

Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV

Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Tel.: 0255 564646
Fax.: 0255 564644
Internet: postkamer@rivo.dlo.nl

Postbus 77
4400 AB Yerseke
Tel.: 0113 572781
Fax.: 0113 573477

RIVO Rapport

Nummer: C066/04

Analyse van baggerslib met de DR-CALUX assay en een screening met gaschromatografie met time-of-flight massaspectrometrie

Pim E.G. Leonards, Marion Hoek van Nieuwenhuizen en Judith M. van Hesselingen

Opdrachtgever: RIKZ
Postbus 207
9750 AE Haren
drs. J.C. Klamer

Project nummer: 3441228008

Akkoord: dr. J. de Boer
Afdelingshoofd Milieu en Voedselveiligheid

Handtekening: _____

Datum: 13 september 2004

Aantal exemplaren:	10
Aantal pagina's:	17
Aantal tabellen:	6
Aantal figuren:	2
Aantal bijlagen:	4

In verband met de
verzelfstandiging van de
Stichting DLO, waartoe tevens
RIVO behoort, maken wij sinds 1
juni 1999 geen deel meer uit van
het Ministerie van Landbouw,
Natuurbeheer en Visserij. Wij zijn
geregistreerd in het
Handelsregister Amsterdam
nr. 34135929
BTW nr. NL 808932184B09.

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

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets van dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	2
Samenvatting	3
1. Inleiding.....	3
2. Doelstelling	4
3. Materialen en methoden	4
3.1 Extractie en zuivering	4
3.2 GC-ToF-MS screening	6
3.3 DR-CALUX	6
4. Resultaten en discussie.....	7
4.1 DR-CALUX	7
4.2 Degradatie	8
4.3 GC-ToF-MS screening	9
5. Conclusies	15
6. Referenties.....	15

Samenvatting

In dit onderzoek werd de toxiciteit van dioxine-achtige stoffen met behulp van de DR-CALUX assay van sediment uit het Zeehavenkanaal van Delfzijl bepaald. De toxiciteit was vergelijkbaar met de resultaten uit het onderzoek van 2002. De activiteit van het sediment bewerkt met een niet-destructieve methode (GPC) was 100 maal hoger dan wanneer het sediment werd bewerkt met het standaard protocol (SPECIE-01) waarbij een chemisch agressieve methode wordt toegepast. Dit bevestigt de resultaten uit eerder onderzoek.

Na 18 maanden van anaërobe degradatie van het sediment was de DR-CALUX activiteit van de totale hoeveelheid extraheerbare stoffen met een DR-CALUX activiteit onveranderd, maar een verhoging werd waargenomen voor de fractie waarin zich dioxinen, furanen en PCB's bevonden. Onduidelijk is waardoor deze verhoging werd veroorzaakt. Echter een sterke afname in DR-CALUX activiteit werd gevonden voor stoffen die biologisch beschikbaar zijn.

In sediment werd een drietal stoffen (dichloroanthraceen, dichloro-lichexanthone, dichloorbenzidine) met gaschromatografie met time-of-flight massaspectrometrie geïdentificeerd. Deze stoffen bezitten mogelijk een DR-CALUX activiteit en kunnen daarom bijdragen in de dioxine-achtige toxiciteit. Uitgezocht zou moeten worden of deze stoffen inderdaad een activiteit bezitten en hoeveel van de toxiciteit verklaard kan worden.

1. Inleiding

Baggerspecie afkomstig van het Zeehavenkanaal van Delfzijl, bemonsterd in oktober 2002, werd in een recente studie onderzocht op dioxine-achtige toxiciteit met behulp van de DR-CALUX assay en een chemische analyse van gechlorideerde dioxinen en dibenzofuranen en PCB's (Klamer et al., 2004). De DR-CALUX activiteit was 43 pg TEQ/g sediment, uitgevoerd volgens SPECIE-01 en voldeed aan de baggerspecie CTT-norm (Chemie-Toxiciteit-Toets) van 50 pg TEQ/g. Het onderzoek liet zien dat circa 46% van de dioxine-achtige toxiciteit afkomstig was van de geanalyseerde dioxinen, dibenzofuranen en vlakke PCB's. Het overige deel van de toxiciteit werd toegeschreven aan onbekende stoffen met een dioxine-achtige werking. Door gebruik te maken van een nieuwe analytische procedure werd aangetoond dat een circa 100x maal hogere DR-CALUX respons werd gevonden. Het overgrote deel van deze extra activiteit kon niet worden verklaard en aanbevolen werd om chemisch onderzoek te verrichten naar de aard van deze onbekende stoffen. Door middel van een biomimetische extractie (siliconen rubber sheet) liet het onderzoek tevens zien dat de aanwezige dioxine-achtige stoffen slecht beschikbaar waren voor organismen.

Het onderhavige project is het vervolg op het bovenbeschreven onderzoek en heeft als doel om de gevonden resultaten met de biomimetische extractie en het verschil tussen de nieuwe analytische procedure en het SPECIE-01 protocol van de vorige studie te bevestigen. Daarnaast werd door middel van een tweejarige anaërobe afbraakstudie nagegaan of de DR-CALUX activiteit van het slib verlaagd kon worden. In alle monsters werd vervolgens een chemische screening uitgevoerd om de identiteit van de stoffen te achterhalen.

In het huidige onderzoek werd de DR-CALUX activiteit van het sediment uit 2002 en het sediment na de degradatie stap (mei 2004) bepaald. Het sediment werd geëxtraheerd met een totale extractie (ASE) en met een biomimetische extractie procedure om de makkelijk opneembare stof fractie te bepalen. Vervolgens werden de extracten gezuiverd met een chemisch agressieve methode (multilayer silica, MLS) en een niet-destructieve methode (gel permeatie chromatografie, GPC). Alle extracten werden met de DR-CALUX geanalyseerd en tevens werd een chemische screening met gaschromatografie gecombineerd met time-of-flight massaspectrometrie (GC-ToF-MS) uitgevoerd om de mogelijke identiteit van de aangetroffen stoffen te bepalen. De stoffenlijst kan gebruikt worden om stoffen te selecteren die een dioxine-achtige werking bezitten. Met behulp van de relatieve potenties van de geselecteerde stoffen voor de DR-CALUX kan bepaald worden hoe veel deze stoffen bijdragen aan de totale DR-CALUX activiteit. Dit laatste deel van het onderzoek ligt buiten de doelstelling van het huidige project.

2. Doelstelling

Doel van het onderzoek was het bepalen van de DR-CALUX activiteit van het baggerslib en het analyseren van de extracten met gaschromatografie met time-of-flight massaspectrometrie (GC-ToF-MS) om de identiteit van de aanwezige stoffen te bepalen.

3. Materialen en methoden

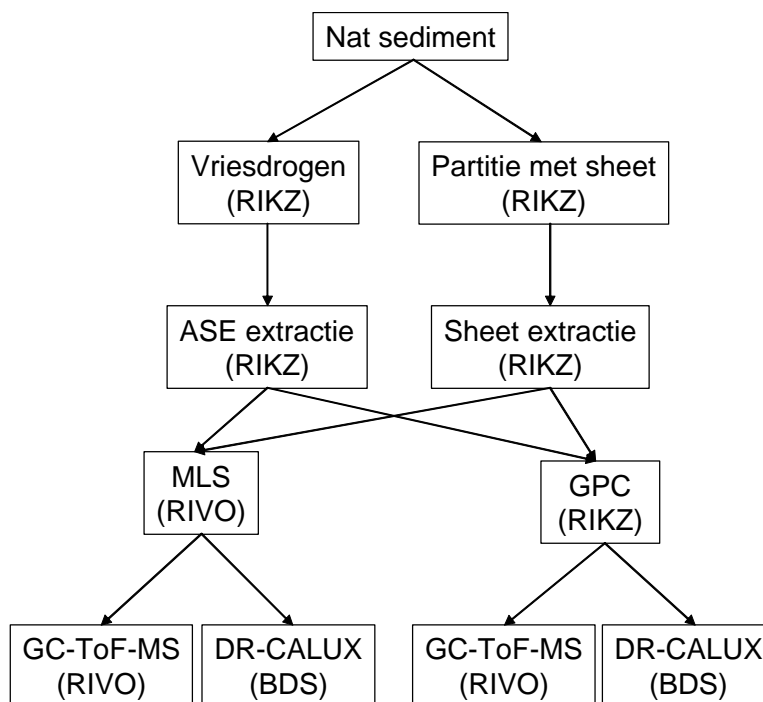
3.1 Extractie en zuivering

Een deel van het natte slibmonster werd gevriesdroogd en vervolgens werd circa 5 gram met Accelerated Solvent Extraction (ASE) (Dionex) geëxtraheerd met dichloormethaan (RIKZ). Een deelextract werd met gel permeatie chromatografie (GPC) (PL gel kolom) met dichloormethaan als elutiemiddel gezuiverd (RIKZ). Het andere deelextract werd met een multilayer silica (MLS) kolom (RIVO) volgens het SPECIE-01 protocol gezuiverd. De MLS kolom bestaat uit silica geïmpregneerd met H₂SO₄, NaOH en zilvernitraat. Zowel het GPC als het MLS extract werd

verdeeld; één deel voor een DR-CALUX bepaling en één deel voor een screening met GC-ToF-MS. De extracten voor de DR-CALUX werden bijna drooggedampt en vervolgens overgebracht in DMSO. Aan de extracten voor de GC-ToF-MS screening werden drie interne standaarden toegevoegd (CB, 112, BDE116 en 13C-BDDE209). Het extract werd ingedampt tot circa 1 ml en overgebracht in ethylacetaat. Het eindextract werd ingedampt tot circa 200 µl en geanalyseerd met GC-ToF-MS. Na GC-ToF-MS analyse bleken de MLS extracten nog te veel zwavel (S8) te bevatten. Deze extracten werden daarom met koper krullen behandeld om de zwavel te verwijderen.

Het RIKZ voerde de biomimetische extractie en elutie met de silicone sheet uit. Dit extract werd gemaakt door een stukje siliconen rubber enkele dagen in een ton met nat sediment op een rollerbank te laten meedraaien. De sheet werd vervolgens met hexaan geëxtraheerd. Een deel van het extract werd met GPC gezuiverd en een deel van het extract met MLS. Beide extracten werden met de DR-CALUX en de GC-ToF-MS geanalyseerd.

In figuur 1 wordt een overzicht van de extractie-, zuivering- en detectiemethoden van zowel de ASE als de silicone sheet procedure weergegeven.



Figuur 1: Opwerkingsprocedure van het sediment en de uitvoerende instituten. ASE: accelerated solvent extraction; Sheet: silicone rubber sheet; MLS: multilayer silica; GPC: gel permeatie chromatografie.

3.2 GC-ToF-MS screening

De extracten werden geanalyseerd met een Trace GC (Thermo-Finnigan) met VF-5 15 m x 0.25 mm x 0.1 μm (Varian) GC kolom. Van het extract werd 1 μl in een PTV injector geïnjecteerd bij een temperatuur van 250°C. De GC oven werd als volgt geprogrammeerd: 90°C voor 2 minuten gevolgd door een temperatuurstijging van 5°C/min naar 310°C met een hold time van 15 min. De interface temperatuur was 300°C. Als massaspectrometer werd een Tempus update (Thermo Finnigan) ToF-MS systeem gebruikt. Bron temperatuur was 200°C in electron impact (EI) mode en 160°C in negatieve chemische ionisatie (NCI) mode. De extracten werden gemeten in de full scan mode (EI: m/z 44-1000, NCI m/z 34-1000) met 2 scans per seconde. Als chemisch ionisatie gas werd methaan gebruikt met een gassnelheid van 2 ml/min.

De chromatogrammen werden vervolgens geladen in AMDIS en na deconvolutie van de pieken werden de mogelijke kandidaten voor de onbekende pieken met behulp van de NIST98 MS bibliotheek voor EI spectra bepaald. Als threshold voor piek identificatie werd een waarde van 0.01% van het totale signaal aangehouden. Bij een lagere waarde worden zeer veel pieken in de ruis van het chromatogram gedetecteerd (tot meer dan 2000 pieken) en werd het onmogelijk om binnen het tijdsbestek van het project alle pieken handmatig te controleren. Met een threshold van 0.01% worden tussen de 75 en 900 pieken gevonden.

Voor de NCI spectra werd de RIVO NCI-MS bibliotheek en het NCI handboek van Stemmler en Hites (1988) gebruikt. Voor NCI-identificatie van gechloreerde en gebromeerde verbindingen werd tevens de NIST98 EI-spectra bibliotheek gebruikt omdat voor deze verbindingen het NCI ionisatieproces voornamelijk via het electron capture principe verloopt en daarmee het NCI-spectrum grote overeenkomsten vertoont met het EI-spectrum.

