

CA 83-01

BROMIDE EN ORGANOBROOMVERBINDINGEN  
IN VISSERIJPRODUKTEN.  
BROMIDEBEPALING IN VISWEEFSELS MET  
BEHULP VAN HPLC.

H. Pieters en A. de Vries

CA 83-01

# RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

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

Afdeling: CHEMISCH ONDERZOEK

Rapport: CA 83-01  
BROMIDE EN ORGANOBROOMVERBINDINGEN  
IN VISSERIJPRODUKTEN.  
BROMIDEBEPALING IN VISWEEFSELS MET  
BEHULP VAN HPLC.

Auteur: H. Pieters en A. de Vries

Project: 2-7138 - Broomonderzoek.

Projectleider: Drs. H. Pieters

Datum van verschijnen: Januari 1983

Inhoud: I SAMENVATTING.  
II INLEIDING.  
III MATERIALEN EN METHODEN.  
IV RESULTATEN EN DISCUSSIE.  
V REFERENTIES.  
VI BIJLAGEN, TABELLEN, GRAFIEKEN.

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

/MV

1096750

INHOUDSOPGAVE:

I SAMENVATTING.

II INLEIDING.

III MATERIALEN EN METHODEN.

IV RESULTATEN EN DISCUSSIE.

4.1. Optimalisering van de bromide-analyse.

4.1.1. Waterige extractie.

4.1.2. Verassingsstap.

4.1.3. HPLC analyse.

4.1.4. Methodiekbeschrijving.

4.2. Bromide en Totaalbroomgehalten.

V REFERENTIES.

VI BIJLAGE, TABELLEN EN GRAFIEKEN.

BROMIDE EN ORGANOBROOMVERBINDINGEN IN VISSERIJPRODUKTEN.  
BROMIDEBEPALING IN VISWEEFSELS MET BEHULP VAN HPLC.

I SAMENVATTING.

Het toenemende gebruik van organobroomverbindingen als bestrijdings-, blus- en brandvertragende middelen en de mogelijke vorming van broomverbindingen tijdens chlorering van koel- en afvalwater in aanwezigheid van bromide, tesamen met een geringe kennis van de toxiciteit en accumulatie-eigenschappen van organobroomverbindingen, pleiten voor een nadere bestudering van het voorkomen van bromide en organobroomverbindingen in visserijprodukten. De bestaande onduidelijkheid over de toelaatbare hoeveelheid broom, die dagelijks door de mens mag worden opgenomen via het voedsel, en het voorkomen van broomgehalten in vis, die op een hoog natuurlijk niveau liggen, versterkt mede de motivering voor onderzoek op dit terrein.

Ten behoeve van dit onderzoek is een bromide-analyse ontwikkeld met behulp van hogedrukvlloeistofchromatografie, uitgaande van gevriesdroogd visweefsel.

In elf visserijprodukten zijn analyses uitgevoerd ter bepaling van het bromide en het totaal broomgehalte. Het verschil tussen beide gehalten levert het organobroomgehalte op.

Een belangrijk percentage van het totaalbroomgehalte bleek uit organobroomverbindingen te bestaan, variërende van 35 % in zeevis, 40 % in zoetwatervis, 60 % in sprot tot 75 % in garnaal. Absolute gehalten van totaalbroom en bromide lopen sterk uiteen. Snoekbaars bevat 1,8 mg broom per kg versgewicht, terwijl garnaal meer dan 70 mg bevat. Verschillen in gehalten in aal uit de Grevelingen en het IJsselmeer worden besproken, als ook het grote verschil in organobroomgehalten tussen sprot en haring.

## II INLEIDING.

Het element broom komt in de natuur veelal als het eenwaardig bromide ion voor. Het gemiddelde gehalte van broom in de aardkorst bedraagt 1 mg/kg. Natuurlijke anorganische broomverbindingen, die niet oplosbaar zijn in water, zijn broomargyriet en zilverbromide. De grootste bronnen van bromide zijn echter de oplosbare zouten van natrium, kalium en magnesium, die het meest verspreid voorkomen in zeewater, dat 65 mg/kg bromide bevat. Daardoor ook is het broomgehalte van mariene organismen hoger dan van landdieren. Een belangrijk gedeelte van het totaalbroom in zee-organismen is aanwezig in de vorm van organische verbindingen, waarvan er reeds meer dan 600 zijn geïdentificeerd.

In het zoete water is het bromidegehalte laag. Het Rijnwater bevat circa 0,2 - 0,3 g / m<sup>3</sup>. Bromide in grondwater is grotendeels afkomstig van binnendringend zeewater. Een belangrijke bron voor verhoogde bromidegehalten in oppervlaktewater is verder het gebruik van kunstmest. Chilisalpeter bevat onder andere jodaten en bromaten. Het gebruik van methylbromide als ontsmettingsmiddel in de glastuinbouw (Westland) kan door snelle omzetting in bromide het bromidegehalte in de sloten ter plaatse tot zeer hoge gehalten doen oplopen (> 30 g / m<sup>3</sup> Br).

Voor broom wordt een fysiologische werking mogelijk geacht. Bromide is in het verleden veelvuldig als geneesmiddel toegepast. Het werkt kalmerend op het zenuwstelsel in, vermoedelijk door verdringing van het chloride. Voor sommige diersoorten blijkt bromide een onmisbaar spoorelement te zijn. De hypofyse van de hond is rijk aan broom en bevat 125 mg/kg, terwijl bij kleine zoogdieren en kuikens een groei-effect van broom is waargenomen. Veel lagere mariene organismen, zoals mollusken, sponzen, diverse wormensoorten en algen zijn in staat organische broomverbindingen te synthetiseren, bijvoorbeeld het dibroomindigo door de purperslak (het zogenaamde "Royal Purple"). Verschillende broomfenolen zijn uit wormen geïsoleerd. Verder is van verschillende organobroomverbindingen, geïsoleerd uit algenmateriaal, een antimicrobiële werking bekend.

Al deze voorbeelden geven aan dat een biologische functie voor broom niet ondenkbaar is. Naast natuurlijke broomverbindingen kunnen ook op andere wijze organobroomverbindingen in het aquatisch milieu terechtkomen.

Na chlorering van koelwater van elektriciteitscentrales en van industrieel afvalwater kunnen, via bromeringsreacties van onder andere fenolen, organobroomverbindingen ontstaan, die uiteindelijk in het aquatisch milieu verspreid worden. Verschillende van deze stoffen kunnen smaakbezwaren in consumptievis teweegbrengen. Het verbruik van broombevattende bestrijdingsmiddelen in de landbouw (bromofos, bromacil, etc.) is een andere bron van organische broomverbindingen, die na lozing of uitwassing vanuit de bodem in het oppervlaktewater verschijnen.

