

CA 80-02

De invloed van extractiemethoden
op PCB gehalten in visweefsel in
relatie tot de hoeveelheid geëx-
traheerd vet.

Mw. Drs. M.A.T. Kerkhoff (RIVO)
Ir. L.G.M.T. Tuinstra (RIKILT)

CA 80-02

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

Haringkade 1 - Postbus 68 - IJmuiden - Tel. (02550) 1 91 31

Afdeling: Chemisch Onderzoek

Rapport:

CA 80-02

De invloed van extractiemethoden op PCB gehalten in visweefsel in relatie tot de hoeveelheid geëxtraheerd vet.

Mw. Drs. M.A.T. Kerkhoff (RIVO)
Ir. L.G.M.T. Tuinstra (RIKILT)

Auteur:

Medewerkers:

J. de Boer (RIVO)
H. Keukens, A. Roos (RIKILT)

Project:

2-7121 Organische microverontreinigingen (RIVO)
8.265 Het gehalte aan pesticiden in landbouw- en visserij-
produkten (RIKILT).

Projectleider: Mw. Drs. M.A.T. Kerkhoff (RIVO) Ir. L.G.M.T. Tuinstra (RIKILT).

Datum van verschijnen: 21 maart 1980.

Opgesteld ten behoeve van de LAC stuurgroep Visverontreiniging.

Inhoud:

I	- Inleiding	pag. 1
II	- Werkwijze	pag. 1
III	- Monsternamen en voorbereiding	pag. 2
IV	- Analysemethoden	pag. 3
V	- Resultaten en discussie	pag. 4
VI	- Conclusies	pag. 5

/dks

**DIT RAPPORT MAG NIET GECITEERD WORDEN ZONDER TOESTEMMING VAN DE
DIRECTEUR VAN HET R.I.V.O.**

E-1234-0

DE INVLOED VAN EXTRACTIEMETHODEN OP PCB GEHALTEN IN
VISWEEFSEL IN RELATIE TOT DE HOEVEELHEID GEEEXTRAHEERD
VET.

I - INLEIDING.

Enige tijd geleden werden RIVO en RIKILT geconfronteerd met vragen betreffende de PCB- en pesticidenbepaling in vis en visserijprodukten in relatie tot het vetgehalte. PCB's en pesticiden worden opgeslagen in het vetweefsel van organismen, alleen is hierbij niet duidelijk of alle vetweefsels bij deze accumulatie betrokken zijn. Naast een hoeveelheid "gebonden" vetten heeft een vis ook "vrije" vetten, waarvan de hoeveelheden bij sommige vissoorten door het jaar heen fluctueren.

In het kader van de LAC-stuurgroep Visverontreiniging werd besloten dat voornoemde instituten aandacht aan deze problematiek zouden besteden. In eerste instantie was het van belang om de volgende twee vragen te beantwoorden:

1. In hoeverre worden PCB's en pesticiden volledig geëxtraheerd uit vis met de gebruikte extractiemethoden? De mogelijkheid bestaat immers dat de PCB's en pesticiden, die opgeslagen zijn in de "gebonden vetten", daar zo vast gebonden zitten dat ze niet via gebruikelijke extractie methoden vrijkomen.
2. Wat voor waarde kan er toegekend worden aan PCB en pesticidengehalten uitgedrukt op vetbasis? Deze vraag is als het ware direct gekoppeld aan de vraag of alle vetweefsels, "vrije" en "gebonden" vetten bij het accumulatieproces betrokken zijn of slechts een bepaalde groep. Een vetgehalte, nodig bij de notitie van een getal op vetbasis, is immers zeer afhankelijk van de gebruikte methode en kan uit uitsluitend "vrije" vetten bestaan zoals bij een pentaanextractie of alle vetten omvatten zoals bij de chloroform/methanol extractie of bij gebruikmaking van diverse destructie methoden.

II - WERKWIJZE.

Vier extractie methodieken werden naast elkaar vergeleken om na te gaan met welke methoden goede gehalten verkregen konden worden.

