

Onderzoek naar de aanwezigheid van tris (4-chloorfenyl)methanol en tris (chloorfenyl)-methaan in marine top-predatoren uit de Noordzee en Waddenzee

J. de Boer and P.G. Wester

rivo-dlo



RIVO Rapport C006/94

Onderzoek naar de aanwezigheid van tris (4-chloorfenyl)methanol en tris (chloorfenyl)-methaan in marine toppredatoren uit de Noordzee en Waddenzee

J. de Boer en P.G. Wester

maart 1994

Dit onderzoek werd gedeeltelijk gefinancierd door het Rijks Instituut voor Kust en Zee van de Rijkswaterstaat

DLO-Rijksinstituut voor Visserijonderzoek
Haringkade 1
Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Telefoon: 02550 64646
Telefax: 02550-64644

De Direktie van het RIVO-DLO is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het RIVO-DLO; opdrachtgever vrijwaart het RIVO-DLO van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

E-1896763

Inhoudsopgave:

Samenvatting	3
1. Inleiding	4
2. Materiaal en methoden.....	5
2.1 Gaschromatografisch gedrag en detectie.....	5
2.2 Clean-up	6
2.3 Extractie	7
2.4 Monstergegevens.....	7
3. Resultaten en discussie	8
4. Conclusies	10
Referenties.....	10

Samenvatting

Een methode werd ontwikkeld voor de analyse van tris (4-chloorfenyl)methanol (TCP) in organismen. Met behulp van soxhletextractie, gelpermeatiechromatografie, fractionering over silicagel en gaschromatografische analyse met massaspectrometrische detectie (negatieve chemische ionisatie) kan TCP in organismen bepaald worden met een recovery van 90% en een detectiegrens van 0,02 µg/kg.

De gevonden TCP gehalten in marine toppredatoren uit het Nederlandse kustgebied variëren tussen 0,2 en 2 mg/kg op vetbasis. Vergeleken met TCP-gehalten in kabeljauwlever uit de zuidelijke Noordzee was het gehalte in toppredatoren 25-35 voudig hoger. Het TCP-gehalte in kabeljauwlever ligt met waarden rond 0,04 mg/kg op vetbasis op hetzelfde niveau als dat van HCB en p,p'-DDT.

De gevonden gehalten geven aanleiding tot een uitgebreider onderzoek naar de aanwezigheid van TCP in o.a. vis en sediment.

Nadere informatie over toxicologie, productie en gebruik van TCP wordt zeer gewenst geacht.

De aanwezigheid van tris (4-chloorfenyl)methaan (TCPMe) in de onderzochte organismen werd eveneens aangetoond, maar kon, bij gebrek aan een standaard, niet worden gekwantificeerd.

1. Inleiding

Naar aanleiding van recente informatie uit de literatuur over de wereldwijde verspreiding van tris (4-chloorfenyl)methanol (TCP) en tris (4-chloorfenyl)methaan (TCPMe) (Fig. 1) werd een onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen van TCP in marine toppredatoren uit het Nederlandse kustgebied.

TCP werd aangetoond in zeehonden, dood aangetroffen in Puget Sound in het noordwesten van de Verenigde Staten, in de periode 1972-1982 in gehalten van 23-750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ op vetbasis (Walker et al., 1989). Het voorkomen van TCP werd vervolgens ook gerapporteerd door Jarman et al. (1992), in vogels en zeezoogdieren van het Noord- en

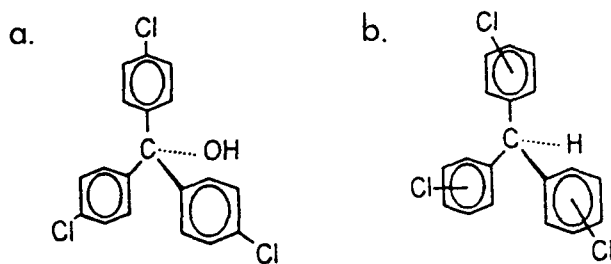


Fig. 1 Structuur van TCP (a) en TCPMe (b).

Zuidpoolgebied, Australië en de oost- en westkust van de Verenigde Staten. In vogeleieren uit British Columbia en Californië werden gehalten tot 5 mg/kg op vetbasis gerapporteerd, terwijl in ijsbeerlever (St. Lawrence river) een gehalte van 6,8 mg/kg op vetbasis werd gevonden (Jarman et al., 1992). Zook et al. (1992) rapporteerden schattingen van TCP-gehalten tot 3 mg/kg vetbasis (0,8 mg/kg produktbasis) in levers van zeehonden uit de Oostzee. In hun spierweefsel werden gehalten tot 1 mg/kg vetbasis (0.3 mg/kg produktbasis) aangetroffen. Naast TCP werd ook TCPMe aangetroffen, maar kwantitatieve gegevens over TCPMe ontbreken tot nu toe.