Alle EI en NCI resultaten werden vervolgens overgebracht naar Excel en in AMDIS werden handmatig alle geselecteerde kandidaten gecontroleerd. Niet correcte identificaties werden verwijderd uit de spreadsheet. Uit eerdere studies is gebleken dat een handmatige controle van de spectra strikt noodzakelijk is omdat er relatief veel onjuiste identificaties via de automatisch functie worden gerapporteerd. Alleen voor verbindingen die een match factor van groter dan 95% bezitten is handmatige controle niet noodzakelijk, dit betreft echter minder dan 1% van alle gerapporteerde kandidaten.

3.3 DR-CALUX

Alle extracten werden door BioDetection Systems (BDS, Amsterdam) met de DR-CALUX assay gemeten volgens BDS protocol Pe-BDS-004e (Besselink et al., 2001). De resultaten werden uitgedrukt in pg TEQ/g droge stof. Van beide opwerkingsmethoden (GPC en MLS) werd een procedurele blanco geanalyseerd.

4. Resultaten en discussie

4.1 DR-CALUX

De procedurele blanco monsters vertonen een verhoogde respons; vooral de GPC blanco. De bijdrage van de blanco's aan de sedimentmonsters bedraagt echter minder dan 5% en daarom werden de DR-CALUX activiteiten van het sediment niet gecorrigeerd voor de blanco waarden. Onverdunde GPC-extracten van de sedimenten waren cytotoxisch maar na een verdunding van het DMSO-extract kon de DR-CALUX activiteit worden bepaald.

In tabel 1 worden de DR-CALUX activiteiten van het sediment geanalyseerd in 2004 (Man, 2004) en ter vergelijking de resultaten van de eerdere studie uit 2002 (Leonards et al., 2002) weergegeven. De gemeten activiteit in 2004 met de MLS methode is 41 pg TEQ/g in het sediment uit 2002 (1002888 A) en is vergelijkbaar met het resultaat uit 2002 van 43 pg TEQ/g (10028887). De gehalten voldoen aan de CTT-norm van 50 pg TEQ/g baggerslib. Met de MLS methode worden voornamelijk dioxinen, dibenzofuranen en PCBs gemeten.

Met de GPC procedure werd een DR-CALUX gehalten gevonden van 4719 pg TEQ/g die overeenkomt met de waarde van 4693 pg TEQ/g uit 2002. De DR-CALUX activiteit van de GPC methode is circa 100 maal hoger dan de MLS methode en vergelijkbaar met eerdere bevindingen uit het Zeehavenkanaal (Klamer et al., 2004), Rotterdamse Haven en de Noorzee (Klamer et al. 2002). De hogere activiteit met de GPC methode is mogelijk toe te schrijven aan de aanwezigheid van andere stoffen die een DR-CALUX activiteit bezitten. De aanwezigheid van andere stoffen komt aanbod in het GC-ToF-MS screeningsonderzoek.

Geconcludeerd wordt dat de huidige resultaten de bevinding van 2002 wat betreft het niveau van verontreiniging en de verschillen tussen de MLS (SPECIE-01) en GPC procedure bevestigen.

Tabel 1: Gemiddelde en standaarddeviatie (SD) van de DR-CALUX activiteit (pg TEQ/g dw of pg TEQ/g silicone extract) van het Zeehavenkanaal sediment en het siliconen sheet extract geanalyseerd in 2004. Tevens zijn de bemonsterings- en analysedatum, zuiveringmethode en of biodegradatie werd uitgevoerd weergegeven. De analyseresultaten van 2002 (Leonards et al., 2002) zijn ter vergelijking opgenomen.

RIKZ code	Bemonstering datum	Analyse datum	Zuivering methode	Degradatie	DR-CALUX activiteit (pg TEQ/g sediment of pg TEQ/g silicone extract)	SD	Verhouding GPC/MLS
Sediment							
10028887	Okt. 02	2002	MLS	nee	43	3	109
10028888 A	Okt. 02	2004	MLS	nee	41	3	115
10041046 A	Mei 04	2004	MLS	ja	76	2	56
10028887	Okt. 02	2002	GPC	nee	4693	681	
10028888 B	Okt. 02	2004	GPC	nee	4719	176	
10041046 B	Mei 04	2004	GPC	ja	4257	304	
Silicone sheet extract							
Sheet 02 MLS	Okt. 02	2002	MLS	nee	84	11	48
Sheet 04 MLS	Mei 04	2004	MLS	ja	102	8	4
						108	
Sheet 02 GPC	Okt. 02	2002	GPC	nee	3996	8	
Sheet 04 GPC	Mei 04	2004	GPC	ja	397	15	

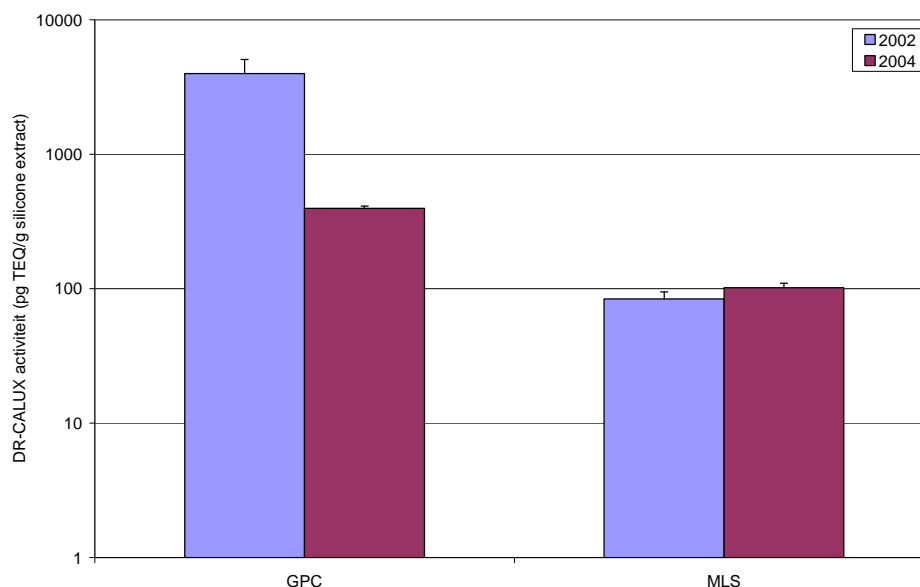
4.2 Degradatie

Na 18 maanden van anaërobe degradatie bij 20°C is de DR-CALUX activiteit van de MLS fractie, waarin zich voornamelijk dioxinen, dibenzofuranen en PCBs bevinden, met 77% toegenomen: 41 pg TEQ/g voor degradatie en 76 pg TEQ/g na degradatie. Dit in tegenstelling tot de activiteit van de GPC fractie waarin de activiteit voor en na degradatie gelijk is gebleven, 4719 en 4257 pg TEQ/g respectievelijk. Dit duidt er op dat de totale hoeveelheid extraheerbare stoffen met een DR-CALUX activiteit onveranderd is gebleven na degradatie. De toename van de activiteit van de MLS fractie kan niet worden verklaard. Het ontstaan van meer toxische transformatie producten door de afbraak van moederverbindingen, bijvoorbeeld de degradatie van mono-ortho gesubstitueerde PCBs tot de meer toxische non-ortho gesubstitueerde PCBs, is niet waarschijnlijk omdat hiervoor geen aanwijzingen in de literatuur worden gevonden (Aider et al., 1993; Qensen et al., 1998; Cheolcho et al., 2003).

De biomimetische extractieprocedure geeft informatie over de beschikbaarheid van stoffen. In figuur 2 worden de gevolgen van de degradatiestap voor GPC en MLS methode geïllustreerd. De DR-CALUX activiteit van het silicone-sheet extract gemeten in 2004 na degradatie is 20% hoger dan het gehalte gevonden in 2002 indien het extract behandeld wordt met de chemische destructieve methode (MLS). Deze geringe toename kan grotendeels verklaard worden aan de

onzekerheid van de meting. De resultaten duiden op geen afbraak van dioxinen, dibenzofuranen en PCBs.

Voor de extracten gemaakt met de niet-destructieve methode (GPC) werd een circa tien maal lagere DR-CALUX activiteit na degradatie gevonden: 3996 pg TEQ/g extract voor en 397 pg TEQ/g extract na degradatie. Dit duidt mogelijk op afbraak van goed beschikbare stoffen of ageing van stoffen.



Figuur 2: DR-CALUX activiteit (pg TEQ/g silicone extract) van de bio-mimetische extractie van het sediment voor (2002) en na 18 maanden van anaërobe degradatie (2004). Extracten werden bewerkt met een non-destructieve methode (GPC) en een chemisch destructieve methode (MLS).

4.3 GC-ToF-MS screening

De EI- en NCI-chromatogrammen van de sediment en de siliconen sheet extracten zijn weergegeven in bijlage 1 en 2. Opvallend is het grote verschil in patroon van de EI-chromatogrammen tussen de "totaal" extractie procedure met ASE en de biomimetische extractie met het siliconen rubber. Dit verschil is minder groot voor de NCI chromatogrammen. Het degradatie-experiment laat weinig verschillen zien in zowel de EI- en NCI-chromatogrammen voor en na degradatie.

In tabel 2 en 3 wordt een overzicht gegeven van i) het aantal pieken dat werd aangetroffen door AMDIS in het chromatogram, ii) het aantal pieken dat geïdentificeerd werd met de automatische zoekfunctie en de NIST98 bibliotheek en iii) het aantal geïdentificeerde pieken na handmatige controle waarbij het spectrum van de onbekende piek werd vergeleken met het spectrum uit de NIST98 bibliotheek. Opvallend is het grote aantal pieken dat niet juist kon

worden geïdentificeerd bij de automatische zoekfunctie. Dit betreft niet alleen pieken met een lage intensiteit of een lage reverse fit waarde maar ook pieken met een hoge reverse fit waarde.

Tabel 2: Totaal aantal pieken na deconvolutie met AMDIS, het aantal pieken geïdentificeerd pieken met automatische zoekfunctie en NIST98 bibliotheek, en het aantal pieken geïdentificeerd na handmatige controle van de EI-chromatogrammen.

Monster	Zuivering methode	Totaal aantal pieken gevonden na deconvolutie met AMDIS	Aantal pieken geïdentificeerd met automatische zoekfunctie en NIST98 bibliotheek zonder threshold	Aantal pieken geïdentificeerd met automatische zoekfunctie en NIST98 bibliotheek met een threshold van 0.01%	Aantal pieken juist geïdentificeerd na handmatige controle
Blanco A	MLS	709	552	121	38
10028888A	MLS	827	594	84	23
10041046A	MLS	733	493	78	25
Blanco B	GPC	1451	1050	38	19
10028888B	GPC	1276	1140	229	47
10041046B	GPC	2449	2378	252	63
Sheet 04 GPC	GPC	195	137	75	20
Sheet 04 MLS	MLS	783	733	123	15

A: MLS zuivering; B: GPC zuivering

Tabel 3: Totaal aantal pieken na deconvolutie met AMDIS, het aantal pieken geïdentificeerd pieken met automatische zoekfunctie en NIST98 bibliotheek, en het aantal pieken geïdentificeerd na handmatige controle van de NCI-chromatogrammen.

Monster		Totaal aantal pieken gevonden met AMDIS zonder threshold	Aantal CI en Br pieken geïdentificeerd met automatische identificatie	Aantal CI en Br pieken juist geïdentificeerd na handmatige controle
Blanco A	MLS	32		1
10028888A	MLS	386	104	75
10041046A	MLS	155	60	43
Blanco B	GPC	31		1
10028888B	GPC	985	158	35
10041046B	GPC	1047	190	34
Sheet 04 GPC	GPC	574	129	43
Sheet 04 MLS	MLS	118	67	57

Het totaal aantal pieken in de chromatogrammen varieerde tussen de 118 en 2449. In de GPC extracten werden twee tot zeven maal zoveel pieken aangetroffen als in de MLS extracten. Het totaal aantal verbindingen dat positief met EI en NCI kon worden geïdentificeerd lag tussen de 63 en 98 (tabel 2). In bijlage 3 (EI) en bijlage 4 (NCI) worden de mogelijke kandidaten voor de onbekende pieken weergegeven. Deze bijlagen bevatten alleen de kandidaten waarvoor een goede overeenkomst tussen het spectrum van de onbekende piek en de MS bibliotheek werd gevonden.

Tabel 4: Totaal aantal pieken correct geïdentificeerd met EI en NCI mode.

