

MINISTERIE VAN LANDBOUW  
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek  
Rijkscentrum voor Landbouwkundig Onderzoek - Gent  
RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - Oostende  
Directeur : P. HOVART

## SEMI - KWANTITATIEVE BEPALING VAN POLYGECHLOREERDE BIFENYLS (PCBs) IN VIS MET DUNNELAAGCHROMATOGRAPHIE.

M. BAETEMAN, D. TILLEMEN & W. VYNCKE.



Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)  
Publicatie nr 119/1976  
D/1976/0889/7

MINISTERIE VAN LANDBOUW  
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek  
Rijkscentrum voor Landbouwkundig Onderzoek - Gent  
RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - Oostende  
Directeur : P. HOVART

## SEMI - KWANTITATIEVE BEPALING VAN POLYGECHLOREERDE BIFENYLS (PCBs) IN VIS MET DUNNELAAGCHROMATOGRAFIE.

M. BAETEMAN, D. TILLEMEN & W. VYNCKE.

Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)  
Publicatie nr 119/1976  
D/1976/0889/7

## 1. Inleiding. (\*)

In recente jaren heeft een nieuwe groep organochloorverbindingen, de polygechloreerde biphenyls (PCBs) de aandacht van de ekologen getrokken. Zij werden voor het eerst door Jensen in 1966 in vis en wild ontdekt (14). PCBs worden als chemikaliën sedert ca 1930 in talrijke industrieën gebruikt. De handelsnamen zijn Aroclor (USA, Groot-Brittannië, Canada), Kanechlor (Japan), Phenochlor (Frankrijk) en Clophen (Duitsland).

Hun voornaamste eigenschappen zijn hun hoge dielektrische konstante en hun termische en chemische stabiliteit, die voor vele industriële processen van groot belang zijn. Deze stabiliteit en het feit dat zij gemakkelijk door levende organismen worden opgenomen en geakkumuleerd kunnen echter milieu-problemen scheppen. Dit blijkt vooral voor zoetwater en mariene organismen het geval te zijn (7).

De huidig vastgestelde concentraties zijn duidelijk hoger dan deze van andere organochloorverbindingen (bv. pesticiden), maar blijken nog niet alarmerend te zijn (12) (20). Niettemin is in het kader van het wetenschappelijk onderzoek i. v. m. de verontreiniging van de zee en de weerslag ervan op het mariene leven noodzakelijk meer aandacht aan het probleem PCB te besteden. Het is in dit verband wenselijk te beschikken over snelle routinemetoden om het gehalte aan PCBs te bepalen.

Gas-vloeistofchromatografie wordt meestal gebruikt voor de dosering van PCBs. Een ernstig nadeel is echter dat PCBs een complex piekenpatroon vertonen en dat andere organochloorverbindingen (bv. DDE) kunnen interfereren (11).

---

(\*) D. TILLEMANN was stagiair van het Hoger Technisch Instituut Oostende.

Alhoewel dunnelaagchromatografie niet zo gevoelig is als gaschromatografie, biedt zij toch het voordeel dat de PCBs als twee of drie kompakte spots voorkomen die goed gescheiden zijn van de organochloorpesticiden, uitgenomen DDE en aldrin (5). Dunnelaagchromatografie wordt trouwens sedert geruime tijd voor de analyse van organochloorverbindingen gebruikt (23). Deze techniek is eenvoudiger en goedkoper dan gaschromatografie.

Voor de dunnelaagchromatografie van organochloorverbindingen in het algemeen worden als adsorbens vooral aluminiumoxide en silicagel gebruikt. In mindere mate wordt kieselguhr aangewend (4) (23).

Enkele auteurs hebben methoden beschreven voor de preliminaire scheiding van PCBs vóór de gaschromatografische bepaling of als kwalitatieve bepaling.