De in de literatuur gerapporteerde gegevens over TCP en TCPMe waren aanleiding voor een screening van marine toppredatoren uit het Nederlandse kustwater op TCP en TCPMe. Alvorens tot een dergelijke screening te kunnen komen diende eerst uiteraard over een betrouwbare analysemethode te worden beschikt. In dit rapport wordt de hiervoor ontwikkelde analysemethode beschreven, gevolgd door een overzicht van de gevonden gehalten.

2. Materiaal en methoden

Alle materialen en chemicaliën die werden gebruikt, zijn getest op eventuele aanwezige verontreinigingen. Alle oplosmiddelen waren ECD-zuiver (nanograde), afkomstig van C.N. Schmidt, Amsterdam (Promochem).

Een TCP-standaard werd verkregen van Dr. W. Jarman, Joseph M. Long Marine Laboratory, Santa Cruz, Californië, Verenigde Staten. De standaard werd verdund in iso-octaan tot een werkbare concentratie van 3 µg/ml.

2.1 Gaschromatografisch gedrag en detectie

Onderzoek naar gaschromatografisch gedrag en mogelijkheden voor detectie waren gericht op vergelijking van GC/EI-MS (electron impact massaspectrometrie), GC/NCI-MS (negatieve chemische ionisatie-MS) en GC/ECD (electron capture detectie), aan de hand van selectiviteit en detectiegrenzen. Gemeten werden retentietijden en relatieve

Tabel 1: GC/ECD en GC/MS condities voor de analyse van TCP

	GC/ECD	GC/EI-MS	GC/NCI-MS
Apparaat	PE 8500	HP5988A	HP5988A
Ionisatiespanning (eV)	-	70	200
Injectiemethode	splitless	splitless	splitless
Splittertijd	3 min	3 min	3 min
Dragergas	H ₂	He	He
Lineaire gassnelheid (cm/s)	44	28	28
Kolom	CP Sil 8	CP Sil 12	CP Sil 12
Lengte (m)	50	45	45
Inwendige diameter (mm)	0.15	0.25	0.25
Filmdikte (µm)	0.30	0.20	0.20
Injectievolume (µl)	1	3	3
Injectortemperatuur (°C)	280	285	285
Detectortemperatuur (°C)	360	-	-
Transferline temperatuur (°C)	-	280	280
Brontemperatuur (°C)	-	200	100
Analysatortemperatuur (°C)	-	120/75	120/75
Methaandruk plasma (torr)	-	-	1
Brondruk (torr)	-	10 ⁶	2.10 ⁻⁵
Oven temperatuur begin (°C)	90 (3 min)	90 (3 min)	90 (3 min)
Temperatuurprogramma	30°C/min-215°C 40 min 215°C 5°C/min-270°C 35 min 270°C	30°C/min-210°C 10 min 210°C 5°C/min-290°C 30 min 290°C	30°C/min-210°C 10 min 210°C 5°C/min-290°C 30 min 290°C
Geanalyseerde massa's (m/z)	-	111,139,141, 251,362,364	362,364,366
Massa gebruikt voor kwantificering (m/z)	-	139	362