Het totale verbruik van broom in Nederland bedroeg in 1978 ongeveer 3100 ton. Hiervan werd 60 % als methylbromide in de tuinbouw verbruikt, 20 % als ethyleendibromide toegevoegd aan benzine als antiklop middel, 10 % als grondstof door de industrie verbruikt en de overige 10 % werd in de fotografie verbruikt of toegepast als brandvertragende middelen, blusmiddelen, bestrijdingsmiddelen en/of geneesmiddelen. Sinds een aantal jaren wordt broom door de Coördinatie Commissie voor de meting van Radio-activiteit en Xenobiotische stoffen (C.C.R.X.) in

het nationale meetprogramma opgenomen. Eén van de belangrijkste argumenten hiervoor is, dat broomverbindingen in toenemende mate als bestrijdingsmiddelen worden gebruikt, terwijl er geen eenduidige en juist gefundeerde normen voor menselijke opname van broom bestaan.

Er bestaan wel normen voor het bromidegehalte in voedingsmiddelen, neergelegd in de "Residubeschikking". Voor vis en visprodukten bestaat echter vooralsnog geen normwaarde. In de LAC-stuurgroep Visverontreiniging worden voorstellen uitgewerkt voor de vaststelling van broomnormen in zoetwater- en zeevis.

De wereldgezondheidsorganisatie (WHO) heeft een ADI (acceptable daily intake) vastgesteld van 1 mg/kg lichaamsgewicht. Op grond van chronische toxiciteitsproeven met ratten komt het RIV echter onder hanteren van bepaalde veiligheidsfactoren tot een 10 x lagere ADI-waarde. In een recente studie van het RIV (Sangster, 1982) met menselijke vrijwilligers is overigens gebleken dat bij een dagelijkse bromide-opname van 1 mg/kg lichaamsgewicht geen enkel biologisch effect kon worden waargenomen. Voor een gemiddelde Nederlander van 70 kg betekent een ADI van 1 mg/kg een dagelijkse opname van 70 mg bromide. De gemiddelde opname van broom in Nederland ligt op een niveau van 8 - 14 mg per dag.

Het RIVO-broomonderzoek is gestart ter verkrijging van meer informatie over het voorkomen van bromide en broomverbindingen in vis. Voor de voortgang van dit onderzoek was het gewenst over een geschikte methode van bromide-analyse te kunnen beschikken. In dit rapport wordt een HPLC-analyse van bromide in visweefsel beschreven, alsmede de analyse resultaten van bromide en totaal-broombepalingen in enige vissoorten.

### III MATERIALEN EN METHODEN.

De diepgevroren vissen werden na ontdooid te zijn, gefileerd, gehomogeniseerd met behulp van een Waring Blendor en gevriesdroogd. De monstergegevens staan vermeld in tabel I. Garnalen en mosselen werden eerst gekookt, alvorens gevriesdroogd werd. Eén garnalenmonster is rauw verwerkt. Van elke vissoort is 25 gram gevriesdroogd materiaal naar de Keuringsdienst van Waren te 's-Gravenhage verzonden, alwaar door Dr. Klein Haneveld het totaal-broomgehalte werd bepaald met behulp van röntgenfluorescentie.

Een bromidebepaling in visweefsel is ontwikkeld bestaande uit de drie volgende stappen:

- a. een waterige extractie,
- b. een verassingsstap,
- c. HPLC-analyse.

De optimalisering van deze methode met een beschrijving van de modificaties ten opzichte van een HPLC-analyse beschreven door Leuenberger (1979) zal in de resultaten worden besproken.

Voor de verassingsstap is een moffeloven gebruikt met een temperatuurinstelling op 10 °C nauwkeurig. De HPLC-analyse werd uitgevoerd met behulp van een SP 8100 vloeistofchromatograaf, uitgerust met een ternair pompsysteem. Als detector diende een Spectraphysics SP 8400 UV/VIS variabele golflengte detector.

Ter bepaling van het bromidegehalte in vis werd een meervoudige standaard-additie toegepast, welke per computer is uitgewerkt met behulp van lineaire regressie. Hiervoor werden vijf oplopende "spikes" van bromide aan het monsterextract toegevoegd. Extrapolatie van de regressielijn naar het punt zonder toevoeging levert het gehalte in het vismonster op.

De berekening van het 95 % betrouwbaarheidsinterval voor het bromidegehalte staat omschreven in bijlage I.

#### IV RESULTATEN EN DISCUSSIE.

##### 4.1. Optimalisering van de bromide-analyse.

###### 4.1.1. Waterige extractie.

Om het bromide uit het gevriesdroogde vismateriaal te isoleren, werd een waterige extractie uitgevoerd bij 100 °C onder reflux. In zwak alkalisch milieu (0,1 N NaOH) bleek geen verlies van bromide op te treden. Zelfs in zuur milieu bleef het verlies beperkt tot 8 %, veroorzaakt door het ontwijken van waterstofbromide (HBr). Gezien deze minimale verliezen is verondersteld dat de variatie in de opbrengst bij de extractie met bidest uiterst gering is. In verband hiermee werd ten behoeve van de standaard-additie een hoeveelheid van 6 x 2,5 gram gevriesdroogd visweefsel in één keer geëxtraheerd en naderhand in zes gelijke porties verdeeld. Vóór de verassing werd aan 5 deelextracten een bromide standaard toegevoegd van, respectievelijk 25, 50, 75, 100 en 125 µg.

###### 4.1.2. Verassingsstap.

Omdat nog relatief veel organische verbindingen in het ruwe extract aanwezig zijn, die storingen kunnen geven bij de HPLC-analyse, bleek het invoegen van een verassingsstap noodzakelijk. Porceleinen kroezen voor de verassing zijn later vervangen door nikkelen kroezen, waaruit de as makkelijker te verwijderen viel. Vóór de verassing werd het extract eerst in de kroes drooggedampt onder toevoeging van KOH. De invloed van deze KOH toevoeging op de piekvorm in het chromatogram is nagegaan. Aan telkens 20 ml extract werd toegevoegd 1, 5 en 10 ml 1 N KOH-oplossing. Bij toenemende hoeveelheid veranderde de piekvorm: de piekhoogte nam af, terwijl de breedte op halve hoogte sterk toenam. Tevens verscheen in het chromatogram een extra piek naast de nitrietpiek, in oppervlakte toenemend bij hogere KOH toevoeging.

Om bromideverlies tijdens de verassing tegen te gaan, is een toevoeging van 1 ml N KOH ruim voldoende gebleken.

De temperatuur tijdens de verassing heeft grote invloed op de opbrengst (recovery %) van bromide in het veraste monster. In tabel II is het recoverypercentage weergegeven bij enkele temperatuurreksen bepaald met wijtingmonster, waaraan voor indampen van het extract, behalve in de eerste reeks, natrium-nitraat was toegevoegd (ter stimulering van oxidatiereacties, waarbij het nitraat wordt omgezet in nitriet).