- 1). De gebruikelijke soxhlet-extractie met pentaan. Hierbij zijn door RIVO en RIKILT twee van verschillende varianten toegepast (zie methode).
- 2). Extractie door middel van zoutzure hydrolyse (RIKILT).
- 3). Extractie met een mengsel van chloroform en methanol (RIVO).
- 4). Directe verzeeping met alcoholische loog (RIKILT).

Het onderzoek werd uitgevoerd met een vette (aal) en een magere vis (snoekbaars) om informatie te verkrijgen over de aard van de bij accumulatie betrokken vetsoorten. Bij een vette vis wordt het totale vetgehalte in belangrijke mate bepaald door de "vrije" vetten en is de bijdrage van de "gebonden" vetten procentueel zeer gering. Dit in tegenstelling tot een magere vis, waarbij het totale vetgehalte

vooral wordt bepaald door de "gebonden"vetten.

III. - MONSTERNAME EN VOORBEWERKING.

Zowel de rode aal als de snoekbaars waren afkomstig uit het IJsselmeer en werden respectievelijk gevangen op 21 mei en op 10 juli 1979. Alle vissen werden na binnenkomst gefileerd en diepgevroren bewaard. Voor het mengmonster aal werden 15 exemplaren gebruikt en voor het mengmonster snoekbaars 25 vissen. Van alle vissen werden gelijke hoeveelheden genomen (11 g bij aal en 40 g bij snoekbaars), die gezamenlijk gehomogeniseerd werden in een Waring Blendor, waarna de beide mengmonsters gereed waren voor verdere analyse. De exacte monstergegevens staan vermeld in tabel I.

Tabel I - Exacte monstergegevens

Aal (vangdatum: 21 mei 1979)			Snoek- (vangdatum: 10 juli 1979)		
nr.	lengte(cm)	gewicht(g)	baars nr.	lengte(cm)	gewicht(g)
min	30	51	min	39	502
max	40	95	max	48	999
gemiddelde	33,5	67	gemiddelde	43	750
1	34	63	1	42	675
2	35	78	2	39	502
3	33	51	3	44	820
4	37	95	4	48	999
5	33	64	5	42	672
6	31	53	6	45	873
7	30	44	7	43	745
8	33	64	8	43	733
9	34	70	9	43	735
10	34	72	10	44	899
11	40	90	11	43	725
12	30	56	12	41	594
13	32	58	13	41	650
14	33	61	14	44	807
15	34	90	15	44	744
			16	46	803
			17	44	825
			18	43	667
			19	46	863
			20	41	652
			21	42	732
			22	41	782
			23	45	854
			24	42	728
			25	39	664

IV - ANALYSE METHODEN.

1. Soxhlet extractie met pentaan.

RIVO variant:

Een hoeveelheid van het gehomogeniseerde vismonster (snoekbaars: 35 g, aal: 10 g) wordt met Na_2SO_4 in een mortier verwreven tot een droog, homogeen mengsel. Dit wordt overgebracht in een glazen extractie huls. Voor de snoekbaars worden 3 soxhlehulsen per monster gebruikt en voor de aal 1 huls. Vervolgens wordt 3 uur met pentaan geëxtraheerd in een soxhletapparaat met vloeistofreservoir en overloop. De snoekbaarsextracten worden gezamenlijk aan de rota-vapor ingedampt tot het volume kleiner dan 100 ml is en vervolgens kwantitatief overgespoeld in een maatkolf van 100 ml en aangevuld. Het aalextract wordt direct overgebracht in een maatkolf en aangevuld tot 100 ml. Het vetgehalte van de oplossingen wordt bepaald door 10 ml droog te dampen. Van ieder extract wordt een volume hoeveelheid overeenkomend met maximaal 250 mg vet op een kolom gebracht bestaande uit 15 g Al_2O_3 , 5% H_2O met bovenop een laagje Na_2SO_4 . De elutie geschiedt met 230 ml pentaan. Het eluaat wordt aan de rotavapor ingedampt tot bijna droog en het residu wordt kwantitatief overgebracht in een maatcilinder. Het uiteindelijke volume in de cilinder moet 2 ml bedragen. Fractioneren geschiedt op een 2g SiO_2 (210°C, 1 nacht) kolom i.d. 6 mm. Eerst wordt 2 ml monster opgebracht, vervolgens wordt nagespoeld met 1 ml hexaan, gevolgd door een elutie met 10 ml hexaan (1e fractie) en een elutie met 10 ml hexaan/15% diëthyleter (2e fractie). Beide fracties worden op de gaschromatograaf onderzocht gebruikmakend van capillaire kolommen.