Monster	Totaal aantal pieken geïdentificeerd met EI	Totaal aantal pieken geïdentificeerd met NCI	Totaal aantal pieken geïdentificeerd met EI en NCI
Blanco A		1	1
10028888A	23	75	98
10041046A	25	43	68
Blanco B		1	1
10028888B	47	35	82
10041046B	63	34	97
Sheet 04 GPC	20	43	63
Sheet 04 MLS	15	57	72

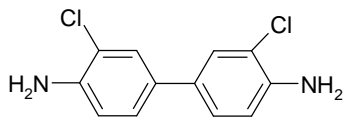
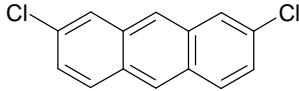
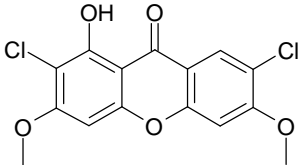
Een overzicht van de verschillende stofgroepen per monsters is weergegeven in tabel 5. In zowel de MLS als de GPC-extracten werden alkanen, ftalaten, PCBs, PCNs, PBDEs, hexachlorobenzene (HCB), pentachlorobenzene (QCB) en dichloorbenzidine aangetroffen. Dichloorbenzidine (figuur 2) wordt gebruikt als pigment in de inkt, textiel, papier, verf, leer, en plastic industrie. De structuur van deze stof vertoont enige overeenkomst met PCBs en de chlooratomen zijn aanwezig op de 3,3'-positie en een DR-CALUX activiteit is daarom niet uit te sluiten. Met behulp van een analytische standaard zou nagegaan moeten worden of deze stof inderdaad een DR-CALUX activiteit bezit en of de identificatie gebaseerd op MS-spectrum bevestigd kan worden met de retentietijd. Vervolgens zou de concentratie in het sediment bepaald moeten worden en kan de bijdrage berekend worden die deze stof levert aan de totale DR-CALUX activiteit voor zowel het MLS als het GPC extract.

De volgende stofgroepen werden uitsluitend in de GPC extracten aangetroffen: PAKs, tributyltin chloride, tributyltin bromide, dichloroanthraceen, dichloro-lichexanthone, cholesterol derivaten, organofosfaten, fenol derivaten, chlordane en geurstoffen. Mogelijk zijn tributyltin chloride en bromide verantwoordelijk voor de cytotoxiciteit van de GPC extracten omdat bekend is dat deze stoffen een zeer hoge toxiciteit bezitten. Naast de PAKs zijn er twee stoffen, dichlooranthraceen en dichloro-lichexanthone, interessant met betrekking tot de DR-CALUX (figuur 2). Vooral de structuur van dichloro-lichexanthone heeft een grote overeenkomst met tetrachloro-dibenzodioxine en verwacht wordt dat deze stof een DR-CALUX activiteit bezit. Dichloor-

lichexanthone is een natuurlijke stof die door korstmossen wordt gemaakt. Deze verbinding is ook aanwezig in het biomimetisch extract wat er op duidt dat deze stof biologisch beschikbaar is.

De structuur van dichlooranthraceen geeft minder aanleiding om een hoge DR-CALUX activiteit te verwachten omdat de stof overeenkomst vertoont met dichloordibenzo-dioxine waarvan bekend is dat deze een lage DR-CALUX activiteit bezit. Geadviseerd wordt om de de DR-CALUX activiteit van de drie bovengenoemde stoffen, dichloorbenzidine, dichlooranthraceen en dichloor-lichexanthone, te bepalen.

Tabel 6: Drie stoffen die werden geselecteerd op basis van de aanwezigheid in het Zeehavenkanaal sediment en de mogelijkheid dat deze stoffen een DR-CALUX activiteit bezitten.

Naam	CAS no.	Afkomst of gebruik	Structuur
Dichloorbenzidine	91-94-1	pigment in de inkt, textiel, papier, verf, leer en plastic industrie	
Dichlooranthraceen	605-48-1	onbekend	
Dichloor-lichexanthone	22346-58-3	Natuurlijke stof gemaakt door korstmossen	

Degradatie

Een toename van de pieken rond de 14 minuten is zichtbaar na de degradatie stap. De identiteit van deze stoffen kon niet met zekerheid worden vastgesteld maar het betreft in ieder geval alkaan or alcohol derivaten. Enkele stoffen waren voor degradatie wel aanwezig (vanilline, dibenzofuran) maar konden na degradatie niet meer worden aangetoond. Daarnaast zijn er een aantal stoffen die mogelijk als transformatieproduct zijn ontstaan; voorbeelden hiervan zijn pentachloorbenzeen als degradatieproduct van hexachloorbenzeen en tributylfosfaat afkomstig van een organische fosfaat verbinding.

5. Conclusies

- ?? De DR-CALUX resultaten uit eerder onderzoek van het Zeehavenkanaal sediment werden bevestigd.
- ?? De verhouding in DR-CALUX activiteit tussen de chemisch agressieve methode (MLS) en niet-destructieve methode (GPC) is 100 en bevestigt de bevindingen uit 2002.
- ?? Na anaërobe degradatie was de totale hoeveelheid stoffen met een DR-CALUX activiteit onveranderd. Dit werd bevestigd met de GC-MS chromatogrammen waarin weinig verschillen tussen het sediment voor en na degradatie werden waargenomen.
- ?? De biobeschikbare fractie van de totale hoeveelheid extraheerbare stoffen met een DR-CALUX activiteit was echter sterk verminderd na 18 maanden van degradatie.
- ?? In de niet-destructieve extracten werden twee tot zeven maal zoveel verbindingen aangetroffen als in de destructieve extracten.
- ?? Het totale aantal aangetroffen pieken in de chromatogrammen varieerde tussen de 100 en 2500.
- ?? Een drietal geïdentificeerde verbindingen (dichloroanthraceen, dichloro-lichexanthone, dichloorbenzidine) bezit mogelijk een DR-CALUX activiteit en zouden een deel van de totale activiteit kunnen verklaren. Geadviseerd wordt om deze stoffen te testen met DR-CALUX.

6. Referenties

- Aider, A.C., M.M. Haggblom, S.R. Oppenheimer, and L.Y. Young. 1993. Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls in anaerobic sediments. *Environ. Sci. Technol.* 1993, 27, 530-538.
- Besselink, H., E. Felzel, A. Jonas, S. van der Linden. 2001. Analysis of Ah-receptor mediated luciferase activity in DR-CALUX® cells. Biodetection Systems b.v. Protocol no. Pe-BDS-004^e.
- Cheolcho, Y., R. Sokol, R.C. Frohnhoefer, G. Yullrhee. 2003. Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls: threshold concentration and dechlorination kinetics of individual congeners in Aroclor 1248. *Environ. Sci. Technol.* 37,5651-5656.
- Klamer, H.J.C., P.E.G. Leonards, M.H. Lamoree, and J.F. Baker. 2002. Chemical and toxicological risk assessment of North-Sea surface sediments. Brominated flame retardants and dioxin-type toxicity. *Organohalog. Comp.* 59, 111-114.

- Klamer, H.J.C., J. Jorritsma, L. Van Vliet, F. Smedes, J.F. Baker. 2004. Dioxine-achtige toxiciteit in baggerspecie van het Zeehavenkanaal, Delfzijl. Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ.
- Leonards, P.E.G., I. van der Veen. 2002. TIE-studie naar dioxine-achtige toxiciteit in het Zeehavenkanaal te Delfzijl. RIVO rapport no. C060-02.
- Man, S. 2004. Analyse van opgezuiverde sediment-extracten op de aanwezigheid van dioxine en/of dioxine-achtige verbindingen m.b.v. de DR CALUX bioassay. BDS rapport no. BDS-226-485 rap-1/hb.
- Qensen, J.F., M.A. Mousa, S.A. Boyd, T. Sanderson, K.L. Froese, J.P. Giesy. 1998. Reduction of aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of polychlorinated biphenyl mixtures due to anaerobic microbial dechlorination. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 17 (5) 806–813, 1998.
- Stemmler, A., R.A. Hites. Electron capture negative ion mass spectra of environmental contaminants and related compounds. ISBN 0-89573-708-6, VCH Publishers, Inc., New York.

Bijlage 1: EI-chromatogrammen van de MLS en GPC extracten van het Zeehavenkanaal.

Bijlage 2: NCI-chromatogrammen van de MLS en GPC extracten van het Zeehavenkanaal.

Bijlage 3: Kandidatenlijst van onbekende verbindingen van de Zeehavenkanaal sediment die werden geïdentificeerd met GC-ToF-MS in EI mode. Zie bijgaande Excel sheet.

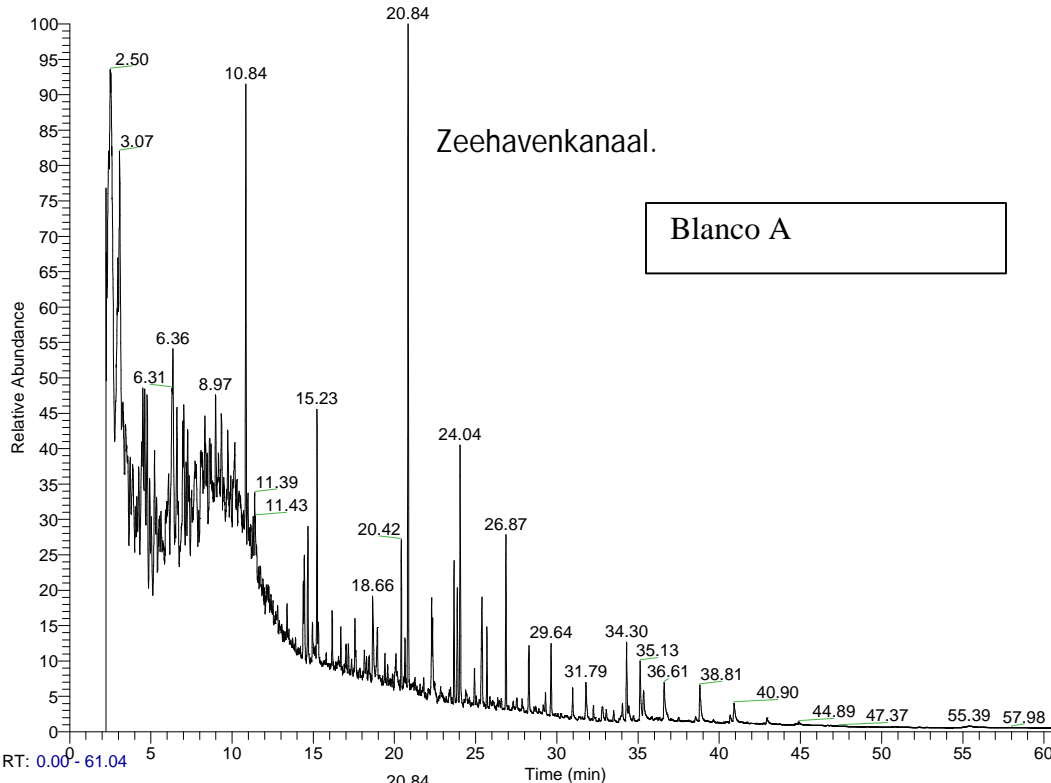
Bijlage 4: Kandidatenlijst van onbekende verbindingen van de Zeehavenkanaal sediment die werden geïdentificeerd met GC-ToF-MS in NCI mode. Zie bijgaande Excel sheet.

