

Afdeling Contaminanten Datum: 1982-11-09

VERSLAG 82.94

Pr.nr. 404.0400

Onderwerp: Het bepalen van het gehalte aan
polychloorbifenylen in vetbiop-
ten afkomstig uit menselijk
weefsel.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling Con-
taminanten (4x), afdeling Normalisatie (Humme), Projekt-
beheer, dr J.J.T.W.A. Strik (Rijksinstituut voor de
Volksgezondheid), dr J.S.M. Boleij (15x) (Landbouwhoge-
school, vakgroep Toxicologie).

Met dank voor de bepaling van het vetgehalte:

- drs B.G. Muuse
- H.J. van der Kamp
- H.J. Keukens

Project: Onderzoek naar het voorkomen, gehalte en stapeling van diverse organische contaminanten in landbouw- en visserijprodukten

Onderwerp: Het bepalen van het gehalte aan polychloorbifenylen in vetbiopten afkomstig uit menselijk weefsel

Doel:

Inventariserend onderzoek naar het voorkomen, zowel kwalitatief als kwantitatief, van polychloorbifenylen in vetbiopten. De vetbiopten zijn genomen bij studenten van de vakgroep voeding van de Landbouwhogeschool te Wageningen.

Samenvatting:

In het kader van een samenwerkingsverband tussen het RIKILT en de LH te Wageningen zijn een aantal monsters menselijk weefsel onderzocht op het voorkomen van polychloorbifenylen.

Een en ander is uitgevoerd teneinde inzicht te krijgen in de besmetting van menselijk vet met individuele polychloorbifenylen zowel qua identiteit als qua kwantiteit.

Conclusie:

Het PCB-patroon in de onderzochte monsters menselijk weefsel is nage-noeg identiek en vergelijkbaar met, eerder onderzochte monsters, moedermelk.

Achttien PCB componenten konden geïdentificeerd en gekwantificeerd worden, waaronder de, vanuit toxicologisch oogpunt bezien, interessante PCB componenten 118, 153 en 180.

Het gehalte van de drie componenten 118, 153 en 180 bedraagt gemiddeld resp. 78 µg/kg, 324 µg/kg en 219 µg/kg uitgedrukt op vetbasis.

Samen bedragen deze drie componenten ca. 30% van het totale PCB-gehalte, terwijl de som van de achttien geïdentificeerde PCB's ca. 75% van het totale PCB-gehalte bedraagt.

Uit dit onderzoek is gebleken dat het zinvol is om het aantal monitoring componenten, met component 118, uit te breiden tot zeven.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra 

Medewerkers/Samenstellers: J.J.M. Driessen, W.A. Traag 

Projectleider: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Inleiding:

De aanwezigheid van polychloorbifenylen is de laatste jaren in bijna elke matrix aangetoond.

Vanwege accumulerende eigenschappen zullen de hoogste concentraties aan het einde van de voedselketen worden aangetroffen. Het RIKILT heeft de laatste jaren actief deelgenomen aan de PCB problematiek, onder meer door analytische ondersteuning en het aandragen van bouwstenen teneinde te komen tot een beleidsvisie.

Een methode gebaseerd op het meten van individuele gechloreerde bifenylen in een groot aantal produkten is ontwikkeld (1).

Dank zij de ontwikkelde methode was het mogelijk om accumulatie factoren (2,3) vast te stellen alsmede het niveau van voorkomen in zgn. "life samples" (4) te bepalen.

Deze bovengeschetste ontwikkeling heeft geleid tot het ontstaan van een discussienota (4) met betrekking tot voorstellen voor normstelling van individuele gechloreerde bifenylen in zuivelprodukten, vis, vlees etc.

In deze discussienota worden een zestal componenten genoemd welke geschikt zijn om te dienen als monitoring component. Naast deze zogenaamde monitoring componenten zijn er een aantal componenten om toxicologische redenen interessant gebleken. Met name het voorkomen van de monitoring componenten en enkele toxisch belangrijke componenten aan het eind van de voedselketen, de mens, is in verband met het vaststellen van normen van belang.

