

Projectnr: 513.0000

Ontwerpen van (multi)residumethoden voor de opsporing en identificatie van milieu contaminanten

Projectleider: W.A. Traag

Rapport 94.07

januari 1994

ONTWIKKELING VAN EEN DETECTIEMETHODE VOOR HEMOGLOBINE-
ADDUKTEN, NITRO-POLYCYCLISCHE AROMATISCHE KOOLWATERSTOFFEN EN
METABOLIETEN MET BEHULP VAN GASCHROMATOGRAFIE -
MASSASPECTROMETRIE

T. Zuidema en W.A. Traag

afdeling: Instrumentele Analyse

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telefax 08370-17717

Copyright 1994, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

projectleider

programmaleiders

public relations en secretariaat (2x)

bibliotheek (4x)

leesplanken (2x)

EXTERN:

-Katholieke Universiteit Nijmegen (KUN), Vakgroep Toxicologie, t.a.v. ir. P.T.J. Scheepers

-Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO), t.a.v. Prof. dr. W. de Wit

ABSTRACT

Gas Chromatographic - Mass Spectrometric determination of Haemoglobin-adducts, Nitro Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and metabolites.

Report 94.07

January 1994

T. Zuidema and W.A. Traag

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

On request of the department of Toxicology of the University of Nijmegen a method has been developed for the determination of haemoglobin-adducts (Hb-adducts), nitro polycyclic aromatic hydrocarbons (NO₂-PAHs) and metabolites (n-OH-2-AAF).

The developed method uses Gas Chromatography - Mass Spectrometry by which two ionisation modes can be used, electron impact (positive ions) and chemical ionisation (negative ions).

Studies to determine the detection limit resulted in the conclusion that electron impact is the most sensitive of the two ionisation modes if 1-nitropyrene and 2-nitrofluorene have to be determined (limit of detection approximately 0.25 and 0.10 pg/ μ l).

Using electron impact, 36 samples and 3 test samples have been analysed quantitatively for 1-nitropyrene and 2-nitrofluorene, and qualitatively for 2-nitropyrene, 4-nitropyrene, 2-nitrofluoranthene and 3-nitrofluoranthene. Some samples have also been analysed using chemical ionisation which resulted in a better sensitivity for 2-nitroanthene.

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	3
AFKORTINGEN	4
1 INLEIDING	5
2 REAGENTIA EN APPARATUUR	7
2.1 Reagentia	7
2.2 Apparatuur	8
3 METHODEN	10
3.1 Ionisatie d.m.v. electron impact (positieve ionen)	10
3.2 Chemische ionisatie (negatieve ionen)	11
3.3 Bepalingsgrenzen	12
3.4 Conclusie	13
4 RESULTATEN	14
5 CONCLUSIE	15
LITERATUUR	16
BIJLAGE 1: Electron Impact spectra	
BIJLAGE 2: Acquisitiemethoden	
BIJLAGE 3: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A (0,33 ng/ μ l) en B (0,25 ng/ μ l)	
BIJLAGE 4: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A1 (3,3 pg/ μ l) en B1 (2,5 pg/ μ l)	
BIJLAGE 5: CI-spectrum van 1-NP en 1-NPIS	
BIJLAGE 6: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (CI)	
BIJLAGE 7: Resultaten monsters KUN (EI en CI)	

SAMENVATTING

Op verzoek van de vakgroep Toxicologie van de Katholieke Universiteit Nijmegen (KUN) is een detectiemethode ontwikkeld voor de bepaling van hemoglobine-addukten (Hb-addukten), nitro-polycyclische aromatische koolwaterstoffen (NO₂-PAKs) en metabolieten (n-OH-2-AAF).

Een detectiemethode is ontwikkeld met behulp van Gas Chromatografie - Massa Spectrometrie waarbij gebruik kan worden gemaakt van twee ionisatietechnieken, te weten electron impact (positieve ionen) en chemische ionisatie (negatieve ionen).

Electron impact levert bijvoorbeeld voor 1-nitropyreen en 2-nitrofluoreen de laagste detectiegrenzen op, respectievelijk ca. 0,25 en ca. 0,10 pg/ μ l.

36 monsters en 3 testmonsters zijn kwantitatief geanalyseerd voor 1-nitropyreen en 2-nitrofluoreen en kwalitatief voor 2-nitropyreen, 4-nitropyreen, 2-nitrofluorantheen en 3-nitrofluorantheen, waarbij gebruik werd gemaakt van electron impact. Daarnaast zijn enkele monsters herhaald met chemische ionisatie, waarbij bleek dat de gevoeligheid voor bijv. 2-nitrofluorantheen beter werd.

AFKORTINGEN

1-AP: 1-aminopyreen

1-NP: 1-nitropyreen

1-NPIS: 1-nitro(²H₉)pyreen

2-A-7-FF: 2-amino-7-fluorfluoreen

2-AF: 2-aminofluoreen

2-NF: 2-nitrofluoreen

2-NFIS: 2-fluor-7-nitrofluoreen

2-NFT: 2-nitrofluorantheen

2-NP: 2-nitropyreen

3-NFT: 3-nitrofluorantheen

4-NP: 4-nitropyreen

EI: electron impact

GC-MS: gaschromatografie-massaspectrometrie

Hb-addukten: hemoglobine-addukten

KUN: Katholieke Universiteit Nijmegen

NICI: negative ion chemical ionisation

NO₂-PAKs: nitro-polycyclische aromatische koolwaterstoffen

n-OH-2-AAF: n-hydroxy-2-acetylaminofluoreen

SIR: selected ion recording

S/N-verhouding: signaal/ruis-verhouding

1 INLEIDING

Op verzoek van de Katholieke Universiteit Nijmegen (KUN) is een methode ontwikkeld voor de bepaling van hemoglobine-addukten (Hb-addukten), nitro-polycyclische aromatische koolwaterstoffen (NO₂-PAKs) en metabolieten (n-OH-2-AAF) met als doel een grotere gevoeligheid bij de detectie te bereiken dan momenteel met de apparatuur op de KUN mogelijk is.

Dit onderzoek maakt deel uit van het Dieselproject van de vakgroep Toxicologie van de KUN.

Het Dieselproject (1) heeft als doel beter inzicht te verkrijgen in de blootstelling van mensen aan de uitstoot van diesel op het moleculaire niveau en dus aan de mutagene en carcinogene risico's die hiermee samenhangen.

Emissies van auto's dragen voor een groot deel bij aan de milieuvervuiling in de Europese Gemeenschap. Deze emissies bevatten verschillende componenten die bekend staan om hun toxische, mutagene en carcinogene eigenschappen. Met name dieselmotoren vertonen een emissie van toxische componenten. Deze componenten maken maar een klein deel uit van benzine-emissies (<1%), terwijl ze 30% van de dieselemisies vertegenwoordigen. Uit dierexperimenten en in vitro testen is gebleken dat dieselemisies meer carcinogeen en mutageen zijn dan benzine-emissies.

In het onderzoeksprogramma van de KUN zullen karakteristieke markercomponenten, zoals 1-nitropyreen, 3-nitrofluorantheen en 2-nitrofluoreen worden onderzocht, omdat nitropolycyclische moleculen verantwoordelijk lijken te zijn voor het grootste deel van de mutageniteit.

Om de relatieve bijdrage van individuele moleculen in de dieseluitstoot welke met biologische moleculen reageren te bepalen maakt de KUN gebruik van hemoglobine-addukten (Hb-addukten). Hb-addukten kunnen worden gevormd doordat bijv. arylamines na N-hydroxylering aan vrije cysteïne-groepen van hemoglobine binden. De op deze manier gevormde Hb-addukten kunnen worden gebruikt bij de dosimetrie van arylamines en nitro-arenen.

Om bijv. Hb-addukten van 2-aminofluoreen in het bloed van ratten te bepalen, wordt de gevormde sulfamidebinding van het Hb-addukt in vitro gehydrolyseerd, waarna het vrije arylamine wordt geëxtraheerd, gederivatiseerd en bepaald m.b.v. Gaschromatografie-Massaspectrometrie (GC-MS). Op dit moment bedraagt de bepalingsgrens met de door de KUN gebruikte apparatuur ca. 0,5 nmol addukt/g Hb, wat overeen komt met 20 pg Hb-addukt absoluut, als gebruik wordt gemaakt van GC-MS m.b.v. ionisatie d.m.v. electron impact (EI) en ion-trap detectie.

Voor de bepaling van nitro-arenen is op de KUN een analysemethode beschikbaar voor de bepaling in stofmonsters. Na extractie, conversie van de nitro-groep in een amino-groep en derivatisering vindt analyse plaats m.b.v. GC-MS (EI).

Ring-OH-derivaten zijn belangrijke metabolieten van nitro-arenen die in de urine verschijnen. De bepaling van deze metabolieten kan inzicht geven in de opname van de corresponderende nitro-arenen. Momenteel is op de KUN er een methode beschikbaar om deze metabolieten te meten in urinemonsters van ratten die zijn blootgesteld aan 2-nitrofluoreen en 2-aminofluoreen. De analyse wordt na derivatisering uitgevoerd m.b.v. GC-MS (EI).

Het doel van dit onderzoek voor het RIKILT-DLO is een methode te ontwikkelen waarbij een zo groot mogelijke gevoeligheid kan worden behaald voor bovengenoemde componenten. In eerste instantie is ionisatie d.m.v. electron impact (positieve ionen) uitgevoerd en gevolgd door chemical ionisation (negatieve ionen).

De verwachting vooral wat betreft de Hb-addukten is nl. dat de bepalingsgrens lager is als de analyse m.b.v. negative ion chemical ionisation (NICI) wordt uitgevoerd.

De ontwikkelde methode is getest door monsters op NO₂-PAKs te analyseren.

2 REAGENTIA EN APPARATUUR

2.1 Reagentia

2.1.1 Tolueen

2.1.2 Standaardoplossing 2-aminofluoreen (2-AF), gederivatiseerd met heptafluorboterzuur (HBFA), 1 ng/ μ l in tolueen.

2.1.3 Standaardoplossing 1-aminopyreen (1-AP), gederivatiseerd met HBFA, 1 ng/ μ l in tolueen.

2.1.4 Standaardoplossing 2-amino-7-fluorfluoreen (2-A-7-FF), gederivatiseerd met HBFA, 1 ng/ μ l in tolueen.

2.1.5 Standaardoplossing 5-hydroxy-2-acetylaminofluoreen (5-OH-2-AAF), gederivatiseerd met HBFI, 1 ng/ μ l in tolueen.

2.1.6 Standaardoplossing 7-hydroxy-2-acetylaminofluoreen (7-OH-2-AAF), gederivatiseerd met HBFI, 1 ng/ μ l in tolueen.

2.1.7 Standaardoplossing 8-hydroxy-2-acetylaminofluoreen (8-OH-2-AAF), gederivatiseerd met HBFI, 1 ng/ μ l in tolueen.

2.1.8 Standaardoplossing 9-hydroxy-2-acetylaminofluoreen (9-OH-2-AAF), gederivatiseerd met HBFI, 1 ng/ μ l in tolueen.

2.1.9 Mengsel A: 2-AF, 1-AP en 2-A-7-FF, conc. 0,33 ng/ μ l.

2.1.10 Mengsel B: 5-OH-2-AAF, 7-OH-2-AAF, 8-OH-2-AAF en 9-OH-2-AAF, conc. 0,25 ng/ μ l.

2.1.11 Mengsel A1: Mengsel A (2.1.1.9), conc. 3,3 pg/ μ l.

2.1.12 Mengsel B1: Mengsel B (2.1.1.10), conc. 2,5 pg/ μ l.

2.1.13 Standaardoplossing 1-nitropyreen (1-NP), gereduceerd tot aminoPAK en gederivatiseerd tot HFB-aminoPAK m.b.v. HFBA, 1 ng/ μ l.

2.1.14 Interne standaardoplossing 1-nitro(²H₉)pyreen (1-NPIS), gereduceerd tot aminoPAK en gederivatiseerd tot HFB-aminoPAK m.b.v. HFBA, 1 ng/ μ l.

2.1.15 Standaardoplossing 2-nitropyreen (2-NP), gereduceerd tot aminoPAK en gederivatiseerd tot HFB-aminoPAK m.b.v. HFBA, 1 ng/ μ l.

2.1.16 Standaardoplossing 4-nitropyreen (4-NP), gereduceerd tot aminoPAK en gederivatiseerd tot HFB-aminoPAK m.b.v. HFBA, 1 ng/ μ l.

2.1.17 Standaardoplossing 2-nitrofluoreen (2-NF), gereduceerd tot aminoPAK en gederivatiseerd tot HFB-aminoPAK m.b.v. HFBA, 1 ng/ μ l.

2.1.18 Interne standaardoplossing 2-fluor-7-nitrofluoreen (2-NFIS), gereduceerd tot aminoPAK en gederivatiseerd tot HFB-aminoPAK m.b.v. HFBA, 1 ng/ μ l.

2.1.19 Standaardoplossing 2-nitrofluorantheen (2-NFT), gereduceerd tot aminoPAK en gederivatiseerd tot HFB-aminoPAK m.b.v. HFBA, 1 ng/ μ l.

2.1.20 Standaardoplossing 3-nitrofluorantheen (3-NFT), gereduceerd tot aminoPAK en gederivatiseerd tot HFB-aminoPAK m.b.v. HFBA, 1 ng/ μ l.

2.1.21 Mengstandaard van 2.1.13 t/m 2.1.20, 125 pg/ μ l.

2.2 Apparatuur

2.2.1 Pipetten, Gilson p-200, p-1000 (Meyvis, Bergen op Zoom).

2.2.2 Crimptop vials 1,2 ml (cat.no. 1100), caps (cat.no. 1150), 100 μ l inserts (cat. no. 150813) (LC-service, Emmen).

2.2.3 Gaschromatograaf-massaspectrometer, bestaande uit:

2.2.3.1 Autosampler HP 7673 A (Hewlett-Packard, Avondale, USA).

injectie volume 2 μ l; aantal opzuigstappen 5; viscositeits parameter 2; aantal spoelstappen 2x5.

2.2.3.2 Fused silica capillaire kolom lengte 60 m; inwendige diameter 0,25 mm; filmdikte 0,25 μ m, coating DB 5 (J & W, Folsom, USA).

2.2.3.3 Gaschromatograaf HP 5890 (Hewlett-Packard, Avondale, USA).

Temperatuur injector: 280°C.

Methode KUN:

Temperatuur oven: 100°C gedurende 3 minuten, waarna de oven wordt verwarmd naar 300°C met een snelheid van 15°C/min. Gedurende ten minste 30 minuten wordt de oven op 300°C gehouden.

Methode KUN_1:

Temperatuur oven: 95°C gedurende 3 minuten, waarna de oven wordt verwarmd naar 150°C met een snelheid van 20°C/min. Hierna wordt direct verder verwarmd tot 300°C met 5°C/min. Gedurende ten minste 10 minuten wordt de oven op 300°C gehouden.

De splitter wordt 2 minuten na injectie geopend. De kolom is door middel van een directe koppeling verbonden met de massaspectrometer. De interfacetemperatuur is 280°C.

2.2.3.4 Massaspectrometer Autospec Q (VG Analytical, Manchester, U.K.).

Ionisatie in electron impact (EI) mode (positieve ionen) bij een electronen energie van ca. 35 eV. De emissiestroom is ongeveer 600 μ A. Brontemperatuur 280°C en de resolutie voor ion M/Z 317 is ingesteld op 10.000 (\pm 10%). Multiplier gain 350 - 400 V.

Ionisatie in chemical ionisation (CI) mode (negatieve ionen) bij een electronen energie van ca. 45 eV. De emissiestroom is ongeveer 1,0 mA. Brontemperatuur 180°C en de resolutie voor ion M/Z 381 is ingesteld op 6000 (\pm 10%). Multiplier gain 350 - 400 V. Als reactiegas wordt isobutaan gebruikt, waarbij de druk in de bron wordt afgeregeld op ca. $7 \cdot 10^{-6}$ bar.

Data systeem is VAX 3100 station met "operating system" VMS en het door VG ontwikkelde besturingsprogramma OPUS.

3 METHODEN

3.1 Ionisatie d.m.v. electron impact (positieve ionen)

Bij een resolutie van 3000 zijn zeven standaardoplossingen (2.1.2 t/m 2.1.8) apart geïnjecteerd om de retentietijden te bepalen en de spectra op te nemen. Dit gebeurde door middel van een magneetscan van M/Z 50 tot M/Z 650. Het gevolgde temperatuurprogramma was methode KUN (2.2.3.3). De gevonden retentietijden, samen met de specifieke ionen van de moleculen die gemeten kunnen worden zijn gegeven in tabel 1. De bijbehorende spectra zijn te vinden in bijlage 1.

Tabel 1

	Retentietijd (min)	Specifieke ionen	
1-AP	18:04	413,065	414,068
2-AF	14:41	377,065	378,068
2-A-7-FF	14:40	395,056	396,059
5-OH-2-AAF	15:02	589,036	590,039
7-OH-2-AAF	15:36	589,036	590,039
8-OH-2-AAF	15:06	589,036	590,039
9-OH-2-AAF	14:12	589,036	590,039

Nadat deze gegevens bekend waren kon er bij een resolutie van 10.000 Single Ion Recording (SIR) worden uitgevoerd.

Doordat het niet mogelijk is de optimale gevoeligheid te halen als de zeven standaarden in één mengsel worden geanalyseerd (dit in verband met het grote verschil tussen de molecuulionen die worden gemeten), zijn twee mengsels gemaakt (mengsel A (2.1.9) en mengsel B (2.1.10)), die elk met een apart experiment zijn geanalyseerd.

Mengsel A is geanalyseerd m.b.v. experiment KUN_1 en mengsel B m.b.v. experiment KUN_2. (zie bijlage 2)

Aan de hand van de verkregen resultaten (zie bijlage 3) valt af te leiden dat de standaardmengsels minimaal nog 100 maal kunnen worden verdund. De resultaten van de verdunde standaardmengsels (2.1.11 en 2.1.12) zijn te vinden in bijlage 4.

3.2 Chemische ionisatie (negatieve ionen)

In eerste instantie is dezelfde procedure gevolgt als bij electron impact, met uitzondering van het gevolgde temperatuurprogramma voor de GC (KUN_1 i.p.v. KUN, zie 2.2.3.3) en de standaarden (2.1.13 t/m 2.1.20). Dit laatste i.v.m. monsteronderzoek dat na ontwikkeling van de methode moet worden uitgevoerd (analyse op NO₂-PAKs). Het mengspectrum van 1-NP en 1-NPIS is weergegeven in bijlage 5, dit ter vergelijking met het EI-spectrum van 1-AP (1-AP is de tot Amino-PAK gereduceerde 1-NP. Dit geldt ook voor 2-AF en 2-NF). De resultaten zijn gegeven in tabel 2.