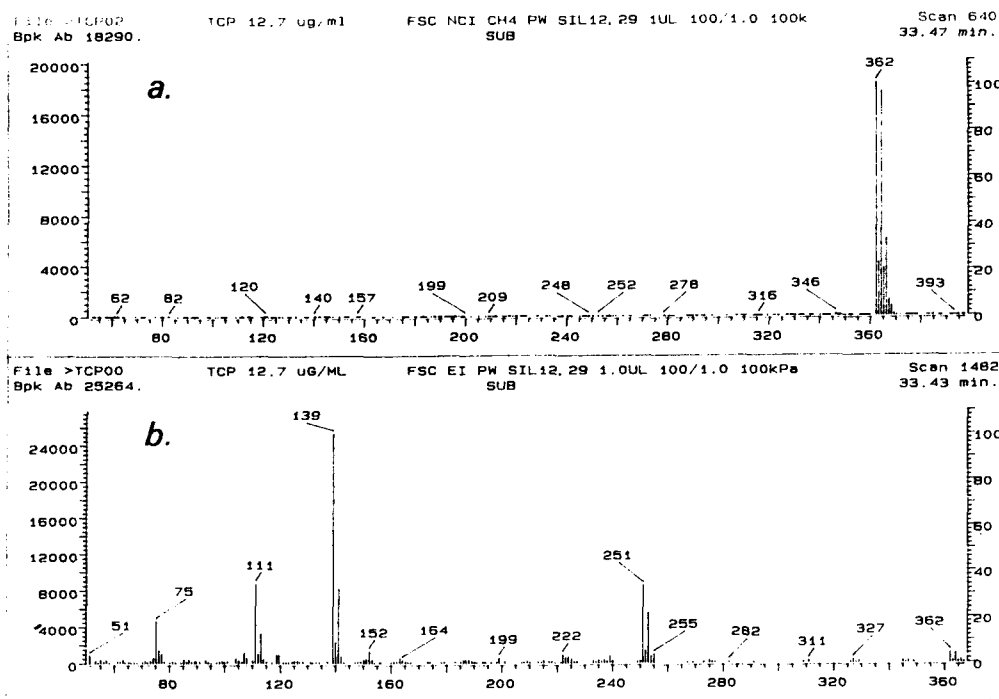


Fig. 2: Massaspectra van TCP standaard: a) NCI, b) EI

retentietijden t.o.v. interne standaarden. In Tabel 1 worden de omstandigheden weergegeven die na een aantal testen geschikt werden bevonden voor de analyse van TCP.

In Tabel 2 worden de detectiegrenzen (3x de ruis) en de retentietijden van TCP weergegeven. Als interne standaard werd 1,2,3,4-tetrachlooraфтаleen (TCN) gebruikt. De EI en NCI spectra zijn duidelijk verschillende (Fig. 2): het NCI spectrum laat een veel minder gefragmenteerd patroon zien.

Tabel 2: Detectiegrenzen en retentietijden van TCP

Methode:	GC/ECD	GC/EI-MS	GC/NCI-MS
Kolom:	CP-Sil 19	CP-Sil 12	CP-Sil 12
Detectiegrens (pg)	10	30	3
Detectiegrens (µg/kg)	0.07	0.2	0.02
Retentietijd (min)	85.88	33.46	33.46
Relatieve retentietijd t.o.v. TCN	3.22	2.26	2.26

2.2 Clean-up

Het gedrag van TCP op een 1.8 g SiO₂.2% H₂O kolom werd onderzocht. Geëluëerd werd met 11 ml iso-octaan (1e fractie) en 10 ml 15% diëthylether in iso-octaan (2e fractie). TCP elueerde volledig gescheiden van de PCB's en temidden van de meeste organochloorpesticiden als dieldrin, DDT, etc.

Het gedrag van TCP op een 15 g $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\% \text{H}_2\text{O}$ kolom werd onderzocht. TCP bleek niet te elueren binnen de fractie van 170 ml pentaan, waarin normaal de PCB's en organochloor pesticiden elueren. Met pentaan/dichloormethaan (1:1) was het wel mogelijk om TCP van de Al_2O_3 kolom te elueren (recovery 96%). Helaas werd met het pentaan/dichloormethaan ook 75% van het opgebrachte vet geëluëerd. Deze methode was dus ongeschikt om TCP van het aanwezige vet te scheiden.

Het bleek ook niet mogelijk om TCP van het vet te scheiden met behulp van destructie met zwavelzuur. TCP werd na roeren met geconcentreerd zwavelzuur volledig afgebroken.

Tenslotte werd een onderzoek naar het gedrag van TCP in gelpermeatiechromatografie uitgevoerd. Gekozen werd voor SX-3 Biobeads met dichloormethaan/hexaan (1:1) als eluens (Norstrom et al., 1986). De kolomlengte was 33 cm en de inwendige diameter 2 cm. Geëluëerd werd onder atmosferische druk. TCP elueerde tussen 70 en 150 ml, terwijl 99% van het opgebrachte vet elueerde tussen 20 en 70 ml. Toch bleek het resterende vet in de TCP fractie nog hinderlijk tijdens het vervolg van de analyse, zodat werd besloten tot het toepassen van een herhaalde gelpermeatie clean-up. Dit leidt weliswaar tot tijdverlies, maar eveneens tot een sterke verbetering van de uiteindelijke chromatogrammen en minder vervuiling van het GC systeem. Om toch weer enige tijdwinst te boeken en bandverbreding tegen te gaan werd uiteindelijk onder N_2 druk gewerkt. De elutiesnelheid ging daardoor omhoog van 1-2 ml/min tot circa 10 ml/min. Een automatische gelpermeatie chromatograaf zou een oplossing kunnen zijn om zowel de snelheid als de reproduceerbaarheid te vergroten.