In een samenwerkingsverband tussen RIKILT en de Vakgroep Toxicologie van de LH (J.J.T.W.A. Strik en J.S.M. Boleij) wordt door het RIKILT binnen een project getiteld "Blootstelling aan vlamvertragers en de pre-toxische effecten daarvan bij een plastic producerend bedrijf" een oriënterend onderzoek uitgevoerd naar het PCB-gehalte in menselijk weefsel.

De monsters menselijk weefsel zijn afkomstig van een dertiental studenten van de LH welke dienen als de zogenaamde controle groep, ter vaststelling van de normaalwaarde.

Analyse:

Inleidng

Om de PCB-gehalten van de monsters onderling te kunnen vergelijken is het noodzakelijk het gehalte op vetbasis uit te drukken.

Echter van de te onderzoeken monsters (elk slechts ongeveer 50 mg) was het vetpercentage niet bekend.

Om in de monsters het vetgehalte te berekenen werd aan elk monster een bekende hoeveelheid van de methylester van heptadecaanzuur (Me C17) toegevoegd. Na de verzeping (5) werden, na aanzuren, de vetzuren uit de waterige fase geëxtraheerd en na methylering op vetzuur-samenstelling geanalyseerd. De verhouding van Me C17 ten opzichte van de overige vetzuren is een maat voor het vetgehalte.

De PCB's bevattende organische fase werd na zuivering geanalyseerd met behulp van capillaire gaschromatografie en "electron capture" detectie.

Uitvoering:

- Voorbewerking

Het menselijk weefsel bevattende buisje werd gewogen ($\pm 0,02$ mg) en het weefsel werd overgebracht in een rondbodempol van 100 ml, daarna werd het lege buisje opnieuw gewogen en kon het gewicht van elk monster berekend worden.

Aansluitend werd een hoeveelheid Me C17 toegevoegd overeenkomend met 10% van het monstergewicht.

Het monster werd verzeept volgens intern voorschrift F 26 (5).

De PCB's bevattende pentaanfase werd gezuiverd over aluminiumoxide en gaschromatografisch geanalyseerd.

De waterige fase werd gebruikt om het percentage vet in de weefsels te bepalen. De vetbepalingen zijn uitgevoerd door de afd. Akkerbouw.

Bepaling vetgehalte in weefsel:

De waterige fractie werd aangevuld tot 100 ml, aangezuurd met 5 ml H_2SO_4 (3 N), en uitgeschud met 25 ml ether. De etherfase werd drie maal gewassen met 15 ml water en gedroogd over natriumsulfaat.

De ether werd afgedampt en de aanwezige vrije vetzuren omgezet tot de methylesters volgens (6) met methanolische BF_3 .

De vetzuursamenstelling werd gaschromatografisch bepaald volgens (7).

Berekening van het vetgehalte:

Bereken het vetgehalte met behulp van de toegevoegde interne standaard (methylester van heptadecaanzuur = MeC17) volgens onderstaande formule.

Het piekoppervlak van de interne standaard (IS) werd gecorrigeerd voor het in een monster menselijk weefsel gevonden percentage MeCl7 (0,17%).

$$\text{Formule: } \% \text{ vet} = \frac{(a - b)}{b} \times \frac{c}{d} \times 100$$

waarin:

a = totale piekoppervlak van alle componenten inclusief IS oppervlak

b = gecorrigeerde piekoppervlak van de IS

c = toegevoegde hoeveelheid IS in mg

d = afgewogen hoeveelheid menselijk weefsel in mg.

Bepaling PCB's:

De gezuiverde pentaanfase werd geconcentreerd tot 0,5 ml en daarna aangevuld tot 2,0 ml met iso-octaan. Van het extract werd 5 µl splitless (1) geïnjecteerd op een glazen capillaire kolom gecoat met een apolaire fase (CP-Sil 7) laagdikte 0,45 µm. De lengte van de kolom is 25 meter en de inwendige diameter 0,25 mm.

De oventemperatuur bedroeg bij injectie 100°C. Na vier minuten werd de temperatuur met 40°C/min verhoogd tot 220°C.