Tabel 2

	Retentietijd (min)	Specifieke ionen	
1-NP	32:51	393,059	394,062
1-NPIS	32:47	402,115	403,119
2-NP	33:43	393,059	394,062
4-NP	32:22	393,059	394,062
2-NF	24:47	357,059	358,062
2-NFIS	24:47	376,057	377,060
2-NFT	32:29	393,059	394,062
3-NFT	31:49	393,059	394,062

Met behulp van bovenstaande gegevens is er bij een oplossend vermogen van 6000 SIR (methode KUN_4Cl, zie bijlage 2) uitgevoerd met een mengstandaard (2.1.21). De resultaten hiervan zijn te vinden in bijlage 6.

3.3 Bepalingsgrenzen

Met behulp van de procedure "NOISE-CALC" zijn de signaal/ruis-verhoudingen van de zeven componenten berekend. Hierbij is aangenomen dat een piek die drie maal hoger is dan de ruis nog te bepalen is. Met het programma "NOISE-CALC" wordt de standaard deviatie van de ruis bepaald waarna de signaal/ruis-verhouding als volgt wordt berekend:

$$\text{S/N-verhouding} = \frac{\text{signaal component (hoogte)}}{3 \times \text{standaard deviatie van de ruis}}$$

In bijlage 4 (EI) en bijlage 6 (CI) zijn de chromatogrammen met de berekende standaard deviaties te vinden. In tabel 3 en 4 zijn de S/N-verhoudingen van de verschillende componenten gegeven.

Tabel 3: S/N-verhoudingen EI+.

Component	Massa	S/N-verhouding	Concentratie (pg/ μ l)	Bepalingsgrens (pg/ μ l)
1-AP	413,065	33,1	3,3	0,25
	414,068	13,3		
2-AF	377,065	61,6	3,3	0,07
	378,068	48,5		
2-A-7-FF	395,056	274,9	3,3	0,03
	396,059	102,5		
5-OH-2-AAF	589,036	109,4	2,5	0,06
	590,039	41,6		
7-OH-2-AAF	589,036	156,9	2,5	0,08
	590,039	31,4		
8-OH-2-AAF	589,036	129,1	2,5	0,06
	590,039	41,8		
9-OH-2-AAF	589,036	43,1	2,5	0,33
	590,039	7,6		

Tabel 4: S/N-verhoudingen CI-.

Component	Massa	S/N-verhouding	Concentratie (pg/ μ l)	Bepalingsgrens (pg/ μ l)
1-NP	393,059	301,2	125	0,67
	394,062	185,8		
1-NPIS	402,115	1492,0	125	0,38
	403,119	325,8		
2-NF	357,059	7160,0	125	0,10
	358,062	1231,1		
2-NFIS	376,057	811,5	125	0,98
	377,060	127,2		

3.4 Conclusie

Als naar de geïntegreerde chromatogrammen gekeken wordt lijkt op het eerste gezicht de gevoeligheid het grootst als gebruik gemaakt wordt van chemische ionisatie. De oppervlakten zijn groter bij chemische ionisatie dan bij electron impact. Kijken we echter naar de signaal/ruis-verhouding, dan wordt het duidelijk dat juist het tegenovergestelde het geval is. De gevoeligheid voor 1-nitropyreen en 2-nitrofluoreen is het grootst indien gebruik wordt gemaakt van ionisatie door middel van electron impact (positieve ionen).

Hierbij komt ook nog dat chemische ionisatie een groot nadeel heeft, te weten snelle vervuiling van de bron door het gebruik van isobutaan als reactiegas.

Aangezien de monsters van de KUN kwantitatief geanalyseerd moeten worden op 1-nitropyreen en 2-nitrofluoreen is er voor ionisatie m.b.v. electron impact gekozen.

4 RESULTATEN

In totaal zijn 36 monsters en 3 testmonsters geanalyseerd, waarbij gebruik is gemaakt van GC-methode KUN_1 (zie 2.2.3.3) en acquisitie-methode KUN_4 (zie bijlage 2).

De monsters hebben dezelfde behandeling ondergaan als de standaardoplossingen. Na reductie van de eventueel aanwezige NO₂-PAKs tot Amino-PAKs m.b.v. NaSH (2), worden deze in een klein volume n-hexaan met 20 µl HFBA gedurende 30 min. bij 60°C gederivatiseerd tot HFB-Amino-PAKs. Vervolgens wordt na afkoelen ca. 2 ml n-hexaan en 0,5 ml water toegevoegd. Na centrifugeren wordt de n-hexaan laag drooggedampt en opgenomen in iso-octaan voor analyse m.b.v. GC-MS. (3)

Bijgevoegd waren 2 ijkreeksen (hoog en laag concentratiebereik) met een bijbehorend testmonster. De testmonsters dienen ervoor om een kwantitatieve relatie te leggen tussen de ijkreeksen en de monsters. Vrijwel alle ijkreeks-, testmonster- en monstervials waren droog aangeleverd en zijn weer opgelost door iso-octaan toe te voegen, ultrasoon te trillen en te vortexen.

De monsters zijn kwantitatief geanalyseerd voor 1-nitropyreen en 2-nitrofluoreen. Kwalitatieve analyse is uitgevoerd voor 2-nitropyreen, 4-nitropyreen, 2-nitrofluorantheen en 3-nitrofluorantheen. De gevonden gehalten zijn te vinden in bijlage 7.

Enkele monsters zijn ter vergelijking ook geanalyseerd m.b.v. chemische ionisatie (negatieve ionen). De resultaten hiervan zijn ook te vinden in bijlage 7.

Opvallend bij deze resultaten is, dat vooral voor 2-nitrofluorantheen een hogere respons waarneembaar is dan bij Electron Impact.

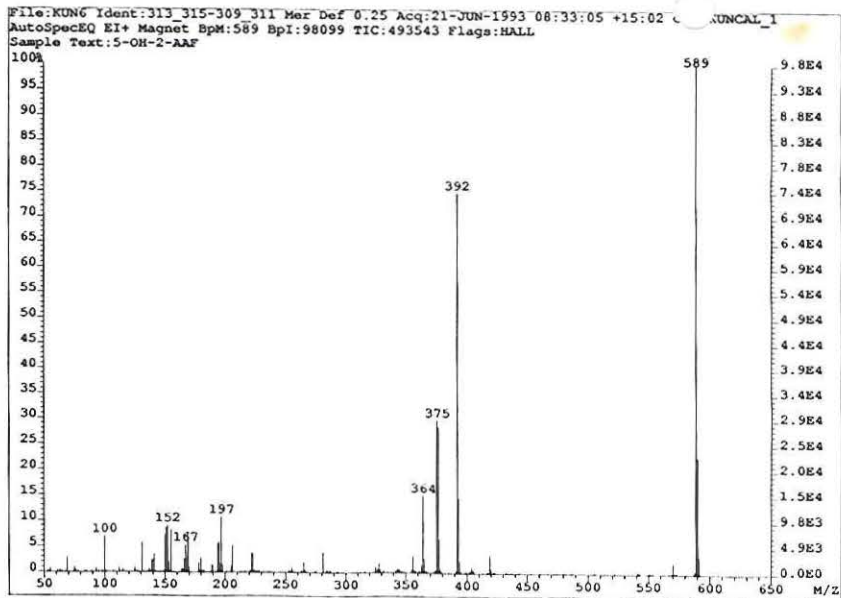
5 CONCLUSIE

Er is een analysemethode ontwikkeld voor nitro-PAKs, hemoglobine-addukten en n-OH-2-acetylaminofluorenen met behulp van gaschromatografie-massaspectrometrie. Er kunnen twee ionisatie-methoden gebruikt worden, te weten electron impact en chemische ionisatie. Ionisatie door middel van electron impact, waarbij positieve ionen worden gemeten, levert voor 1-nitropyreen en 2-nitrofluoreen de laagste detectiegrenzen op. Een uitzondering is vooral 2-nitrofluorantheen: deze component heeft een betere respons bij chemische ionisatie dan bij electron impact. Zouden monsters kwantitatief geanalyseerd moeten worden op bijv. deze component dan kan er beter gebruik gemaakt worden van chemische ionisatie.

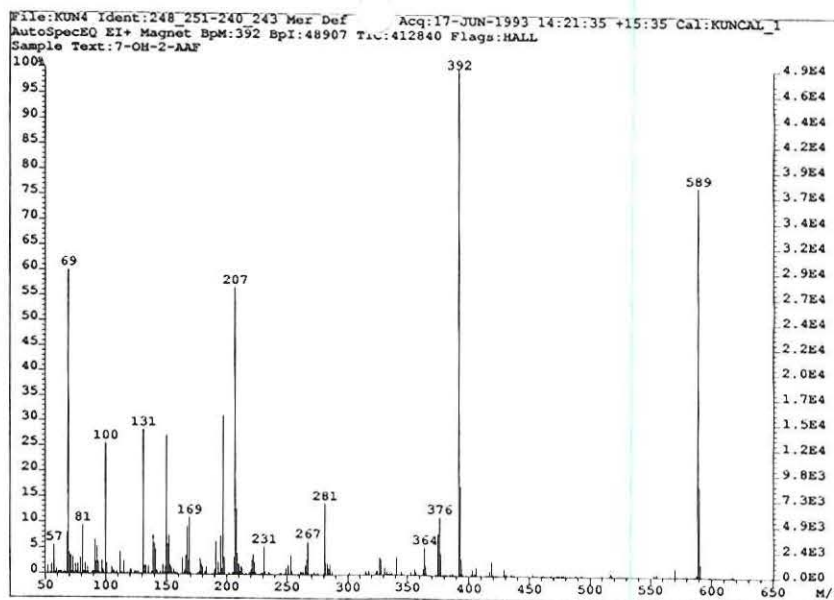
Een groot nadeel van chemische ionisatie is dat er snel vervuiling van de bron optreedt door het gebruik van isobutaan als reactiegas.

LITERATUUR

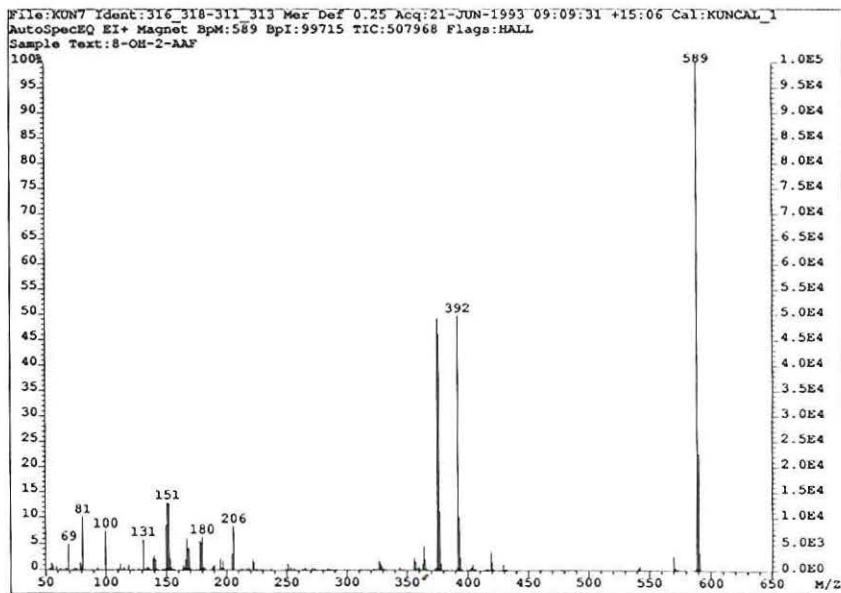
1. Voorstel Dieselproject, 1992, Katholieke Universiteit Nijmegen, Vakgroep Toxicologie.
2. Y. Hisamatsu, T. Nishimura, K. Tanabe and H. Matsushita, *Mutation Research*, 172, 1986, 19-27.
3. P.T.J. Scheepers, M.H.J. Martens, D.D. Velders, R.P. Bos, GC-MS determination of 1-nitropyreen in diesel exhaust derived airborne particulate matter sampled from work place atmospheres (Poster 1994). Katholieke Universiteit Nijmegen, Vakgroep Toxicologie.



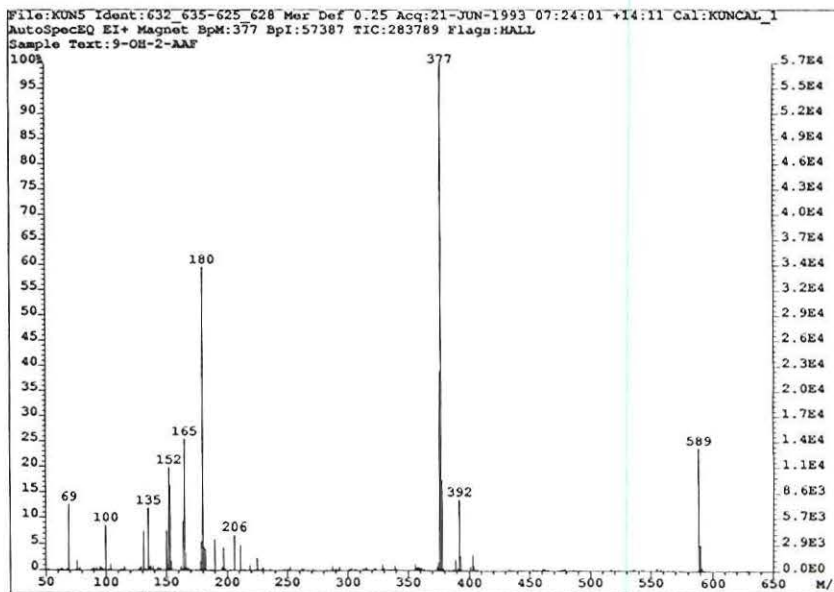
5-OH-2-Acetylaminofluoreen



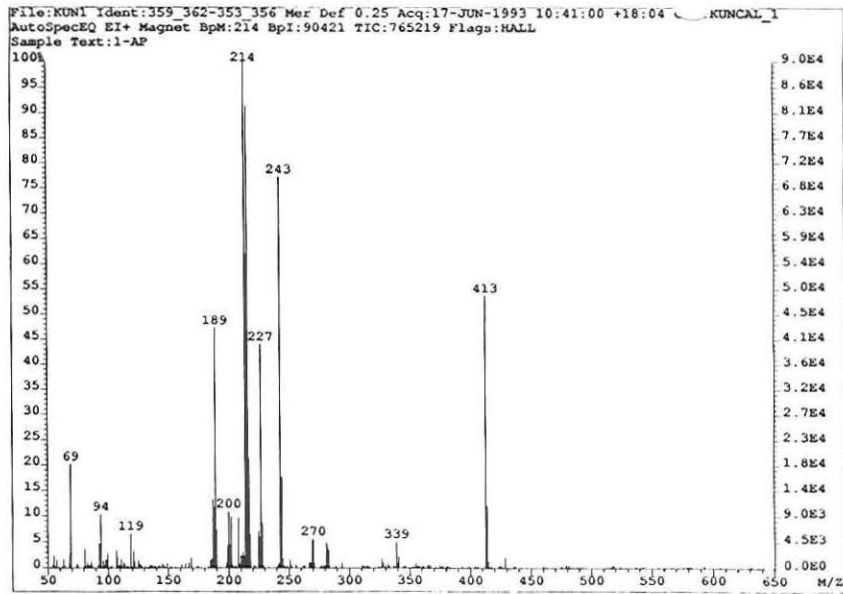
7-OH-2-Acetylaminofluoreen



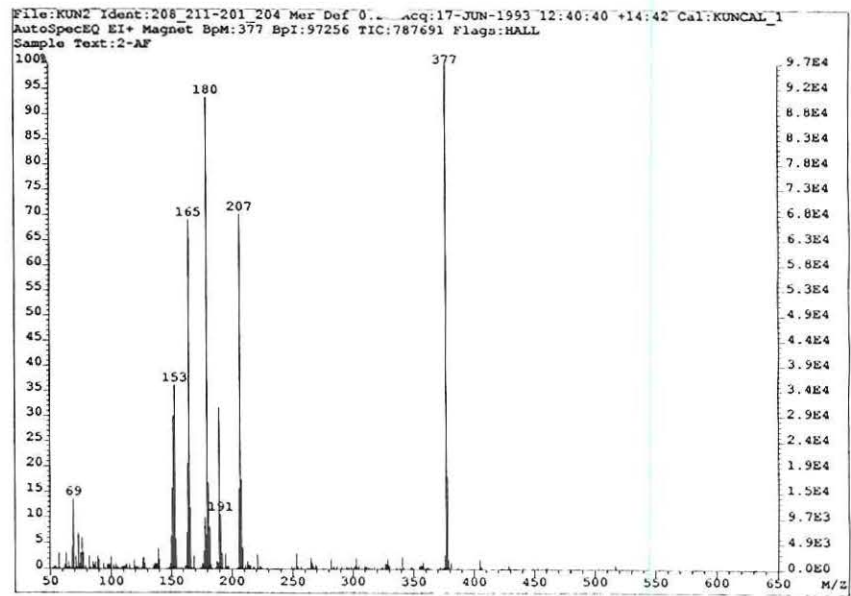
8-OH-2-Acetylaminofluoreen



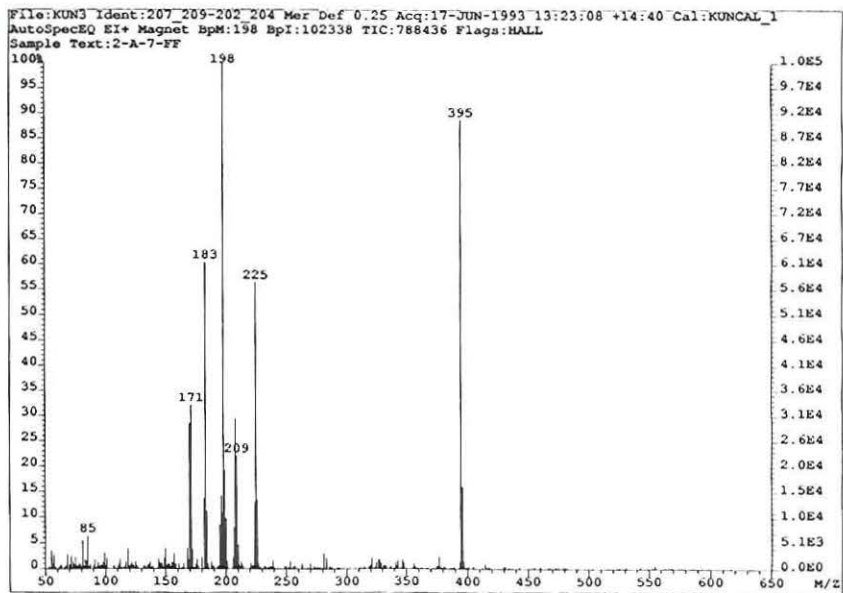
9-OH-2-Acetylaminofluoreen



1-Aminopyreen



2-Aminofluoreen



2-Amino-7-fluorfluoreen

BIJLAGE 2: Acquisitie methoden

Experiment: KUN 1 (2 Functions)