RIKILT variant:

Verwrijf 10 gram van het gehomogeniseerde vismonster in een mortier met natriumsulfaat tot een droog, homogeen mengsel. Breng dit over in een extractiehuls en extraheer acht uur in een soxhletapparaat zonder vloeistofreservoir. De pentaan wordt vervolgens grotendeels afgedampt. Van het restant wordt de helft (= 5 gram produkt) verzeept volgens methode vier; met het overige extract wordt het vetgehalte bepaald.

2. Extractie m.b.v. zoutzure hydrolyse.

Weeg 10 gram gehomogeniseerd vismonster af, in een erlenmeijer en hydrolyseer gedurende 90 minuten in een kokend waterbad met 10 ml zoutzuur (1:1 v/v) onder terugvloeiëling. Na afkoelen ca. 10 ml. ethanol toevoegen, overbrengen in een scheidrecter en achtereenvolgens uitschudden met 30 ml diëthyleter en 30 ml. petroleumether. Dit wordt nog twee maal herhaald met 15 ml. van elk. De verzamelde etherfracties worden drooggedampt, het residu wordt opgenomen in pentaan. Daarvan wordt de helft (= 5 gram produkt) verzeept volgens methode vier. Met het resterende extract wordt het vetgehalte bepaald.

3. Soxhlet extractie met chloroform-methanol (2:1).

De monsterbewerking vindt op dezelfde wijze plaats als bij

de pentaanextractie. Alleen geschiedt de soxhlet extractie met een mengsel van chloroform en methanol in de verhouding 2:1. Bovendien wordt het chloroform/methanol extract niet rechtstreeks op de Al_2O_3 kolom gebracht. De volume hoeveelheid, die overeenkomt met maximaal 250 mg vet wordt daarin tegen in een peerkolf gepipetteerd, vervolgens wordt 10 ml heptaan toegevoegd en wordt het geheel aan de rotavapor tot bijna droog ingedampt. Het residu wordt daarna opgenomen in 25 ml pentaan en de pentaanoplossing wordt op de Al_2O_3 kolom overgebracht. De verdere procedure geschiedt overeenkomstig analyse methode 1.

4. Directe verzeping met alcoholische loog.

Aan 5 gram gehomogeniseerd vismonster wordt 20 ml alcoholische loog toegevoegd. Er wordt 30 minuten verzeept op een waterbad (70°C) waarna door middel van uitschudden de reactieproducten worden opgenomen in pentaan. Na indampen en zuivering over aluminiumoxide kan het PCB gehalte worden bepaald.

V - RESULTATEN EN DISCUSSIE.

De resultaten zijn per vissoort gegeven in de tabellen II t/m V op produktbasis en op vetbasis.

Produktbasis:

Vette vis: Alle methoden geven min of meer vergelijkbare PCB-gehalten

Tabel II - Gehalten in aal in mg/kg (produktbasis)

Methode Instituut Component	1		2	3	4
	RIVO	RIKILT	RIKILT	RIVO	RIKILT
2,4,5-2'4'5'	.30	.30	.26	.27	.30
2,3,4-2'4'5'	.28	.21	.19	.24	.23
2,3,4,5-2'4'5'	.15	.14	.10	.16	.14

Magere vis:

De twee varianten van de pentaan soxhlet-extractie blijken geen vergelijkbare resultaten op te leveren. De verschillen kunnen mogelijk optreden door de hoeveelheid monster die in bewerking wordt genomen en de manier van extraheren waarbij de stevigheid van de vissoort mogelijk ook een rol speelt. Ook de methodiek met zoutzure hydrolyse levert geen resultaten op vergelijkbaar met één van de varianten. Daarentegen geven de directe verzeping, de chloroform/methanol extractie en de RIVO pentaan extractie overeenkomstige resultaten.