In eerste instantie werd een standaardmengsel bestaande uit 23 componenten (zie tabel I) geanalyseerd.

Aan zowel het extract van het menselijk weefsel als aan het standaardmengsel werd een bekende hoeveelheid van de interne standaard penta-chlooraniline (PCA) en mirex toegevoegd.

Resultaten

Het vetpercentage in de weefselmonsters alsmede het gewicht van de monsters is in tabel II weergegeven.

In de monsters konden een aantal PCB componenten aan de hand van de relatieve retentietijd ten opzichte van de interne standaard (PCA = 1,00) geïdentificeerd worden.

In tabel III zijn deze geïdentificeerde componenten en het gehalte weergegeven.

Naast de geïdentificeerde PCB componenten komen er in de monsters een aantal componenten voor waarvan de overeenkomstige standaarden niet in ons bezit zijn.

Het gehalte van deze, niet geïdentificeerde PCB componenten is berekend aan de hand van de response van bekende chloorbifenylen. De som van deze globale gehalten van de niet geïdentificeerde componenten, het geschatte gehalte, is gegeven in tabel III.

Daar slechts zeer weinig monster ter beschikking was bleek het noodzakelijk de metingen te verrichten bij de allergevoeligste stand van de versterker van de gaschromatograaf, resulterend in een aanzienlijke ruis.

Onder meer hierdoor trad er vanuit het oplosmiddel een interferentie op met component 52 en component 185 waardoor deze niet te bepalen waren.

Het niveau van deze twee PCB componenten zou overigens op de detectiegrens liggen. Vooral bij monstergrootte beneden de 10 mg zou een overschatting van het totaal PCB-gehalte plaatsgevonden kunnen hebben. Ook was de hoeveelheid beschikbaar monster erg verschillend, hetgeen invloed heeft op de detectiegrens (zie ook tabel III).

Discussie:

Zoals uit tabel II blijkt bevatten alle monsters ongeveer hetzelfde percentage vet namelijk ca. 80%.

In de onderzochte monsters konden in het algemeen zestien PCB componenten geïdentificeerd worden (zie figuur I), dit is in goede overeenstemming met de literatuur (8). De som van deze geïdentificeerde PCB's bedraagt ongeveer 75% van het totale PCB-gehalte (= berekend + geschat).

Ook geldt dat de geïdentificeerde PCB componenten de meest belangrijke zijn; immers experimenten uit het verleden hebben aangetoond welke PCB componenten in technische produkten voorkomen en wat hun accumulatie is. Van de tot nu toe niet geïdentificeerde componenten is de structuur vermoedelijk bekend. Op grond van gaschromatografisch gedrag, accumulatiefactoren en massaspectrometrische analyse (9) zijn niet alleen door ons maar ook in de literatuur (10) mogelijke structuren verondersteld.

Uit het onderzoek is gebleken dat het PCB-patroon in menselijk vet, van de controlegroep, per monster niet of nauwelijks verschilt.

Met uitzondering van component 52 (interferentie vanuit oplosmiddel) konden de door ons voorgestelde monitoring componenten aangetoond worden. Van de, op grond van toxicologische eigenschappen, interessante componenten (11), te weten 118 en de monitoring componenten 153 en 180 zijn de percentages ten opzichte van het totale PCB-gehalte (= berekend + geschat) vermeld in tabel IV.

Uit tabel IV blijkt dat deze drie componenten ca. 30% uitmaken van het totale PCB-gehalte.

Ook bestaat er een grote overeenkomst tussen het PCB-patroon in de onderzochte monsters en het PCB-patroon in, door het RIKILT incidenteel onderzochte, monsters moedermelk.

Conclusie:

Het PCB-patroon in de onderzochte monsters menselijk weefsel is nage-noeg identiek en vergelijkbaar met, eerder onderzochte monsters, moedermelk.

Achttien PCB componenten konden geïdentificeerd en gekwantificeerd worden, waaronder de vanuit toxicologisch oogpunt bezien, interessante PCB componenten 118, 153 en 180.