Een te snelle temperatuurstijging tijdens de verassing en een te hoge eindtemperatuur veroorzaken een te groot bromideverlies en dus een te lage opbrengst (< 50 %). Gedurende de experimenten is gebleken dat verkoling (ontleding van organische verbindingen) van het geëxtraheerde materiaal optreedt tussen 180 °C en 250 °C. Als de temperatuur gedurende dit traject slechts langzaam stijgt, wordt een veel gunstiger recovery voor bromide gevonden (experiment 4). Langdurig handhaven van de temperatuur tussen 500 °C en 600 °C heeft geen nadelig effect op de bromide opbrengst. Alleen bij de verassing van een bromide standaard in alkalisch milieu met een maximum temperatuur van 500 °C geeft een recovery van 90 % of meer. Bij deze temperatuur

vindt echter geen volledige verassing van vismateriaal plaats. Zelfs bij toevoeging van nitraat aan het vis-extract moet de temperatuur tot minstens 550 °C verhoogd worden om volledige verassing te verkrijgen. In aanwezigheid van nitraat vindt de oxidatie van organisch materiaal sneller plaats. Het gebruik van magnesiumnitraat bij hoge pH gaf vorming van een neerslag van  $Mg(OH)_2$ , waaraan mogelijk bromide adsorbeerde, waardoor extra verliezen kunnen optreden. Het gebruik van natriumnitraat verdiende daarom de voorkeur en is bij een aantal vismonsters toegepast.

Diverse zuren zijn getest om het asresidu in op te lossen. Zowel zoutzuur en zwavelzuur als ook salpeterzuur hadden het nadeel hoge pieken in het chromatogram op te leveren of piekverbreding van de bromidepiek te geven. Alhoewel azijnzuur redelijke resultaten gaf, bleek oplossen van het asresidu in de fosfaatbuffer, die als mobiele fase in de HPLC-analyse werd gebruikt, ook goed te voldoen. Een langzame, geprogrammeerde temperatuurstijging tijdens de verassing was echter een vereiste. Door gebruik van ultrasone trillingen loste de as goed op in de fosfaatbuffer.

#### 4.1.3. HPLC-analyse.

Voor de bepaling van bromide in het visextract is gebruik gemaakt van een analysebeschrijving van Leuenberger en medewerkers (1980). Deze auteur gebruikte een amino C-18 HPLC kolom om nitraat en bromide in waterige extracten rechtstreeks te kunnen analyseren. De scheiding, die met deze aminokolom wordt verkregen berust voornamelijk op verschillen in affiniteit van de diverse ionen voor de aminogroepen, feitelijk een milde vorm van ion-exchange chromatografie. Enkele modificaties op de door Leuenberger gebruikte methoden bleken noodzakelijk. De invloed van verschillende parameters op het retentiegedrag van de anorganische ionen nitraat, nitriet en bromide wordt hierna besproken:

##### Molariteit van de mobiele fase:

Bij verlaging van de molariteit van de gebruikte fosfaatbuffer bleek de retentietijd van de ionen toe te nemen. Door de lagere ionensterkte wordt de uitwisselingsnelheid van de ionen geringer, doordat meer bindingsplaatsen beschikbaar komen ten gunste van de te scheiden ionen. Hierdoor wordt de vertragingfactor groter. Een vermindering van de molariteit van 0,08 M tot 0,02 M deed de retentietijd met een factor 2 toenemen; een vermindering tot 0,01 M gaf een 3 à 4 voudige toename van de retentie te zien. Als gevolg van de langere retentietijden trad aanzienlijke piekverbreding op en gelijktijdige verlaging van de pieken waardoor de detectiegrens ongunstig werd beïnvloed. Wel is een verbetering van de scheiding zichtbaar. Als optimale molariteit is gekozen voor een buffersterkte van 0,02 M fosfaatbuffer.

##### pH:

Een verlaging van de pH zal het percentage van geprotoneerde  $NH_2$  groepen doen stijgen, waardoor de bindingsmogelijkheid voor anionen toeneemt. Alhoewel het effect slechts gering bleek te zijn, is de scheiding tussen nitraat en bromide bij een pH van 2,6 gunstiger in vergelijking met een pH van 3.



Temperatuur:

De temperatuur heeft slechts een marginaal effect op de retentietijden van nitraat, nitriet en bromide. Bij een verhoging van 30 °C naar 60 °C neemt de retentietijd met circa 10 % af. Het effect voor nitriet is echter tegengesteld, waarbij een geringe toename in de retentie werd gevonden.

Golflengte:

Bij verlagings van de detectiegolflengte van 210 nm naar 202 nm nam de gevoeligheid, waarmee bromide gemeten kan worden met een factor 2 à 3 toe, terwijl de respons voor nitraat sterk afnam. Een lagere golflengte is niet te gebruiken in verband met de waterabsorptie.

Chromatografische scheiding:

Figuur 1 geeft het chromatogram weer van een ionenstandaard waarin nitriet, nitraat en bromide volledig gescheiden zijn. Het aantal theoretische schotels per meter berekend aan de hand van de nitraatpiek bedraagt 15.000 onder de heersende omstandigheden.

In het chromatogram van een verast vismonster (figuur 2) verscheen vlak na de bromidepiek een onbekende piek, die niet geheel basislijn gescheiden kon worden van de bromidepiek. Een ratioplot (figuur 3) van de extincties van 202 nm en 210 nm uitgezet voor een aantal tijden rondom de retentietijd van de bromidepiek laat zien, dat de verhouding 202/210 nagenoeg constant is over een beperkt gebied rond de retentietijd. Hieruit is geconcludeerd dat de piekhoogte van bromide niet beïnvloed werd door verontreinigingen en als maat kon gelden voor de bromideconcentratie in het vismonster.

4.1.4. Methodiekbeschrijving.

Onderstaande beschrijving is beknopt weergegeven in bijlage II.

A. Waterige extractie:

Ten behoeve van de standaard-additie methode wordt 6 x 2,5 gr ( $\approx$  15 gr) gevriesdroogd visweefsel afgewogen in een 250 ml erlemeijer, waaraan 120 ml bidest toegevoegd wordt. Na 10 min mengen wordt gedurende 30 min. gekookt onder reflux (stand 5 van een kookplaatje van 500 W). Na afkoelen van het extractie mengsel wordt afgecentrifugeerd bij 18.000 r.p.m. gedurende 20 min. De bovenstaande vloeistoflagen worden afgegoten en verzameld in een maatcilinder. Met bidest wordt aangevuld tot 120 ml.

Het extract wordt vervolgens verdeeld over 6 nikkelen kroezen (20 ml elk) waaraan achtereenvolgens wordt toegevoegd:

- a. aan elke kroes 1 ml 1N NaOH,
- b. eventueel 1 ml 2,5 % ige NaNO<sub>3</sub>-oplossing,
- c. respectievelijk 0, 1, 2, 3, 4 en 5 ml van een bromide standaardoplossing van 25 mg/l.

Gedurende de nacht wordt ingedampt tot droog bij 95 °C onder een persluchtstroom.

### B. Verassing:

De zes kroezen worden vervolgens gelijktijdig verast bij een maximale temperatuur van 550 °C. Deze temperatuur wordt geprogrammeerd bereikt via de volgende stappen:

180 °C	-	1 uur
→ 250 °C	-	10 °C/10 min.
300 °C	-	1 uur
500 °C	-	15 uur
550 °C	-	3 uur.