2.3 Extractie

Van een zeehondmonster werd circa 1 g afgewogen, gehomogeniseerd door zeer fijne stukjes te snijden en in een mortier gewreven met 25 g watervrij natriumsulfaat. Dit monster werd gespiked met 306 ng TCP. Vervolgens werd gesoxhlet met pentaan/dichloormethaan (1:1) gedurende 6 uur. Na een clean-up van het extract met gelpermeatie en fractionering over silicagel zoals hierboven beschreven, werd met GC/NCI-MS een recovery bepaald van 90%. Uit dit gegeven, tezamen met het non-destructieve karakter van soxhletextractie en de vergelijkbaarheid in structuur van TCP en andere organochloorpesticiden, die goede recovery's laten zien met soxhletextractie, werd geconcludeerd dat soxhletextractie met pentaan/dichloormethaan geschikt is als extractiemethode voor TCP.

2.4 Monstergegevens

TCP gehalten werden bepaald in 8 verschillende monsters: 2 zeehonden, 4 dolfijnen, een bruinvis en een kabeljauwlever. De monstergegevens staan vermeld in Tabel 3.

Tabel 3: *Monstergegevens*

Soort	Weefsel	Jaar	Locatie	Leeftijd (jaar)	Geslacht	Vetgehalte (g/kg)
Zeehond (1)	spek	1990	Waddenzee	2	V	385
Zeehond (2)	spek	1992	Waddenzee	0.01	c	563
Gewone dolfijn	spek	1992	Waddenzee	5	V	824
Dolfijn ^a	spek	1989	Centrale Noordzee	d	V	839
Witsnuitdolfijn (1)	spek	1992	Waddenzee	e	M	614
Witsnuitdolfijn (2)	spek	1990	Hollandse kust	10	M	719
Bruinvis	spek	1990	Hollandse kust	>10	M	666
Kabeljauw ^b	lever	1993	Hollandse kust			448

^a preciese soort niet bekend; ^b mengmonster van 25 stuks; ^c onbekend; ^d onbekend, lengte 220 cm; ^e onbekend, lengte 216 cm, gewicht ca. 85 kg.

De zeehondmonsters, de gewone dolfijn en een witsnuitdolfijnmonster (1) werden verkregen van Dr. P. Reijnders van het IBN-DLO (Texel) en de monsters bruinvis en witsnuitdolfijn (2) werden verkregen van Ir. R. Kastelein van het Dolfinarium te Harderwijk.

3. Resultaten en discussie

Uit Tabel 2 blijkt dat de detectiegrenzen van GC/ECD en GC/NCI-MS elkaar niet veel ontlopen. Vanwege de grotere selectiviteit gaat de voorkeur uit naar GC/NCI-MS. Een vergelijkbare analyse van een zeehondmonster met GC/ECD en GC/NCI-MS resulteerde in aanzienlijke hogere gehalten met GC/ECD. Dit is vermoedelijk een gevolg van coëlutie en zal nog nader worden onderzocht. In Fig. 3 wordt een GC/ECD chromatogram van een zeehondmonster op een CP Sil 8 kolom getoond. Vanwege de betrekkelijk lange retentietijd bestaat ook het gevaar van discriminatie tijdens de GC analyse, hetgeen de gehalten kan beïnvloeden.

In het algemeen zijn stoffen met minder dan vier chlooratomen niet goed te meten met NCI vanwege een lage respons. De aanwezigheid van het electronegatieve zuurstof zorgt er blijkbaar voor dat TCP toch een goede respons vertoont. GC/EI-MS komt t.g.v. een veel lagere gevoeligheid voor TCP niet in aanmerking als geschikte detectiemethode.

