

Projectnr.: 71.496.01

Ontwikkelen van een methode voor de bepaling van nitropak's

Projectleider: W.A. Traag

Opdrachtgever: LNV directie Landbouw, ir. G.H.M. Wellen

Rapport 2001.030

december 2001

ONTWIKKELEN VAN EEN METHODE VOOR DE BEPALING VAN NITRO-PAK'S

Fase 1 Literatuuronderzoek

P. Zomer en W.A. Traag

afdeling: Analyse en Ontwikkeling

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 0317-475400

Telefax 0317-417717

Copyright 2001, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

Business Unit Manager Analyse & Ontwikkeling, mw. Ir. A.E.M. Vermunt

Business Unit Manager Onderzoek & Effecten, dhr. C.P. van der Plasse

EXTERN:

Ministerie LNV, directie DWK, ir. J.A. Cornelese

Ministerie LNV, directie Landbouw, ir. G.H.M. Wellen, dhr. R.G.W. Huibers

Ministerie LNV, directie VVA, drs. R.M.C. Theelen

RIVM, Bilthoven, dr. R.A. Baumann

Keuringsdienst van Waren Oost, Zutphen, drs. J. de Vries

INHOUDSOPGAVE	Blz.
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 VORMING VAN NITRO-PAK'S	6
3 ANALYSE VAN NITRO-PAK'S	7
3.1 Extractie en clean-up	7
3.2 Chromatografie	7
3.3 Detectie	7
3.4 Detectiegrenzen	8
3.5 Welke componenten moeten worden geanalyseerd?	8
4 VOORKOMEN IN HET MILIEU VAN NITRO-PAK'S	9
4.1 Voorkomen in de atmosfeer	9
4.2 Voorkomen van Nitro-PAK's in agrarische producten	9
4.3 Correlatie tussen de gehalten Nitro-PAK's en niet gesubstitueerde PAK's	9
5 TOXICITEIT VAN NITRO-PAK'S	11
6 BLOOTSTELLING EN RISICOBEOORDELING	12
7 AANBEVELINGEN VOOR VERDER ONDERZOEK	13
LITERATUUR	14
BIJLAGEN	
A OVERZICHT ANALYSE METHODEN	
B STRUCTUURFORMULES DIVERSE PAK'S EN PAK-DERIVATEN	
C DE AMES TEST	

SAMENVATTING

Nitro-PAK's zijn polycyclische aromatische koolwaterstoffen waarvan één of meer waterstofatomen gesubstitueerd zijn door een nitro (NO_2) groep. In tegenstelling tot de niet gesubstitueerde PAK's is er relatief weinig onderzoek uitgevoerd naar de toxiciteit en de analyse van nitro-PAK's.

Nitro-PAK's kunnen gevormd worden in dieselmotoren of in de atmosfeer bij een reactie tussen PAK's en bijvoorbeeld N_2O_2 . De gehalten nitro-PAK's in de atmosfeer liggen i.h.a. 10-100x lager dan die van PAK's. De toxiciteit van de nitro-PAK's is tot 10 maal hoger als die van de meest schadelijke PAK te weten benzo[a]pyrene. Van de meeste nitro-PAK's is door gebrek aan relevante gegevens nog geen schatting van de toxiciteit te geven. Over de analyse van nitro-PAK's in agrarische producten is niet veel gepubliceerd, voor wat betreft de analyse in de atmosfeer is meer literatuur beschikbaar. Door de lage concentraties aan nitro-PAK's die in de literatuur beschreven zijn is het noodzakelijk om een methode te hebben met een detectie grens van minstens $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb). De tot nu toe gebruikte analyse methoden zijn i.h.a. uit de volgende stappen opgebouwd: Soxhlett extractie, clean-up over silica-SPE kolommetje en analyse met HPLC-Fluorescentie of GC-MS.

De door de diverse onderzoekers ontwikkelde methoden zijn of vanwege te weinig selectiviteit (HPLC methoden) niet goed toepasbaar of ten gevolge van gecompliceerde derivatiseringsstappen (GC) niet robuust. Met het beschikbaar komen van nieuwe generaties LC-MS systemen lijkt het routinematig onderzoek naar de aanwezigheid van Nitro-PAK's haalbaar. Het gebruik van een mengsel met nitro-PAK's met 2 tot 5 ringen lijkt een goede optie om een methode te ontwikkelen omdat het te verwachten is dat veel andere nitro-PAK's dan ook met deze methode te bepalen zijn.