Westöb en Noren (25), Reinke et al. (21) en Armour en Burke (2) gebruikten aluminiumoxideplaten, Bagley et al. (3), Fehring en Westfall (8) en Hattula (10) verkozen silicagel. Als loopmiddelen werden hierbij hexaan/ethylether (25) (3) trimethylamine/hexaan (21), hexaan (21) en aceton/n-heptaan (2) voorgesteld wanneer een gewone stijgende chromatografie werd uitgevoerd. Hattula (10) paste een dubbele ontwikkeling met dichloromethaan gevolgd door n-heptaan en Fehring en Westfall (8) een bidimensionale techniek met respectievelijk n-heptaan en n-heptaan/aceton. de Vos en Peet (6) en Ismail en Bonner (13) wendden een omgekeerde fase verdelingschromatografie op kieselguhr (6) of aluminiumoxide (13) aan. Het loopmiddel was acetonitril/aceton/methanol/water.

Als reveleermiddel gebruikten Reinke et al. (21) en Fehring en Westfall (8) UV-stralen en, de Vos en Peet (6), Ismail en Bonner (13) Bagley et al. (3) zilvernitraat en UV-belichting, Westöb en Noren (25) fenoxxyethanol-aceton-waterstofperoxyde-zilvernitraat en Hattula (10) difenylamine.

Deze methoden laten evenwel niet toe DDE volledig van de PCBs te scheiden. Daarom moet DDE voorafgaandelijke met kolomchromatografie verwijderd worden of geoxideerd worden (5).

Voor de semikwantitatieve of kwantitatieve PCB-bepaling met dunnelaagchromatografie werden slechts weinig methoden gepubliceerd.

Mulhern et al. (19) stelden een semi-kwantitatieve dunnelaagmethode voor. Zij gebruikten aluminiumoxideplaten, benzeen/hexaan als loopmiddel en het fenoxxyethanolmengsel (25) als reveleermiddel. Een vooreiniging (clean-up) met kolomchromatografie (florisil) en een oxidatie met chromtrioxide, om DDE te verwijderen, werd evenwel toegepast. De semi-kwantitatieve bepaling werd uitgevoerd door de vlekengrootte te vergelijken met deze van een reeks standaarden.

Bush en Fa-Chun Lo (5) rapporteerden goede resultaten met een kwantitatieve densitometrische methode. Silicagel werd gebruikt als draagmiddel, hexaan als eluens en zilvernitraat + UV-belichting als reveleermiddel. Ook hier werd vooraf een voorreiniging op florisil-kolom en een oxidatie met  $\text{CrO}_3$  uitgevoerd.

Het doel van de hier beschreven proeven was het op punt stellen van een semi-kwantitatieve methode die zo eenvoudig mogelijk en met weinig of geen voorreiniging kan worden uitgevoerd. De methode moest daarenboven toelaten de bekomen vlekken eventueel gemakkelijk aan een verder onderzoek (bv. gaschromatografisch) te onderwerpen.

De drie voornaamste variabelen van de dunnelaagchromatografie nl. het adsorbens, het loopmiddel en het reveleermiddel werden systematisch bestudeerd ten einde de optimale werkomstandigheden te bepalen. Voor het semi-kwantitatief onderzoek werd gezocht in de richting van kleurvariatie en -intensiteit van de gescheiden vlekken.

## 2. Experimentele gegevens.

- DL-platen : volgende platen van 25x25 cm werden gebruikt (Merck).
  - DC - Alufolien, Aluminiumoxide 60 F<sub>254</sub>, neutraal, type E, laagdikte : 0,2 mm.
  - DC - Alufolien Aluminiumoxide F<sub>254</sub>, neutraal, type T, laagdikte : 0,2 mm.
  - DC - Fertigplatten, Kieselguhr F<sub>254</sub>, laagdikte 0,2 mm.
  - DC - Fertigplatten, Kieselgel F<sub>254</sub>, (Kieselgel/Kieselguhr), laagdikte 0,25 mm.

De platen werden gedurende enkele uren vooraf bij 120° C geactiveerd.

