Co Schipper

Rijksinstituut voor Kust en Zee/*RIKZ*

Standaardvoorschrift **RIKZ/SPECIE-7**

OPWERKING VAN MONSTERS SEDIMENT VOOR DE BEPALING VAN DE AANWEZIGHEID VAN DIOXINE-ACHTIGE STOFFEN MET BEHULP VAN DE DR-CALUX ASSAY

Trefwoorden: Extractie, DR-CALUX, toxiciteit

1. Onderwerp

Een belangrijke groep milieu-toxicanten die als zeer giftig wordt beschouwd zijn de polychloordibenzo-p-dioxinen (PCDD) en polychloordibenzofuranen (PCDF), bekend onder de verzamelnaam dioxinen (PCDD/F). Deze groep verbindingen bestaat uit in totaal 210 congeneren, waarvan er slechts 17 toxisch relevant worden geacht. Deze 17 hebben als gemeenschappelijk kenmerk dat ze allen chlooratomen op de 2 -, 3- , 7- en 8-positie bezitten.

Voor een kwantitatieve bepaling van dioxinen wordt gewoonlijk gebruik gemaakt van gaschromatografie in combinatie met (hoge-resolutie) massaspectrometrie (GC/HRMS). Als alternatief kan voor de bepaling van de aanwezigheid van dioxinen in een monster ook gebruik worden gemaakt van de DR-CALUX assay. Evenals bij de GC/HRMS methode wordt het gehomogeniseerde en gedroogde monster geëxtraheerd en wordt het ruwe extract gezuiverd m.b.v. kolomchromatografie.

2. Toepassingsgebied

Dit werkvoorschrift beschrijft de opwerkingsmethode voor monsters sediment bij toepassing van de DR-CALUX assay.

3 WERKWIJZE

3.1 PRINCIPE VAN DE METHODE

Het veldvochtige monster wordt na vriesdrogen geëxtraheerd met een mengsel van hexaan en aceton middels een Soxhletextractie. Na een clean-up over een zgn. multi-layerkolom wordt het eind-extract geconcentreerd tot een klein volume.

3.2 APPARATUUR, HULPMIDDELEN EN STANDAARDEN

3.2.1 Chemicaliën en reagentia

• hexaan	:	HPLC-grade
• aceton	:	HPLC Glass Distilled Grade
• silicagel	:	mesh 60
• natriumsulfaat (watervrij)	:	p.a.
• zilvernitraat	:	p.a.
• natriumhydroxide	:	p.a.
• gesilaniseerde glaswol		
• zoutzuur	:	p.a.
• zwavelzuur	:	p.a.
• milli-Q water		

3.2.2. Apparatuur

- Vriesdroogopstelling voor het drogen van de monsters
- Soxhletopstelling voor extractie
- Rotatiefilmverdamper
- Droogstoof (temperatuurbereik tot 300 °C)
- Bovenweger (minimale nauwkeurigheid van 10 mg)

3.2.3 Hulpmiddelen

- Indamprek
- Stikstof
- Glazen vials 2 ml
- Glasvezelextractiehulzen : Schleicher & Schuell 603 G; 37 x 90 mm

4 MONSTER OPWERKING

4.1 MONSTEROPSLAG

Veldvochtige monsters worden direct na binnenkomst opgeslagen in een vriezer bij een temperatuur lager dan -10°C. De houdbaarheid van monsters sediment in deze toestand is niet bepaald, maar verwacht wordt dat deze ten minste één week bedraagt.

4.2 Monstervoorbehandeling

De handelingen verricht bij de voorbehandeling en extractie van monsters dienen waar mogelijk onder uitsluiting van licht plaats te vinden, dit i.v.m. mogelijke foto-degradatie van aanwezige dioxinen. Indien niet het gehele monster in behandeling wordt genomen wordt een deelmonsters genomen na homogeniseren van het veldvochtige monster. Tevens wordt een deelmonster genomen voor de bepaling van het droge stof gehalte.

4.3 Droge stof bepaling

De bepaling van het gehalte droge stof zou in principe gemaakt kunnen worden door het monster voor en na vriesdrogen te wegen. De praktijk wijst echter uit dat de resultaten van deze wijze van bepalen onnauwkeuriger zijn dan die van de gangbare bepaling (NEN 5748).

1. Voor de bepaling van het droge stof gehalte wordt na mengen van het gehele monster een deelmonster genomen van 2-5 g.
2. Breng de hoeveelheid monster in een tevoren gedroogde en gewogen indampschaal [massa m_0] en weeg deze tezamen [massa m_2].
3. Droog vervolgens in een droogstoof bij 105°C tot constante massa.
4. Laat afkoelen in een exsiccator en weeg opnieuw [massa m_1].
5. Bereken het droge stof gehalte met de formule:

$$d.s. = \frac{(m_1 - m_0)}{(m_2 - m_0)} x100\%$$

waarin:

d.s. = percentage droge stof

m_0 = de massa van de aluminium cup in mg

m_1 = de massa van de aluminium cup + droogrest in mg

m_2 = de massa van de aluminium cup + analyse monster in mg

4.4 Vriesdrogen

Omschrijving vriesdrogen nog in te vullen, zal echter in hoge mate afhankelijk zijn van de daarvoor gebruikte apparatuur.