1 INLEIDING

In de atmosfeer komen veel stoffen voor die agrarische producten, die in de buitenlucht geteeld worden, kunnen besmetten. Voorbeelden van deze contaminanten zijn: dioxinen, polychloorbifenylen (PCB's) en polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's). De stoffen kunnen vanuit de gasfase aan de planten hechten of aan vaste (roet)deeltjes in de lucht adsorberen en dan met deze deeltjes op de planten neerslaan. De aan de planten gehechte stoffen kunnen direct, door consumptie van het gewas, of indirect, b.v. begrazing van weiden door dieren en de daarmee gepaard gaande stapeling in vlees of melk, in de mens terechtkomen. Naar de meeste van deze contaminanten is al veel onderzoek verricht (dioxinen, PCB's en PAK's) maar er zijn ook stoffen waar nog relatief weinig onderzoek naar verricht is. Een voorbeeld hiervan zijn de zogenaamde Nitro-PAK's. Dit zijn PAK's waarbij één of meer waterstofatomen door een nitro (NO_2) groep vervangen zijn. In deze literatuurstudie is gekeken naar de vormingen van deze stoffen, de mogelijkheid van contaminatie van agrarische producten en de chemische analyse van nitro-PAK's.

2 VORMING VAN NITRO-PAK'S

Er zijn twee routes waardoor nitro-PAK's gevormd kunnen worden en in de atmosfeer terecht kunnen komen.

- 1 Tijdens verbranding van fossiele brandstoffen ontstaan nitro-PAK's vooral door electrofiële aromatische substitutie, hierbij worden de isomeren met de grootste resonantie stabilisatie gevormd, voorbeelden zijn 1-nitropyrene, 1-nitronapthalene, 3-nitrofluoranthene en 2-nitrofluorene. De vorming vindt vooral plaats in Dieselmotoren [1].
- 2 In de atmosfeer door reactie van PAK's met N_2O_5 of zuurstof radicalen en NO_x hierbij worden bijvoorbeeld 2-nitropyrene en 2-nitrofluoranthene gevormd [2]

Williams et al [3] melden als mogelijke bron van nitro-PAK's de afbraak van het explosief TNT door micro-organismen in de grond.

Zie voor de structuren van enkele nitro-PAK's bijlage B.

In de atmosfeer kunnen de nitro-PAK's in twee fasen voorkomen, gasvormig en als vaste stof geadsorbeerd aan deeltjes in de lucht (b.v. roet). De verhouding gasvormig/vast verschilt per component [4] en is afhankelijk van de vluchtigheid van de stof.

3 ANALYSEMETHODEN VOOR NITRO-PAK'S

Over de methoden voor analyse van nitro-PAK's in agrarische producten is niet veel gepubliceerd. Wickström et al [5] publiceerden in 1986 een analyse van PAK's en enkele nitro-PAK's in sla. Andere voedingmiddelen waarvan de analyse op nitro-PAK's worden beschreven zijn gegrilde kip, vlees en kaas [6], thee [7] en gedroogde kruiden [8]. Deze producten zijn gemeten om de volgende redenatie: de producten worden gerookt/gegriled, hierbij worden PAK's gevormd, zou dit ook voor nitro-PAK's gelden? Over de analysemethoden voor de bepaling van nitro-PAK's in andere matrices is meer literatuur beschikbaar. Zie voor een overzicht bijlage A. Matrices die hierin beschreven worden zijn luchtfilters, grond en boomschors.

3.1 Extractie en clean-up

Algemeen kan gesteld worden dat de extractie meestal plaats vindt d.m.v. Soxhletextractie of door ultrasoneren van de matrix met oplosmiddel. Schlemitz en Pfannhauser gebruiken superkritische vloeistof extractie (SFE) [7].

Voor de clean-up worden verschillende methoden beschreven zoals solid phase extractie (SPE) [7], HPLC-fractionering [4], Gel Permeatie Chromatografie (GPC) [7], immuno-affiniteitskolom [8] en vloeistof/vloeistof extractie [9]. Meestal wordt er een combinatie van technieken toegepast. De het meest toegepaste techniek is solid phase extractie met een silica kolommetje. Door elutie met opeenvolgend hexaan, dichloormethaan en methanol vind fractionering plaats tussen alifatische koolwaterstoffen en PAK's, nitro-PAK's en de meer polaire componenten.

3.2 Chromatografie

Voor de scheiding van de nitro-PAK's worden vooral HPLC (zie review van Cvaka et al [10]) en GC gebruikt, Tyrpien beschrijft het gebruik van dunne laag chromatografie (TLC) [11]. HPLC heeft als voordeel dat dit bij lage temperatuur plaats vind en er dus geen kans is op temperatuurdegradatie van de analytes. Degradatie van de nitro-PAK's in het GC-injectiesysteem, op de kolom en in de MS interface worden door Sweetman et al [12] en Tong et al [13] beschreven. In latere publicaties over GC methoden wordt niet meer over dit probleem gesproken. Het voordeel van GC boven HPLC is het grotere scheidend vermogen van GC.