Operator : User
 Date : 8-DEC-1993 10:42:47
 Instrument : AutoSpecEQ

Function 1

Type : SIR Voltage
 Calibration file used : TZ27 1
 High mass : 396.1
 Low mass : 377.1
 Resolution : 10000
 Ionisation mode : EI+
 Accelerating Voltage : 8000.0V
 Magnet 1 control : Current
 Start Time : 10:00
 End Time : 16:00
 Fast lock : On
 Number of channels : 6
 Cycle time (ms) : 390

Channel	Mass	Ch Time (ms)	I/ch Time (ms)
1	377.0650	50	20
2	378.0680	50	20
3 (Lock)	380.9760	50	20
Primary Span Lock (Peaks) 2.00			
Secondary Span Lock (Peaks) 2.00			
Lock Level (mV) 0			
Step Lock (Peaks) 0.020			
4	380.9760	20	20
5	395.0560	50	20
6	396.0590	50	20

Septum flow : Off

Function 2

Type : SIR Voltage
 Calibration file used : TZ27 2
 High mass : 417.0
 Low mass : 413.1
 Resolution : 10000
 Ionisation mode : EI+
 Accelerating Voltage : 8000.0V
 Magnet 1 control : Current
 Start Time : 16:00
 End Time : 20:00
 Fast lock : On
 Number of channels : 4
 Cycle time (ms) : 250

Channel	Mass	Ch Time (ms)	I/ch Time (ms)
1	413.0650	50	20
2	414.0680	50	20
3 (Lock)	416.9760	50	20
Primary Span Lock (Peaks) 2.00			
Secondary Span Lock (Peaks) 2.00			
Lock Level (mV) 0			
Step Lock (Peaks) 0.020			
4	416.9760	20	20

Septum flow : Off

Experiment: KUN 2 (1 Functions)

Operator : User
 Date : 8-DEC-1993 10:42:24
 Instrument : AutoSpecEQ

Function 1

Type : SIR Voltage
 Calibration file used : KUN9 1
 High mass : 593.0
 Low mass : 589.0
 Resolution : 10000
 Ionisation mode : EI+
 Accelerating Voltage : 8000.0V
 Magnet 1 control : Current
 Start Time : 10:00
 End Time : 20:00
 Fast lock : On
 Number of channels : 4
 Cycle time (ms) : 250

Channel	Mass	Ch Time (ms)	I/ch Time (ms)
1	589.0360	50	20
2	590.0390	50	20
3 (Lock)	592.9633	50	20
Primary Span Lock (Peaks) 2.00			
Secondary Span Lock (Peaks) 2.00			
Lock Level (mV) 0			
Step Lock (Peaks) 0.020			
4	592.9633	20	20
Septum flow	: Off		

VERVOLG BIJLAGE 2: Acquisitie methoden

Experiment: KUN 4CI (2 Functions)

Operator : User
 Date : 5-JAN-1994 09:24:06
 Instrument : AutoSpecEQ

Function 1

Type : SIR Voltage
 Calibration file used : KUN19_1
 High mass : 377.1⁻
 Low mass : 357.1
 Resolution : 6000
 Ionisation mode : CI-
 Accelerating Voltage : 8000.0V
 Magnet 1 control : Current
 Start Time : 22:00
 End Time : 27:00
 Fast lock : On
 Number of channels : 6
 Cycle time (ms) : 390

Channel	Mass	Ch Time (ms)	I/ch Time (ms)
1	357.0590	50	20
2	358.0620	50	20
3 (Lock)	361.9777	50	20
Primary Span Lock (Peaks) 2.00			
Secondary Span Lock (Peaks) 2.00			
Lock Level (mV) 0			
Step Lock (Peaks) 0.020			
4	361.9777	20	20
5	376.0570	50	20
6	377.0600	50	20

Septum flow : Off

Function 2

Type : SIR Voltage
 Calibration file used : KUN19_2
 High mass : 403.1⁻
 Low mass : 393.1
 Resolution : 6000
 Ionisation mode : CI-
 Accelerating Voltage : 8000.0V
 Magnet 1 control : Current
 Start Time : 29:00
 End Time : 36:00
 Fast lock : On
 Number of channels : 6
 Cycle time (ms) : 390

Channel	Mass	Ch Time (ms)	I/ch Time (ms)
1	393.0590	50	20
2	394.0620	50	20
3 (Lock)	399.9774	50	20
Primary Span Lock (Peaks) 2.00			
Secondary Span Lock (Peaks) 2.00			
Lock Level (mV) 0			
Step Lock (Peaks) 0.020			
4	399.9774	20	20
5	402.1150	50	20
6	403.1190	50	20

Septum flow : Off

VERVOLG BIJLAGE 2: Acquisitie methoden

Experiment: KUN 4 (2 Functions)

Operator : User
 Date : 5-JAN-1994 09:23:20
 Instrument : AutoSpecEQ

Function 1

Type : SIR Voltage
 Calibration file used : KUN23_1
 High mass : 396.1
 Low mass : 377.1
 Resolution : 6000
 Ionisation mode : EI+
 Accelerating Voltage : 8000.0V
 Magnet 1 control : Current
 Start Time : 22:00
 End Time : 27:00
 Fast lock : On
 Number of channels : 6
 Cycle time (ms) : 390

Channel	Mass	Ch Time (ms)	I/ch Time (ms)
1	377.0650	50	20
2	378.0680	50	20
3 (Lock)	380.9760	50	20
Primary Span Lock (Peaks) 2.00			
Secondary Span Lock (Peaks) 2.00			
Lock Level (mV) 0			
Step Lock (Peaks) 0.020			
4	380.9760	20	20
5	395.0560	50	20
6	396.0590	50	20
Septum flow	: Off		

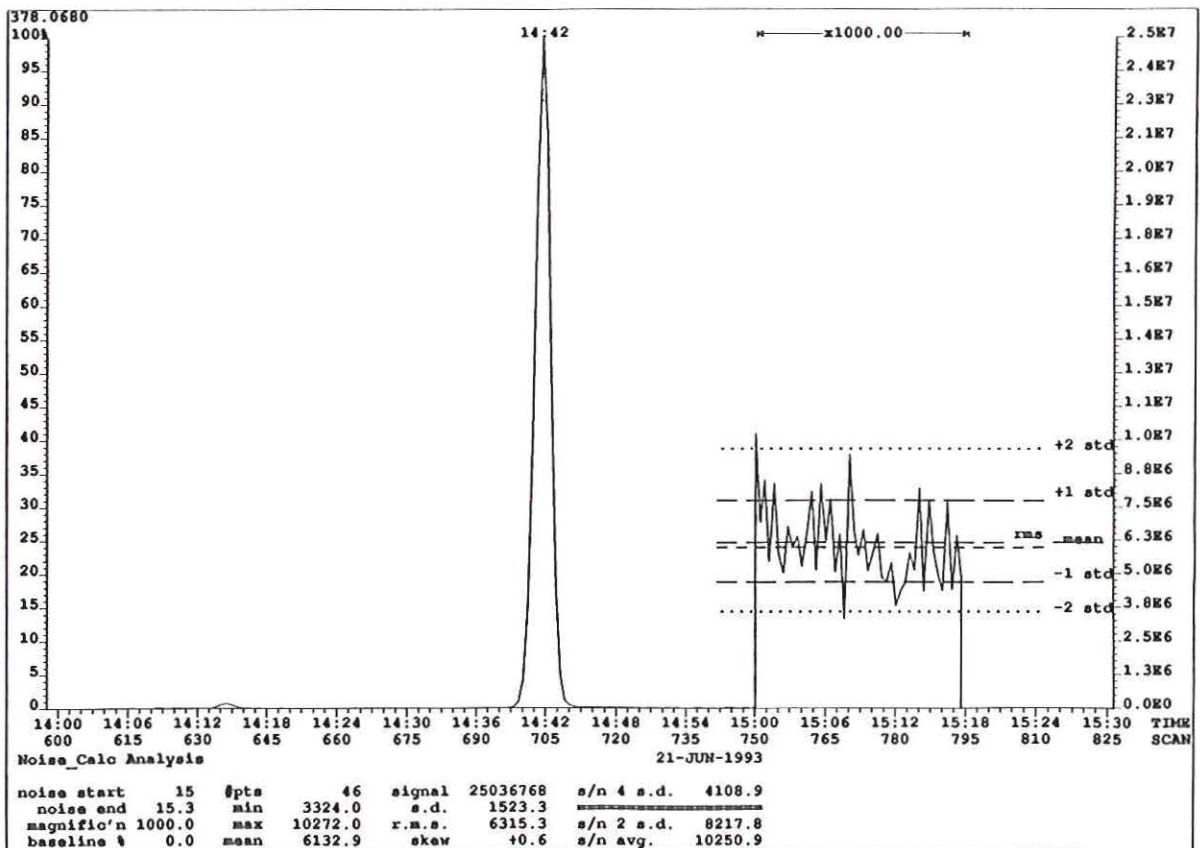
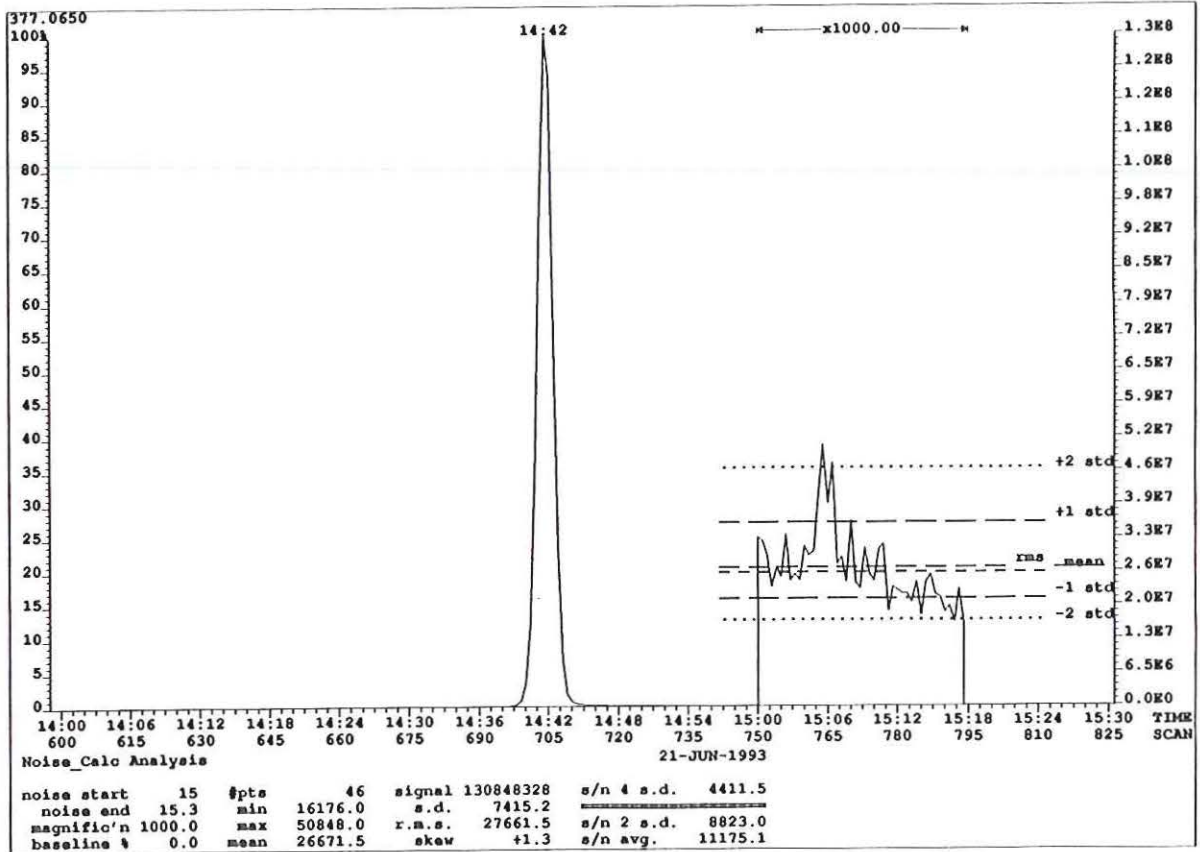
Function 2

Type : SIR Voltage
 Calibration file used : KUN23_2
 High mass : 423.1
 Low mass : 413.1
 Resolution : 6000
 Ionisation mode : EI+
 Accelerating Voltage : 8000.0V
 Magnet 1 control : Current
 Start Time : 29:00
 End Time : 36:00
 Fast lock : On
 Number of channels : 6
 Cycle time (ms) : 390

Channel	Mass	Ch Time (ms)	I/ch Time (ms)
1	413.0650	50	20
2	414.0680	50	20
3 (Lock)	416.9760	50	20
Primary Span Lock (Peaks) 2.00			
Secondary Span Lock (Peaks) 2.00			
Lock Level (mV) 0			
Step Lock (Peaks) 0.020			
4	416.9760	20	20
5	422.1220	50	20
6	423.1250	50	20
Septum flow	: Off		

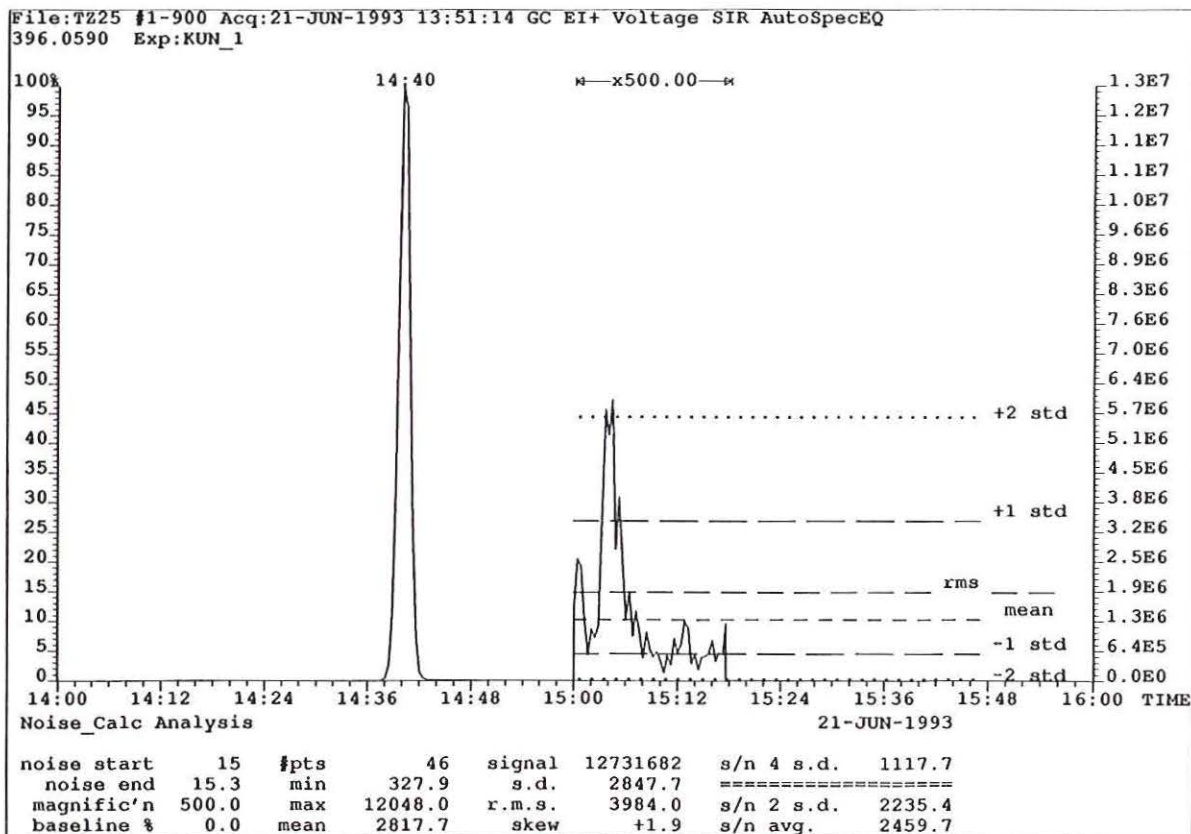
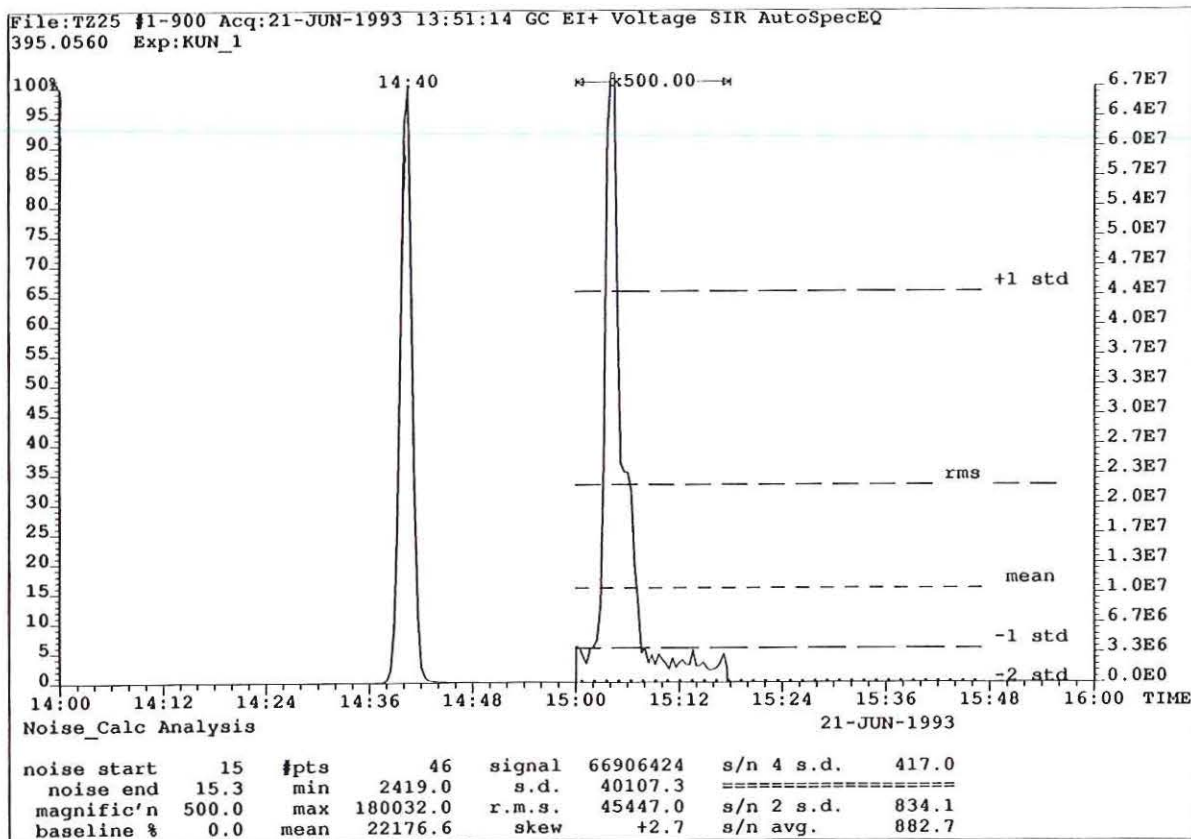
BIJLAGE 3: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A (0,33 ng/ μ l) en B (0,25 ng/ μ l)