De witgrijze as, die hierna overblijft, kan worden opgenomen in 10 ml 0,02 M fosfaatbuffer (pH = 2,6) of in 1N azijnzuur en gesuspendeerd met behulp van een ultrasoon bad gedurende 15 minuten. De suspensie wordt door een Millex filter van 0,45 µm gefiltreerd alvorens voor een HPLC analyse te worden gebruikt.

### C. HPLC bromide-analyse.

Voor de HPLC-analyse wordt gebruik gemaakt van een µ Bondapak C-18 amino kolom met afmetingen van 300 x 3,9 mm (ID) van de firma Waters Associates. Als mobiele fase dient een fosfaatbuffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) met een sterkte van 0,02 M, ingesteld op pH = 2,6. Overige parameters staan vermeld in bijlage II, terwijl de extinctie bij 202 nm wordt bepaald. De voorkolomdruk kan oplopen tot 2000 psi (138 bar) bij een flowsnelheid van 1,5 ml/min.

## 4.2. Bromide en totaal-broomgehalten in vis.

De resultaten van de bromide-analyses, verkregen via de standaard-additie methode, staan vermeld in tabel III. Lineaire regressie van de standaardadditiegegevens (zie als voorbeeld figuur 4) leverde regressiecoëfficiënten op, waarmee het gehalte kon worden berekend. Een voorbeeld van de computerbewerking van deze gegevens geeft bijlage III. De berekening van het 95 % betrouwbaarheidsinterval voor de bromidegehalten staat vermeld op bijlage I. In tabel III is ook aangegeven het recovery %, dat wil zeggen de opbrengst van een inwendige bromidestandaard, toegevoegd aan het monster ten behoeve van de standaardadditie. Het gemiddelde opbrengstpercentage bedroeg 68 ± 7 %, exclusief het percentage voor de garnalenmonsters. Voor garnaal werd een veel lager percentage gevonden, hetgeen in verband staat met een tragere en moeizame verassing. Voor zeevis ligt het percentage boven de 70 %. In aal daalde het opbrengstpercentage beneden de 60 %

Met behulp van het totaal-broomgehalte, bepaald met behulp van röntgenfluorescentie, kon door aftrekken van het bromidegehalte een indruk verkregen worden van het organisch gebonden broom. Dit organobroomgehalte tezamen met het totaalgehalte en bromidegehalte zijn weergegeven in tabel IV. Gehalten zijn zowel berekend voor vers visgewicht als voor het drooggewicht. Garnalen en mosselen bleken het hoogste gehalte aan totaal-broom te bevatten, terwijl zoetwatervis de laagste gehalten liet zien. Het gehalte in garnaal en mossel ligt 10 tot 20 voudig hoger dan in vis.

De analyse van bromide in mosselen leverde problemen op. De bromidepiek was sterk verbreed, mogelijk veroorzaakt door onbekende verontreinigingen.

Terwijl het absolute bromidegehalte in vis een sterke variatie te zien geeft, blijft de relatieve bijdrage aan het totaal-broom-

gehalte vrij constant te zijn, namelijk  $64 \pm 15 \%$ , met uitzondering van sprout (40 %). In garnaal is de bijdrage van bromide laag ( $\pm 24 \%$ ), maar als gehalte uitgedrukt in mg/kg veel hoger dan in andere vissoorten. Het gehalte aan organobroomverbindingen in garnaal ligt boven de 200 mg/kg.

In figuur 5 zijn de gehalten overzichtelijk tot een staafdiagram verwerkt. Er is een groot verschil in broomgehalte tussen aal uit het IJsselmeer en aal uit de Grevelingen (zoutwaterbekken). Zowel het bromide als het organobroomgehalte zijn sterk verhoogd in aal uit de Grevelingen. Dit verschil is reeds eerder voor aal aangetoond. Ongetwijfeld is dit feit gerelateerd aan het zoet/zout verschil. Zeewater bevat van nature  $\pm 68$  mg bromide per kg. Indien dit verschijnsel algemeen is bij paling toont het aan dat gaande van zoet naar zout niet alleen het bromidegehalte toeneemt, doch ook het organobroomgehalte. Ofwel aal accumuleert organobroomverbindingen door andere organismen gesynthetiseerd, ofwel aal is zelf in staat organobroomverbindingen te synthetiseren. Nader onderzoek zal dit moeten uitwijzen.

Sprot heeft in vergelijking met haring een zeer hoog organobroomgehalte. Dit verschil in gehalte tussen beide pelagische vissoorten wordt mogelijk veroorzaakt door verschillen in voedselgebruik en leefwijze. Onderzoek naar de achtergronden hiervan levert misschien gegevens op over het trofisch niveau waarin organische broomverbindingen biogesynthetiseerd worden.

#### V REFERENTIES.

- Andersson, O. and G. Blomkvist. Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden. *Chemosphere* 10(1981) 1051.
- Anzion, C.J.M. en J.F. Feenstra. Gebruik en verspreiding van broom in Nederland. Een stofbalans voor 1978, januari 1980. Instituut voor Milieuvraagstukken.
- Ashworth, R.B. and M.J. Cormier. Isolation of 2,6 Di-bromophenol from the Marine Hemichordate, *Balanoglossus biminensis*. *Science* 155 (1967) 1558.
- FAO/WHO (1966). Evaluation of some pesticide residues in food. FAO. PL : CP/15; WHO/FOOD Add./67.32, 112-125.
- Hagel, P. Geur- en Smaakafwijkingen bij Vissen - Oorzaak en Bepaling. 1980. RIVO-rapport CA 80-05.
- Hartog, C. den. Nieuwe Voedingsleer. Aulareeks nr. 123, 1973 (zesde druk).
- Kerkhoff, M.A.T. Het voorkomen van broom in visserijprodukten, 1979. RIVO-rapport CA 79-04.
- Leuenberger, U. et. al. Determination of Nitrate and Bromide in Foodstuffs by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatogr.* 202 (1980) 461.
- Logten, van et. al. Semichronic toxicity of sodium bromide in rats on a normal diet and a low chloride diet. *Med. Fac. Landbouw Rijksuniv. Gent*, 41 (1976) 1499.
- Lunde, G. The Presence of Volatile, Nonpolar Bromo Organic Compounds Synthetized by Marine Organisms. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50(1) (1973) 24.