3.3 Detectie

Als detectiemethode wordt bij HPLC analyse meestal fluorescentie detectie gebruikt. In tegenstelling tot niet gesubstitueerde PAK's vertonen nitro-PAK's geen fluorescentie Dit komt door de sterk elektronenzuigende NO₂-groep. Door de NO₂-groep te derivatiseren tot een NH₂-groep kan fluorescentie wel als detectietechniek gebruikt worden. De detectie techniek voor HPLC waarmee met de hoogste gevoeligheid gemeten kan worden is chemluminescentie, voor de bepaling van nitro-PAK's is deze techniek heel selectief [10]. Massaspectrometrie als detectietechniek bij LC is nog niet uitgebreid toegepast, zie Cvacka [10] voor enkele toepassingen met 'antieke' LC-MS apparaten als moving-belt. Moderne ionisatie technieken zoals electrospray zijn nog weinig beschreven. Williams en Perreault [3] beschrijven een poging maar zijn er (nog) niet in geslaagd een goed werkend LC-MS systeem te maken. MS met injectie van standaarden gaat wel goed. het probleem is het vinden van een LC combinatie (kolom/eluens) die een goede chromatografie van de nitro-PAK's geeft en geen problemen veroorzaakt bij de MS detectie.

Bij de GC analyses wordt meestal MS als detectietechniek gebruikt. Zowel elektron impact (EI) (b.v. Schlemitz en Pfannhauser [7]) als negatieve chemische ionisatie (NCI) met methaan [4] [2] als reagent gas. Naast MS wordt ook de electron capture detector (ECD) toegepast [2]. [14]. Jinhui en Lee [15] derivatiseren de nitro-PAK's tot de overeenkomstige fluor verbinding en meten de derivaten met een ECD, dit geeft een hogere gevoeligheid en een betere sample-clean-up

3.4 Detectiegrenzen

Uit het weinige onderzoek dat gedaan is naar de gehalten nitro-PAK's in agrarische producten komen gehalten van 0,1- enkele ppb's ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [5, 6]. Een andere schatting van de gehalten nitro-PAK's in planten is uit de literatuur over PAK's en nitro-PAK's in de lucht en PAK's in voedingsmiddelen te halen. Uit de literatuur blijkt dat de verhouding tussen nitro-PAK's en niet gesubstitueerde PAK's in planten en in de atmosfeer gelijk is [5]. In de atmosfeer liggen de gehalten nitro-PAK's minstens 10x lager dan de gehalten niet gesubstitueerde PAK's [16]. In het rapport van Schouten [17] worden gehalten aan niet gesubstitueerde PAK's in voedingsmiddelen van 2-130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ voor de som van 16 PAK's genoemd. Hieruit valt de conclusie te trekken dat het gehalte nitro-PAK's rond het gebied 0,1- 1 ppb zal liggen en dat een detectie grens van 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dus zeker noodzakelijk is.

3.5 Welke componenten moeten worden geanalyseerd?

Er zijn vele nitro gesubstitueerde PAK's die gemeten kunnen worden. Voor niet gesubstitueerde PAK's zijn er enkele verschillende groepen PAK's die gemeten worden. In Nederland soms 10, soms 12 [18], de Amerikaanse EPA hanteert een lijst met 16 PAK's. Maar voor het grootste deel zijn deze lijsten overlappend. Het is dus zeker in grote lijnen bekend welke PAK's geanalyseerd dienen te worden. Voor Nitro-PAK's bestaat zo'n lijst nog niet en is het, door het gebrek aan toxicologische data, moeilijk zo'n lijst op te stellen.