Tabel III - Gehalten in snoekbaars in mg/kg (produktbasis).

Methode Instituut Component	1		2	3	4
	RIVO	RIKILT	RIKILT	RIVO	RIKILT
2,4,5-2'4'5'	.011	.0038	.0023	.014	.014
2,3,4-2'4'5'	.009	.0024	.0015	.012	.0089
2,3,4,5-2'4'5'	.0042	.0015	.0009	.0058	.0047

RESULTATEN OP VETBASIS:Vette vis:

De methodieken 1, 2 en 3 geven min of meer vergelijkbare vetgehalten. Dit kan betekenen dat de hoeveelheid "gebonden" vetten gering is t.o.v. de hoeveelheid "vrije" vetten. De PCB-gehalten op vetbasis zijn voor deze vette vis eveneens vergelijkbaar.

Tabel IV - Gehalten in aal in mg/kg (vetbasis).

Methode Instituut Vetpercentage (%) PCB-component	1		2	3
	RIVO	RIKILT	RIKILT	RIVO
2,4,5-2'4'5'	1,0	1,0	1,0	0,85
2,3,4-2'4'5'	0,92	0,7	0,7	0,76
2,3,4,5-2'4'5'	0,49	0,4	0,4	0,51

Magere vis:

Het vetgehalte is sterk afhankelijk van de gebruikte methode en varieert van 0,11 tot 2,0 procent. Blijkbaar is de bijdrage van "gebonden" vetten aan het totaal-vetgehalte aanzienlijk en daardoor is de extractiemethode van grote invloed op het vetgehalte en daarmee eveneens van invloed op het PCB gehalte op vetbasis.

Tabel V - Gehalten in snoekbaars in mg/kg (vetbasis).

Methode Instituut Vetpercentage (%) PCB-component	1		2	3
	RIVO	RIKILT	RIKILT	RIVO
2,4,5-2'4'5'	2,4	1,6	2,2	0,7
2,3,4-2'4'5'	2,0	1,0	1,4	0,6
2,3,4,5-2'4'5'	0,9	0,6	0,8	0,3

VI - CONCLUSIES.

Voor vette vis blijken de verschillen in gehalten tussen de diverse methodieken verwaarloosbaar klein te zijn. Dit geldt zeker niet voor de magere vis. De effecten die veroorzaakt worden door de wijze van extraheren komen juist bij de snoekbaars goed naar voren. De door velen gebruikte pentaan-

extractie gekoppeld aan de berekening van het PCB gehalte op basis van het met pentaan extraherbare vet is zeer discutabel. Het lijkt beter een PCB gehalte op produktbasis te geven, eventueel aangevuld met een "afzonderlijke" vetbepaling, waarvoor een chloroform-methanol extractie gebruikt kan worden of een andere totaal vetbepaling. Met behulp van dit vetgehalte kan een PCB gehalte op totaal vetbasis worden berekend.

Met de soxhlet-extractie (variant RIVO) met pentaan en met directe verzeping is het mogelijk goed vergelijkbare resultaten op produktbasis te verkrijgen bij zowel vette als magere vis.

Nader onderzoek blijft van belang aangezien niet duidelijk is op welke wijze PCB's in het vetweefsel geïncorporeerd zijn met de daaruit voortvloeiende onduidelijkheid met betrekking tot het extractie mechanisme van PCB's uit visweefsels (de onduidelijkheid van de rol van de gebruikte extractiemiddelen). Met goed gedefinieerde magere vismonsters kan de extractie in verschillende stappen opgesplitst worden uitgevoerd om de relatie:hoeveelheid geëxtraheerd vet - PCB gehalte op vetbasis - gebruikte extractie methode nader te onderzoeken. Met deze vraagpunten zal in de toekomst rekening gehouden worden.