Het gehalte van de drie componenten 118, 153 en 180 bedraagt gemiddeld resp. 78 µg/kg, 324 µg/kg en 219 µg/kg uitgedrukt op vetbasis.

Samen bedragen deze drie componenten ca. 30% van het totale PCB-gehalte, terwijl de som van de achttien geïdentificeerde PCB's ca. 75% van het totale PCB-gehalte bedraagt.

Uit dit onderzoek is gebleken dat het zinvol is om het aantal monitoring componenten, met component 118, uit te breiden tot zeven.

Literatuur:

1. L.G.M.Th. Tuinstra, W.A. Traag: Journal of HRC and CC 2 (1979) 723-728.
2. L.G.M.Th. Tuinstra, K. Vreman, A.H. Roos, H.J. Keukens: Neth. Milk Dairy J. 35 (1981) 147-157.
3. L.G. Hansen, L.G.M.Th. Tuinstra, C.A. Kan, J.J.T.W.A. Strik, J.H. Koeman: geaccepteerd door J. Agr. Food Chem.
4. Verslag 81.13 dd. 1981-02-02: Voorstellen voor normstelling van individuele gechloreerde bifenylen in zuivelprodukten, ruwvoeder, mengvoeder, vis en vlees.
5. Intern voorschrift F 26: De gaschromatografische bepaling van afzonderlijke polychloorbifenylen in melk, kaas, vis, eieren, krachtvoerders, ruwvoerders, grond en slib.
6. Onderzoekingsmethoden voor plantaardige en dierlijke oliën en vetten.
Bereiding van methylesters van vetzuren voor gaschromatografie en infraroodspectrometrie NEN 6302 (1e druk januari 1980).
7. Onderzoekingsmethoden voor plantaardige en dierlijke oliën en vetten.
Gaschromatografische analyse van methylesters van vetzuren NEN 6334 (1e druk juli 1980).
8. S. Jensen, G. Sundström: AMBIO 1974-Vol. 3 (no. 2) 70-76.
9. L.G.M.Th. Tuinstra, W.A. Traag: Geaccepteerd voor publicatie in J.AOAC.
10. Ballschmiter, M. Zell: Fresenius Z. Anal. Chem. 302, 20-21 (1980).
11. Personele mededeling dr ir H. Kuiper. Ministerie van Landbouw en Visserij Directie VKA.

Tabel I: Samenstelling mengsel met zuivere standaarden

IUPAC- nummer	Structuur	
28	2,4-4'	trichloorbifenyl
52	2,5-2'5'	tetrachloorbifenyl
49	2,4-2'5'	tetrachloorbifenyl
44	2,3-2'5'	tetrachloorbifenyl
72	2,5-3'5'	tetrachloorbifenyl
70	2,5-3'4'	tetrachloorbifenyl
95	2,3,6-2'5'	pentachloorbifenyl
101	2,4,5-2'5'	pentachloorbifenyl
97	2,4,5-2'3'	pentachloorbifenyl
87	2,3,4-2'5'	pentachloorbifenyl
151	2,3,5,6-2'5'	hexachloorbifenyl
149	2,3,6-2'4'5'	hexachloorbifenyl
118	2,4,5-3'4'	pentachloorbifenyl
153	2,4,5-2'4'5'	hexachloorbifenyl
141	2,3,4,5-2'5'	hexachloorbifenyl
138	2,3,4-2'4'5'	hexachloorbifenyl
187	2,3,5,6-2'4'5'	heptachloorbifenyl
128	2,3,4-2'3'4'	hexachloorbifenyl
185	2,3,4,5,6-2'5'	heptachloorbifenyl
180	2,3,4,5-2'4'5'	heptachloorbifenyl
170	2,3,4,5-2'3'4'	heptachloorbifenyl
201	2,3,5,6-2'3'4'5'	oktachloorbifenyl
194	2,3,4,5-2'3'4'5'	oktachloorbifenyl

Tabel II: In bewerking genomen hoeveelheid menselijk weefsel en het
bijbehorende vetpercentage