Als startpunt kunnen in ieder geval de componenten genomen worden die door Collins et al [19] een PEF waarde gegeven zijn omdat er voldoende bewijs was dat ze carcinogeen zijn. Dit zijn 1-nitropyrene, 4-nitropyrene, 1,6-dinitropyrene, 1,8-dinitropyrene, 6-nitrocrysene en 2-nitrofluorene. Maar ook andere nitro-PAK's kunnen een gezondheidsrisico inhouden (zie hoofdstuk 5). Er zijn meer dan 40 componenten die als standaard stof verkocht worden [10]. Misschien is het een goede keuze om de stoffen te meten die tot nu toe in atmosfeer gemeten zijn. Hierdoor worden nog 9-nitroantracene, 3-nitrofluorene, 2 nitropyrene, 1,6-dinitropyrene, 4 nitrobifenyyl, 1-nitronaphtalene 3-nitrofluranthene, 2-nitronaphtalene en 7 nitrobenz[a]anthracene aan de lijst toegevoegd. Dit geeft al een lijst van in totaal 14 componenten. In geen van de literatuurartikelen wordt gemeld op welke gronden de te meten componenten gekozen zijn. Enkele van deze componenten zijn ook gedeutereerd te verkrijgen. Deze gedeutereerde verbindingen kunnen bij MS metingen als interne standaard gebruikt worden. Dit is belangrijk voor een goede kwantificering, zeker bij LC-MS metingen. Een andere benadering voor de methodeontwikkeling is het nemen van nitro-PAK's met 2,3,4 en 5 ringen met de veronderstelling dat verbindingen met een andere structuur maar evenveel ringen ook vergelijkbare resultaten zullen opleveren. Een mogelijke combinatie zou dan 1-nitronaphtalene, 9-nitroanthracene, 1-nitropyrene en 6-nitrobenzo[a]pyrene zijn.

4 VOORKOMEN IN HET MILIEU VAN NITRO-PAK'S

4.1 Voorkomen in de atmosfeer

De gehalten nitro-PAK's in de atmosfeer liggen 10-100 maal lager als de gehalten van PAK's [16]. Binnen de nitro-PAK's liggen de gehalten van de dinitro-PAK's 10 maal lager als de mono nitro-PAK's. [10].

4.2 Voorkomen van Nitro-PAK's in agrarische producten

Nitro-PAK's kunnen op 3 manieren agrarische producten contamineren.

- 1 Nitro-PAK's in de lucht (in de gasfase of als vaste stof gehecht aan deeltjes, b.v. roet in de lucht) slaan neer/worden opgenomen op/door agrarische producten.
- 2 Contaminatie tijdens behandeling van producten (b.v. grasbrokken over open vuur).
- 3 Nitro-PAK's in grond en grondwater, opname tijdens de groei door planten, dit proces geeft een kleine bijdrage [20].

Voor de contaminatie tijdens de groei is vooral proces 1 belangrijk [20].

De hoeveelheid contaminatie hangt af van de manier waarop de besmetting plaats vindt. Als dit via de neerslag van roetdeeltjes plaats vind is het 'horizontale oppervlak' van de plant van belang. Vind de contaminatie echter plaats via opname door de plant van nitro-PAK's uit de gasfase dan is het totale bladoppervlak de bepalende factor. [20]

Schouten [17] meldt dat met betrekking tot de analyse van PAK's die aan deeltjes gehecht neerslaan op planten vooral de extractie van de PAK's van de deeltjes af extra aandacht verdient. Dit geldt waarschijnlijk in dezelfde mate voor nitro-PAK's.

Dinitropyrenen komen voor in Japanse grond in stedelijke gebieden [21], 1,3- 1,6- en 1,8-dinitropyrene veroorzaken tot 50% van de mutageniciteit van de grond in de Ames test. Als de nitro-PAK's vanuit de lucht neerslaan op grond is er ook neerslag op agrarische producten.

4.3 Correlatie tussen de gehalten nitro-PAK's en niet gesubsitueerde PAK's

Als er een goede correlatie bestaat tussen bijvoorbeeld de concentratie 1-nitropyrene en andere nitro-PAK's zou het meten van alleen 1 nitropyrene (die de hoogste concentratie van de nitro-PAK's heeft die in de atmosfeer gemeten zijn) voldoende kunnen zijn. Dit zelfde zou op kunnen gaan voor een verband tussen de concentraties nitro-PAK's en niet gesubsitueerde PAK's. Dit zou de analyse aanmerkelijk vereenvoudigen omdat de concentraties niet gesubsitueerde PAK's 10-100x hoger liggen als de nitro-derivaten.

Fielberg [16] heeft de correlatie tussen de concentratie nitro-PAK's onderling (zie tabel 2) en tussen nitro-PAK's en niet gesubsitueerde PAK's (zie tabel 3) onderzocht. De data heeft betrekking op de meting van de atmosfeer in een landelijk gebied.