2-Aminofluoreen



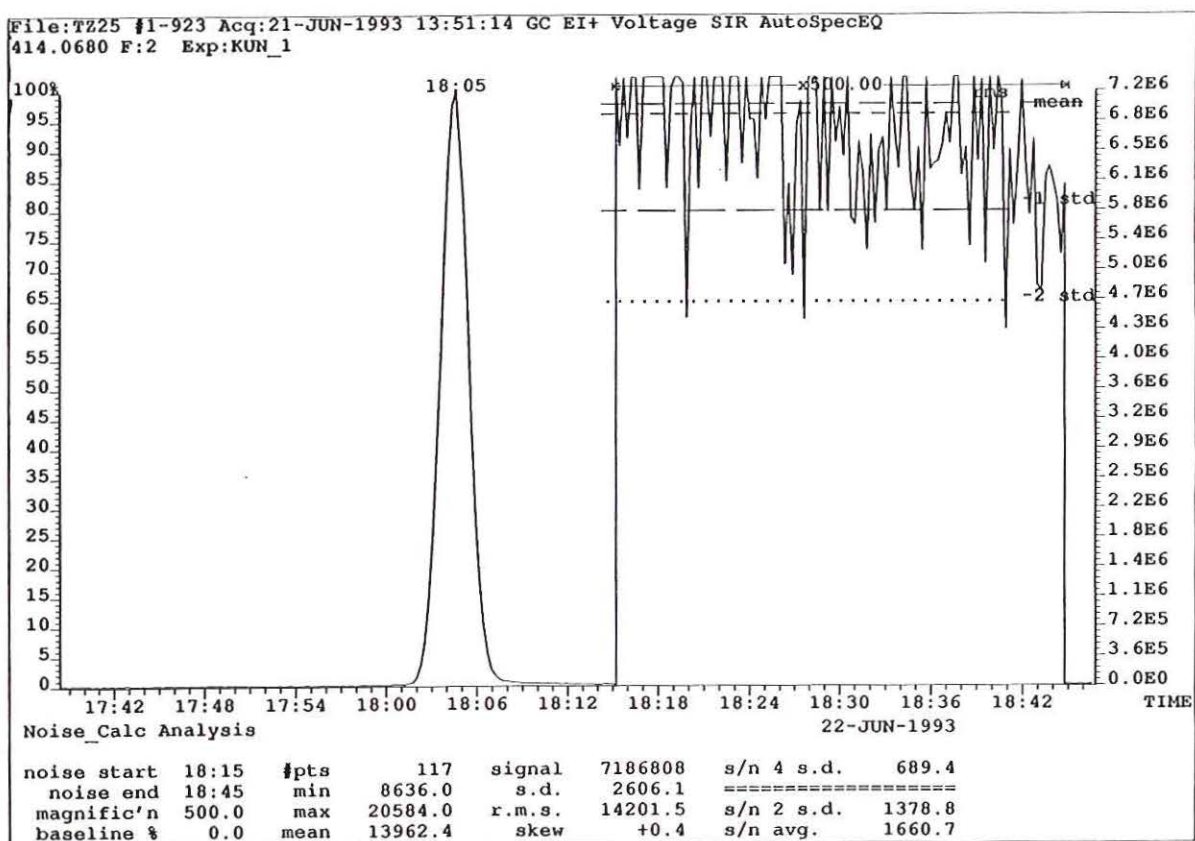
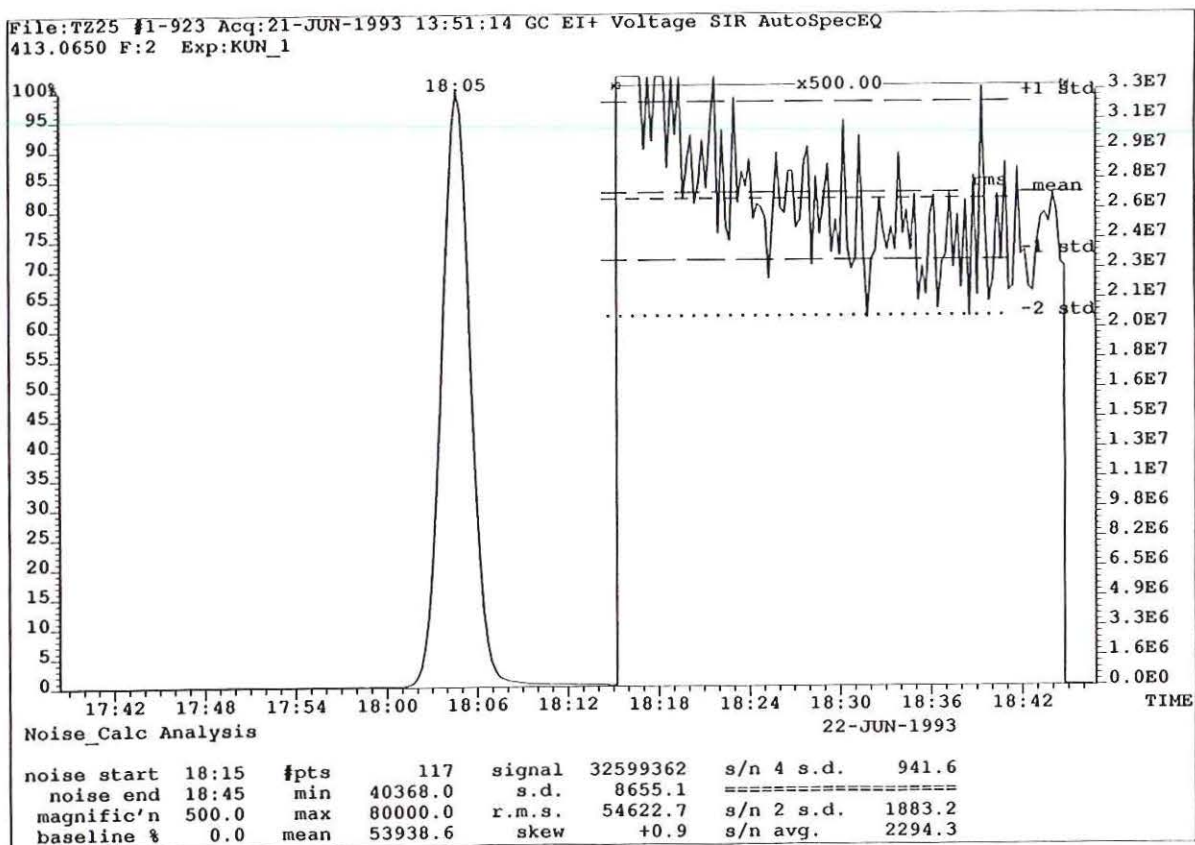
VERVOLG BIJLAGE 3: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A
(0,33 ng/ μ l) en B (0,25 ng/ μ l)

2-Amino-7-fluorfluoreen



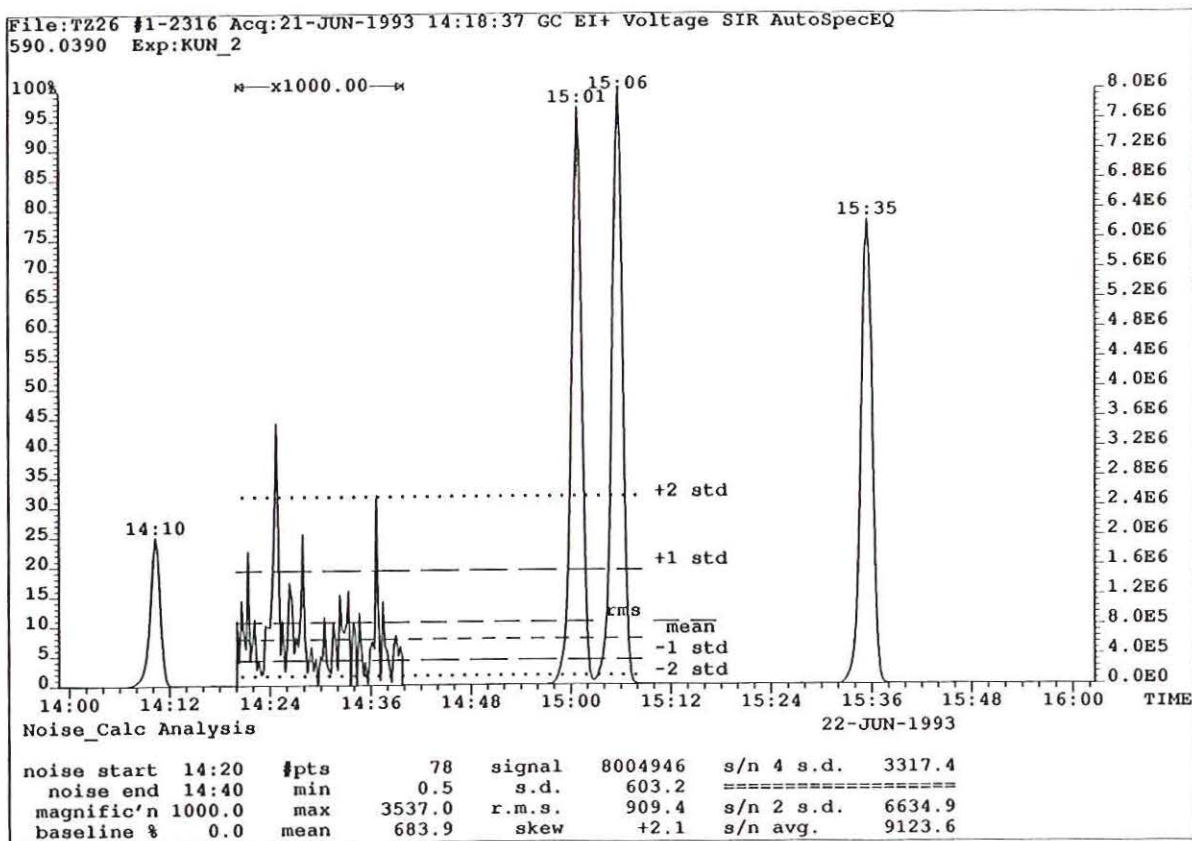
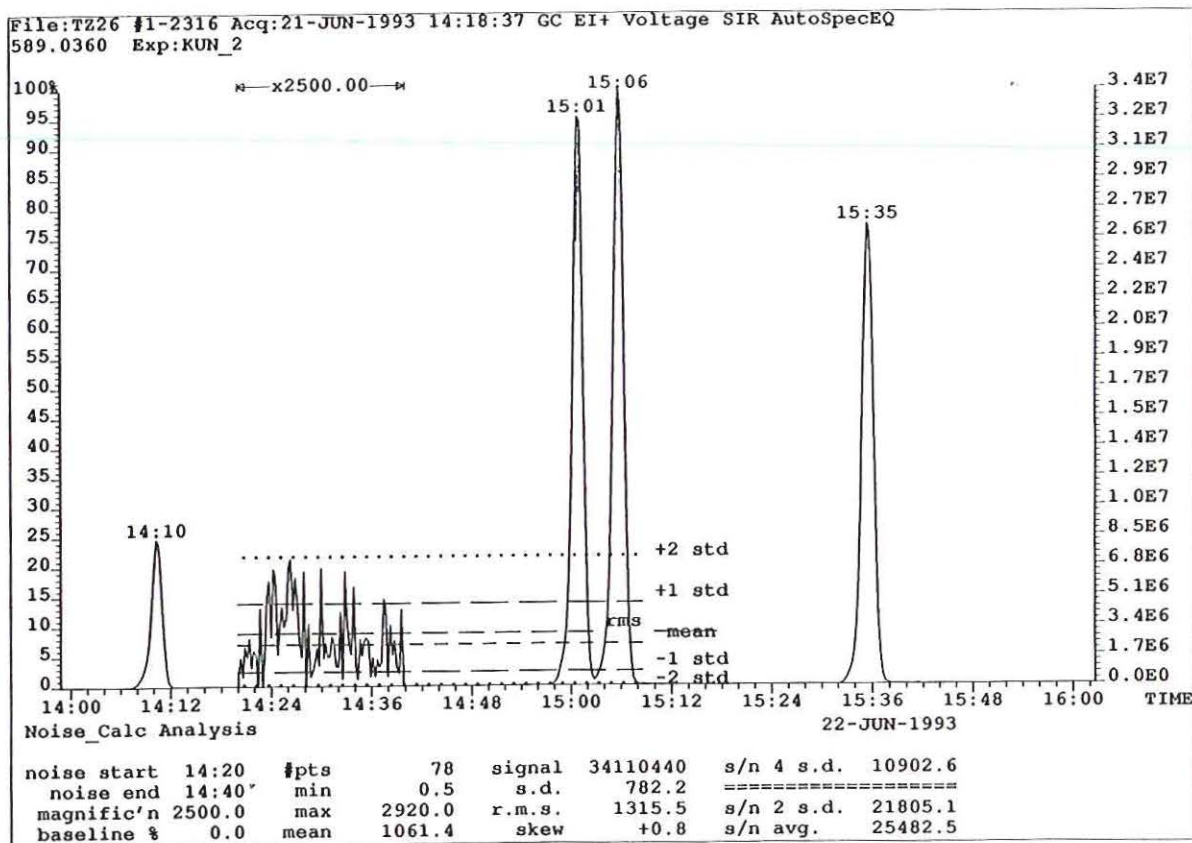
VERVOLG BIJLAGE 3: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A
(0,33 ng/ μ l) en B (0,25 ng/ μ l)

1-Aminopyreen



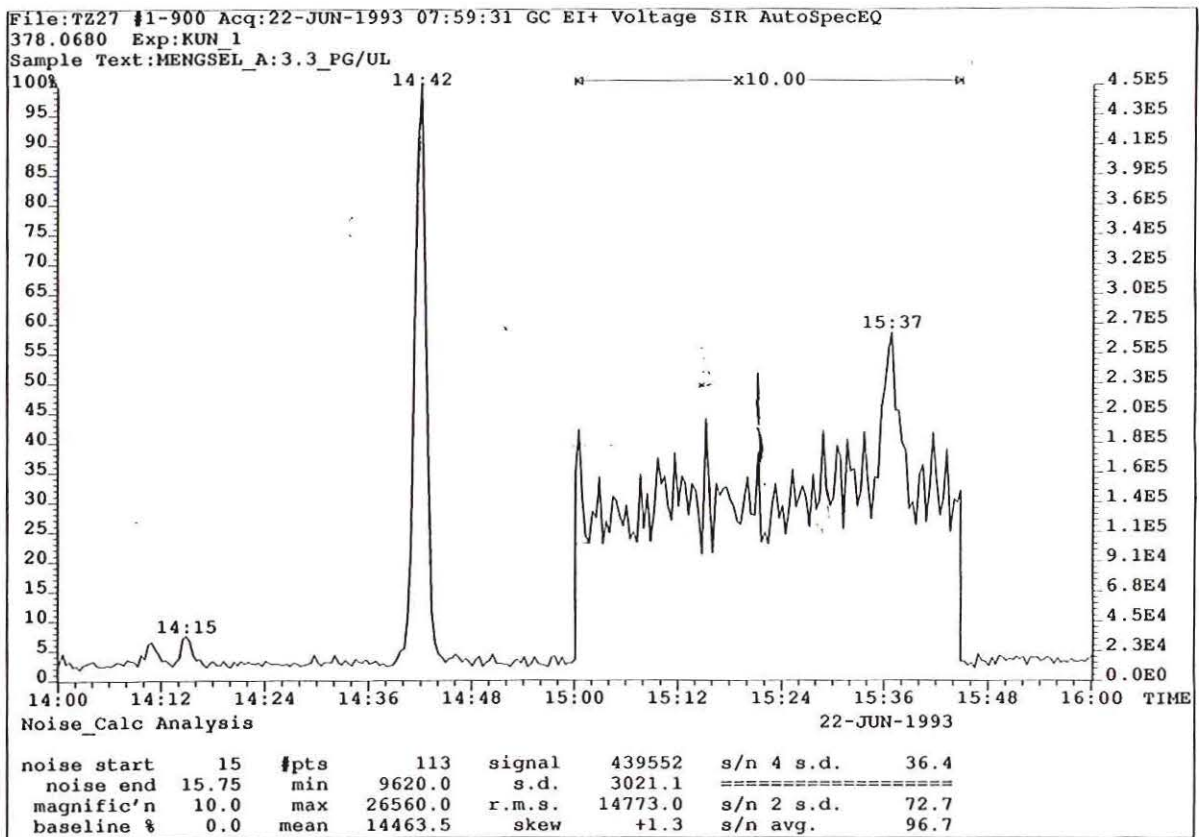
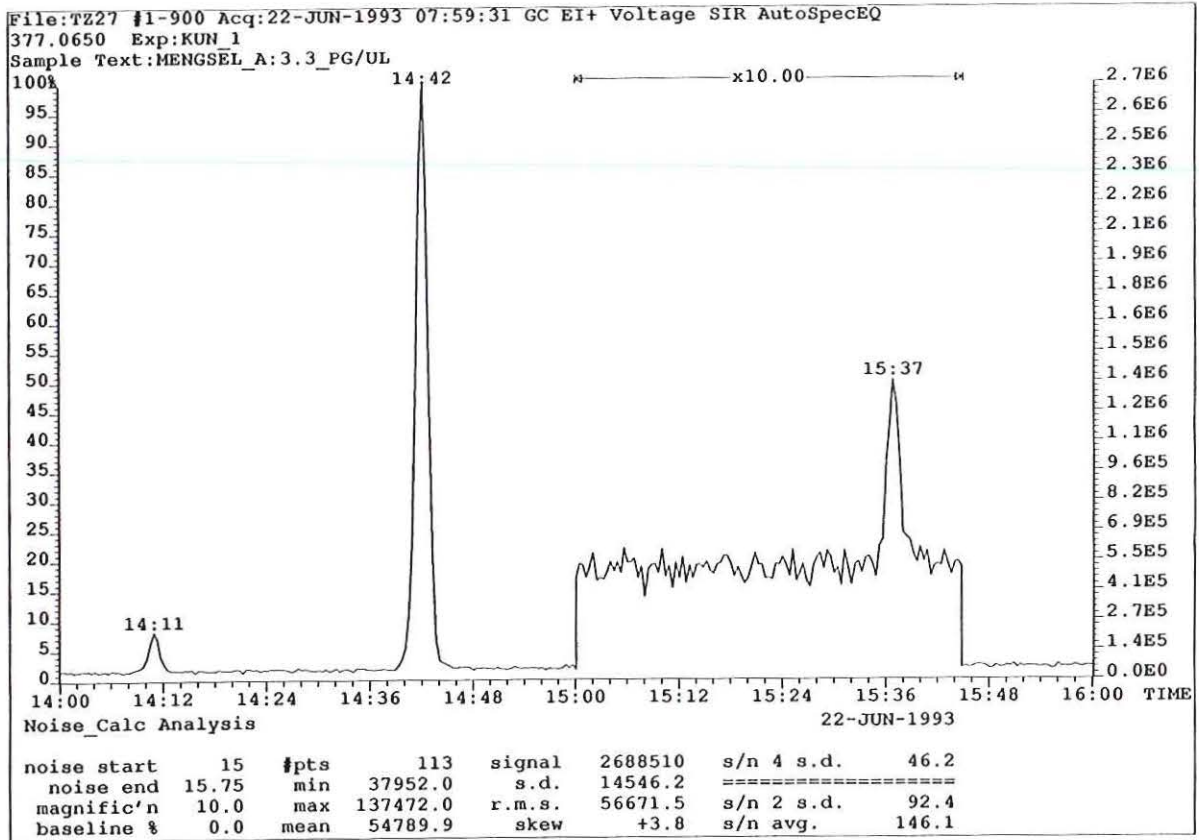
VERVOLG BIJLAGE 3: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A
(0,33 ng/ μ l) en B (0,25 ng/ μ l)