- Makarieva, T.N. et. al. Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae. *Comp. Biochem, Physiol.* 68B (1981) 481.
- Marine Natural Products, chemical and biological. Perspectives, Vol. IV, 1981, chapter 3. Editor: Paul J. Scheuer, Academic Press, Inc.
- Masschelein, W.J. and M. Denis. The specific determination of bromide in natural waters. *Water Research* 15 (1981) 857.
- Péderson, M. Bromochlorophenols and a brominated diphenylmethane in red algae. *Phytochemistry* 17 (1978) 291.
- Péderson, M. et. al. Blue Iridescence and Bromine in the Cuticle of the Red Algae, *Chondrus crispus* S. *Botanica Marina* 23 (1980) 193.
- Topics in Antibiotic chemistry, Vol. 2, part A: Antibiotics from Marine Organisms, 1979. Editor: P. Sammes. Ellis Horwood Publishers.
- Weber, K. and W. Ernst. Occurrence of Brominated phenols in the marine Polychaete *Lanice conchilega*. *Naturwissenschaften*, 65 (1978) 262.
- Sangster, B. et. al. Study of Sodium Bromide in Human Volunteers, with Special Emphasis on the Endocrine System. *Human Toxicol.* 1 (1982), 393.

STATISTISCHE VERWERKING STANDAARD-ADDITIE BROMIDE.  
=====

De resultaten van de standaardadditie zijn per computer verwerkt. Een voorbeeld van schol is als bijlage III toegevoegd.

De regressielijn door de meetpunten wordt geschat met de methode der kleinste kwadraten, dat wil zeggen dat een lijn wordt bepaald  $Y = m(x) = A + Bx$ , zodanig, dat de uit de meetwaardeset berekende waarde van

$$\Sigma(Y_i - m(x))^2 \equiv \Sigma(Y_i - (A + Bx_i))^2$$

minimaal is.

Het snijpunt van deze regressielijn met de x-as, dus waarbij  $Y = 0$  en  $|x| = A/B$ , geeft het gehalte aan bromide in het visextract zonder standaardtoevoeging.

Berekening van het 95 % betrouwbaarheidsinterval voor het berekende bromidegehalte wordt uitgevoerd met behulp van de standaardfouten van de beide regressiecoëfficiënten A en B en de waarde voor  $t_{0,975}$  van de Student verdeling bij  $n - 2$  vrijheidsgraden ( $\equiv 2,776$ ).

De werkelijke waarde  $\bar{\alpha}$  van A ligt dan tussen de volgende grenzen:

$$A - (t_{0,975} \times \text{st.fout (A)}) < \bar{\alpha} < A + (t_{0,975} \times \text{st.fout (A)}),$$

$$\text{waarbij de standaardfout (A)} = \frac{S}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

verkregen is uit de regressieberekening.

Voor de regressiecoëfficiënt B geldt hetzelfde.

Met de onder en bovengrenzen van beide coëfficiënten is dan het interval waarbinnen de waarde van  $|x|$  voor 95 % zekerheid moet liggen, te berekenen, als volgt:

$$|x|_{\text{minimaal}} = \frac{A_{\text{minimaal}}}{B_{\text{maximaal}}}$$

$$|x|_{\text{maximaal}} = \frac{A_{\text{maximaal}}}{B_{\text{minimaal}}}$$

VISMONSTER

BIJLAGE 2

|  
| homogeniseren  
|  
| vriesdrogen  
|  
|

GEVRIESDROOGD VISMONSTER

|  
|  
waterige extractie (2.5 gr vis +  
| 20 ml bidest)  
|

RUW EXTRAKT

|  
droogdampen in | + toevoeging van  
kroes | Br standaard (25 - 125ug)  
|  
|

geprogrammeerde 0  
verassing \_\_\_\_\_ 180 C.....1 uur

0 0  
| 10 C/10 min \_\_\_\_\_ 250 C

| 0  
| 275 C.....15 min

| 0  
| 300 C.....1 uur

| 0  
| 470 C.....20 uur

De witgrijze as wordt | 0  
| 500 C.....2 uur

opgenomen in 10 ml | 0  
| 550 C.....3 uur

fosfaatbuffer (pH=2.6) |

en gefiltreerd door |

een 0.45µm Millex filter |

HPLC - ANALYSE:

kolom	µBONDAPAK C-18 NH2 30cm.
mobile fase	0.02 M FOSFAATBUFFER pH = 2.6
flow	1.5 ml/min
temperatuur	30 °C
injectie volume	10 µl
attenuating	0.02 AUF.
recorder	10 mV
papier snelheid	5 mm/min

TASKNR 5  
STANDAARD-ADDITIE BROMIDE

BIJLAGE 3

LIN. REGRESSIE BROMIDE (ST.ADD)

\*\*\* LINEAR REGRESSION \*\*\*  
\*\*\* Y=A+B\*X \*\*\*

VARIABLES:

X =BROMIDE-ADDITIE  
Y =SCHOL

INPUT DATA:

subs. 1	obs. 1	:	X= 0	Y= 42	WEIGHT 1
subs. 1	obs. 2	:	X= 25	Y= 72	WEIGHT 1
subs. 1	obs. 3	:	X= 50	Y= 100	WEIGHT 1
subs. 1	obs. 4	:	X= 75	Y= 128	WEIGHT 1
subs. 1	obs. 5	:	X= 100	Y= 158	WEIGHT 1
subs. 1	obs. 6	:	X= 125	Y= 185	WEIGHT 1

N analysed : 6  
N missing : 0

MEAN OF X AND Y: 62.5 114.167

STD DEVIATIONS : 46.7707 53.5104

REGRESSION COEFFICIENTS:	STD. ERRORS:	T-VALUES:
A 42.6667	.575974	74.0774
B 1.144	.00760952	150.338

RESIDUAL ST. ERROR : .795822  
CORRELATION COEFF. : .999912  
DEGREES OF FREEDOM : 4

TABLE OF RESIDUALS:

X	Y	Y(CAL)	E(I)
0	42	42.6667	-.666667
25	72	71.2667	.733333
50	100	99.8667	.133333
75	128	128.467	-.466667
100	158	157.067	.933333
125	185	185.667	-.666667

SUM OF ERRORS^2 : 2.53333  
EXPL. PART OF S.S.: .999823

TABEL I - Monstergegevens.

Vissoort	Herkomst	Monsterdatum	Voorbewerking	Mengmonster (aantal)	Leeftijd (jaar) (gemiddeld)	Lengte (cm) (gemiddeld)
Mosselen	Yerseke Bank	30-06-1980	ontschelpt	n = 25	-	6
Mosselen	Hammen	25-06-1980	ontschelpt	n = 25	-	6 - 7
Mosselen	Terschelling	24-06-1980	ontschelpt	n = 25	-	6 - 7
Mosselen	Wieringen	24-06-1980	ontschelpt	n = 25	-	6 - 7
Garnaal-1	Wierbalg	08-04-1980	gekookt	-	-	-
Garnaal-2	Wierbalg	08-04-1980	rauw	-	-	-
Garnaal-3	W. Waddenzee	24-06-1980	gekookt	-	-	-
Sprot	Deense kust	25-06-1980	gefileerd	n = 30	-	-
Wijting	Bruine Bank	20-06-1980	gefileerd	n = 25	3 ½	32 ± 3
Kabeljauw	Bruine Bank	20-06-1980	gefileerd	n = 25	2	56 ± 4
Schol	Bruine Bank	20-06-1980	gefileerd	n = 25	3	33,5 ± 2,5
Tong	Kust Egmond	20-06-1980	gefileerd	n = 25	4 ½	32,5 ± 2
Makreel	Z. Noordzee	20-06-1980	gefileerd	n = 25	-	-
Haring	Centrale Noordzee	30-06-1980	gefileerd	n = 21	-	-
Aal (rode)	IJsselmeer	19-06-1980	gefileerd	n = 25	-	31 ± 1
Aal (rode)	Grevelingen	19-06-1980	gefileerd	n = 25	-	35 ± 2,5
Snoekbaars	IJsselmeer	26-06-1980	gefileerd	n = 25	4	50 ± 9



TABEL II - Recovery % van bromide standaard toegevoegd aan een wijtingmonster, afhankelijk van de temperatuurreeks.