Tabel 2: Correlatie tussen de concentraties van nitro-PAK's in de atmosfeer onderling [16]

	9-nitroantracene	2-nitrofluoranthene	3-ityrofluoranthene	1-nitropyrene
2-nitrofluoranthene	<i>0,76</i>			
3-nitrofluoranthene	-0,01	0,10		
1-nitropyrene	0,12	0,06	0,45	
2-nitropyrene	0,30	<i>0,86</i>	0,14	-0,07

vet: significant ($P < 0,05$)

cursief: significant ($P < 0,001$)

Tabel 3: Correlatie tussen de concentraties nitro-PAK's en enkele PAK's in de atmosfeer [16]

	Benz[a]anthracene	Chrysene	Benzo[e]pyrene	Benzo[a]pyrene
9-nitroantracene	0,65	0,67	0,67	0,66
2-nitrofluoranthene	<i>0,86</i>	<i>0,89</i>	<i>0,86</i>	<i>0,86</i>
3-nitrofluoranthene	-0,06	-0,05	-0,08	-0,04
1-nitropyrene	0,04	0,03	0,02	0,06
2-nitropyrene	0,69	0,71	0,70	0,69

vet: significant ($P < 0,01$)

cursief: significant ($P < 0,001$)

Uit tabel 2 blijkt dat 1-nitropyrene niet als marker voor nitro-PAK's gebruikt kan worden; er is nauwelijks correlatie.

De correlatie tussen sommige nitro en niet gesubstitueerde PAK's is beter. Vooral voor de nitro-PAK's die in de atmosfeer gevormd worden (b.v. 2-nitropyrene), dit is te verklaren uit het feit dat die nitro-PAK's in de atmosfeer gevormd worden, een hogere concentratie van de niet gesubstitueerde PAK zal dan ook tot meer nitro-PAK's leiden.

Smeltz en Pfannhauser [7] konden niet meer correlatie tussen PAK's en Nitro-Pak's in thee bepalen dan dat er altijd PAK's worden aangetroffen als er nitro-PAK's worden gevonden.

De correlatie tussen de verschillende componenten is erg wisselend tussen de verschillende meet lokaties, zijn zijn geen algemenen conclusies uit te trekken. [16].

5 TOXICITEIT VAN NITRO-PAK'S

De toxiciteit van verschillende componenten wordt onder andere gemeten met behulp van een test met bacterien, de zgn. AMES test. Zie voor een beschrijving van de Ames test bijlage C.

Uit de Ames test blijkt dat, afhankelijk van de gebruikte bacterie, de di-nitro-PAK's 50-250 x mutagener zijn dan de mono-nitro-PAK's [22] + referenties hierin. Hieruit blijkt dat de di-nitro-PAK's ondanks de lagere concentraties een minstens even grote invloed op de gezondheid hebben als de mono gesubstitueerde PAK's. De Ames test is niet de enige informatie die gebruikt wordt om de carcinogeniteit van een stof te bepalen. Collins *et al* [19] hebben geprobeerd de verschillende onderzoeken naar de carcinogeniteit van PAK's en nitro-PAK's te combineren en een "Potency Equivalence Factor" (PEF) op te stellen. Deze factor drukt de mogelijkheid van een stof om kanker te veroorzaken uit. Benzo[a]pyrene, de schadelijkste niet gesubstitueerde PAK kreeg de waarde één, voor de andere stoffen werd de relatieve waarde ten opzichte van benzo[a]pyrene bepaald. Zie voor de PEF waarden van enkele nitro-PAK's tabel 1.

Er zijn ook andere pogingen geweest om de verschillen in toxiciteit tussen verschillende PAK's en derivaten hiervan te kwantificeren. Een voorbeeld hiervan is een lijst met voorgestelde toxiciteits factoren voor PAK's [18], echter hierin worden alleen niet gesubstitueerde PAK's genoemd. Er is nog geen internationaal aanvaarde norm voor toxiciteits factoren voor al dan niet gesubstitueerde PAK's zoals die er voor dioxinen en PCB's wel is.

Tabel 1: PEF-waarden voor Benzo[a]pyrene en enkele nitro-PAK's [19]

Component	PEF
Benzo[a]pyrene	1
1-Nitropyrene	0,1
4-Nitropyrene	0,1
1,6-Dinitropyrene	10
1,8-Dinitropyrene	1
6-Nitrocrysene	10
2-Nitrofluorene	0,01

Uit Tabel 1 blijkt dat sommige nitro-PAK's schadelijker zijn dan benzo[a]pyrene maar dat andere even schadelijk zijn als niet gesubstitueerde PAK's. Dat er maar voor 6 nitro-PAK's een PEF-waarde bepaald is heeft te maken met het gebrek aan toxicologische informatie voor andere nitro-PAK's, dit wil zeker niet zeggen dat deze andere nitro-PAK's niet schadelijk voor de mens zijn.