Bijlage 3: Kandidatenlijst van onbekende verbindingen van de Zeehavenkanaal sediment die werden geïdentificeerd met GC-ToF-MS in EI mode

Bijlage 4: Kandidatenlijst van onbekende verbindingen van de Zeehavenkanaal sediment die werden geïdentificeerd met GC-ToF-MS in NCI mode

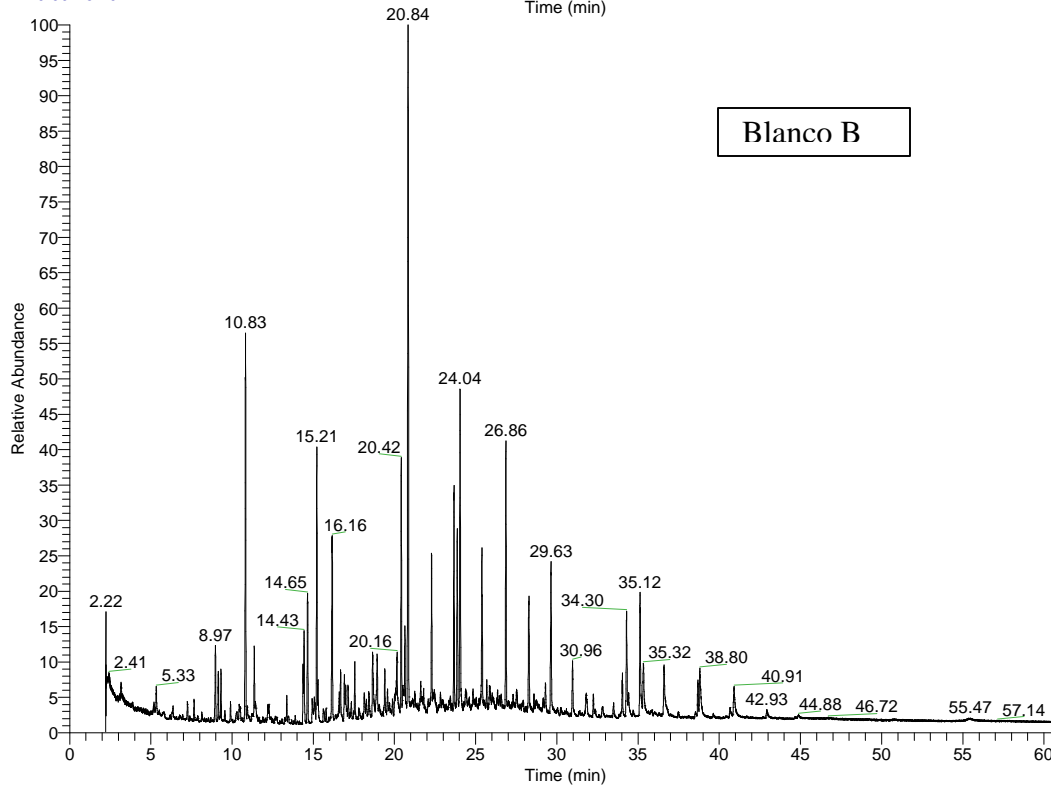
Bijlage 1: EI-chromatogrammen van de MLS en GPC extracten van het

RT: 0.00 - 61.04



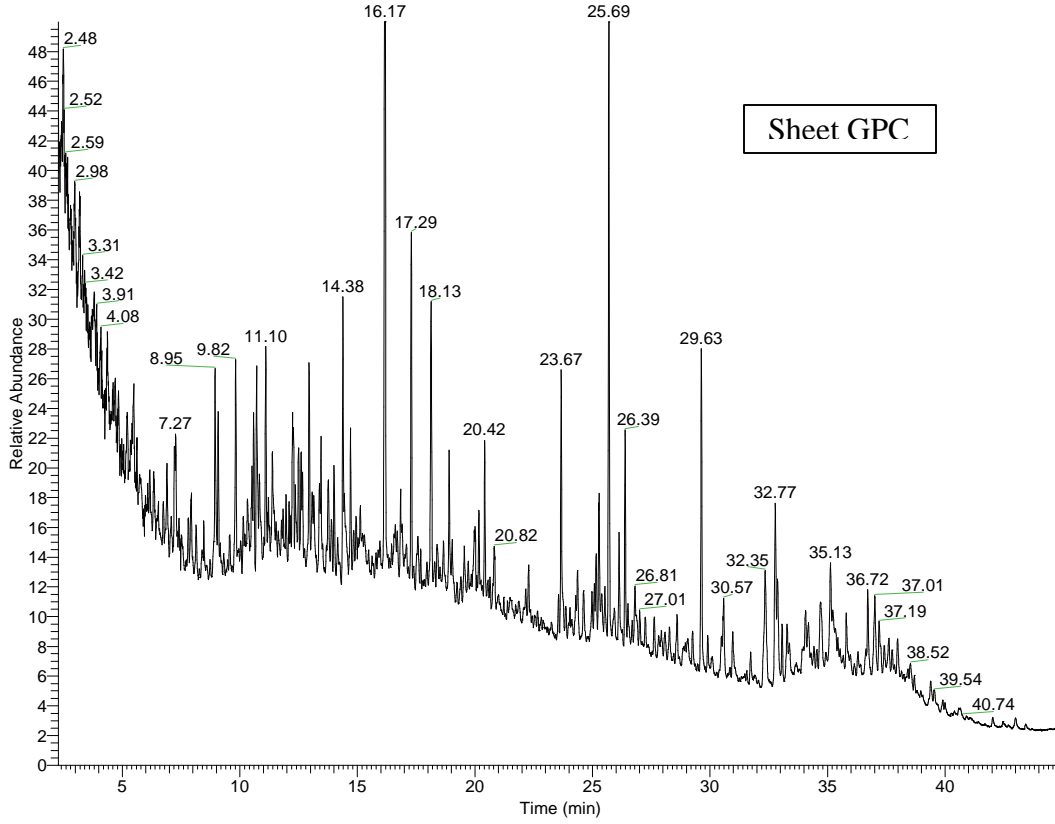
NL:
5.30E6
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr08