4.5 Extractie

1. De gedroogde monsters worden fijngestampt in een mortier of vermalen in een molen (mechanisch of kogelmolen) wanneer grove deeltjes (op het oog > 0,5 mm) aanwezig zijn.
2. Weeg in een voorgeëxtraheerde glasvezelhuls ca. 10 gram gedroogd sediment nauwkeurig af (massa ± 0,1 %).
3. Breng een propje gesilaniseerde glaswol in de glasvezelhuls op het monster sediment om het zweven van deeltjes te voorkomen. Plaats de huls in de Soxhletopzet en extraheer gedurende 16 uur (overnacht) met 200 ml aceton/hexaan (3/1 v/v).
4. Concentreer het ruwe extract aan de roteerverdamper tot ca. 5 ml (p=0,05 bar; T=40°C). Filtreer, wanneer het extract vaste deeltjes bevat, over diatomeeënaarde ten einde deze te verwijderen en concentreer het filtraat weer tot 5 ml aan de roteerverdamper .
5. Breng het residu kwantitatief over in een puntbuis en concentreer tot juist droog. Neem het residu vervolgens op in 3 ml hexaan.

4.6 Clean-up

De clean-up van het ruwe extract wordt uitgevoerd met behulp van een zogenaamde multi-layer-kolom.

4.6.1 Preparatie kolom

De multi-layer kolom, een glazen chromatografie buis met een lengte van 30 cm en een i.d. van 1 cm, wordt als volgt samengesteld (van top naar bodem):

- 1 cm watervrije natriumsulfaat
- 1 g silicagel
- 7 g 44 % zwavelzuur op silicagel
- 1 g silicagel
- 2 g 33 % natriumhydroxide op silicagel
- 1 g silicagel
- 1,5 g 10 % zilvernitraat op silicagel
- een propje gesilaniseerde glaswol.

Na toevoeging van iedere laag wordt de kolom voorzichtig getikt om de vulling compacter te maken. Vervolgens wordt de kolom bevochtigd en voorgeëlueerd door 25 ml hexaan op te brengen. Het beladen van de silicagel met zilvernitraat, natriumhydroxide en zwavelzuur wordt beschreven in Annex 1.

4.6.2 Clean-up

1. Breng het ruwe hexaan extract kwantitatief op de top van de kolom.

2. Spoel twee keer na het bijna droogvallen van de kolom met 2 ml hexaan.
3. Elueer de kolom na bijna droogvallen met 110 ml hexaan.
4. Concentreer het eluaat aan de roteerverdamper tot ca. 5 ml (p=0,2 bar; T=40°C).
5. Spoel het restant kwantitatief over in een puntbuis en concentreer verder onder een zwakke stikstofstroom (kamertemperatuur) tot minder dan 1 ml.
6. Vul het residu aan met hexaan tot een eindvolume van 1,0 ml.
7. Breng het gezuiverde extract over in een voor de verdere verwerking geschikte glazen vial. Bewaar deze zonodig in de vriezer bij een temperatuur lager dan –10°C.

3. KWALITEITSBORGENDE MAATREGELEN

Neem bij elke serie minimaal een opwerkblanco mee. Dit is een lege glasvezelhuls die op dezelfde wijze en tegelijk met de monsters wordt opgewerkt.

Annex 1. Bereiding en voorreiniging van kolommaterialen voor de multi-layer kolom

Alle adsorbentia worden in een exsiccator boven "Sicapent" bewaard.

Silicagel

- 50 g silicagel wordt gewassen met methanol (2 maal met 100 ml) en dichloormethaan (2 maal met 100 ml). De silicagel wordt vervolgens gedroogd in een droogunit door stikstof door te leiden. Na drogen wordt de silicagel geactiveerd bij 250°C gedurende 24 uur.

Zilvernitraat op silicagel

- 5,6 g zilvernitraat wordt opgelost in 22 ml milli-Q water. Deze oplossing wordt toegevoegd aan 50 g gewassen en gedroogde silicagel in een rondbodemkolf van 500 ml. Er wordt met een spatel geroerd tot er een egale slurrie is ontstaan. De kolf wordt in aluminiumfolie gewikkeld ten einde licht uit te sluiten.
- De in aluminiumfolie gewikkelde kolf met beladen silicagel wordt aan een roteerverdamper verder gehomogeniseerd.
- Na homogeniseren wordt de beladen silica geactiveerd bij 130°C gedurende 24 uur.
- De beladen silica wordt overgebracht in een bruine of zwarte erlenmeyer en bewaard in een exsiccator boven sicapent.

Natriumhydroxide op silicagel

- 49,3 g natronloog (1 M) wordt toegevoegd aan 100 g silicagel en gemengd in een rondbodemkolf tot een homogene massa.
- Het mengsel wordt verder behandeld als bij de bereiding van zilvernitraat op silicagel.

Zwavelzuur op silicagel

- In een rondbodemkolf worden 78,5 g geconcentreerd zwavelzuur en 100 g silicagel met elkaar gemengd en gehomogeniseerd door rotatie aan een roteerverdamper.

Natriumsulfaat

- Natriumsulfaat wordt voor gebruik gedroogd bij 250°C gedurende minimaal 16 uur.

Opmerkingen