RIKILT-nummer	gewicht monster mg	% vet
27883	13,19	81
27884	20,16	80
27885	25,16	88
27886	2,57	68
27887	44,70	80
27888	7,51	79
27889	3,16	80
27890	21,24	84
27891	15,80	85
27892	14,80	79
27893	3,28	81
27894	46,66	85
27895	26,44	79

Tabel III: Gehalten polychloorbifenylen in menselijk weefsel uitgedrukt
in µg/kg op vetbasis *

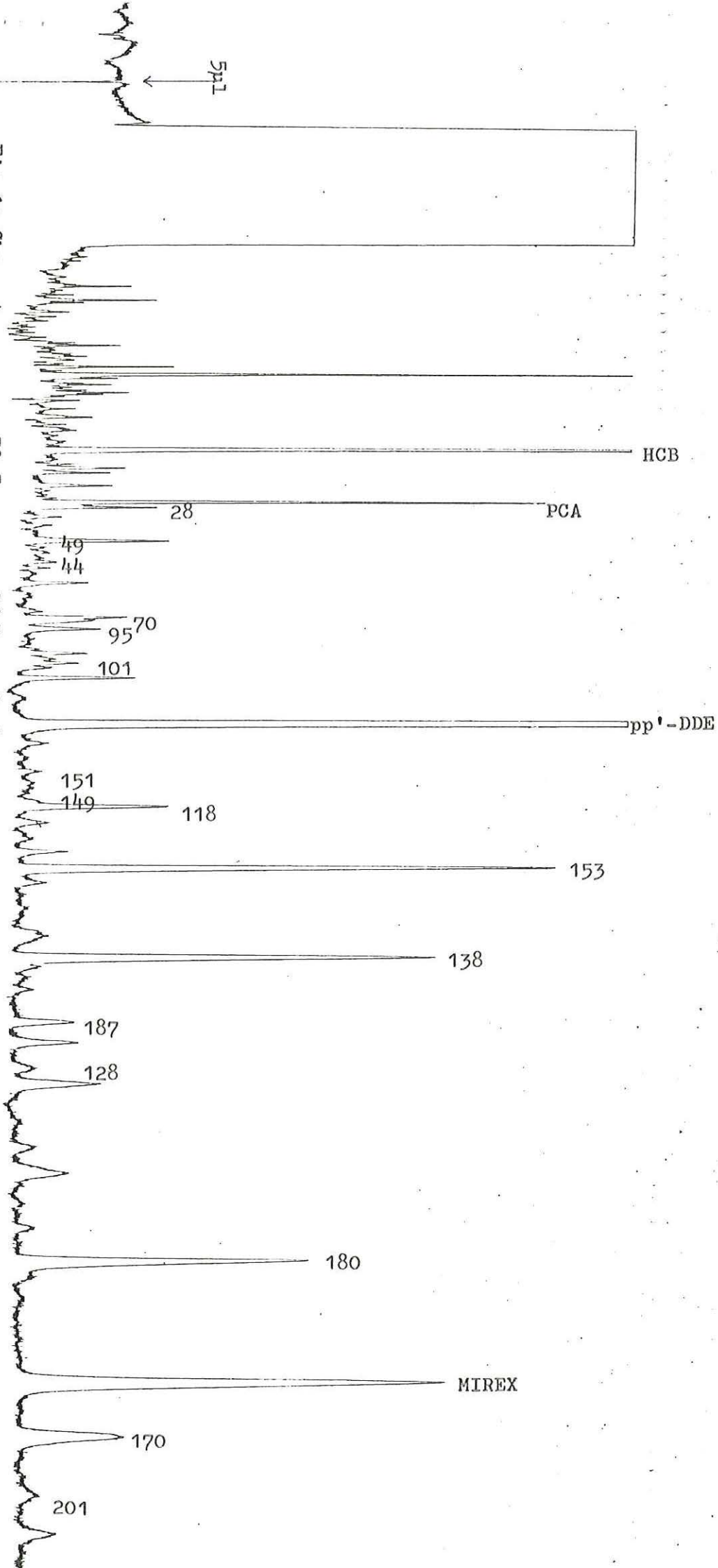
IUPAC- nummer	RIKILT-nummer Polychloor- bifenylen	27883	27884	27885	27886	27887	27888	27889	27890	27891	27892	27893	27894	27895
28	2,4-4'	55	30	40	310	80	70	220	45	45	45	245	20	35
49	2,4-2'5'	< 10	5	< 5	60	15	< 10	30	5	5	10	40	< 5	5
44	2,3-2'5'	10	10	5	85	15	15	50	10	10	15	75	5	5
72	2,5-3'5'	< 10	< 5	< 5	< 30	< 5	< 10	< 30	< 5	< 5	< 5	< 30	< 5	< 5
70	2,5-3'4'	55	10	30	550	25	105	260	20	20	25	35	10	10
95	2,3,6-2'5'	50	20	30	295	35	75	165	25	25	25	125	20	30
101	2,4,5-2'5'	40	5	25	140	10	30	80	10	5	10	65	10	15
97	2,4,5-2'3'	< 10	< 5	< 5	< 30	< 5	< 10	< 30	< 5	< 5	< 5	< 30	< 5	< 5
151	2,3,5,6-2'5'	10	5	10	70	< 5	20	40	10	10	10	50	10	5
149	2,3,6-2'4'5'	35	10	15	180	10	40	120	15	15	20	120	15	15
118	2,4,5-3'4'	80	40	80	130	70	65	80	80	80	65	120	55	65
153	2,4,5-2'4'5'	335	220	415	510	295	370	325	275	295	290	445	190	250
141	2,3,4,5-2'5'	10	< 5	< 5	< 30	< 5	20	< 30	5	< 5	5	< 30	5	5
138	2,3,4-2'4'5'	235	165	295	395	230	265	290	190	205	200	280	110	165
187	2,3,5,6-2'4'5'	45	35	70	100	50	55	105	50	35	40	80	40	45