- Loopmiddelen : de geteste loopmiddelen waren samengesteld uit een basissolvent ("background solvent"), zoals pentaan, hexaan, heptaan, benzeen en cyclohexaan en uit een elueersolvent van verschillend type zoals alcoholen, ketonen, ethers, esters en zuren. Het "basis-solvent" werd evenwel ook zuiver gebruikt.
- Aanbrengen van de spots : in streepvorm (1,5 cm) met microapplicator van 10 µl (Cordis Laboratories, Miami, V.S.A.) op 1,5 cm van de rand van de plaat.
- Ontwikkelen van de chromatogramen : in chromatografietanks met gleuven voor 5 platen (Desaga). De wanden werden met filterpapier bekleed om de kamerverzadiging te bevorderen. De loopafstand bedroeg 15 cm.
- Reveleermiddelen :
  - (A) 0,5 g zilvernitraat + 1 ml water + 35 ml glycerol + 45 ml ethanol 96 % (in het donker bewaren) (5).
  - (B) 1,7 g zilvernitraat in 200 ml ethanol 96 % (6).
  - (C) 0,1 g zilvernitraat + 1 ml water + 20 ml 2-fenoxyethanol + aceton tot 200 ml + 1 à 5 druppels waterstofperoxyde 30 % (17).
  - (D) 1,7 g zilvernitraat + 10 ml water + 5 ml ammoniak + aceton tot 200 ml. Aan 45 ml van die ammoniakale oplossing worden 5 ml 2-fenoxy-ethanol toegevoegd (18).



homogenisator

NS 29

eerste scheidrecter

glazen filter P 1

tussenstuk met zijarm

tweede scheidrecter

fig. 1 Extractietoestel.

- (E) 0,5 g difenylamine + 0,5 g zinkchloride in 100 ml aceton.  
De plaat moet tot 200° C verhit worden (16).
- (F) 1 % tolidine in aceton (24).
- UV-lamp (254 nm).
- Testoplossingen :
  - PCBs : Arochlor 1232, 1242, 1245, 1254, 1260 (Analabs, North Haven, Conn. USA).
  - Chloorpesticiden : pp'DDT, op'DDD, diëldrin, lindaan (Fluka), pp'DDE (National Physical Laboratory, Teddington, England).  
Als oplosmiddel werd hexaan gebruikt.

- Visextrakten :

Het extraktietoestel voorgesteld door Jensen en Renberg (15) werd gebruikt (fig. 1). Het bestaat uit twee cilindervormige scheidrechters van 150 ml, die gescheiden zijn door een tussenstuk met zijarm. De bovenste scheidrecter bezit een filter uit gesinterd glas (porositeit 1). Als homogenisator werd een **Ultra-turrax** TP 18/2 N (Janke & Kunkel , Staufen, W-Duitsland) gebruikt.

De vis wordt van huid en graten ontdaan en in stukjes gesneden. Daarvan wordt 10 g afgewogen en in de bovenste scheidrecter gebracht. Daaraan wordt nu 35 ml van een mengsel aceton-hexaan, 25/10 (v/v) toegevoegd. Dit mengsel wordt gedurende 3 min gehomogeniseerd. De kraan wordt geopend en onder stikstofdruk wordt de vloeistof door de glasfilter in de onderste scheidrecter geperst. De kraan wordt opnieuw gesloten en aan het overgebleven ruw produkt wordt 20 ml hexaan-ether 18:2 (v/v) toegevoegd. Na homogenisering (2 min) wordt deze vloeistof ook door de filter gedrukt. De bovenste scheidrecter wordt nu gespoeld met 20 ml van eenzelfde hexaan-ether mengsel. Gedurende een tweetal minuten wordt nog stikstof in de scheidrecter gestuurd, zodat slechts een droog vezelig produkt overblijft.

In de onderste laag is nu een mengsel van vet, water en organisch solvent met daarin PCBs en de organochloorpesticiden. Dit mengsel wordt vervolgens met 75 ml 0,1 M HCl geschud. Nadat de organische



laag zich van de waterige laag afgescheiden heeft, wordt deze laatste in een beker van 150 ml verzameld. De organische laag die het vet bevat wordt in een vooraf afgewogen erlenmeyer gebracht. De waterlaag wordt opnieuw met 10 ml hexaan in dezelfde scheitrechter geëxtraheerd. De organische laag wordt nu met 10 ml absolute ethanol behandeld om het laatste water te verwijderen. Die water vrije organische laag wordt dan ook in de gewogen erlenmeyer gebracht.