n-OH-2-Acetylaminofluoreen



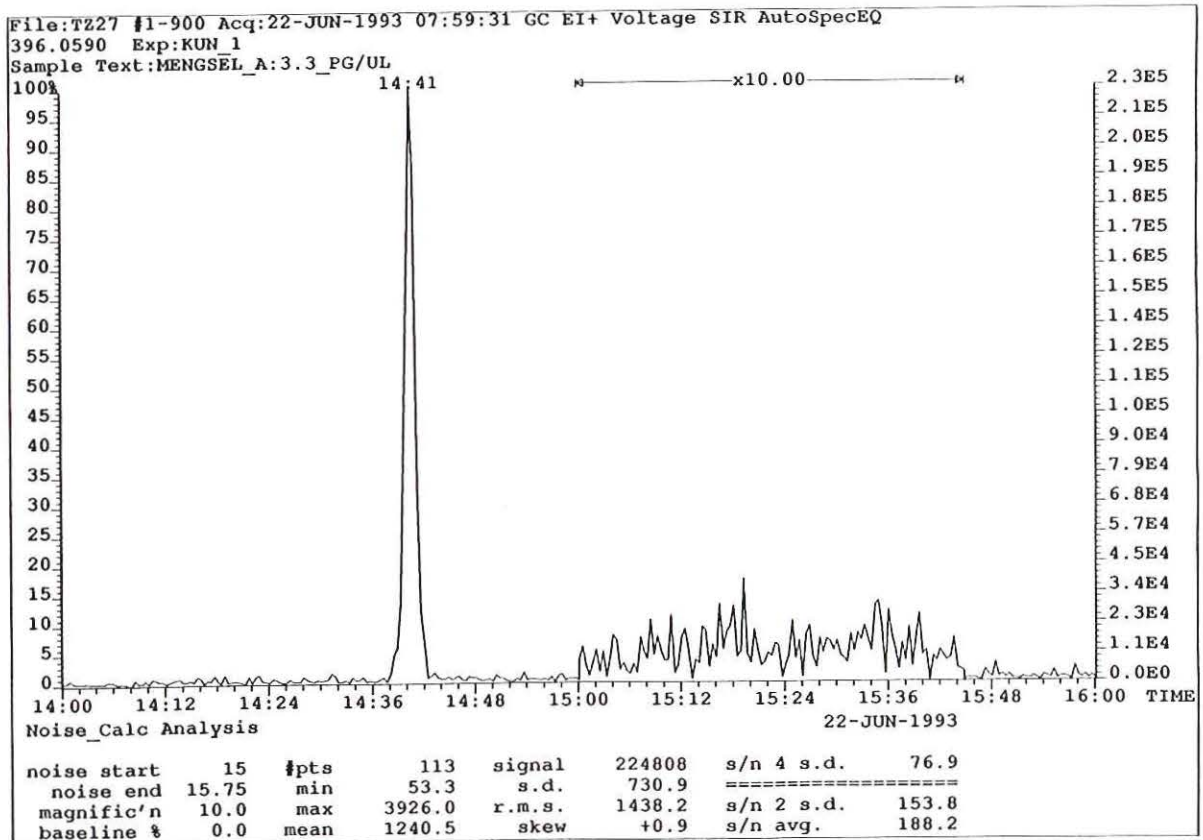
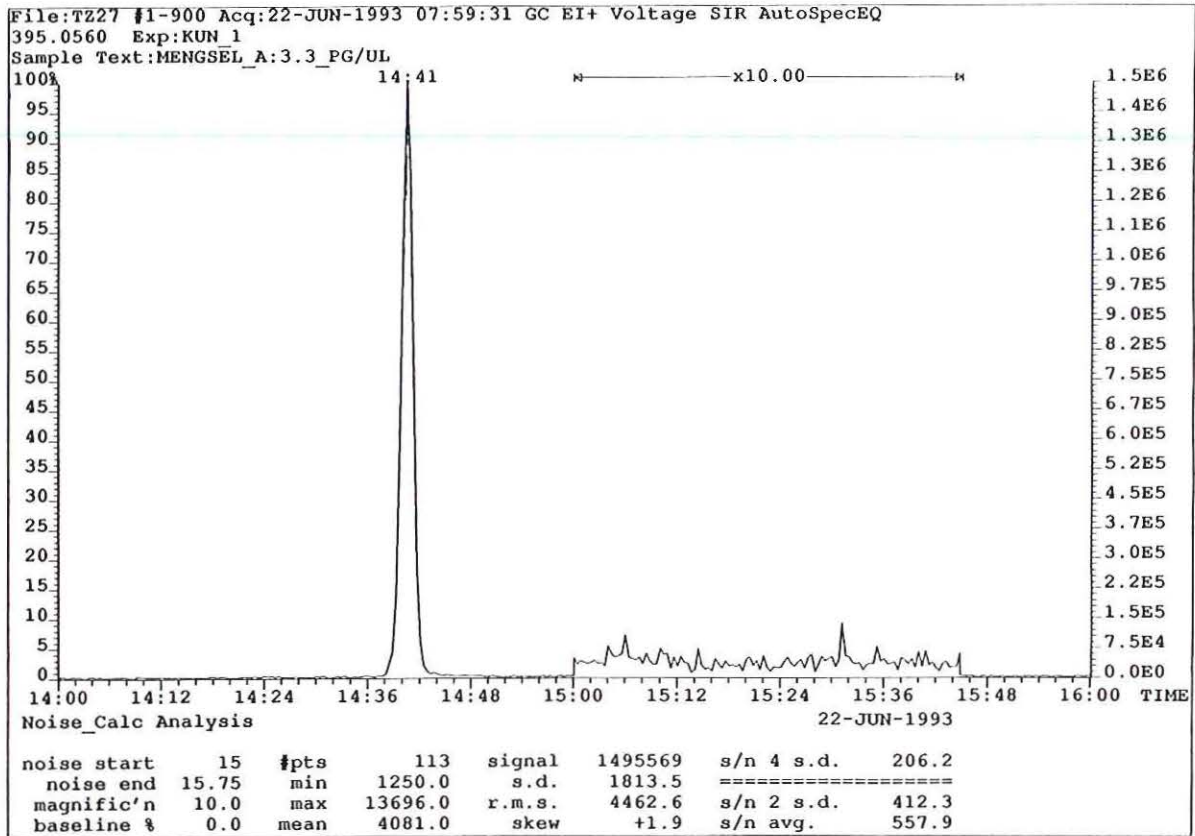
BIJLAGE 4: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A1 (3,3 pg/ μ l) en B1 (2,5 pg/ μ l)

2-Aminofluoreen



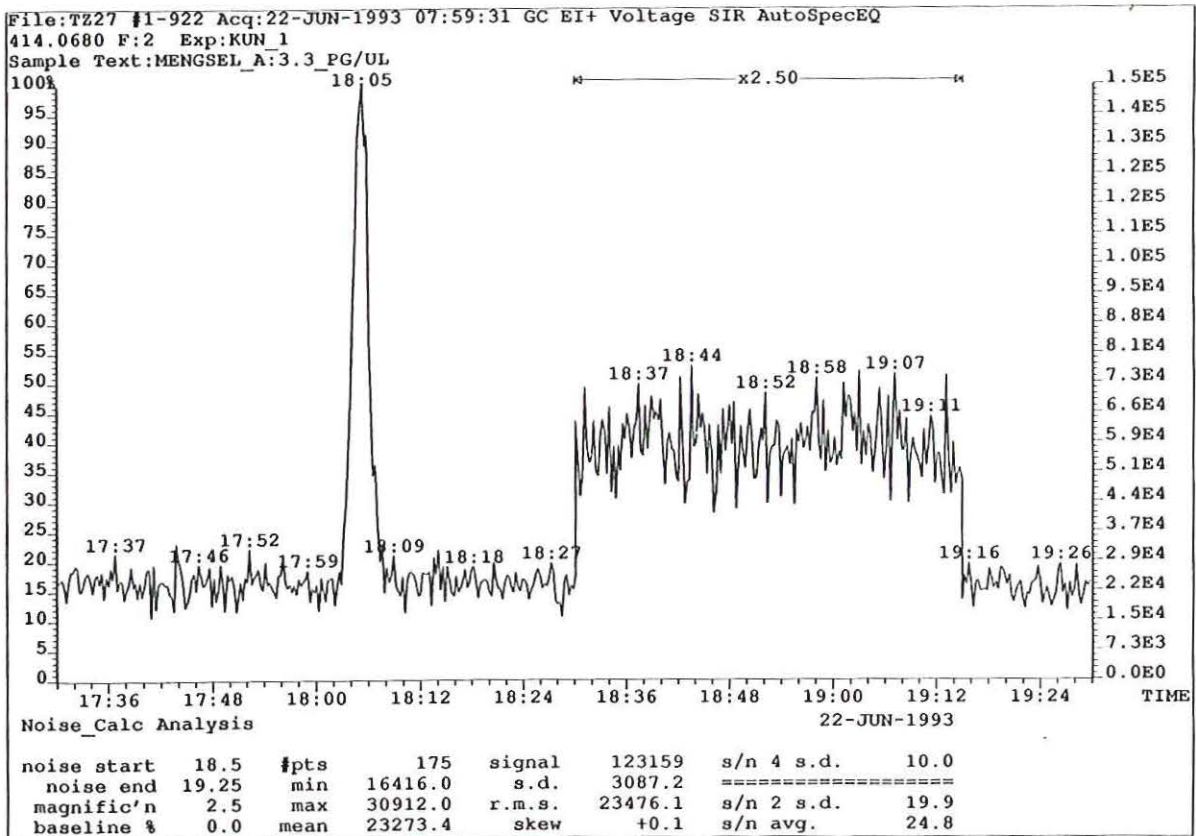
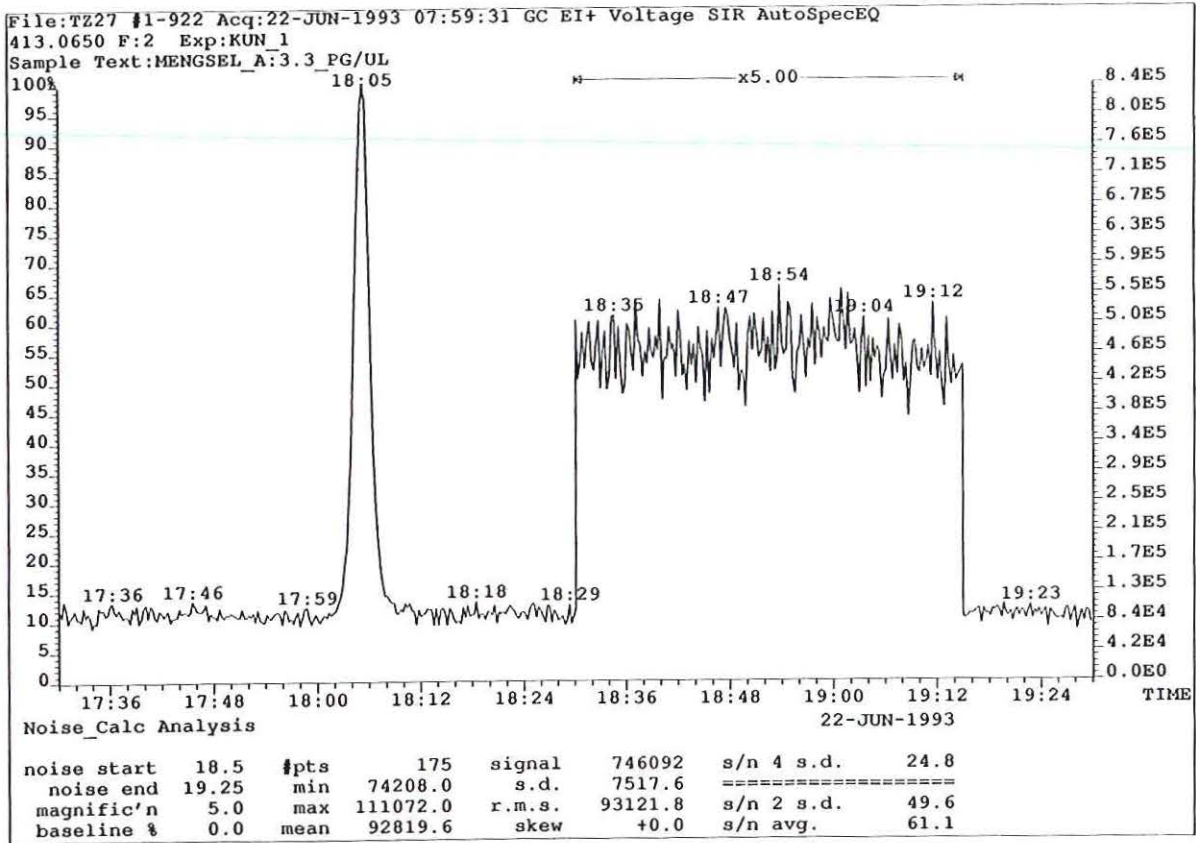
VERVOLG BIJLAGE 4: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A1
(3,3 pg/ μ l) en B1 (2,5 pg/ μ l)

