloorbenzeen, toxafeen overige componenten niet getest
Methode 1	oplossen vet => on-line silica => GC-MS		
Methode 2	oplossen vet => off-line GPC (>) => on-line GPC (<) => GC-MS		
Methode 3	oplossen vet => zure silica => on-line GPC (<) => GC-MS		

*1 methode geschikt voor nationaal plan

*2 methode geschikt voor RVV