RT: 0.00 - 61.04



NL:
7.88E6
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr01

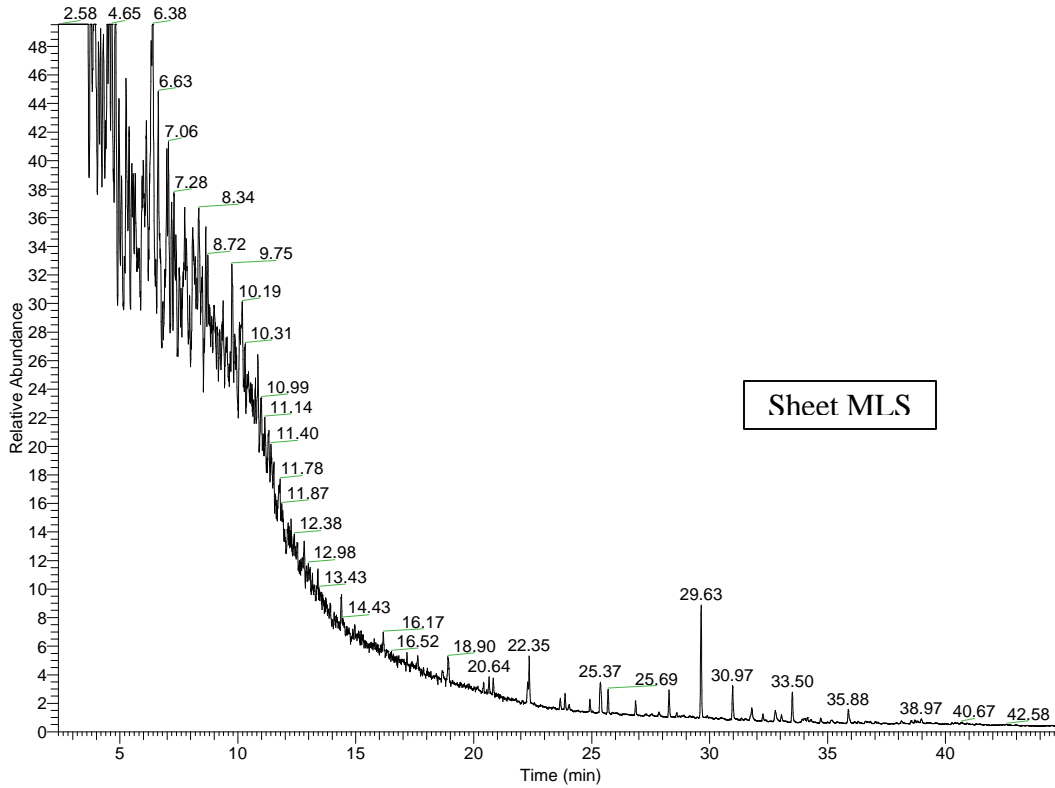
RT: 2.28 - 44.99



NL:
1.43E6
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr06

Sheet GPC

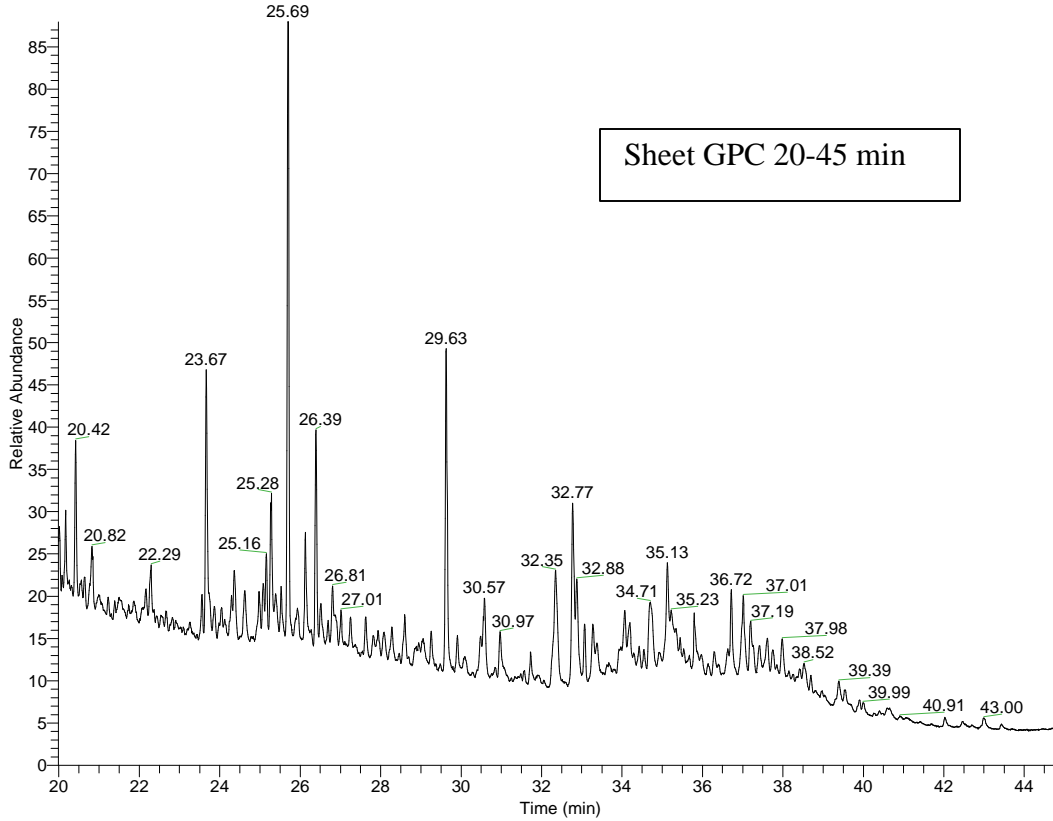
RT: 2.39 - 44.95



NL:
1.08E7
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr07

Sheet MLS

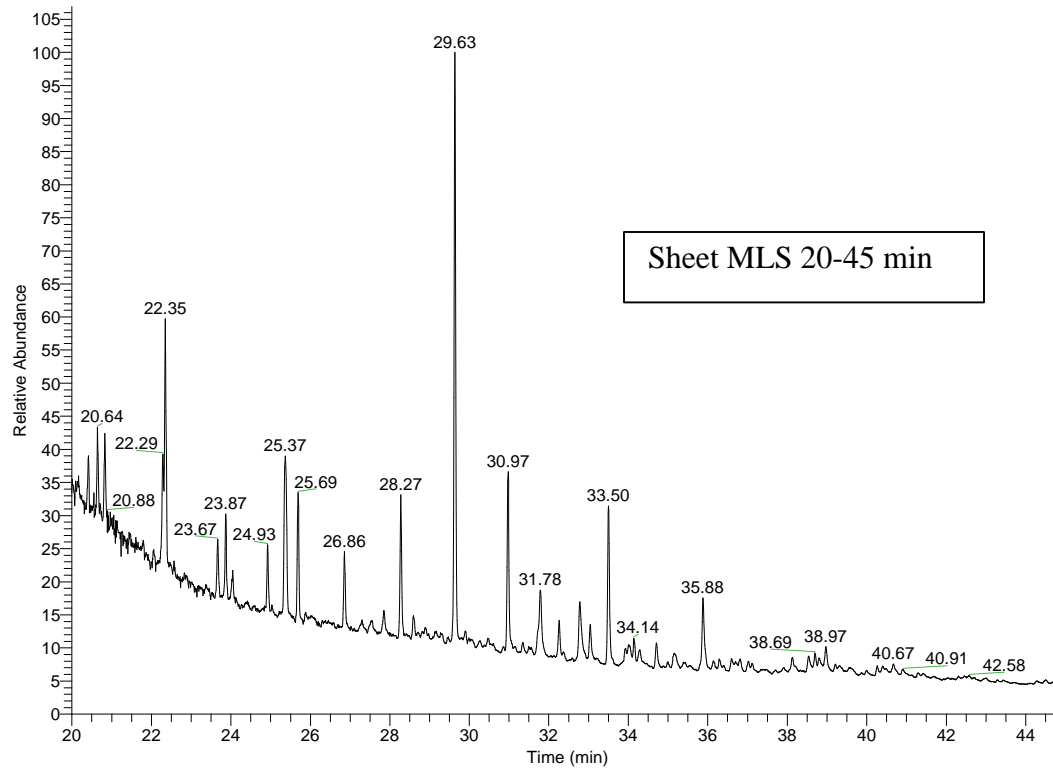
RT: 19.99 - 44.95



NL:
8.14E5
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr06

Sheet GPC 20-45 min

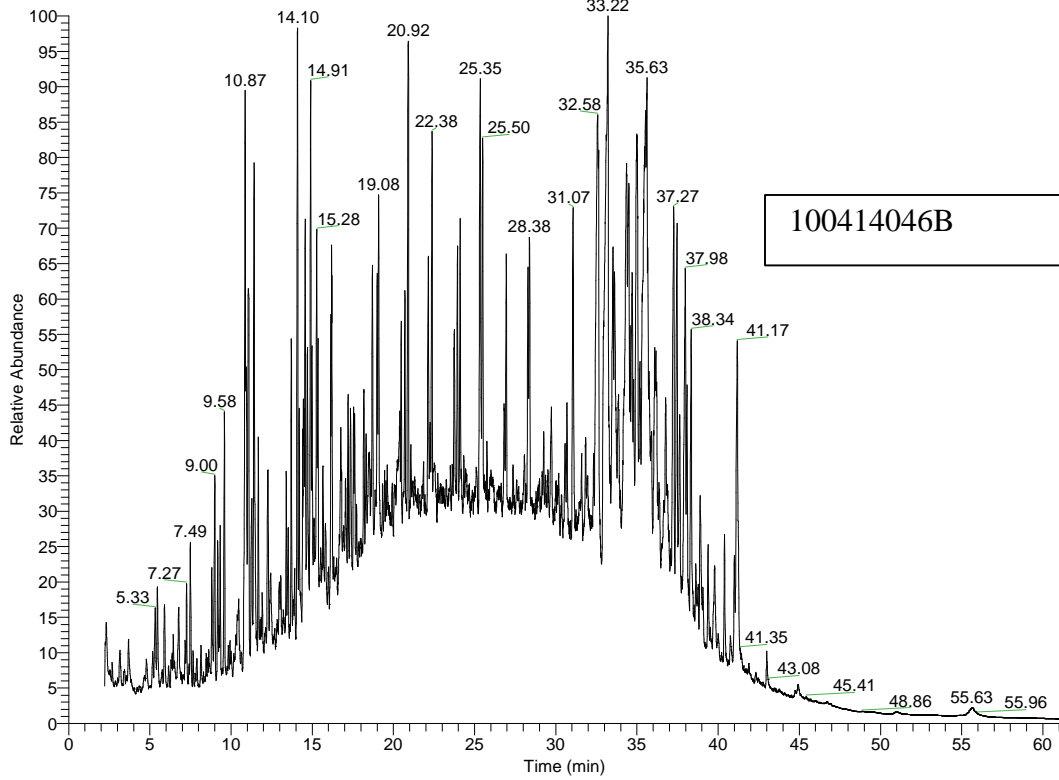
RT: 19.99 - 44.92



NL:
9.55E5
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr07

Sheet MLS 20-45 min

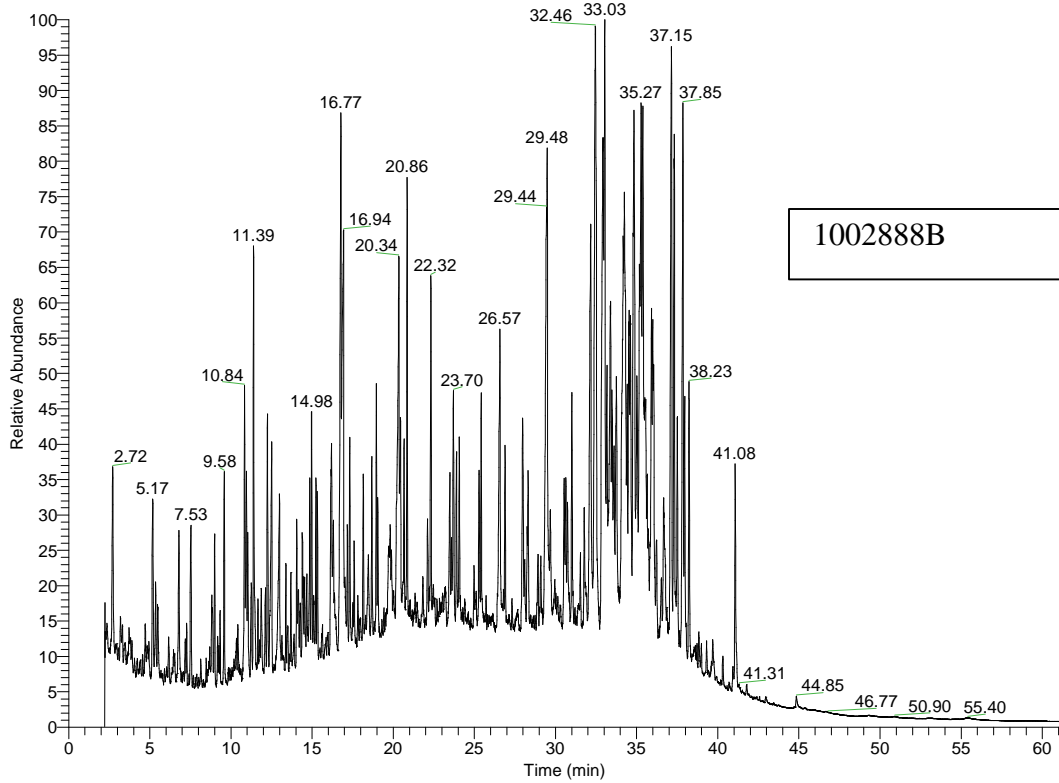
RT: 0.00 - 61.02



NL:
9.77E6
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr04

100414046B

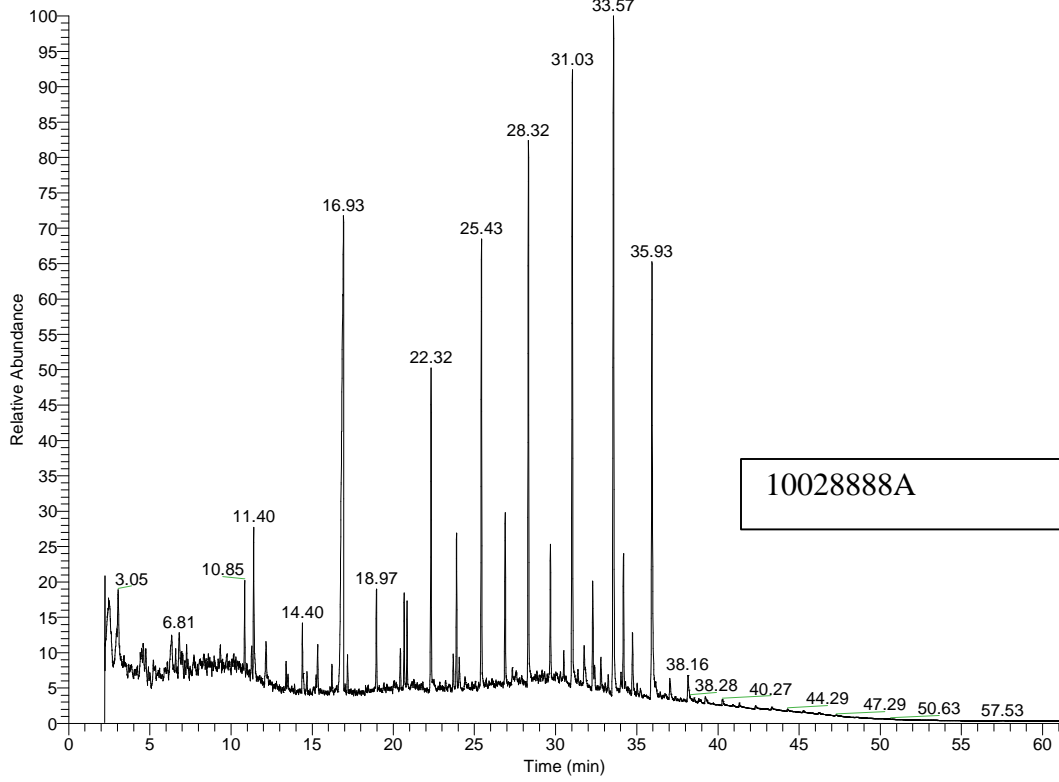
RT: 0.00 - 61.05



NL:
5.83E6
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr05

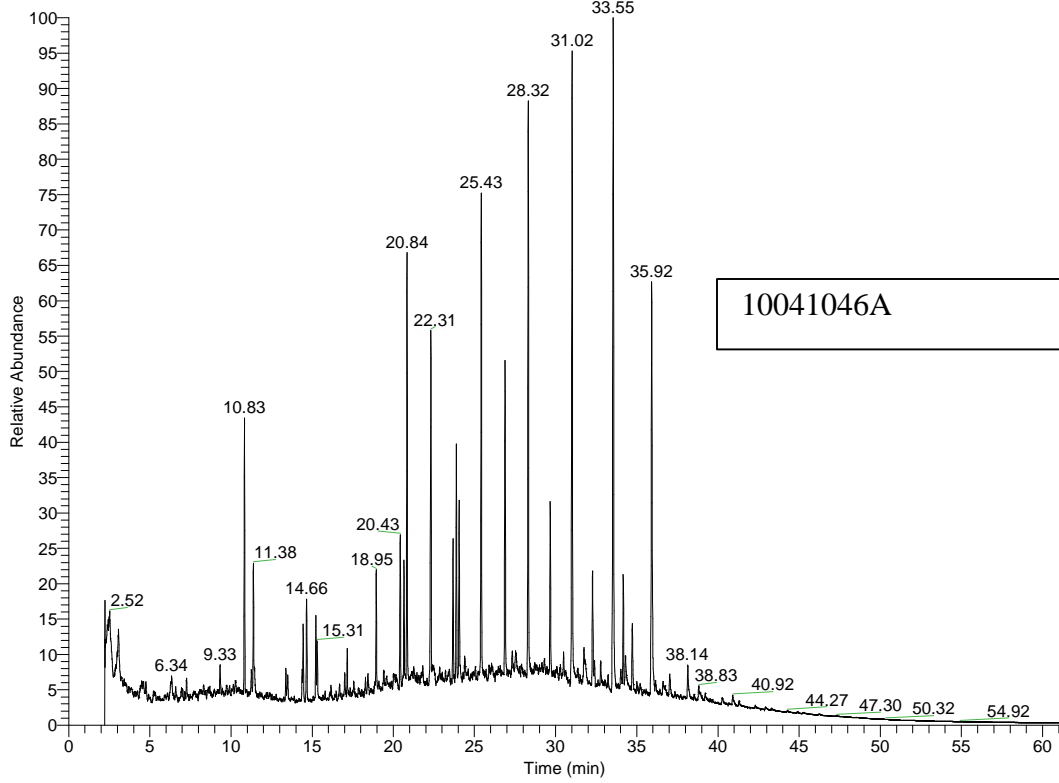
1002888B

RT: 0.00 - 61.03



NL:
6.95E6
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr13

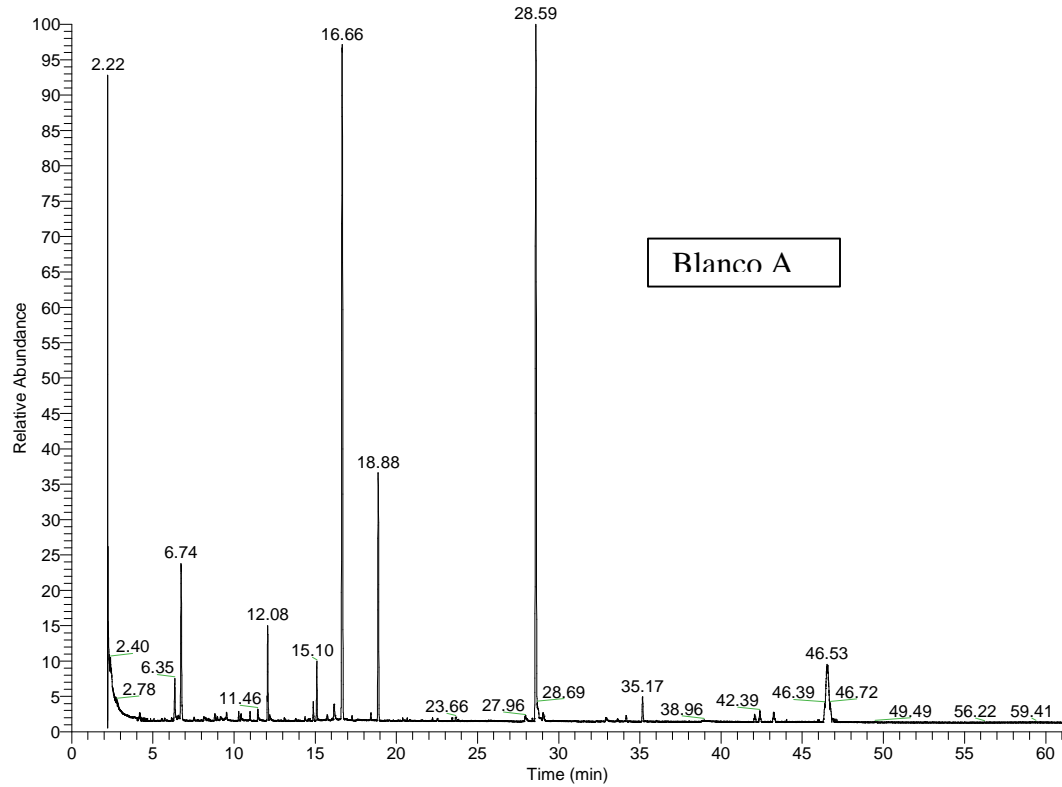
RT: 0.00 - 61.03



NL:
6.63E6
TIC F: MS
EI_0408200
4_scr14

Bijlage 2: NCI-chromatogrammen van de MLS en GPC extracten van het Zeehavenkanaal.