2-Amino-7-fluorfluoreen



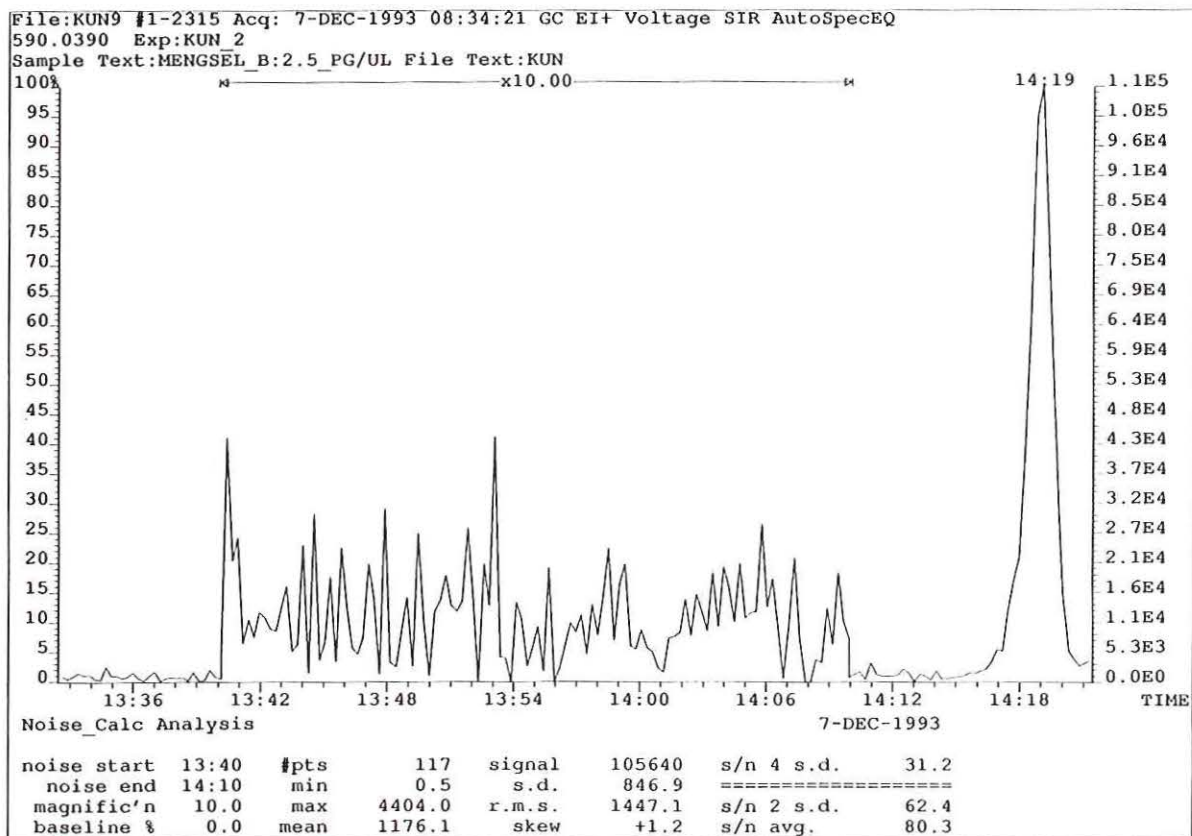
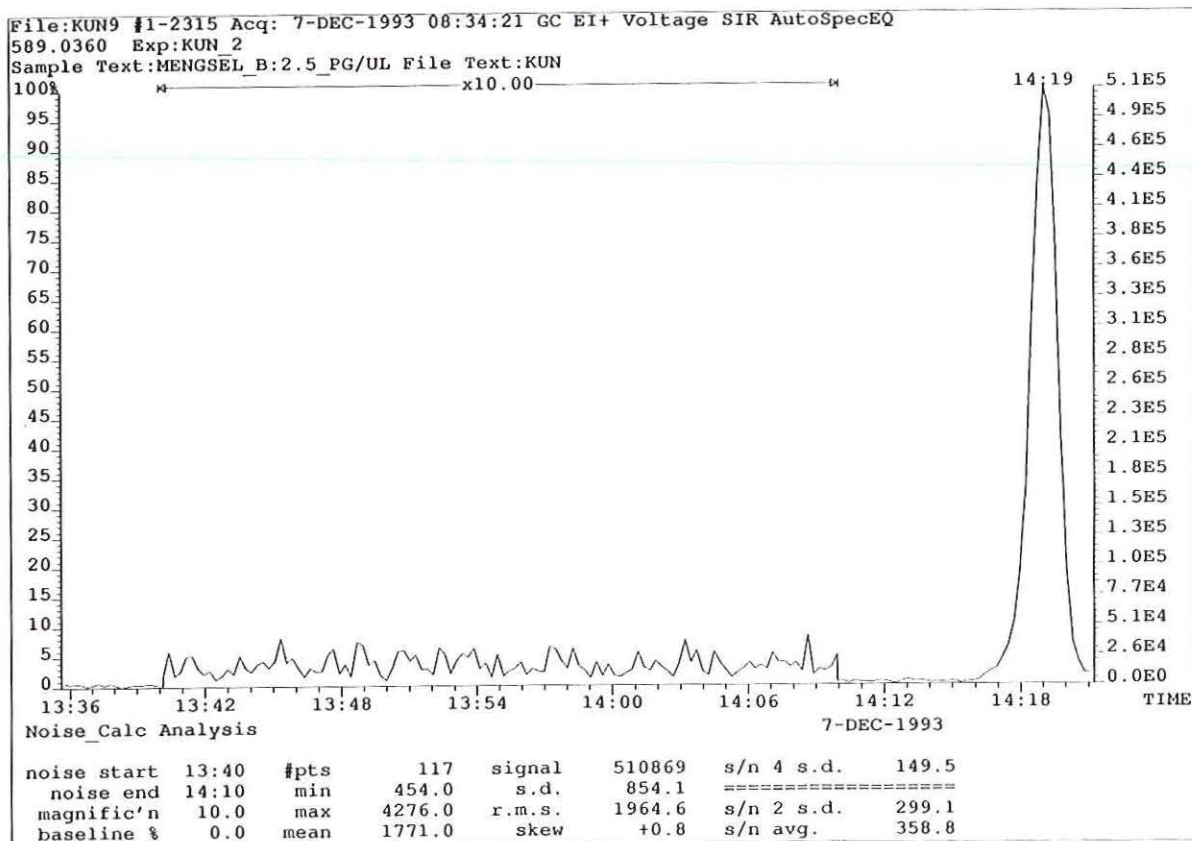
VERVOLG BIJLAGE 4: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A1
(3,3 pg/ μ l) en B1 (2,5 pg/ μ l)

1-Aminopyreen



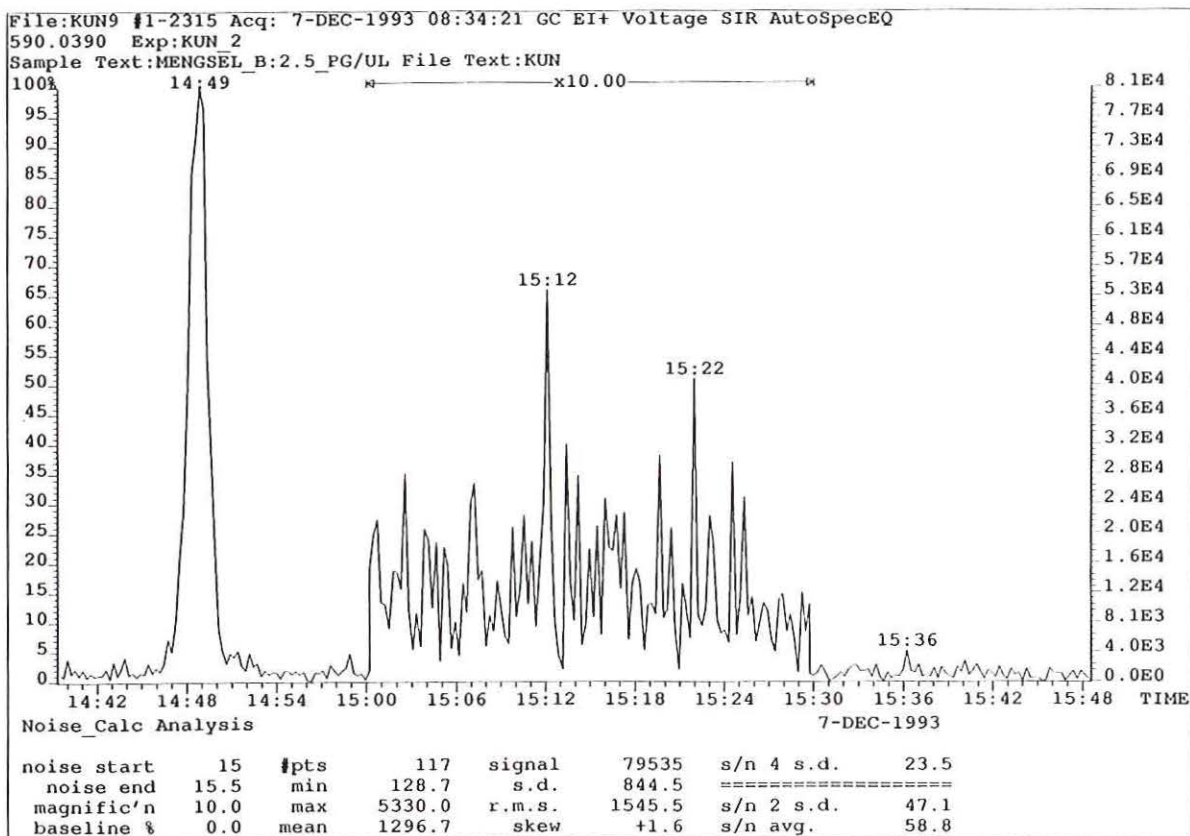
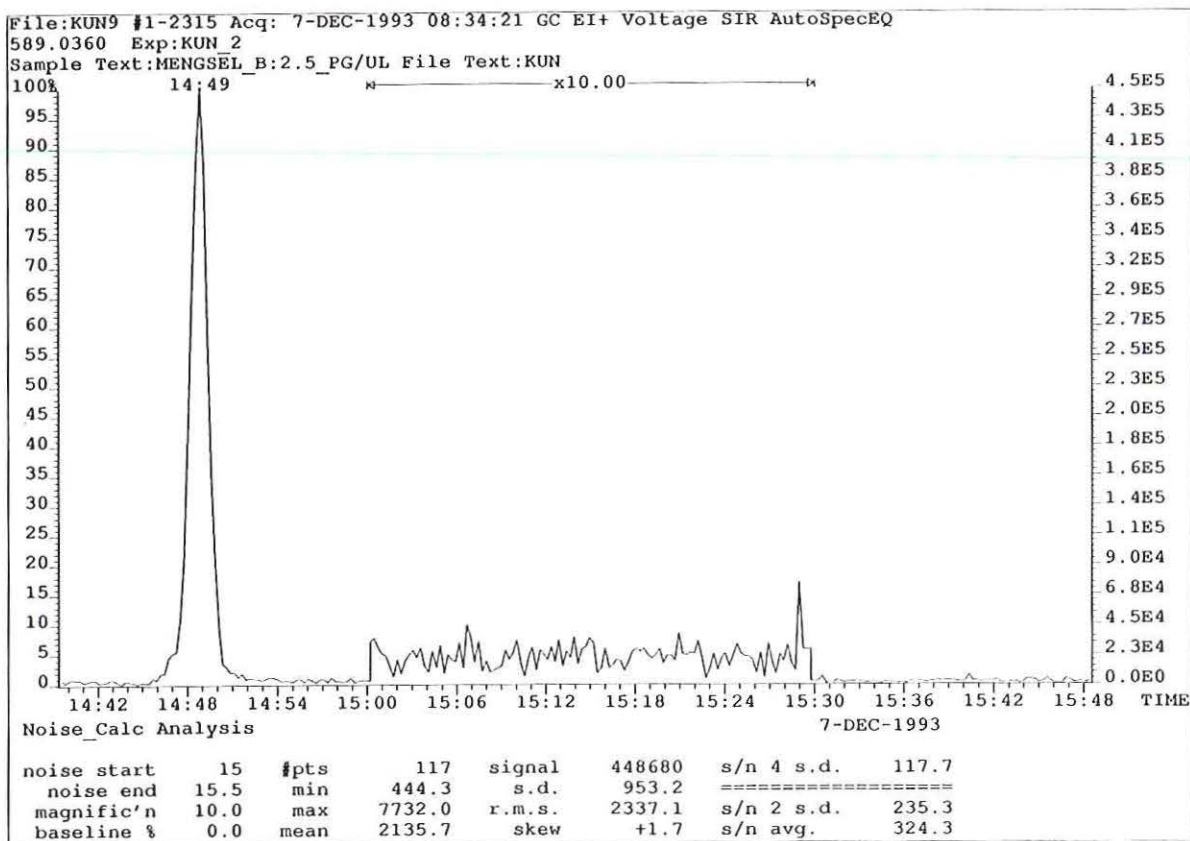
VERVOLG BIJLAGE 4: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A1
(3,3 pg/ μ l) en B1 (2,5 pg/ μ l)

5-OH-2-Acetylaminofluoreen



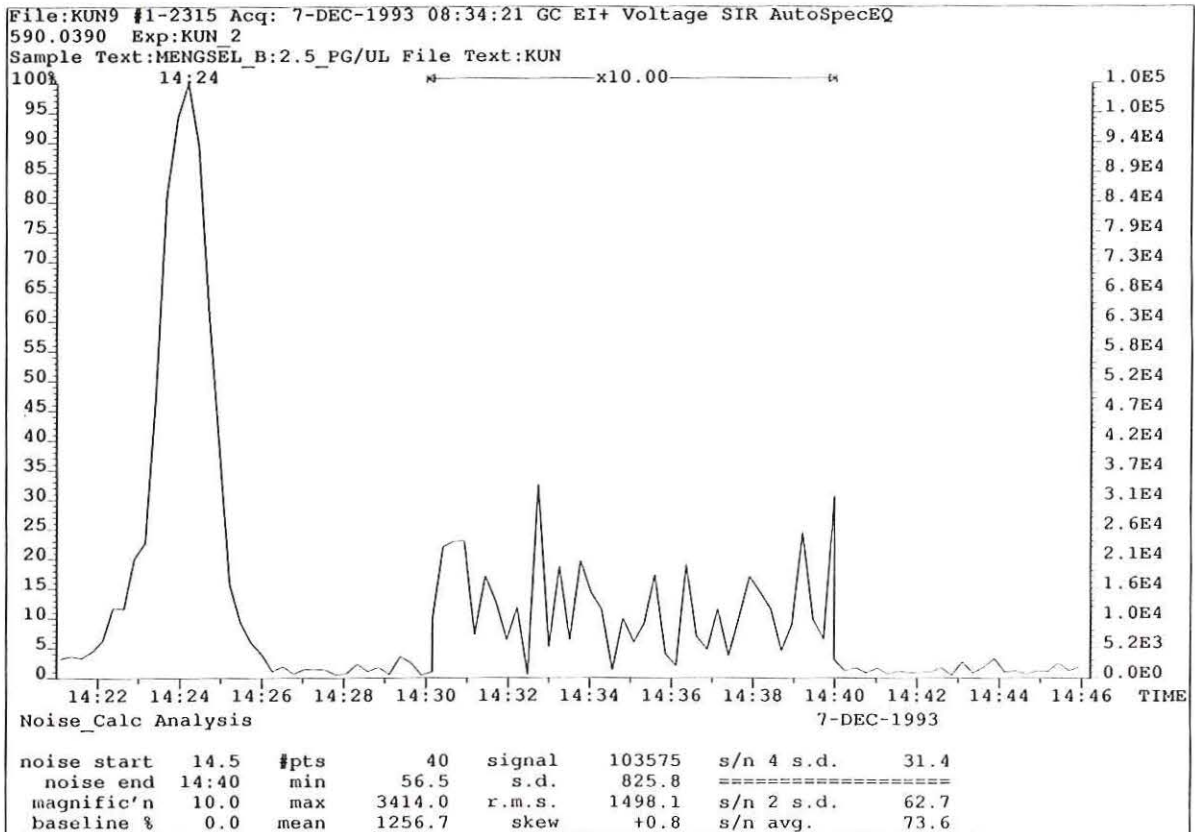
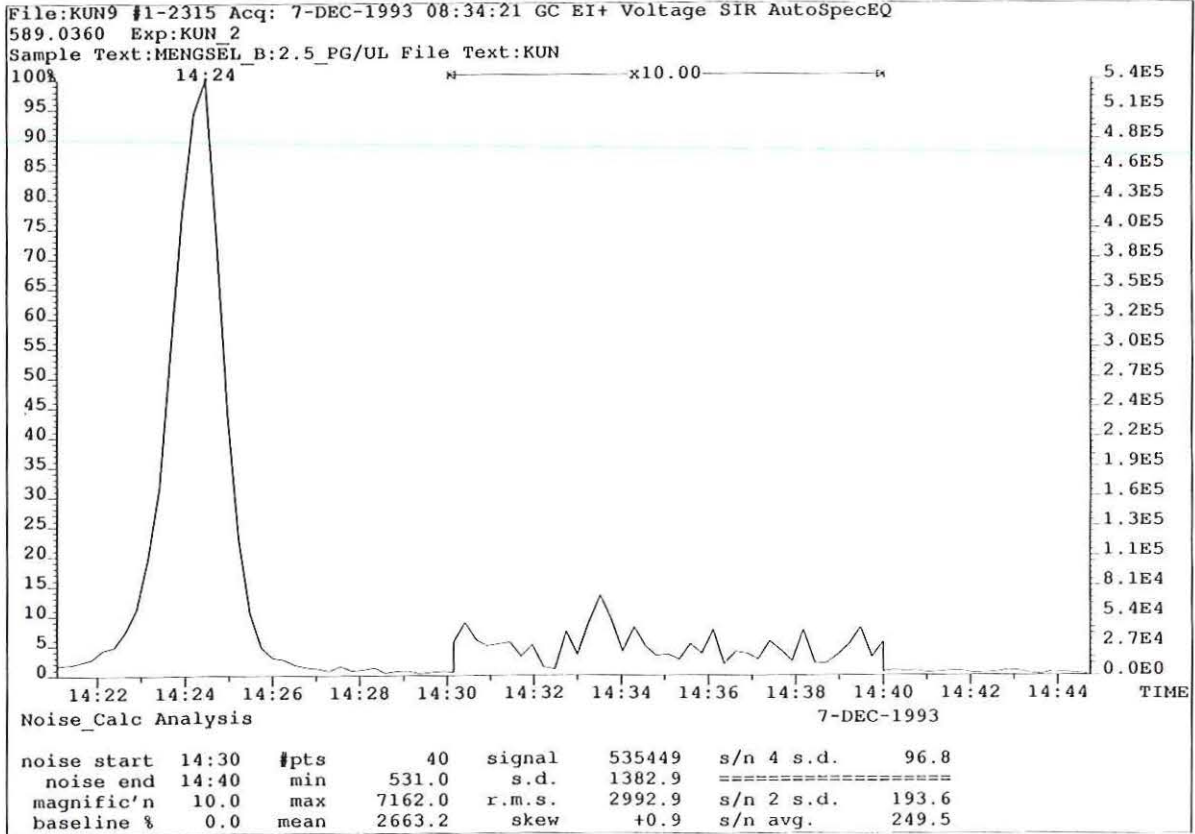
VERVOLG BIJLAGE 4: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A1
(3,3 pg/ μ l) en B1 (2,5 pg/ μ l)