6 BLOOTSTELLING EN RISICOBEOORDELING

De informatie over de hoeveelheden Nitro-PAK's in primaire agrarische producten is erg beperkt. De gegevens over Nitro-PAK's in de lucht zijn talrijker. Wickström et al [5] toonden in sla PAK's en enkele nitro-PAK's aan en vonden overeenkomsten tussen de verhoudingen tussen de verschillende PAK's in de atmosfeer en in sla monsters. Het lijkt dus gerechtvaardigd de gegevens voor de atmosfeer te gebruiken voor een schatting van de risico's van agrarische producten.

De concentratie waarmee de nitro-PAK's voorkomen in de atmosfeer ligt 10-1000 maal lager dan die van de niet gesubstitueerde PAK's. Maar de weinige toxiciteitsgegevens die bekend zijn over Nitro-PAK's geven voor enkele verbindingen een toxiciteit die 10x hoger ligt dan die voor de schadelijkste PAK, benzo[a]pyrene. De schadelijkheid van de verschillende Nitro-PAK's ligt daarmee in dezelfde orde van grote als een aantal niet gesubstitueerde PAK's. In ieder geval de meest schadelijke nitro-PAK's zouden moeten meegenomen worden als de gevaren van de totale hoeveelheid PAK's in bepaalde producten wordt bekeken. Dit geldt zeker voor die gevallen waarbij de PAK contaminatie uit de atmosfeer plaatsvindt omdat er dan zeer waarschijnlijk ook contaminatie met nitro-PAK's optreedt. Uit de nu beschikbare data komen 1,6-dinitropyrene en 6-nitrochrysene naar voren als de toxicologisch meest relevante stoffen. Door het gebrek aan toxicologische data is een verdere onderverdeling lastig, meer toxicologische data zou duidelijkheid kunnen scheppen.

Over de totale blootstelling van mensen aan Nitro-PAK's is geen data beschikbaar.

7 AANBEVELINGEN VOOR VERDER ONDERZOEK

Voor het bepalen van de risico's van Nitro-PAK's voor mens en dier is het verkrijgen van inzicht in onder andere de hoeveelheden Nitro-PAK's waaraan men wordt blootgesteld van groot belang.

Vanwege het ontbreken van gevalideerde methoden voor de meting op laag niveau (≤ 1 ppb) is het ontwikkelen van een analysemethode noodzakelijk. Gezien de fysisch/chemische eigenschappen van Nitro-Paks lijkt LC-MS lijkt de aangewezen techniek.

Nadat de methode ontwikkeld en gevalideerd is kan een surveillance naar Nitro-PAK gehalten in nederlandse voedingsmiddelen inzicht geven in de aard van het probleem. Naar aanleiding van de resultaten van het survey-onderzoek kan besloten worden tot het opzetten van een monitoringsprogramma.

LITERATUUR

1. Enya, Y., et al., *3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates*. Environ. Sci. Technol., 1997. **31**: p. 2772-2776.
2. Douce, D.S., et al., *Evidence for the adsorption of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by tree bark*. J. Chromatogr. A, 1997. **786**: p. 275-283.
3. Williams, T.T.J. and H. Perreault, *Selective detection of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by electrospray ionization mass spectrometry and constant neutral loss scanning*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2000. **14**: p. 1474-1481.
4. Dimashki, M., S. Harrad, and R.M. Harrison, *Measurements of nitro-PAH in the atmospheres of two cities*. Atmos. Environ., 2000. **34**: p. 2459-2469.
5. Wickström, K., et al., *Polycyclic aromatic compounds*. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1986. **183**: p. 182-185.
6. Schlemitz, S. and W. Pfannhauser, *Analysis of nitro-PAHs in food matrices by on-line reduction and high performance liquid chromatography*. Food Addit. Contam., 1996. **13**(8): p. 969-977.
7. Schlemitz, S. and W. Pfannhauser, *Supercritical fluid extraction of mononitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from tea - correlation with the PAH concentration*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, 1997. **205**: p. 305-310.
8. Spitzer, B., et al., *Determination of 1-nitropyrene in herbs after selective enrichment by a sol-gel-generated immunoaffinity column*. J. Chromatogr. A, 2000. **880**: p. 113-120.
9. Kuo, C.-T. and H.-W. Chen, *Determination of 1,3- 1,6-, 1,8-dinitropyrene and 1-nitropyrene in airborne particulate by column liquid chromatography with electrochemical detection*. J. Chromatogr. A, 2000. **897**: p. 393-397.
10. Cvaka, J., et al., *High-performance liquid chromatography of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons*. Analyst, 1998. **123**: p. 9R-18R.
11. Tyrpién, K., B. Jonoszka, and D. Bodzek, *Application of planar chromatography to the analysis of polycyclic aromatic compounds and their derivatives in environmental samples*. J. Chromatogr. A, 1997. **774**: p. 111-120.
12. Sweetman, J.A., F.W. Karasek, and D. Schuetzle, *Decomposition of nitropyrene during gas chromatographic-mass spectrometric analysis of air particulate and fly-ash samples*. J. Chromatogr., 1982. **247**: p. 245-254.
13. Tong, H.Y., J.A. Sweetman, and F.W. Karasek, *Quantitation of 1-nitropyrene in diesel exhaust particulates by capillary gas chromatography-mass spectrometry and capillary gas chromatography*. J. Chromatogr., 1983. **264**: p. 231-239.
14. Jinhui, X. and F.S.C. Lee, *Quantification of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter*. Anal. Chim. Acta, 2000. **416**: p. 111-115.
15. Jinhui, X. and F.S.C. Lee, *Analysis of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons*. Chemosphere, 2001. **42**: p. 245-250.
16. Fielberg, A., *Atmospheric chemistry of polycyclic aromatic compounds with special emphasis on nitro derivatives*. 2000, Risø National Laboratory: Risø, Denemarken.
17. Schouten, A., *Polycyclische aromatische koolwaterstoffen in voeding*. 1988, TNO: Zeist.
18. Traag, W., et al., *Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) in diervoeders, dierlijke vetten, plantaardige oliën/vetten, vetzuren en dergelijke*. 2001, RIKILT.