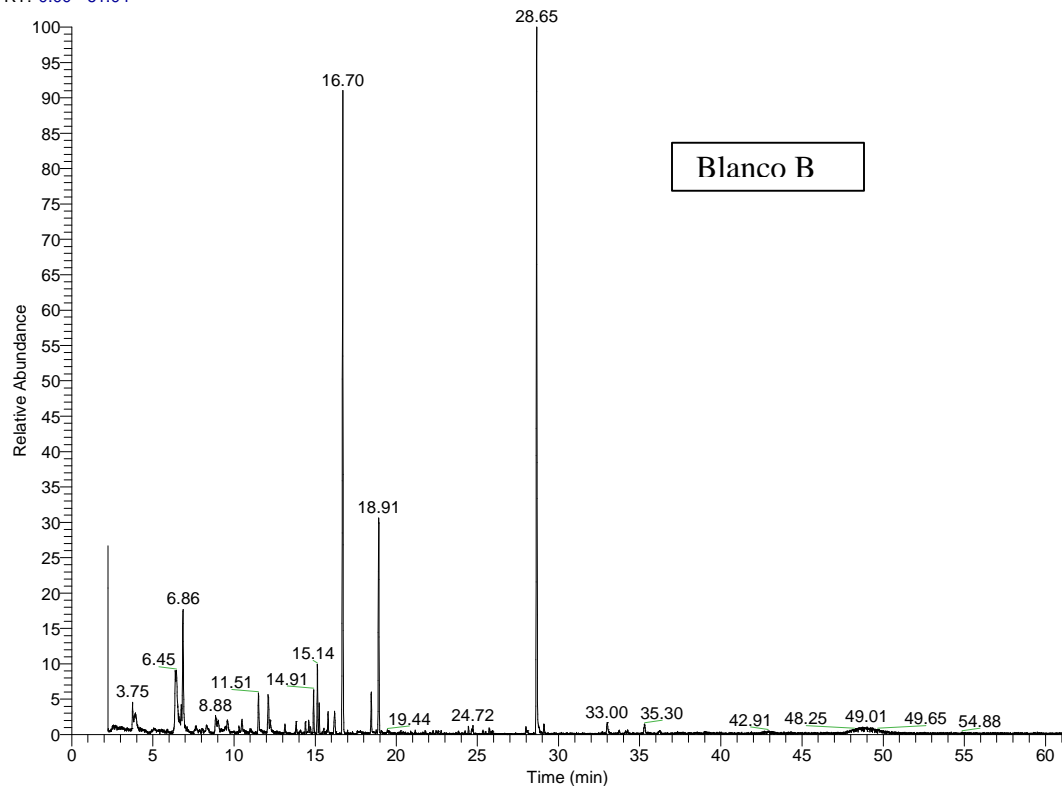
RT: 0.00 - 61.02



NL:
6.86E6
TIC F: MS
30072004_
scr04_1_ul

Blanco A

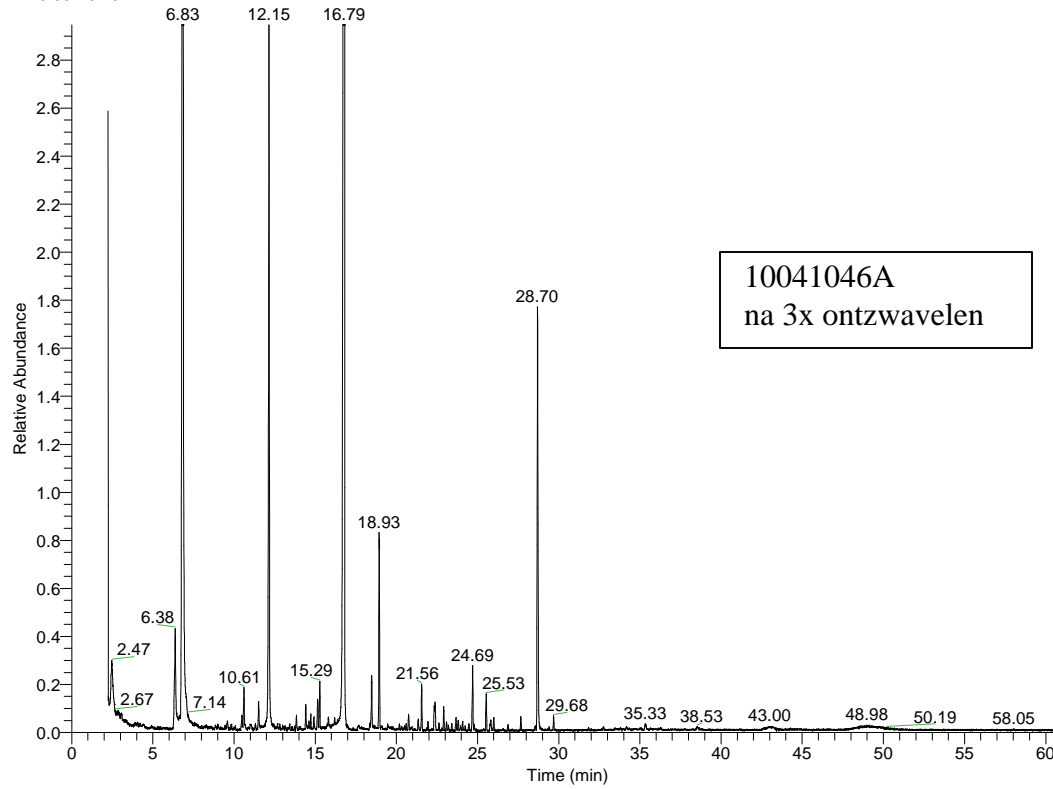
RT: 0.00 - 61.04



NL:
3.09E4
TIC F: MS
NCI_scr_09
0804_10

Blanco B

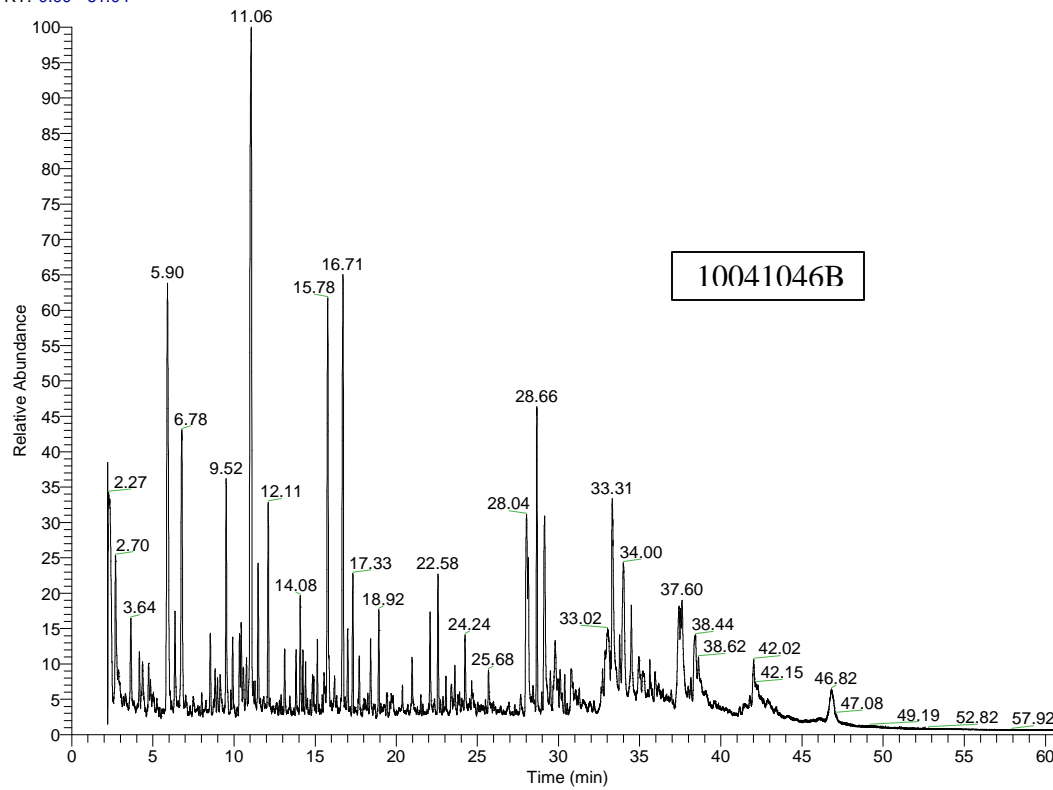
RT: 0.00 - 61.02



NL:
1.54E6
TIC F: MS
NCL_scr_09
0804_16

10041046A
na 3x ontzwavelen

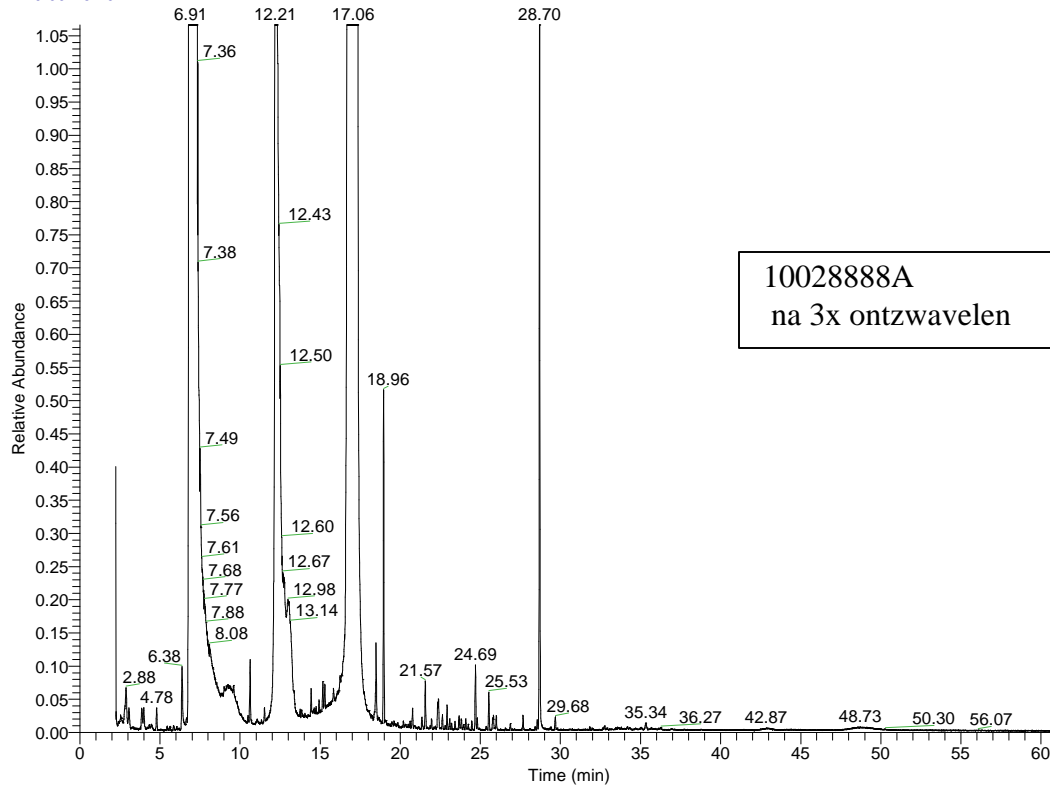
RT: 0.00 - 61.04



NL:
1.61E7
TIC F: MS
30072004_
scr06_1_ul

10041046B

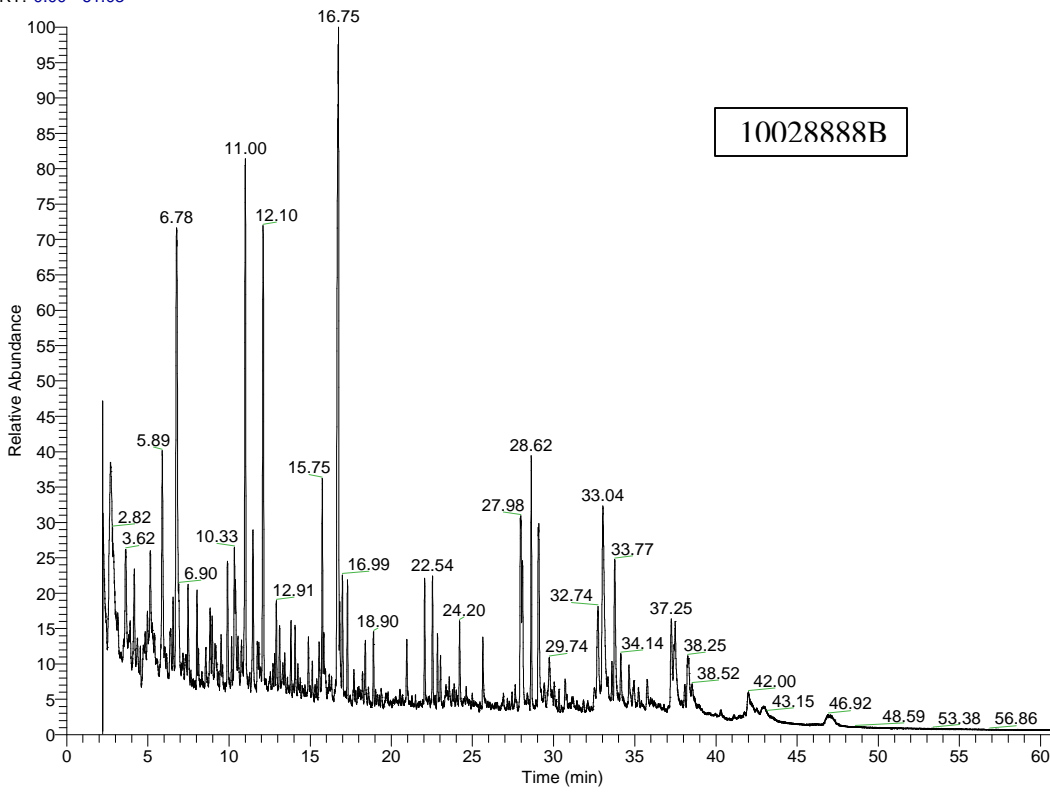
RT: 0.00 - 61.02



NL:
9.56E6
TIC F: MS
NCL_scr_09
0804_15

10028888A
na 3x ontzwavelen

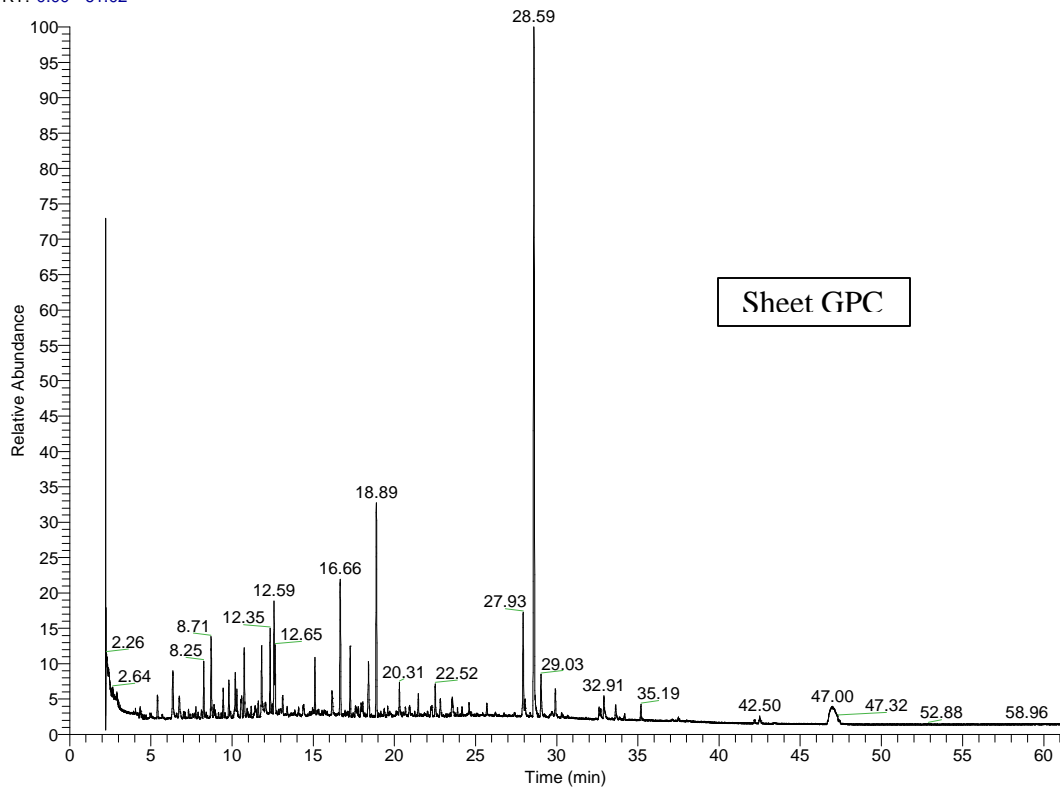
RT: 0.00 - 61.03



NL:
1.41E7
TIC F: MS
30072004_
scr08_1_ul

10028888B

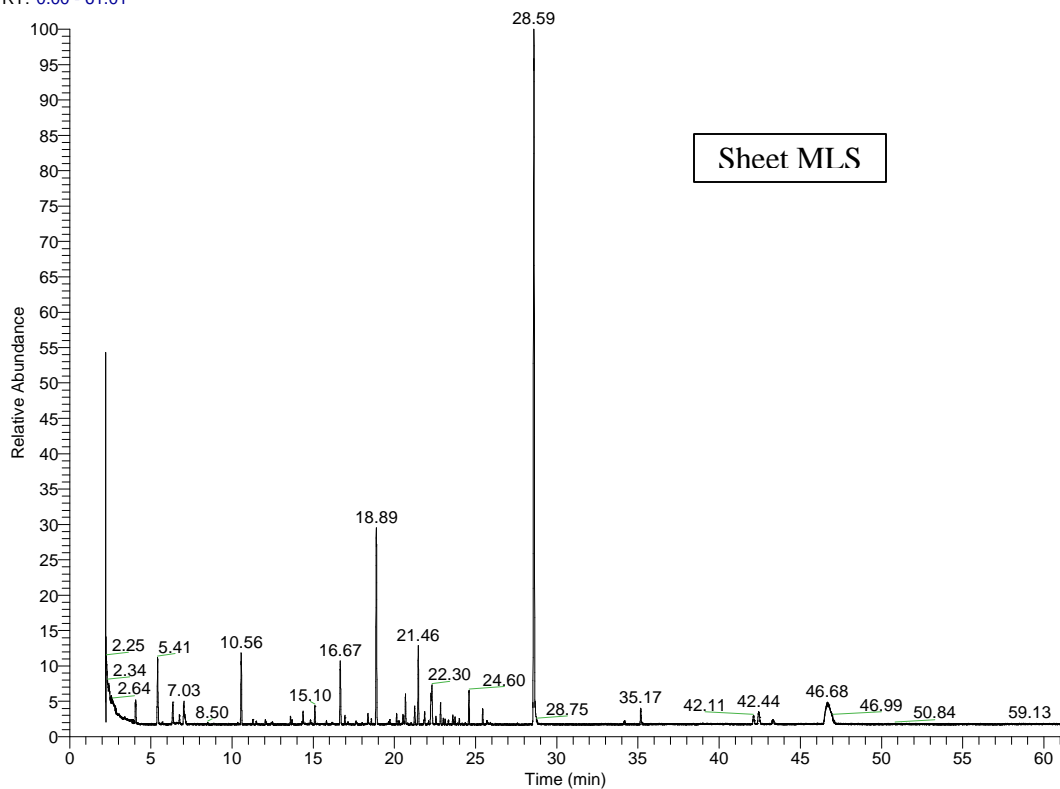
RT: 0.00 - 61.02



NL:
5.77E6
TIC F: MS
30072004_
scr09_1_ul

Sheet GPC

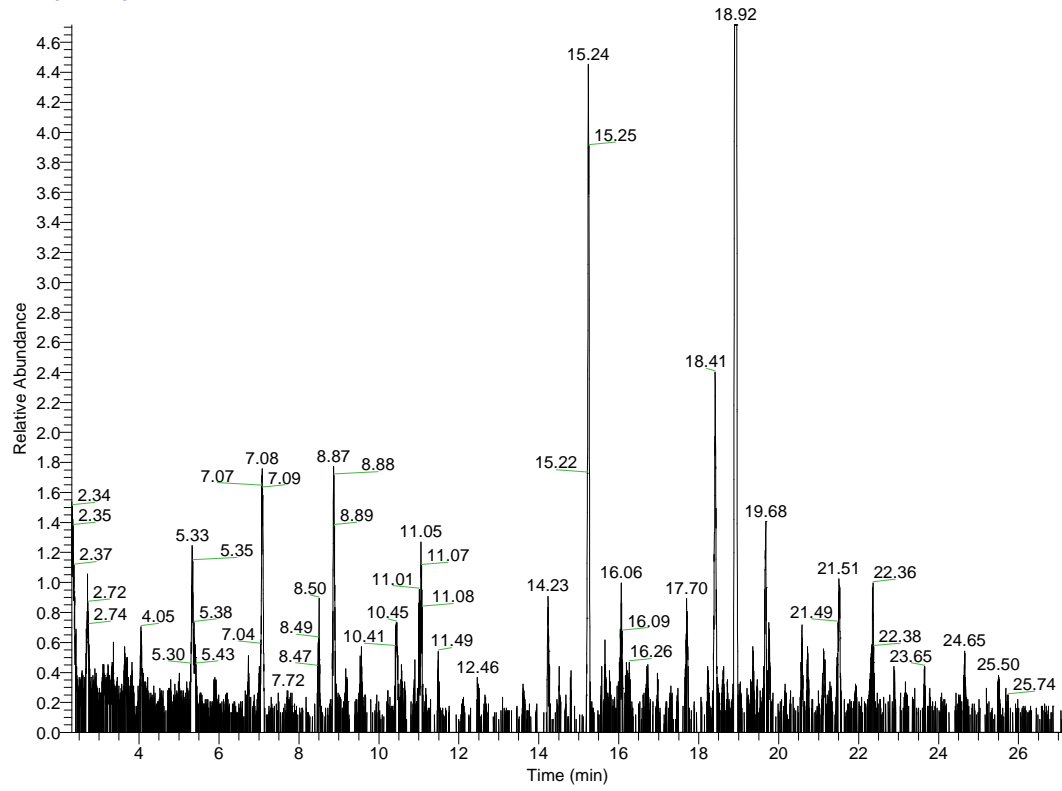
RT: 0.00 - 61.01



NL:
5.83E6
TIC F: MS
30072004_
scr10_1_ul

Sheet MLS

RT: 2.32 - 27.10



NL:
5.62E4
m/z=
34.50-
35.50 F:
MS
30072004_
scr06_1_ul

Blanco A

R.T.	Name	Model	Tot.Signal	Weighted	Reverse	Purity
5,017	Decane, 2,9-dimethyl-	111 m/z (1:	242923	83	87	40%
5,027	Nonane, 3,7-dimethyl-	TIC	197260	80	84	34%
5,356	Decane, 2,2,8-trimethyl-	TIC	219326	77	81	28%
6,355	Decane, 2,2,8-trimethyl-	TIC	620122	75	84	48%
6,596	Decane, 2,2,4-trimethyl-	57 m/z (97)	491065	78	86	37%
6,686	Undecane, 2-methyl-	TIC	141510	69	77	29%
7,027	Dodecane, 2,6,11-trimethyl-	TIC	305455	81	82	41%
7,179	Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	TIC	111005	56	61	21%
7,261	Dodecane, 2,2,11,11-tetramethyl-	TIC	337671	78	81	32%
7,717	1,7-Dimethyl-4-(1-methylethyl)cyclodecane	127 m/z (1:	29305	70	72	8,60%
7,783	Decane, 2,9-dimethyl-	123 m/z (9:	210775	70	78	32%
8,983	Diethyl Phthalate	149 m/z (1:	381423	78	86	31%
9,163	Phenol, 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-	135 m/z	361798	84	84	20%
9,335	Hexadecane	TIC	209568	80	80	27%
9,734	Octane, 3-ethyl-2,7-dimethyl-	TIC	134559	77	82	18%
11,392	Heptadecane	TIC	155529	73	74	29%
14,382	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	149 m/z	362880	85	85	45%
15,306	Nonadecane	125 m/z	72741	79	79	25%
16,162	Dibutyl phthalate	149 m/z	316348	85	85	42%
16,693	Cyclic octaatomic sulfur	64 m/z	90817	53	69	35%
17,158	Eicosane	71 m/z	83853	84	84	30%
18,658	Cycloeicosane	TIC	88171	83	83	54%
19,411	Octadecanoic acid, methyl ester	69 m/z (12:	60494	88	89	31%
20,018	Eicosane, 3-methyl-	57 m/z (69)	26062	66	69	17%
20,648	Docosane	57 m/z	135594	82	82	45%
22,353	2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-ethylhexyl ester	69 m/z	234420	87	87	54%
23,667	Octadecanoic acid, butyl ester	83 m/z	276428	82	82	74%
23,869	Hexacosane	57 m/z (83)	247867	85	86	72%
24,045	Acetic acid, octadecyl ester	83 m/z	197075	84	84	82%
25,691	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	149 m/z	242618	88	89	68%
26,858	Hexacosane	57 m/z	385672	87	87	81%
28,279	Heptacosane	TIC	154726	87	87	66%
29,626	Squalene	69 m/z (57)	107639	90	90	44%
29,639	Octacosane	TIC	108734	80	82	69%
31,788	Tetradecanoic acid, tetradecyl ester	69 m/z (71)	27500	79	79	55%
32,244	Eicosane	57 m/z	27679	85	87	42%
32,806	Cholest-5-en-3-ol, (3à)-	TIC	3697	61	61	30%
35,128	ç-Sitosterol	TIC	20507	89	89	74%

Min. Abunc	Amount	Scan	Peak Tailin	S/N (total)	CAS	Width	Corrections	S/N (m/z)	Conc.
0,01%	0,19%	337	1	458	1002171	>11			
0,01%	0,05%	337	1,1	421	17302328	>11			
0,01%	0,04%	377	0,7	420	62238011	>8			
0,00%	0,19%	497	2,1	893	62238011		17		