7-OH-2-Acetylaminofluoreen



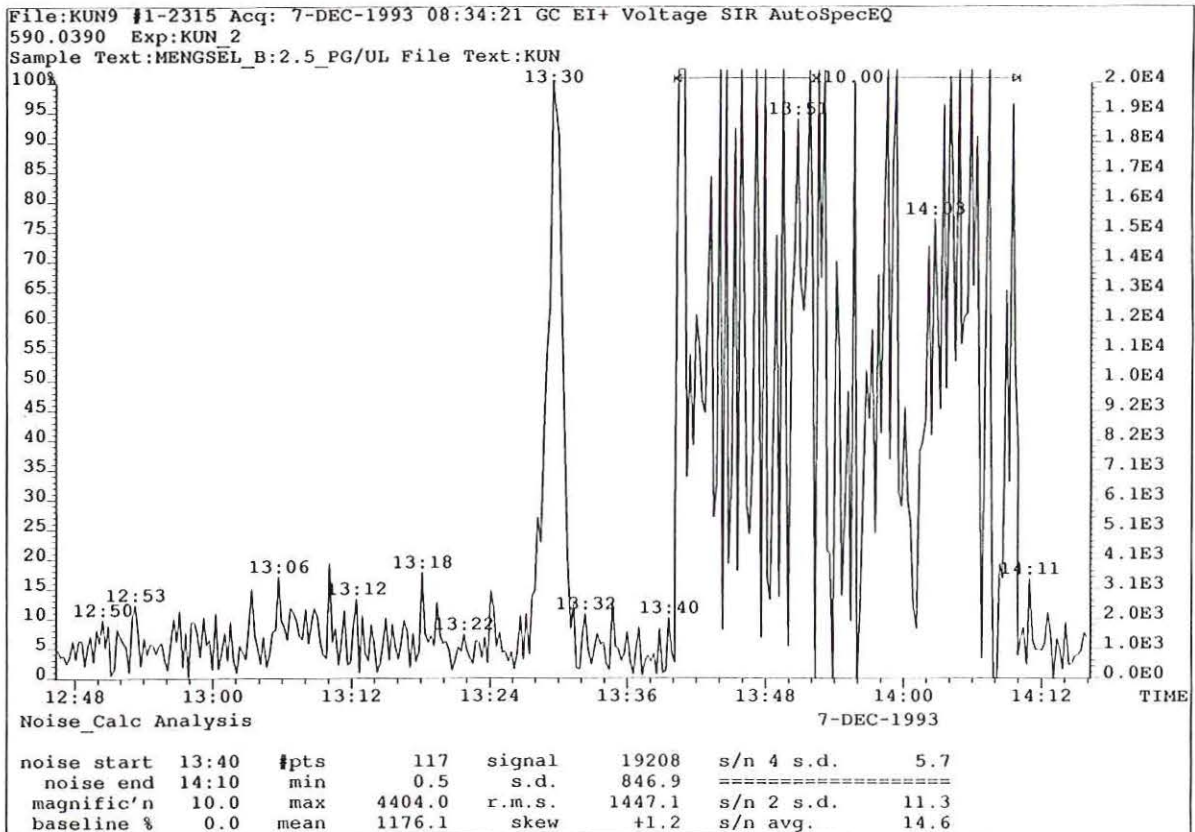
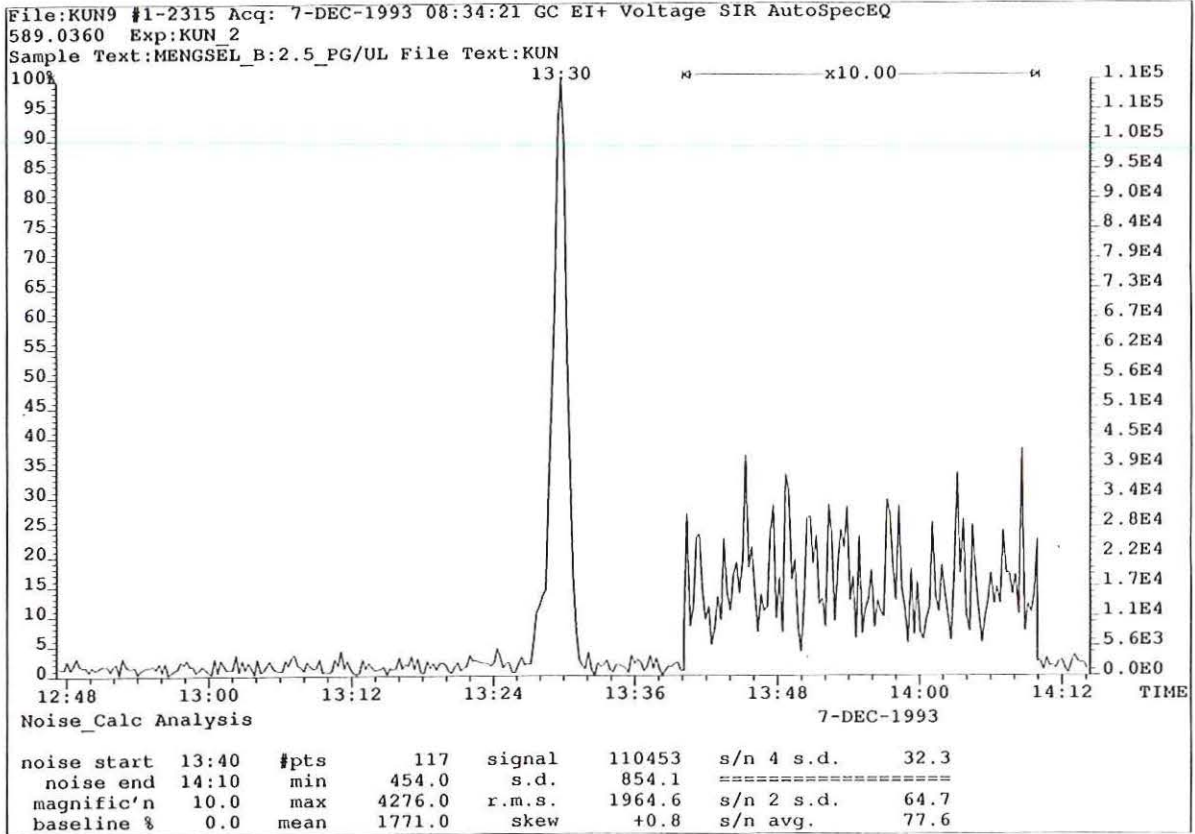
VERVOLG BIJLAGE 4: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A1
(3,3 pg/ μ l) en B1 (2,5 pg/ μ l)

8-OH-2-Acetylaminofluoreen



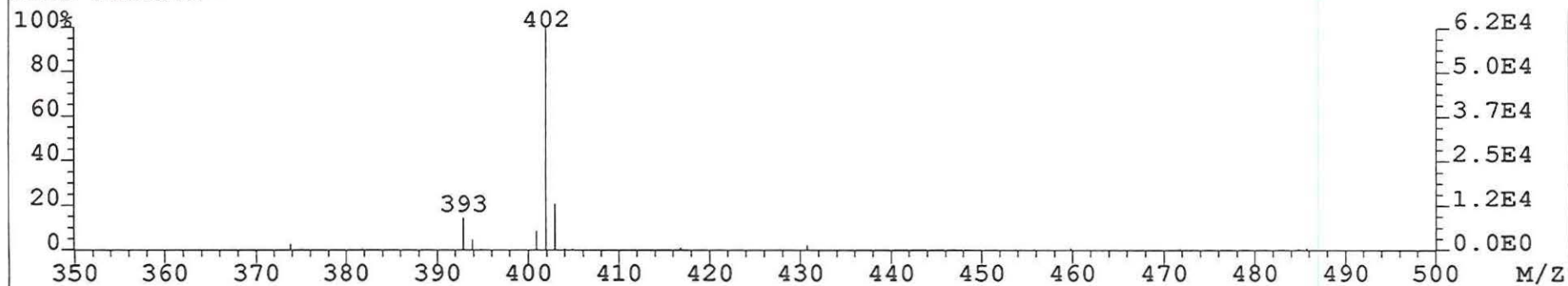
VERVOLG BIJLAGE 4: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (EI) van mengsel A1
(3,3 pg/ μ l) en B1 (2,5 pg/ μ l)

9-OH-2-Acetylaminofluoreen



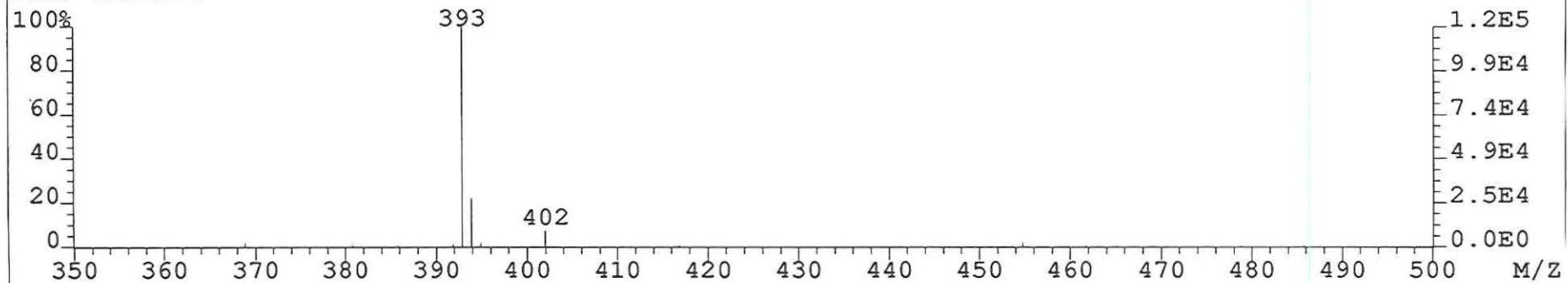
1-Nitro(²H₉)pyreen

File:KUN18 Ident:2068_2077-2058_2065 Mer Def 0.25 Acq:17-DEC-1993 11:42:01 +32:46 Cal:KUN18_1
AutoSpecEQ CI- Magnet BpM:402 BpI:61970 TIC:105579 Flags:HALL
File Text:CI-



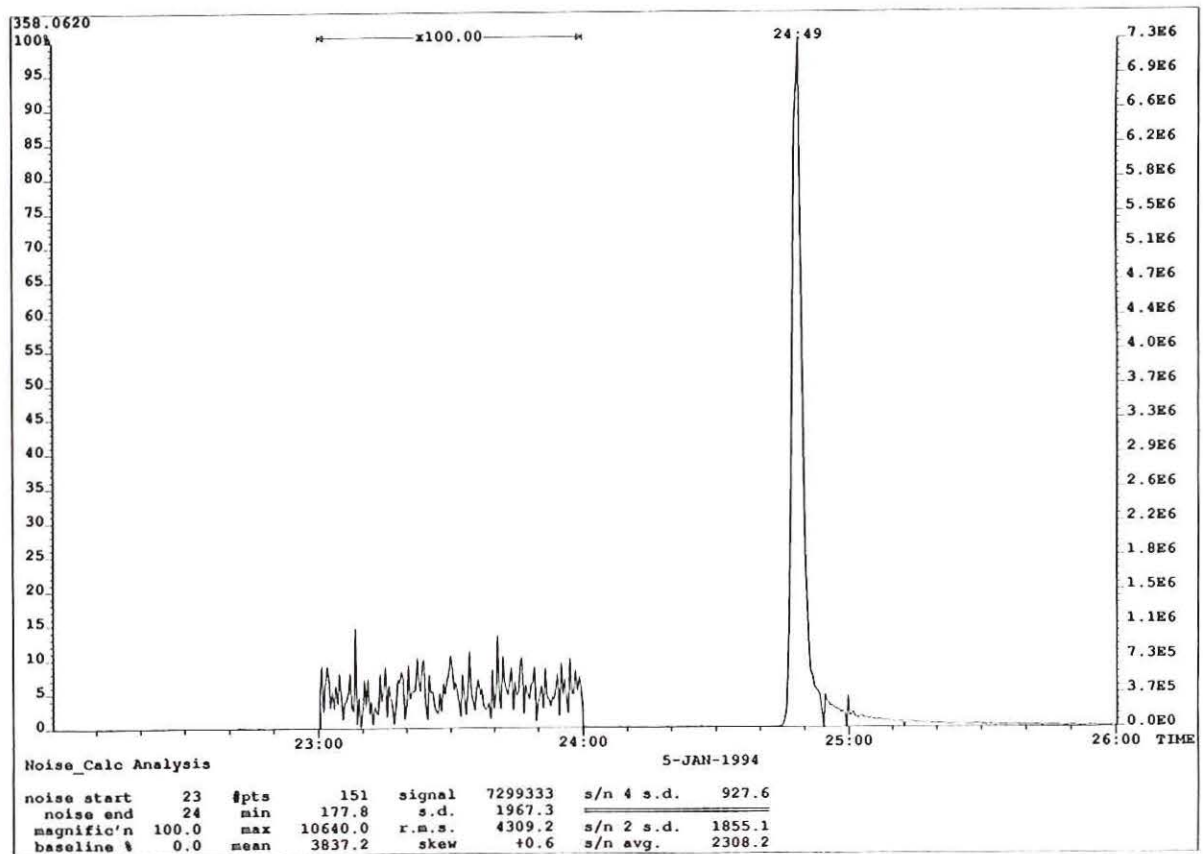
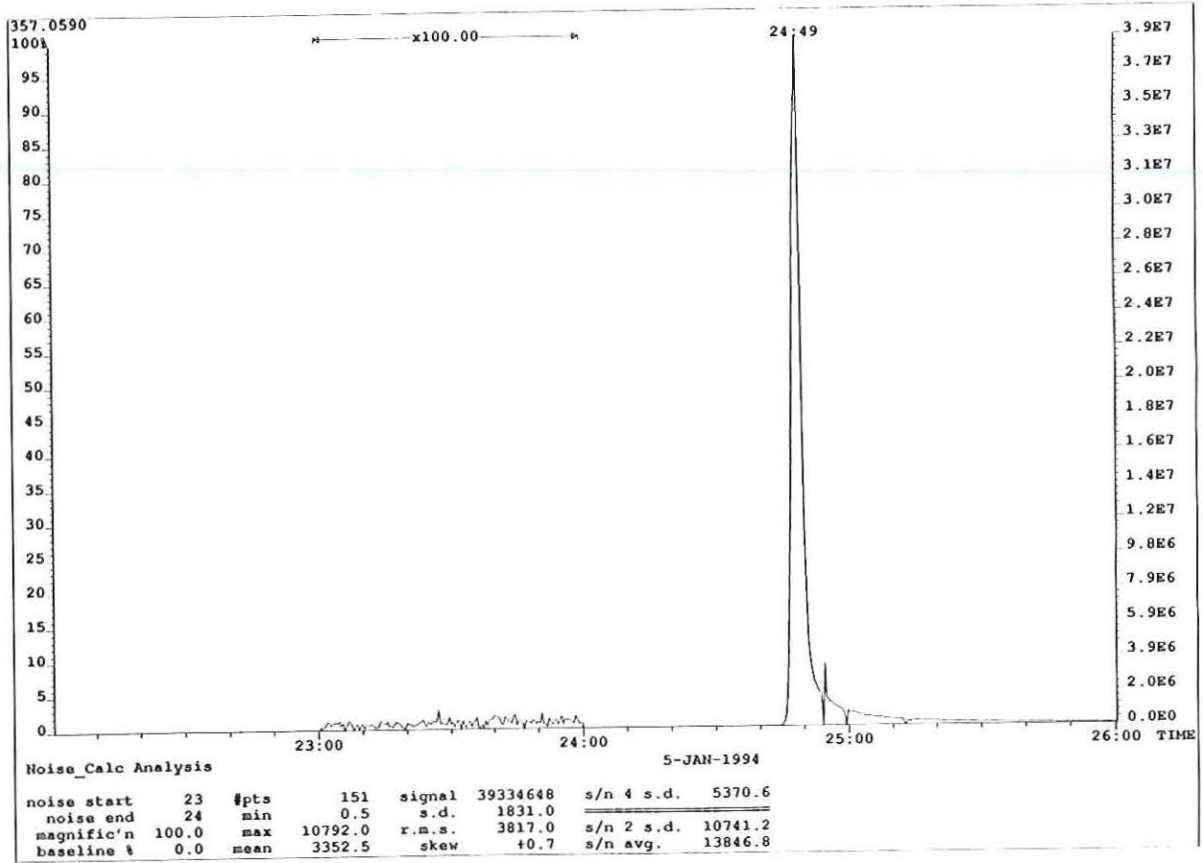
1-Nitropyreen

File:KUN18 Ident:2078_2084-2089_2096 Mer Def 0.25 Acq:17-DEC-1993 11:42:01 +32:52 Cal:KUN18_1
AutoSpecEQ CI- Magnet BpM:393 BpI:123728 TIC:179136 Flags:HALL
File Text:CI-



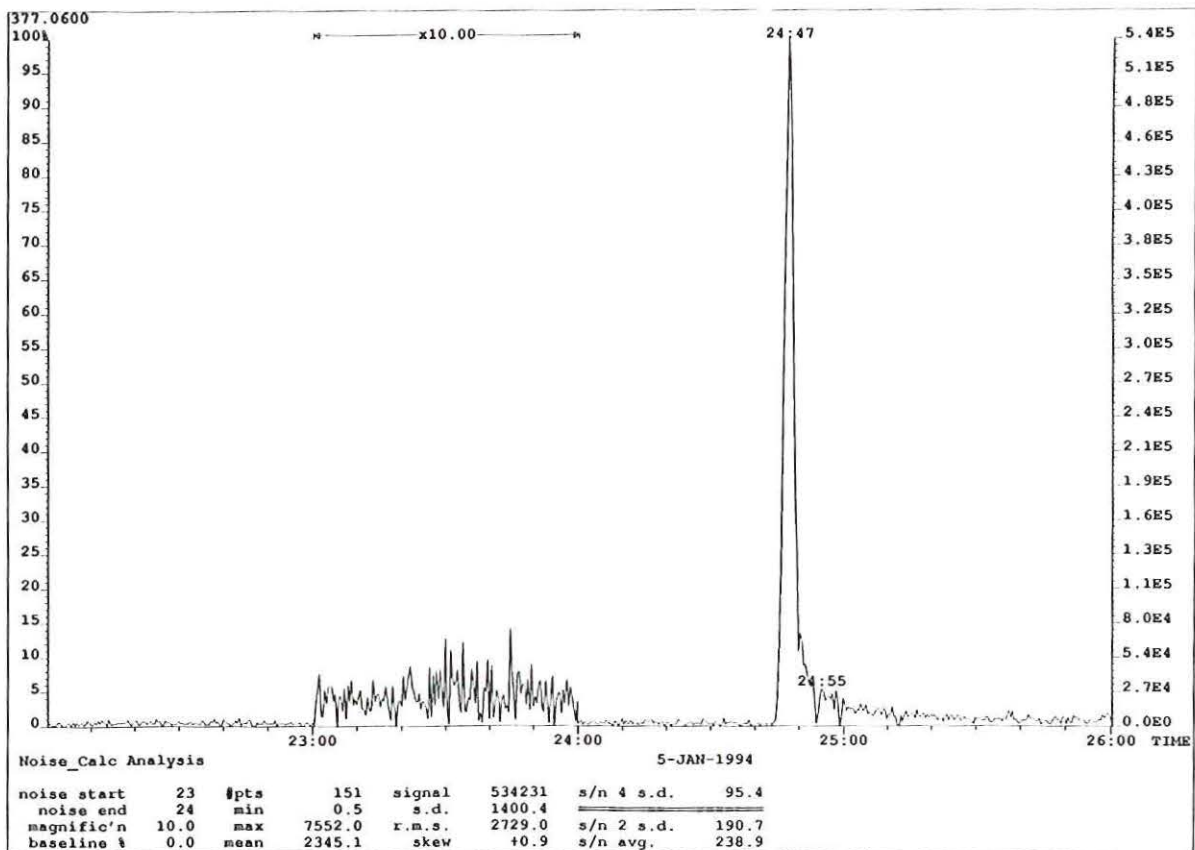
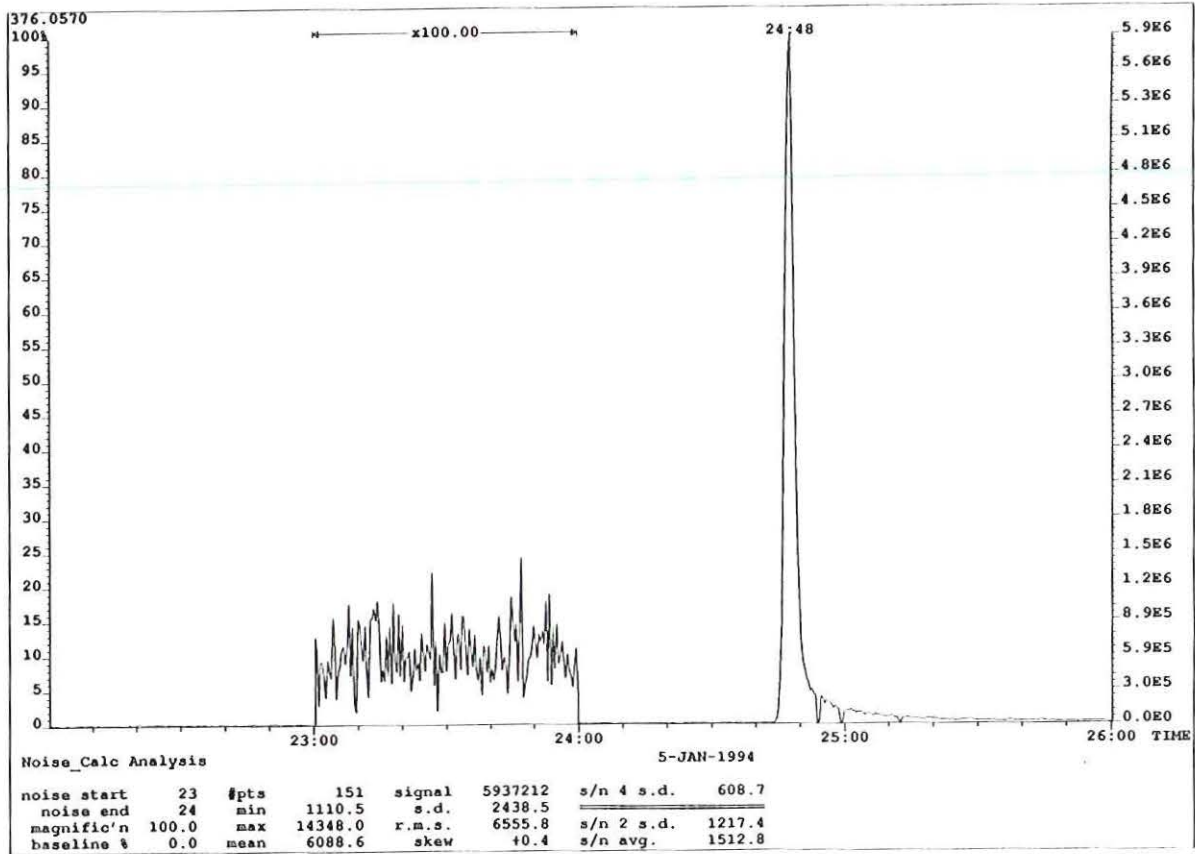
BIJLAGE 6: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (CI)