Het mengsel in de erlenmeyer bestaat uit vet en de organochloorverbindingen in een organisch oplosmiddel. Dit oplosmiddel wordt volledig uitgedampt onder stikstofstroom in een warmwaterbad bij 90° C. Na 15 min blijft slechts het vet over dat de organochloorpesticiden en PCBs bevat. Na afkoeling wordt de erlenmeyer opnieuw gewogen, waaruit dan de hoeveelheid vet kan worden berekend. Het vet wordt nu in een bekende hoeveelheid hexaan opgelost. Normaal wordt 1 ml hexaan voor ongeveer 25 mg vet gebruikt. Voor hoeveelheden kleiner dan 40 mg wordt het vet in 2,00 ml opgelost. In deze concentraties is een clean-up niet noodzakelijk (10). Voor grotere hoeveelheden vet (meer dan 150 mg) wordt een clean-up uitgevoerd.

De hexaanoplossing wordt hiervoor met een ekwivalente hoeveelheid gekoncentreerd zwavelzuur geschud. De organische laag die zich dan afscheidt, is van het vet gezuiverd en bevat de organochloorcomponenten. Er moet nog worden gezorgd dat de temperatuur van de oplossing niet stijgt. De organische laag wordt dan kwantitatief in een droge proefbuis overgebracht, drooggedampt en terug in 0,200 ml (vette vissen) of 0,400 ml (magere vissen) opgelost.

### 3. Resultaten en discussie.

#### 3.1. Kwalitatief onderzoek.

##### 3.1.1. Invloed van het adsorbens :

Het aluminiumoxide type E had met organochloorverbindingen een vrij goed scheidingsvermogen met apolaire solventen

(bv. hexaan) in een relatief korte ontwikkelingstijd. Wanneer de plaat voor de detektie met een zilvernitraatoplossing werd besproeid (zie 3.1.3.), vertoonde zij slechts een matige neiging om te verdonkeren. Daardoor werd een goed contrast tussen de donkere spots en de achtergrond bekomen. Met de aluminiumplaat type E werd een detektielimiet van  $0,04 \mu\text{g}$  bekomen.

De aluminiumoxideplaat type T had als groot nadeel dat de stijging van het ontwikkelingsmedium heel traag verliep waarbij in vergelijking met de andere platen vrij lage  $R_f$ -waarden werden bekomen, hetgeen het scheidingsvermogen vermindert. Zo gaf het type T voor Arachor 1254 na 50 min een  $R_f$ -waarde van 0,31 (solvent : hexaan/benzeen (95/5)) t. o. v. 0,63 voor het type E na 35 min. Wanneer evenwel de behandeling een tweede maal werd herhaald, werd voor type T een  $R_f$ -waarde van 0,61 gevonden. Op te merken valt dat type T een kleiner specifiek oppervlak dan type E heeft, nl. 50-100 t. o. v. 100-200  $\text{m}^2/\text{g}$ .

Met kieselguhr werd een zeer gering verschil in  $R_f$ -waarden voor verschillende componenten bekomen ; daarbij benaderde  $R_f$  sterk de waarde 1.

Het silicagel had ook een goed scheidend vermogen, analoog met dit van aluminiumoxide type E. De gevoeligheid bekomen met het silicagel, dat met een zilvernitraatoplossing werd besproeid, was evenwel beperkt door het feit dat het adsorbens vrij snel verdonkerde onder invloed van UV-stralen. De bekomen detektielimiet bedroeg  $0,1 \mu\text{g}$  voor PCBs . Zoals verder besproken wordt, kan deze plaat echter voor de semi-kwantitatieve bepaling met kleurbepaling worden gebruikt. Beide platen werden dan ook in het verder onderzoek gebruikt.

Ismail en Bonner (13) stelden eveneens vast dat aluminiumoxide-platen de gevoeligheid voor PCBs verhoogden. Ook voor organochloorverbindingen van het DDT-type bleek dit adsorbens gevoeliger

dan silicagel te zijn (4).