Experiment	1	2	3	4
Temperatuurreeks	temperatuur tijd (uren)	temperatuur tijd (uren)	temperatuur tijd (uren)	temperatuur tijd (uren)
	300 °C 500 °C 700 °C	150 °C 200 °C 300 °C 400 °C 450 °C	180 °C 300 °C 430 °C 450 °C 460 °C	180 °C tot 250 °C : 10 min/10 °C 300 °C 500 °C 550 °C
	2 32 1/2	1 1 1 5 20	1 1 18 7 12	1 1 1 22 3
Recovery %	40	39	50	74
NaNO <sub>3</sub>	-	+	+	+

TABEL III - Gegevens standaardadditie methode ( $Y = A + Bx$ ).

Vissoort	Regressiecoëfficiënt A	Regressiecoëfficiënt B	Correlatie- coëfficiënt	Standaardfout A	Standaardfout B	(Bromide) mg/kg dry weight	95 % Betrouwbaar- heidsinterval	Recovery % Bromide standaard na verassin.
Garnaal-1	68.6667	0.4640	0.9957	1.6398	0.0217	59.19	+ 11,8	30
Garnaal-2	93.5714	0.5429	0.9993	0.7491	0.0099	68.94	+ 5	36
Garnaal-3	61.8571	0.3223	0.9991	0.5044	0.0067	76.76	+ 6,1	--
Sprot,	63.4419	1.0363	0.9988	2.2953	0.0287	24.48	+ 4,3	67
Wijting	53.7143	0.8606	0.9998	0.6645	0.0088	24.96	+ 1,6	74
Kabeljauw	14.9048	1.0949	0.9998	0.7607	0.0100	5.44	+ 0,9	76
Schol	42.6667	1.1440	0.9999	0.5759	0.0076	14.91	+ 0,8	73
Tong	59.1429	1.1257	0.9997	1.0942	0.0144	21.01	+ 1,8	69
Makreel	35.9524	1.0594	0.9997	0.9370	0.0124	13.57	+ 1,4	68
Haring	32.5714	1.2069	0.9999	0.4411	0.0058	10.79	+ 0,6	77
Aal (IJsselmeer)	8.0952	0.8891	0.9993	1.2752	0.0168	3.64	+ 1,8	56
Aal (Grevelingen)	34.6000	0.8760	0.9996	0.7874	0.0129	15.79	+ 1,7	56
Snoekbaars	14.9048	1.0948	0.9998	0.7607	0.0101	5.44	+ 0,9	65

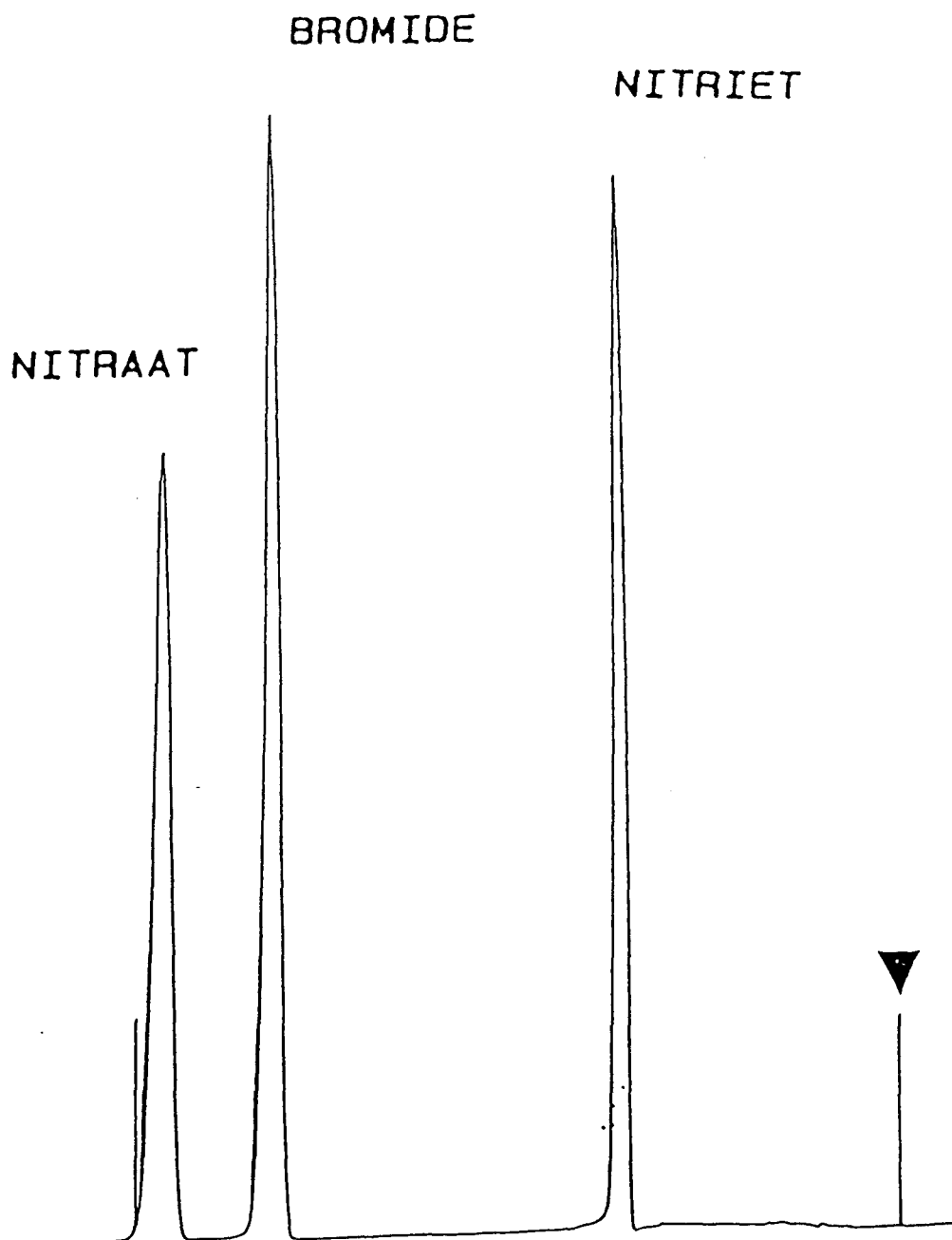
Het bromidegehalte is berekend als  $\frac{A}{B} \times 0,4$  (0,4 = omrekeningsfactor).