2-Nitrofluoreen



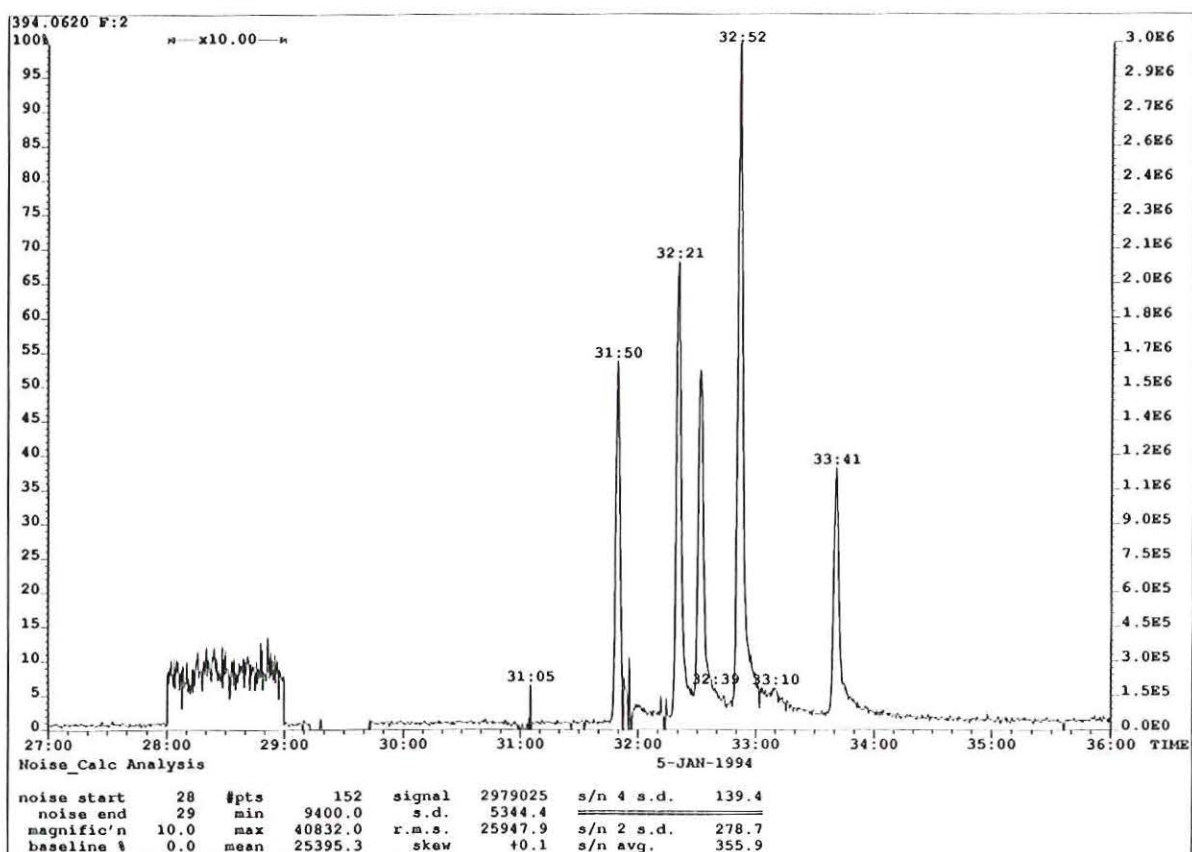
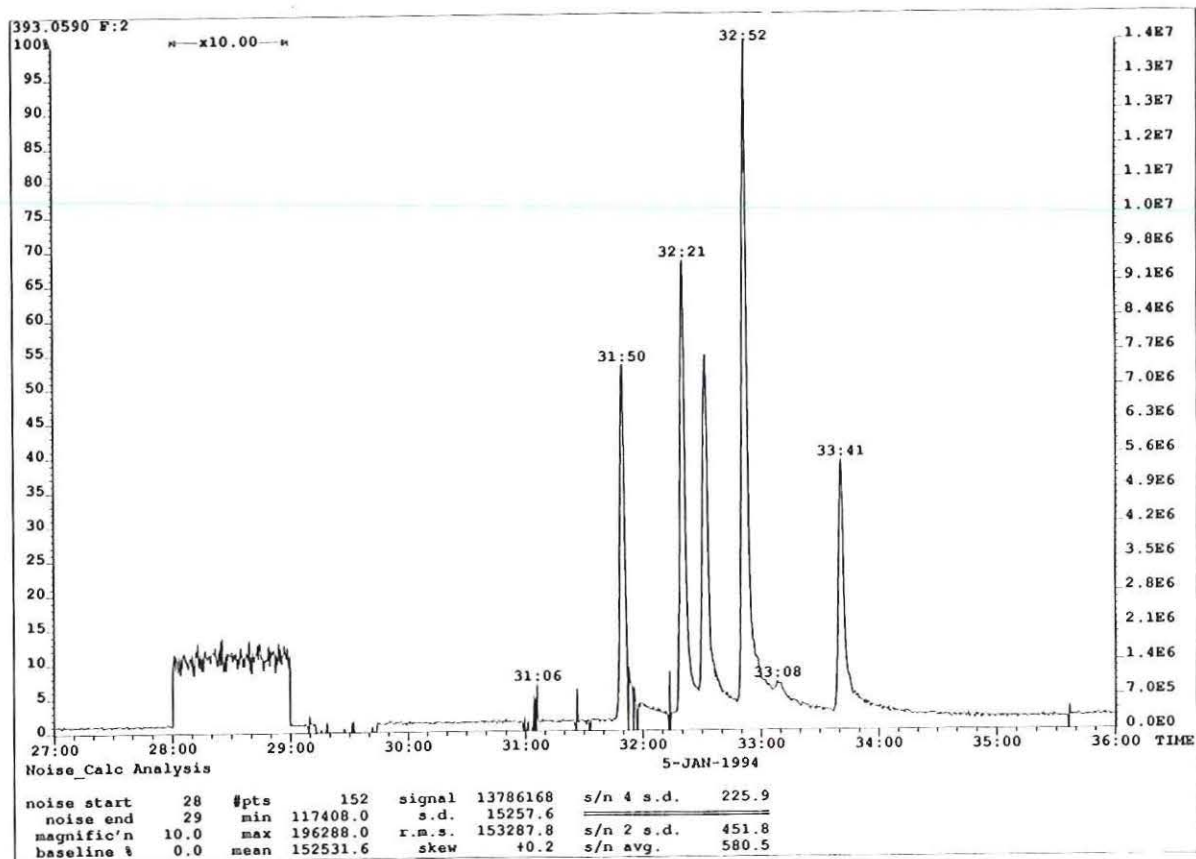
VERVOLG BIJLAGE 6: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (CI)

2-Fluor-7-Nitrofluoreen



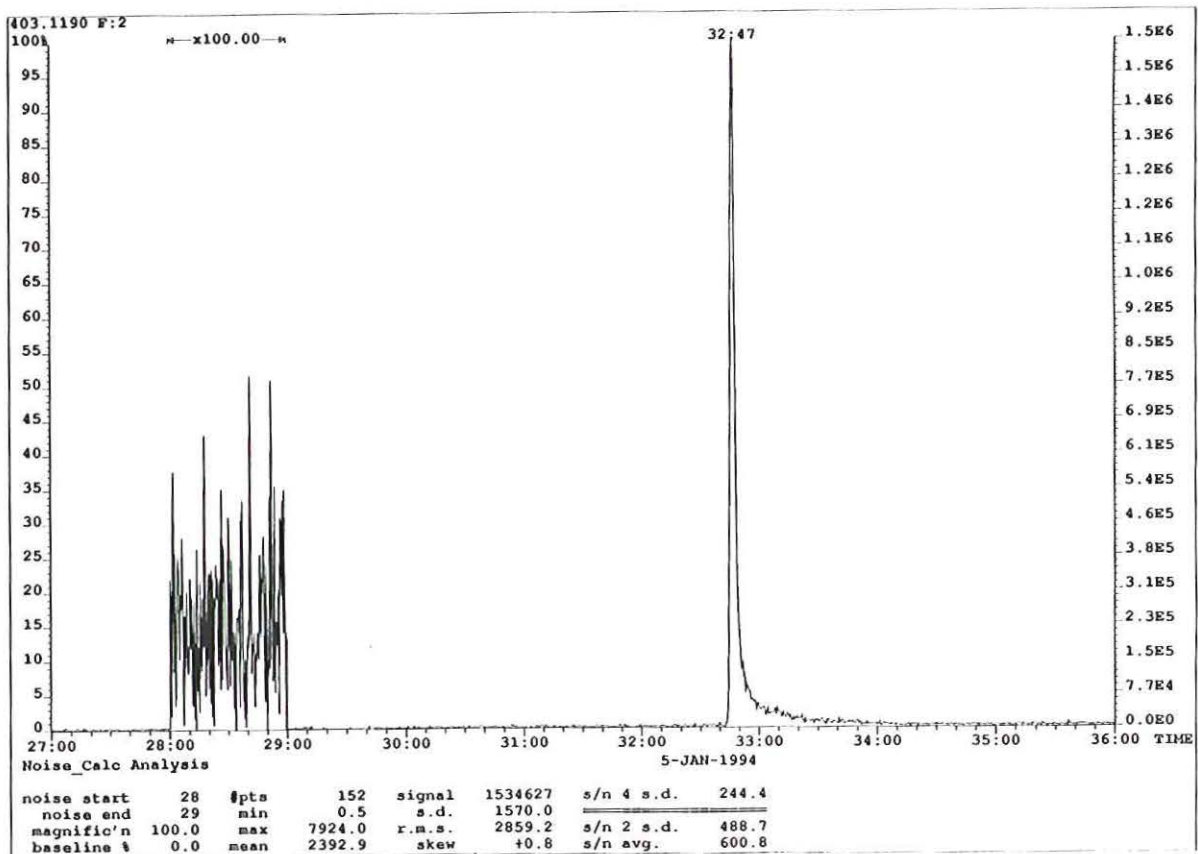
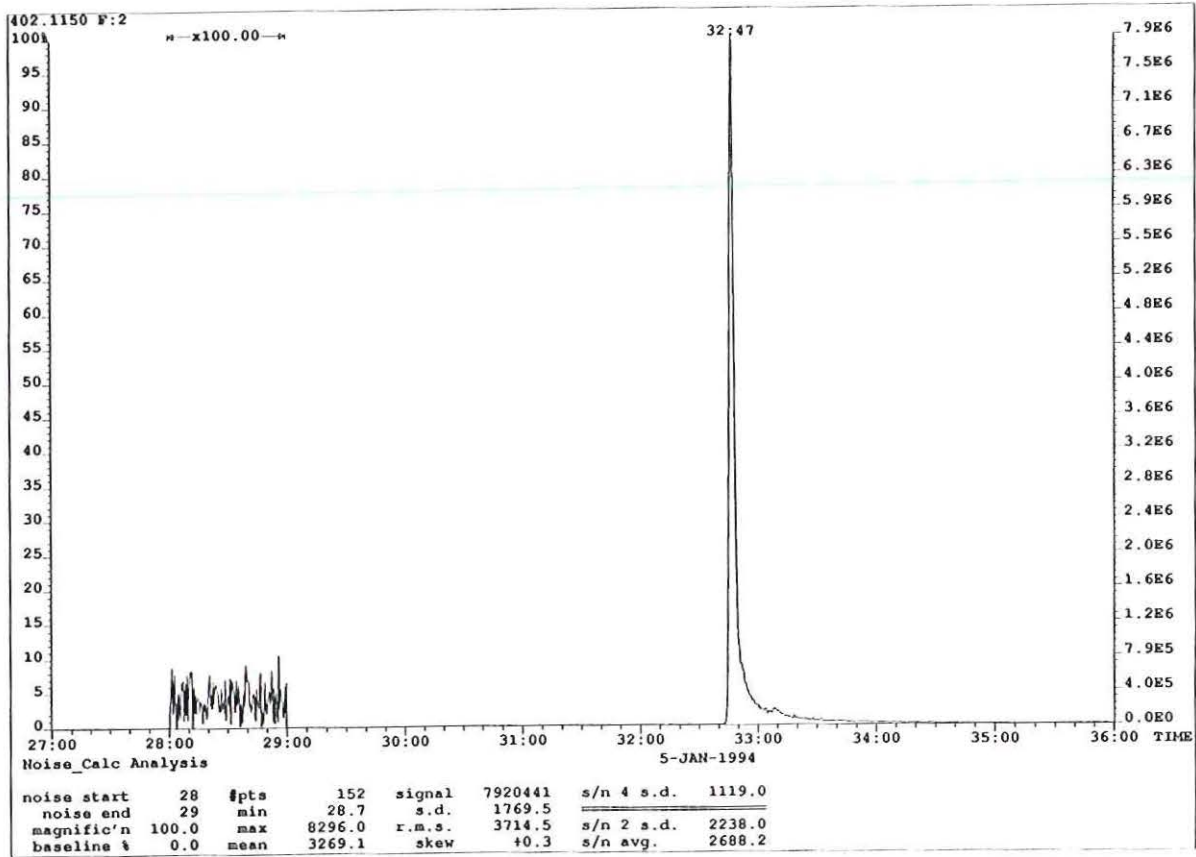
VERVOLG BIJLAGE 6: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (C)

1-Nitropyreen



VERVOLG BIJLAGE 6: Chromatogrammen met berekende standaarddeviaties (CI)

1-Nitro(²H₉)pyreen



BIJLAGE 7: Electron Impact resultaten monsters KUN in pg/ μ l.

Monsternr.	1-NP	2-NF	2-NP	4-NP	2-NFT	3-NFT
TM3	222,22	1,34				
A	12,78	0,48	*		*	*
B	1,21	1,19	*		*	*
C	24,05	1,78	*	*	*	*
D	84,93	0,83	*	*	*	*
E	79,62	1,31	*			
F	7,14	4,11	*	*	*	
G	299,54	1,84			*	
H	298,11	8,53	*	*	*	*
I	111,52	5,84	*	*	*	*
J	49,30	2,07	*	*	*	*
K	49,94	6,80	*	*	*	*
L	<0,25	1,52	*		*	*
M	2,29	1,00	*	*	*	*
N	821,37	42,92		*		*
O	17,62	4,78	*	*	*	*
P	84,16	3,90	*	*	*	*
Q	35,58	1,93	*	*	*	*
R	181,12	2,42	*	*	*	*
S	188,48	2,57	*	*	*	*
T	142,78	3,73	*	*	*	*
U	21,82	2,21	*		*	*
V	422,24	2,03	*		*	

*: component is in monster aanwezig

VERVOLG BIJLAGE 7: Electron Impact resultaten monsters KUN in pg/ μ l.

Monsternr.	1-NP	2-NF	2-NP	4-NP	2-NFT	3-NFT
W	168,92	2,92	*	*	*	*
X	346,80	2,12	*		*	*
Y	359,45	1,90	*		*	*
TM14	188,69	1,84				*
101	672,58	1,09	*		*	*
117	302,44	1,99	*	*	*	*
121	34,06	5,69	*		*	*
136	30,91	0,82	*	*	*	*
TM13	328,34	1,43				
108	292,96	2,10			*	*
115	128,63	2,59	*	*	*	*
118	66,16	1,18	*	*	*	*
123	23,72	1,15	*	*	*	*
145	25,08	1,84	*	*	*	*
G12	4,58	1,08	*	*	*	*
G33	77,08	1,50	*	*	*	*
TM12	311,13	10,94				

*: component is in monster aanwezig.

VERVOLG BIJLAGE 7: Chemische Ionisatie resultaten monsters KUN in pg/ μ l.

Monsternr.	1-NP	2-NF	2-NP	4-NP	2-NFT	3-NFT
TM3	252,58	1,33				
121	38,43	6,79		*	*	
TM13	373,13	1,24				
TM14	269,52	1,24				
A	14,16	0,29	*		*	
D	87,36	0,99	*			
J	56,38	1,45	*	*	*	
N	620,91	41,00				
P	82,27	3,37	*	*	*	
S	195,27	2,36	*	*	*	
101	797,61	1,29				
118	26,60	1,31		*	*	*
145	28,63	2,12	*	*	*	
G12	5,30	2,34	*	*	*	
G33	86,69	3,03			*	

*: component is in monster aanwezig.