De hier vastgestelde detectielimieten, nl. 0,04 en 0,1  $\mu\text{g}$  voor respectievelijk aluminiumoxide en silicagel liggen lager dan deze van Ismail en Bonner (13) en Mulhern et al. (19), die respectievelijk 1 en 0,2  $\mu\text{g}$  vermeldden. Zij liggen echter wel in het gebied van de detectiegrenzen die voor organochloorverbindingen in het algemeen werden gevonden, nl. 0,01 - 0,5  $\mu\text{g}$  (1) (4).

Abbott et al. (1) wijzen in dit verband op de grote invloed die de zuiverheid van het adsorbens heeft op de detectiegevoeligheid.

### 3.1.2. Invloed van het loopmiddel en de ontwikkelingsmethode.

Eén van de voornaamste problemen was een ontwikkelingsoplossing te vinden die een optimale scheiding geeft tussen PCB's enerzijds en de organochloorpesticiden anderzijds. Uit oriënterende proeven bleken heel wat oplosmiddelen een analoog scheidingsvermogen te vertonen, zodat aanvullende eisen konden worden gesteld :

- een snelle ontwikkeling geven (12 à 15 cm in 30 min).
- de plaat mag niet verdonkeren,
- het oplosmiddel moet vrij vluchtig zijn, zodat na de ontwikkeling de plaat vlug droogt,
- het moet een gemakkelijk konstant te houden samenstelling hebben.

#### 3.1.2.1. Eéndimensionale dunnelaagchromatografie in één stap.

In de eerste plaats werd de klassieke opstijgende één-dimensionale dunnelaagchromatografie toegepast. In tabel 1 worden de verkregen resultaten opgegeven voor Aroclor 1254, pp'DDE, pp'DDT, op'DDD, lindaan, diëldrin (telkens 5  $\mu\text{g}$ ) ; 25 oplosmiddelen werden getest (4) (23).

Tabel 1 -  $R_f$ -waarden van PCBs en pesticiden bekomen met diverse loopmiddelen.

Aluminiumoxideplaat.

	PCBs	DDE	DDT	DDD	Lindaan	Diëldrin
hexaan	0,65	0,65	0,54	0,37	0,36	0,16
hexaan-benzeen (90:10)	0,68	0,70	0,59	0,51	0,48	0,24
hexaan-chloroform (90:10)	0,74	0,74	0,67	0,52		
hexaan-aceton (95:5)	0,70	0,71	0,60	0,40		0,10
hexaan-ethanol (80:20)	0,84	0,85	0,84	0,78	0,77	
hexaan-ethylacetaat (90:10)	0,73	0,75	0,70	0,58		
hexaan-ethylpropio- naat (90:10)	0,75	0,74	0,69	0,61		
hexaan-azijnzuur (90:10)	0,88	0,87	0,85	0,76		
hexaan-propionzuur (90:10)	1,00	0,98	0,94	0,89		
heptaan	0,67	0,67	0,58	0,44	0,42	0,24
pentaan	0,62	0,60	0,50	0,35	0,33	0,14
pentaan-aceton (90:10)	0,77	0,75	0,66	0,44		
pentaan-propionzuur (90:10)	1,00	1,00	1,00	0,95		
benzeen-azijnzuur (90:10)	0,88	0,87	0,85	0,78		
cyclohexaan	0,61	0,60	0,45	0,18		
cyclohexaan-aceton (95:5)	0,75	0,75	0,66	0,54		
acetonitrile-aceton- methanol-water (40:18:40:2)	0,72	0,72	0,71	0,72	0,70	
methanol	0,90	0,90	0,89	0,88	0,87	
ethanol	0,89	0,90	0,89	0,88	0,88	
cyclohexaan-benzeen- paraffineolie(45:45:10)	0,89	0,91	0,84	0,85	0,72	0,50

Silicagelplaat.