Een voorbereiding bestaande uit soxhletextractie met pentaan/dichloormethaan (1:1), tweemaal gelpermeatie chromatografie op SX-3 Biobeads (hexaan/dichloormethaan (1:1)) en fractionering over silicagel, is geschikt voor de analyse van TCP en levert een recovery van 90%. De fractionering over silicagel is toegevoegd voor een verdere opschoning van de extracten en voor de scheiding van PCB's. Howel TCP erg laat elueert in de GC analyse, is de kans op coëlutie betrekkelijk gering. Enkele PCB's geven echter wel een signaal op dezelfde massa's van TCP-ionen (m/z 362, 364 en 366). Dit signaal is relatief zodanig veel groter dan dat van TCP, dat in geval van coëlutie de TCP bepaling niet goed mogelijk is. Een automatisering van de gelpermeatie-stap kan, behalve een versnelling en een nauwere bandbreedte, mogelijk ook een scheiding tussen TCP en PCB's bewerkstelligen.

Nader onderzoek kan nog worden verricht naar coëlutie in GC/ECD chromatogrammen, discriminatie in de GC analyse en naar de herhaalbaarheid van de ontwikkelde methode.

In Tabel 4 worden de TCP-gehalten vermeld die in de 8 eerder genoemde monsters werden gemeten.

Tabel 4: TCP-gehalten in zeezoogdieren en kabeljauwlever

monster	TCP-gehalte ($\mu\text{g/kg}$ nat gewicht)	TCP-gehalte ($\mu\text{g/kg}$ vetbasis)
Zeehond, Waddenzee (1)	760	2000
Zeehond, Waddenzee (2)	420	750
Gewone dolfijn, Waddenzee	180	220
Dolfijn, Centrale Noordzee	160	190
Witsnuitdolfijn, Waddenzee	350	570
Witsnuitdolfijn, Hollandse kust	1000	1400
Bruinvis, Hollandse kust	680	1000
Kabeljauwlever, Hollandse kust	18	40

De gevonden TCP-gehalten in zeehonden komen overeen met die geschat door Zook et al. (1992) in zeehonden uit de Oostzee (tot 3 mg/kg vetbasis). TCP-gehalten in zeehonden uit Puget Sound (USA) lagen op een iets lager niveau (23-750 $\mu\text{g/kg}$ vetbasis) (Walker et al., 1989). Er lijkt weinig verschil te bestaan tussen biomagnificatie van TCP in zeehonden en andere toppredatoren. Het TCP-gehalte in kabeljauwlever is op vetbasis 25-35 maal lager dan dat in een bruinvis en een witsnuitdolfijn uit dezelfde omgeving, hetgeen duidt op een sterke biomagnificatie. Het TCP-gehalte in kabeljauwlever is vergelijkbaar met dat van HCB en p,p'-DDT (de Boer, 1989, Anon., 1993).

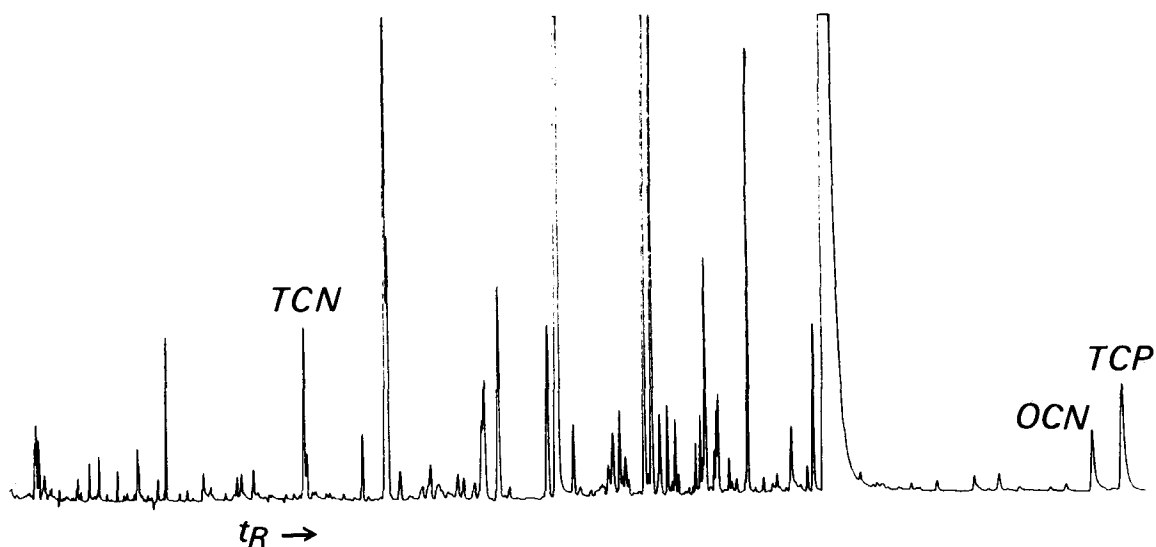


Fig. 3: Chromatogram van een witsnuitdolfijnextract (2) op een CP-Sil 8 kolom (TCN: 1,2,3,4-tetrachloronaftaleen, OCN: octachloronaftaleen).