0,00%	0,17%	526	0,9	668	62237983		6,7		
0,01%	0,02%	536	2,5	421	7045718	>4			
0,01%	0,09%	577	1,4	709	31295564		15,3		
0,01%	0,01%	596	4,5	412	3891983	>4			
0,00%	0,05%	605	1,7	581	1,27E+08		8,7		
0,06%	0,02%	660	0,7	267	645103		13,3		
0,01%	0,17%	668	1,9	513	1002171		12,7		
0,00%	0,11%	812	1,1	631	84662		4,8		
0,00%	0,06%	833	1,3	418	140669		4,8		
0,01%	0,05%	854	1,7	561	544763		9,1		
0,01%	0,02%	902	1,1	441	62183555		7,8		
0,01%	0,02%	1101	1	433	629787		10,6		
0,00%	0,07%	1460	1	339	84695		4,7		
0,02%	0,01%	1571	1	184	629925		4,6		
0,01%	0,05%	1673	1,1	263	84742		4,5		
0,02%	0,04%	1737	0,8	210	10544500		4,4		
0,02%	0,02%	1793	1,1	163	112958		5,3		
0,02%	0,09%	1973	2,9	336	296560		8,3		
0,03%	0,03%	2063	1,4	148	112618		4,9		
0,06%	0,02%	2136	1,1	83	6418468	>6			
0,01%	0,04%	2212	0,8	211	629970		5		
0,01%	0,06%	2416	1,1	281	5466773		5		
0,01%	0,14%	2574	1	496	123955		5,1		
0,01%	0,12%	2598	1,1	409	630013		4,8		
0,01%	0,28%	2619	0,9	872	822231		5,4		
0,01%	0,07%	2817	1,2	291	117817		4		
0,00%	0,19%	2958	0,9	598	630013		5,7		
0,01%	0,07%	3128	1	235	593497		6,3		
0,02%	0,04%	3289	1,3	168	7683649		5,1		
0,02%	0,07%	3291	1,1	247	630024		6,1		
0,06%	0,04%	3549	1,7	124	3234853		6,1		
0,06%	0,01%	3603	2,1	56	112958		4,9		
0,44%	0,01%	3671	1,5	46	474771		12,1		
0,08%	0,09%	3949	1,7	203	83476		7,1		

10041046 B

C:\D_SCHIJFGCTOFMS DATA\RIKZ NCI SCREENING AUG 2004\NCI_SCR_090804_11.FIN

CAS	Name	R.T.	R.I.	Width	Purity
380935	Pentachlorobenzene	7,053		3,5	7,80%
1835-61-6	1-Chloro-2,3,5,6-tetrafluorobenzene	8,398		6,6	31%
2268055	1,3-Dichloro-2-fluorobenzene	8,882		9,6	71%
1461229	Stannane, tributylchloro-	9,861		8,6	79%
118741	Benzene, hexachloro-	10,625		6,7	37%
1461230	Stannane, bromotributyl-	10,778		6,3	35%
91-94-1	1,1'-Biphenyl]-4,4'-diamine, 3,3'-dichloro-	18,495		6,5	62%
91-94-1 of	Anthracene, 1,8-dichloro- of dichlorofluorene	19,692		5,6	22%
51908168	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,4',5,5'-hexachloro-	20,644		4,4	8,80%
80-07-9 of	Benzene, 1,1'-sulfonylbis[4-chloro- of Disulfide,	20,753		5,5	24%
37680732	1,1'-Biphenyl, 2,2',4,5,5'-pentachloro-	20,777		10,6	32%
38380084	1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4,4',5-hexachloro-	21,344		2,8	12%
52663635	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,5,5',6-hexachloro-	21,382		6,7	36%
35065282	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,4,4',5'-hexachloro-	21,586		6	52%
EPA-12062	Dichlorophenoxy methyl acetate, 2,4-	21,791		>12	9,60%
39635319	1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4,4',5,5'-heptachloro-	21,896		2,9	3,50%
35065282	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,4,4',5'-hexachloro-	22,368		3,8	13%
35065282	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,4,4',5'-hexachloro-	22,417		12,4	45%
69782918	1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4',5,5',6-heptachloro-	22,95		6	39%
69782918	1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4',5,5',6-heptachloro-	23,72		5,5	17%
69782918	1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4',5,5',6-heptachloro-	23,85		5,5	19%
69782918	1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4',5,5',6-heptachloro-	24,002		5,8	6,40%
67461-89-6	2-Imidazolidinone, 1-(3,4-dichlorophenyl)-3-metl	24,466	niet zeker	6,2	14%
52663679	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,3',5,5',6-heptachloro-	24,498		5,9	12%
69782918	1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4',5,5',6-heptachloro-	24,728		6,2	44%