19. Collins, J.F., et al., *Potency Equivalency Factors for some polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives*. Regul. Toxicol. Pharm., 1998. **28**: p. 45-54.
20. Böhme, F., K. Welsch-Pausch, and M.S. McLachlan, *Uptake of airborne semivolatile organic compounds in agricultural plants: field measurements of interspecies variability*. Environ. Sci. Technol., 1999. **33**: p. 1805-1813.
21. Watanabe, T., et al., *Mutagenic activity of surface soil and quantification of 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene isomers in soil in Japan*. Chem. Res. Toxicol., 2000. **13**: p. 281-286.
22. Purohit, V. and A.K. Basu, *Mutagenicity of nitroaromatic compounds*. Chem. Res. Toxicol., 2000. **13**(8): p. 673-692.
23. Vincenenti, M., et al., *Sub-parts-per-billion determination of nitro-substituted polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter and soil by electron capture tandem mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1996. **7**: p. 1255-1265.
24. Murayama, M. and K.D. Purnendu, *Liquid Chromatographic Determination of nitro-substituted polynuclear aromatic hydrocarbons by sequential electrochemical and fluorescence detection*. Anal. Chem., 1996. **68**: p. 1226-1232.
25. Bonfanti, L., et al., *Simultaneous identification of different classes of hydrocarbons and determination of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons by means of particle beam liquid chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1996. **728**: p. 359-369.
26. Fu, P.P., et al., *Relationships of structures of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons with high-performance liquid chromatography retention order*. J. Chromatogr., 1993. **642**: p. 107-116.
27. Liu, T.-Y. and A. Robat Jr., *High-performance liquid chromatography retention index and detection of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons*. J. Chromatogr., 1991. **539**: p. 1-14.
28. Bezabeh, D.Z., et al., *Negative ion laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1997. **8**: p. 630-636.
29. Watanabe, T., et al., *High-performance liquid chromatography-fluorescence determination of dinitropyrenes in soil after column chromatographic clean-up and on-line reduction*. J. Chromatogr. A., 1999. **839**: p. 41-48.

BIJLAGE A: OVERZICHT ANALYSEMETHODEN

Zie voor overzicht van de HPLC methoden tot 1998 de review van Cvaka [10]

- Matrix : gedroogde kruiden [8], thee [7]
Extractie : ultrasoon met ACN [8]
Supercritical fluid extraction [7]
Soxhlet ACN 3h [7]
ultrasoon ACN/H₂O 20m [7]
Clean-up : GPC, imuno kolom [8]
L/L extractie (na ultrasoon) [7]
GPC + SPE silica (alles) [7]
Scheiding : HPLC RP [8]
GC [7]
Detectie : Fluorescentie na katalytische reductie tot amine [8]
MSD SIM [7]
- Matrix : lucht filters
Extractie : Soxhlet met DCM 24h [4]
ultrasoon toluen [23]
Soxhlet met DCM 24h + ultrasoon MeOH/H₂SO₄ 85:15 [24]
ultrasoon benzeen/EtOH 3:1 [9]
Clean-up : silica SPE, NP-HPLC (PAH en NPAH fractie) [4]
geen [23] [24]
L/L extractie [9]
Scheiding : HPLC RP [4] en GC [4]
GC [23]
HPLC RP [24]
HPLC RP [9]
Detectie : Fluorescentie van amine [4] en NCI-MS [4]
NCI MS/MS [23]
Electrochemical en Fluorescentie detectie [24]
Electrochemical [9]
- Matrix : standaarden
Scheiding: TLC [11]
NP-HPLC [25]
NP en RP HPLC [26]
HPLC RP [27]
HPLC RP [3]