TABEL IV - Bromide en Organobroomgehalten in visserijproducten.  
 Gehalten staan in mg/kg.

Vissoort	Drooggewicht monster g/kg	Totaal-broomgehalte gevroogd monster	vers visweefsel	Bromide gevroogd monster	Organobroom gevroogd monster	Bromid %
Mosselen-1	---	242	---	---	---	---
Mosselen-2	191	295	56,4	---	---	---
Mosselen-3	157	277	43,5	---	---	---
Mosselen-4	185	210	38,9	---	---	---
Garnaal-1	272	274	74,5	59	215	22
Garnaal-2	250	278	69,5	69	209	24
Garnaal-3	275	287	78,9	77	210	27
Sprot	296	60,5	17,9	24	36,5	40
Wijting	190	33,2	6,3	25	8,2	75
Kabeljauw	192	25,9	5,0	14,8	11,1	57
Schol	215	22,7	4,9	14,9	7,8	66
Tong	206	31,9	6,6	21	10,9	66
Makreel	220	21,1	4,6	13,6	7,5	64
Haring	271	16,6	4,5	10,8	5,8	65
Aal	475	5,9	2,8	3,6	2,3	61
Aal	268	26,6	7,1	15,8	10,8	59
Snoekbaars	210	8,7	1,8	5,4	3,3	62

CHROMATOGRAM IONEN-STANDAARD  
50  $\mu$ G/ION

FIG. 1



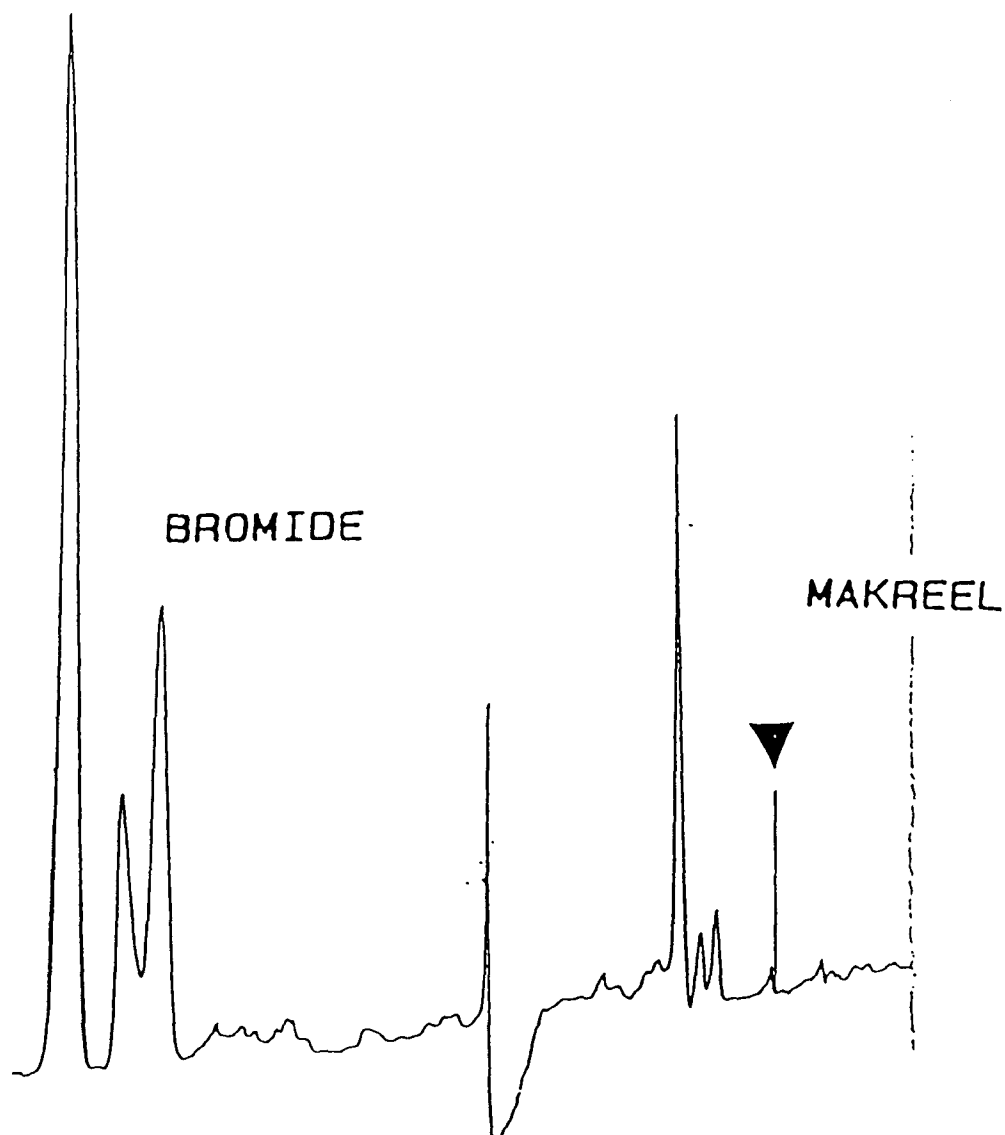
HPLC:  $\mu$ BONDAPAK C-18 amino 30 cm.  
0.02 M FOSFAATBUFFER pH = 2.6  
1.5 ML/MIN  
INJECTIE 10  $\mu$ L

CHROMATOGRAM MAKREEL-MONSTER

FIG. 2

met nitraat-toevoeging t.b.v.  
de verassing.