128	2,3,4-2'3'4'	25	10	20	90	5	30	80	10	15	10	< 30	5	10
180	2,3,4,5-2'4'5'	175	150	300	295	205	240	275	180	195	215	335	115	170
1	2,3,4,5-2'3'4'	85	65	125	125	95	115	100	65	70	90	125	50	70
201	2,3,5,6-2'3'4'5'	20	20	20	70	25	30	50	20	15	20	30	15	25
194	2,3,4,5-2'3'4'5'	< 10	20	10	< 30	25	35	< 30	15	20	20	30	15	20
	Som geïdenti-													
	ficeerde PCB's	1285	830	1500	3465	1200	1595	2330	1035	1075	1120	2260	700	950
	Som geschat	530	370	650	1590	695	620	1150	455	470	455	1280	300	415
	Totaal	1815	1200	2150	5055	1895	2215	3480	1490	1545	1565	3540	1000	1365

* afrondingen hebben plaatsgevonden op 5 µg/kg.

Tabel IV: Gehalten van 3 toxicologisch interessante polychloorbifenylen
118, 153 en 180 uitgedrukt als percentage van totaal PCB-gehalte

RIKILT-nummer	27883	27884	27885	27886	27887	27888	27889	27890	27891	27892	27893	27894	27895
Aandeel van PCB no. 118													
t.o.v. tot. PCB-gehalte	4,4	3,3	3,7	2,6	3,7	2,9	2,3	5,4	5,2	4,2	3,4	5,5	4,8
Aandeel van PCB no. 153													
t.o.v. tot. PCB-gehalte	18,5	18,3	19,3	10,1	15,6	16,7	9,3	18,5	19,1	18,5	12,6	19,0	18,3
Aandeel van PCB no. 180													
t.o.v. tot. PCB-gehalte	9,6	12,5	14,0	5,8	10,8	10,8	7,9	12,1	12,6	13,7	9,5	11,5	12,5

Fig.1: Chromatogram van 39,5 µg menselijk weefsel
Rikilt nummer 27891



Erratum

Tabel III: Totaal PCB-gehalte van monster 27892 moet zijn
1575 µg/kg op vetbasis.