Detectie: Fluorecentie en MS [11]
UV + particle beam MS [25]
UV-DAD [26]
UV-DAD en fluorecentie van amime [27]
ESI - MS [3]
laser desorptie TOF - MS [28]

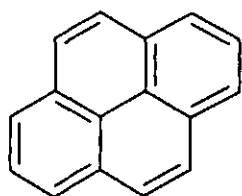
Matrix : grond
Extractie : Soxhlet Toluene/MeOH 1:1 15h [23]
2x ultrasoon MeOH 15 min[29]
Clean-up : silica-gel SPE [23]
silica kolom, 2 hplc ods kolomen (fractionering) [29]
Scheiding : GC [23]
HPLC RP [29]
Detectie : NCI MS/MS [23]
fluorecentie na reductie tot amines [29]

Matrix : Boomschors [2]
Extractie : Soxhlet DCM 96h
Clean-up : SPE amino en silica
Scheiding : GC
Detectie : ECD of NCI-MS

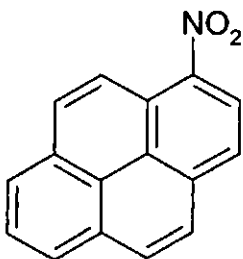
Matrix : Voedingmiddelen: gerookt/gegrild vlees, vis en kaas [6]
Extractie : Soxhlet ACN 4h (vlees)
ultrasoon ACN/H₂O 20m (andere voeding)
Clean-up : L/L extractie met hexaan (andere voeding)
GPC (Alles)
Scheiding : GC
HPLC RP
Detectie : MS (GC)
fluorecentie van amine (HPLC)

Matrix : Sla [5]
Extractie: Ultra-Turrax met ACN
Clean-up: L/L extractie en Silica kolom clean-up
Scheiding: GC
Detectie: SIM-MS

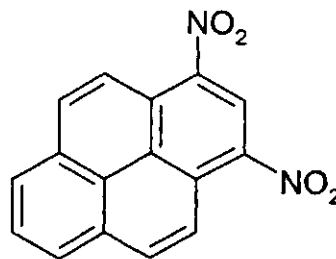
BIJLAGE B: STRUCTUURFORMULES DIVERSE PAK'S EN PAK-DERIVATEN



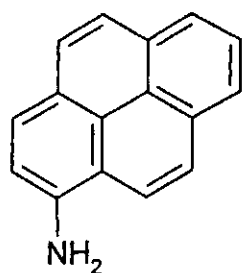
pyrene



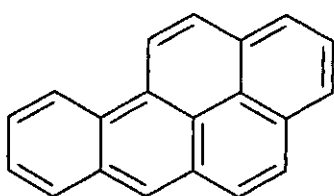
1-nitropyrene



1,3-dinitropyrene



1-aminopyrene



benzo[a]pyrene

BIJLAGE C: AMES TEST

Om te bepalen hoe mutageen stoffen zijn wordt er vaak gebruik gemaakt van de AMES test. Bij deze test worden bacteriestammen van de bacterie *Salomonella typhimurium* gebruikt die kunstmatig enkele defecten in het DNA hebben. Tijdens de groei van de bacteriën muteert in een aantal gevallen dit defect spontaan terug naar de oorspronkelijke volgorde. Als een component na toevoeging een groter aantal mutaties terug naar het oorspronkelijke DNA veroorzaakt wordt deze stof mutageen genoemd. Er wordt onderscheid gemaakt tussen 2 'soorten' mutagene stoffen. 'direct acting' mutagenen hebben na toevoeging direct effect op de bacteriën 'non-direct acting' mutagenen moeten eerst gemetaboliseerd worden tot een mutagene metaboliet. Om dit onderscheid te maken wordt er tijdens de test aan de bacteriën het zogenaamde S9-homogenaat toegevoegd, dit is een extract van lever cellen die de stoffen kunnen metaboliseren. Als een stof S9 nodig heeft om het DNA te veranderen is het een 'non-direct acting mutagen', dit zijn bijvoorbeeld de PAK's. Is een stof ook mutageen zonder S9 is het een 'direct acting mutagen'. De waarden die gevonden worden in de Ames test wisselen per gebruikte bacteriestam met een ander DNA-defect, niet elke stof heeft evenveel invloed op bepaalde mutaties.