Er zijn geen gegevens over de toxiciteit van TCP. Een pesticide dat in structuur lijkt op TCP, dicofol, heeft een betrekkelijk lage toxiciteit vergeleken met andere organochloorpesticiden (LD50 voor ratten: 668-842 mg/kg) (Worthing and Walker, 1983).

Er is eveneens weinig bekend over bronnen van TCP. Het is mogelijk dat TCP een derivaat is van TCPMe of TCP methylchloride, die worden gebruikt bij de vervaardiging van kleurstoffen (Michaels and Lewis, 1985, 1986, Jarman et al., 1992). TCP en TCPMe worden ook gebruikt bij de productie van methylacrylaat polymeren, in de farmaceutische industrie en als bestrijdingsmiddel. Een nadere inventarisatie van voorkomen, productie en gebruik van TCP en TCPMe is, gezien de gevonden gehalten, gewenst. Dit geldt ook voor verder toxicologisch onderzoek.

In een screening van de onderzochte monsters met GC/EI-MS op TCPMe (massa's 346, 348, 350) werd, ondanks de lagere gevoeligheid van deze detectiemethode in vergelijking tot de NCI methode voor TCP, ook de aanwezigheid van TCPMe vastgesteld. TCPMe was aanwezig in zowel de iso-octaan als de diëthylether/iso-octaanfractie van de silicagel kolom. Bij gebrek aan een TCPMe standaard kon TCPMe nog niet worden gekwantificeerd.

4. Conclusies

TCP kan aangetoond en gekwantificeerd worden in biologische monsters na soxhletextractie met pentaan/dichloormethaan (1:1), gelpermeatie chromatografie op SX-3 Biobeads met hexaan/dichloormethaan (1:1) en fractionering over silicagel. De uiteindelijk detectie vindt plaats met GC/NCI-MS. De detectiegrens is 0.02 µg/kg en de recovery is 90%.

In marine toppredatoren van de Nederlandse kust werden TCP gehalten aangetoond van 160-1000 µg/kg op produktbasis en 190-2000 µg/kg op vetbasis. In kabeljauwlever werd een gehalte van 18 µg/kg (40 µg/kg op vetbasis) aangetoond. Het TCP-niveau in kabeljauwlever is vergelijkbaar met dat van HCB en p,p'-DDT.

De gevonden gehalten geven aanleiding tot een uitgebreider onderzoek naar het voorkomen van deze stoffen, onder andere in vis en sediment.

Meer informatie over toxicologische achtergronden van TCP en over productie en toepassing van deze stof is eveneens zeer gewenst.

Voor een kwantificering van het in de onderzochte monsters aangetroffen TCPMe dient over een standaard van deze stof beschikt te worden.

Referenties

Anon (1993). Jaarverslag 1992 RIVO-DLO, IJmuiden.

Boer, J. de (1989). Organochlorine compounds and bromodiphenylethers in livers of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the North Sea, 1977-1987. *Chemosphere* **18**, 2131-2140.

- Jarman, W.M., M. Simon, R.J. Norstrom, S.A. Bruns, C.A. Bacon, B.R.T. Simonelt and R.W. Riseborough (1992). Global distribution of tris (4-chlorophenyl)methanol in high trophic level birds and mammals. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1170-1774.
- Michaels, G.B. and D.L. Lewis (1985). Sorption and toxicity of azo and triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**, 45-50.
- Michaels, G.B. and D.L. Lewis (1986). Microbial transformation rates of azo and triphenylmethane dyes. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**, 161-166.
- Walker, W., R.W. Riseborough, W.M. Jarman, B.W. Lappe, J.A. Tefft and R.L. DeLong (1989). Identification of tris (chlorophenyl)methanol in blubber of harbor seals from Puget Sound. *Chemosphere* **18**, 1799-1804.
- Worthing, C.R. and S.B. Walker (1983). *The Pesticide Manual*, 7th edition. The Lavenham Press Limited, Lavenham, Suffolk, UK.
- Zook, D.R., H.R. Buser, P.A. Bergqvist, C. Rappe and M. Olsson (1992). Detection of tris (chlorophenyl)methane and tris (4-chlorophenyl)methanol in ringed seal (*Phoca hispida*) from the Baltic Sea. *Ambio* **21**, 557-560.