40361-75-9	4-Thiazolemethanol, 2-(4-chlorophenyl)-4,5-dih	24,857	niet zeker	>6	10%
69782918	1,1'-Biphenyl, 2,3,3',4',5,5',6-heptachloro-	25,576		5,6	42%
52663737	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,3',4,5,6,6'-octachloro-	25,863		5,6	18%
52663737	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,3',4,5,6,6'-octachloro-	26,036		5,8	24%
52663737	1,1'-Biphenyl, 2,2',3,3',4,5,6,6'-octachloro-	26,924		6,1	29%
67562-39-4	1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran	29,538		3,7	3,30%
2051243	Decachlorobiphenyl	29,71		3,2	11%
22346583	9H-Xanthen-9-one, 2,7-dichloro-1-hydroxy-3,6-c	30,052		6,7	32%
52258067	2,2'-Biphenylylenephosphoric acid chloride	31,17		>12	14%

Model	Min. Abunc	Amount	Scan	Peak Tailin	S/N (total)	Tot.Signal	Max. Amou	Abs.Amour
112 m/z (10	5,30%	0,00%	580	0,5	40	149		
184 m/z (40	1,60%	0,00%	741	1,3	48	474		
TIC	0,21%	0,04%	799	0,7	139	3653		
269 m/z	0,22%	0,10%	916	2,1	178	3497		
284 m/z	0,62%	0,02%	1008	1,1	91	1274		
319 m/z (20	2,20%	0,01%	1027	1,1	71	360		
216 m/z (30	0,26%	0,06%	1952	1	163	3039		
246 m/z (60	1,70%	0,00%	2096	1	46	450		
364 m/z (60	12%	0,00%	2210	1,6	31	64		
215 m/z (30	2,60%	0,00%	2224	1	50	307		
TIC	1,90%	0,00%	2226	3,1	60	414		
230 m/z (20	9,60%	0,00%	2294	1,4	32	83		
218 m/z (20	1,00%	0,01%	2298	1,2	61	745		
360 m/z (30	0,94%	0,02%	2323	1	87	843		
234 m/z (40	10%	0,00%	2348	999	26	78		
64 m/z	8,70%	0,00%	2361	0,5	17	92		
64 m/z	4,50%	0,00%	2417	1,4	41	176		
360 m/z	1,30%	0,01%	2423	1,7	80	606		
229 m/z	0,76%	0,01%	2487	1,1	76	1042		
392 m/z (20	3,90%	0,01%	2579	1	55	203		
394 m/z (20	3,60%	0,00%	2595	1,2	49	216		
358 m/z (20	7,40%	0,00%	2613	0,9	31	107		
244 m/z (20	2,90%	0,00%	2669	1	42	271		
394 m/z (20	8,10%	0,00%	2673	1	38	99		
394 m/z (20	0,73%	0,02%	2700	0,9	107	1083		
46 m/z (79,	8,70%	0,00%	2716	1,1	36	91		
394 m/z (20	1,40%	0,01%	2802	1	85	560		
430 m/z (10	2,50%	0,01%	2836	1,1	56	317		
430 m/z (20	2,00%	0,01%	2857	1,3	64	397		
296 m/z (20	2,50%	0,01%	2964	0,7	65	320		
412 m/z	9,00%	0,00%	3278	1,2	24	88		
502 m/z (20	6,20%	0,00%	3298	0,7	43	129		
354 m/z	0,45%	0,02%	3339	1,3	96	1756		
266 m/z (20	1,00%	0,01%	3473	1,7	52	747		

Expec. R.T	RI-RI(lib)	Net	Weighted	Simple	Reverse	Corrections	S/N (m/z)	Conc.
			39				50	
			52				64	
			61				68	
			72				72	
			76				78	
			58				65	
			57				71	
			75				80	
			48				58	
			56				75	
			67				76	
			48				61	
			56				60	
			60				67	
			39				49	
			49				58	
			61				67	
			57				67	
			63				74	
			56				71	
			63				73	
			61				70	
			58				74	
			50				64	
			65				77	
			42				63	
			62				75	
			51				70	
			50				67	
			42				57	
			51				59	
			46				62	
			78				82	
			76				86	

Tabel 5: Geïdentificeerde stofgroepen aanwezig in de verschillende monsters. Aangeven is de zuiveringmethode en welke stofgroepen voorkomen in de MLS (blauw blok) en GPC (rood) extracten.

Monster	Zuivering methode	Alkanen	Ftalaten	PCBs	PCNs	PBDEs	HCB en QCB	Dichloor-benzidine	PCTs	PAKs	N-PAKs	Tributyltin chloride of bromide	Benzene derivaten	Dichloor-anthraceen	Dichloor-lichexanthon	Cholesterol derivaten	Organo-fostaten	Fenol derivaten	Chlordane	Geurstoffen	
10028888A	MLS	X	X	X	X	X	X	X													
10041046A	MLS	X	X	X	X	X	X	X	X												
Sheet MLS	MLS	X	X	X	X	X	X														
10028888B	GPC	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X		X	X	
10041046B	GPC	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X			
Sheet GPC	GPC	X	X	X	X	X	X			X		X	X	X	X	X		X			