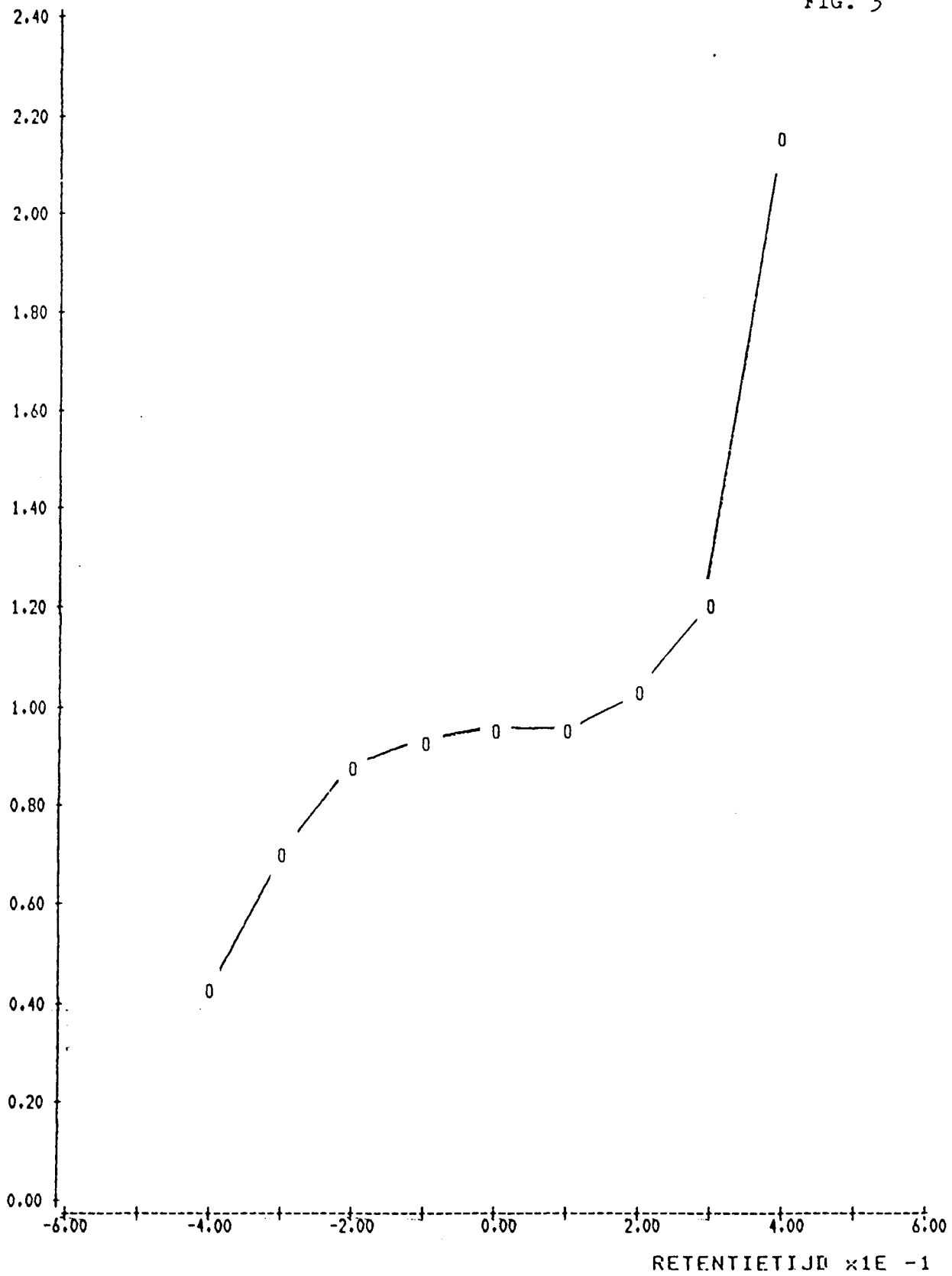
NITRAAT



HPLC: uBONDAPAK C-18 amino 30 cm.  
0.02 M FOSFAATBUFFER pH = 2.6  
1.5 ML/MIN  
INJECTIE 10 uL

RATIO

FIG. 3



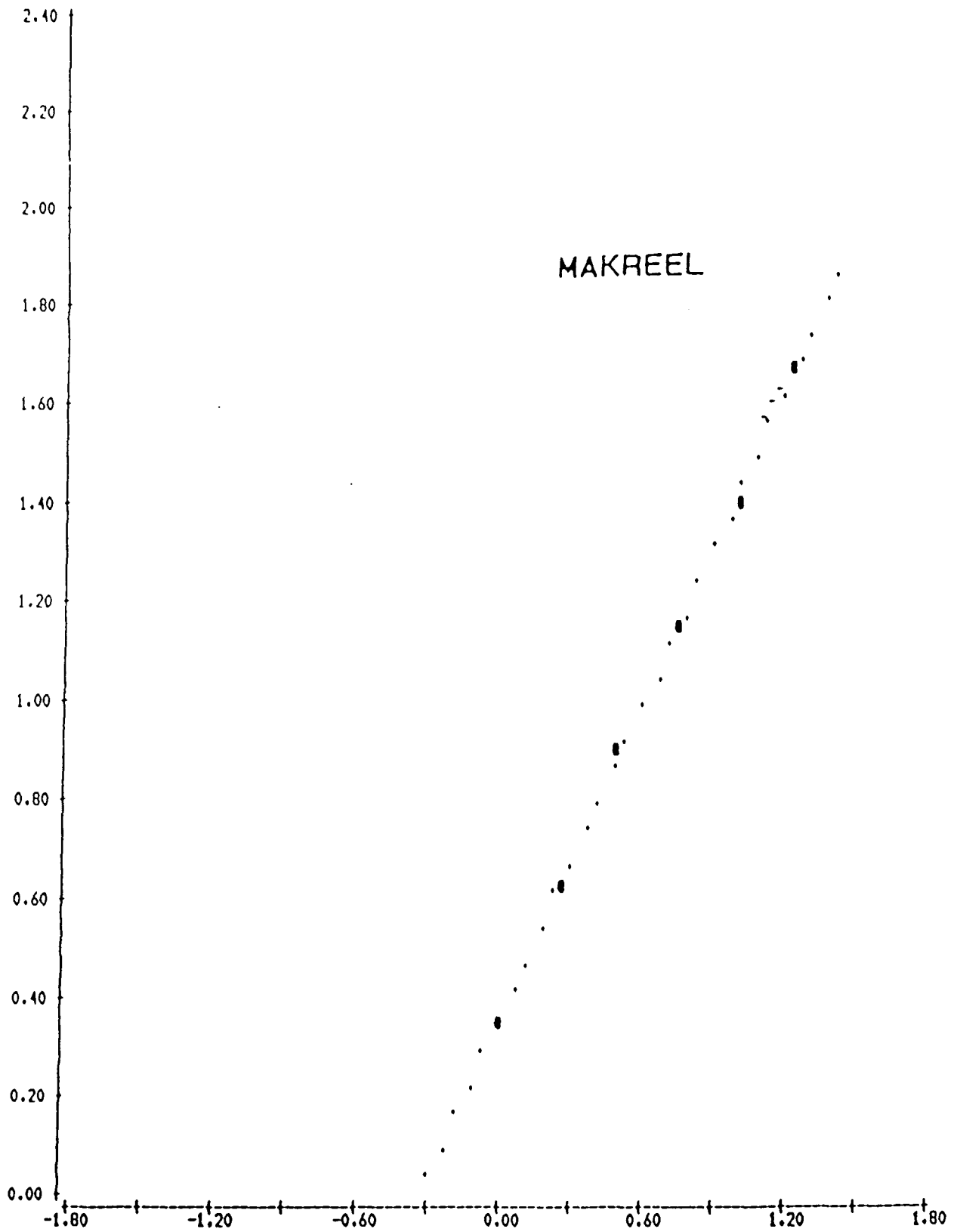
RATIO PLOT HPLC-BROMIDE

RATIO PLOT BROMIDEPIEK 202/210

000000:SUBS. 1

FIG. 4

PIEKHOOGTE in MM X 10<sup>-2</sup>



BROMIDE-TOEVOEGING

STANDAARD-ADDITIE BROMIDE

LIN. REGRESSIE

in  $\mu\text{G} \times 10^{-2}$

Fig. 5

# bromide- en organobroomgehaltenes

MG/KG DROOGGEWICHT