	PCBs	DDE	DDT	DDD	Lindaan	Diëldrin
hexaan	0,56	0,56	0,42	0,27	0,25	0,08
heptaan	0,56	0,56	0,43	0,28	0,14	0,09
cyclohexaan-benzeen paraffineolie (45:45:10)	0,74	0,74	0,52	0,61	0,60	0,49
hexaan-benzeen (95:5)	0,60	0,61	0,40	0,15	0,10	0,07
hexaan-ether (90:10)	0,67	0,66	0,55	0,45	0,35	0,34
hexaan-azijnzuur (90:10)	0,56	0,54	0,46	0,41	0,36	0,37
heptaan-aceton (90:10)	0,63	0,62	0,54		0,42	0,46
benzeen-azijnzuur (90:10)	0,68	0,68	0,68	0,83	0,73	0,71

Uit de bekomen resultaten blijkt, dat de organochloorverbindingen in drie groepen voorkwamen : (a) PCBs, pp'DDE en pp'DDT, (b) lindaan en op'DDD en (c) diëldrin.

Van de basissolventen gaven pentaan, hexaan en heptaan en goede en snelle scheiding, nl. 30-40 min voor 15 cm (\*). Cyclohexaan gaf een goede scheiding, maar een trage ontwikkeling (75 min). Ethanol en methanol lieten geen scheiding toe.

Van de elueersolventen gaven benzeen en aceton een goede scheiding, terwijl chloroform, ethylacetaat en ethylpropionaat gevoelig het scheidingsvermogen verminderden. Azijnzuur, propionzuur en ethanol gaven geen scheiding meer.

---

(\*) Wanneer aangegeven wordt dat een goede scheiding bekomen werd, duidt dit op de scheiding van PCBs van de pesticiden met uitzondering van DDE.

Op te merken valt dat geen loopmiddel gevonden werd dat een scheiding tussen PCBs en DDE gaf.

De beste scheiding werd bekomen met een 10 % aceton-hexaan (heptaan) oplossing en een 10 % benzeen-hexaan oplossing.

Vanuit praktisch oogpunt was het echter interessant te werken met zuiver hexaan om volgende redenen : het scheidingsvermogen was goed, de plaat verdonkerde niet, het is vrij vluchtig (kpt. 68,5° C), zodat de plaat blootgesteld aan de lucht binnen de minuut droog was en de samenstelling blijft konstant daar het een zuiver produkt is.

Figuur 2 geeft een DL-chromatogram van PCBs en pesticiden ontwikkeld met hexaan.

Heptaan bood evenwel ook voordelen : er werd nog een betere scheiding bekomen tussen op'DDD en lindaan, maar heptaan is minder vluchtig en de ontwikkelingssnelheid was kleiner.

### 3.1.2.2. Eéndimensionale dunnelaagchromatografie in twee stappen.

De door Hattula (10) voorgestelde methode waarbij als adsorbens silica wordt gebruikt, werd uitgetest.

De plaat werd eerst in 100 ml dichloromethaan tot halfweg, ontwikkeld, dan gedroogd en in een andere tank gebracht die 100 ml n-heptaan bevatte.

Op basis van de  $R_f$ -waarden (tabel 2) konden twee groepen worden onderscheiden. In de bovenste laag bevonden zich PCBs en pp'DDE en in de tweede laag pp'DDT, op'DDD, lindaan en dieldrin. Ook hier werd geen scheiding tussen PCBs en pp'DDE bekomen.

Tabel 2 - Eén dimensionale ontwikkeling in twee stappen.

Komponent	$R_f$ volgens Hattula (2x10cm)	Eigen $R_f$ -waarden (2x7,5cm)
PCBs	0,67	0,90
DDE	0,67	0,89
DDT	0,55	0,81
DDD	0,54	0,75
Lindaan	0,54	0,70
Diëldrin	0,41	0,55

Bij de één dimensionale ontwikkeling in twee stappen werden analoge resultaten als bij de werkwijze in één stap bekomen. De methode blijkt dus geen bijzondere voordelen te bieden.

### 3.1.2.3. Tweedimensionale dunnelaagchromatografie.

Fehringer en Westfall (8) beschreven een tweedimensionale dunnelaagbepaling. Daarbij gebruikten zij silicagel als adsorbens en n-heptaan en n-heptaan/aceton 95:5 als loopmiddel.

Deze methode werd eveneens getest met respectievelijk silicagel- en aluminiumoxide-platen. Ook enkele andere loopmiddelen-kombinaties werden hierbij beproefd.

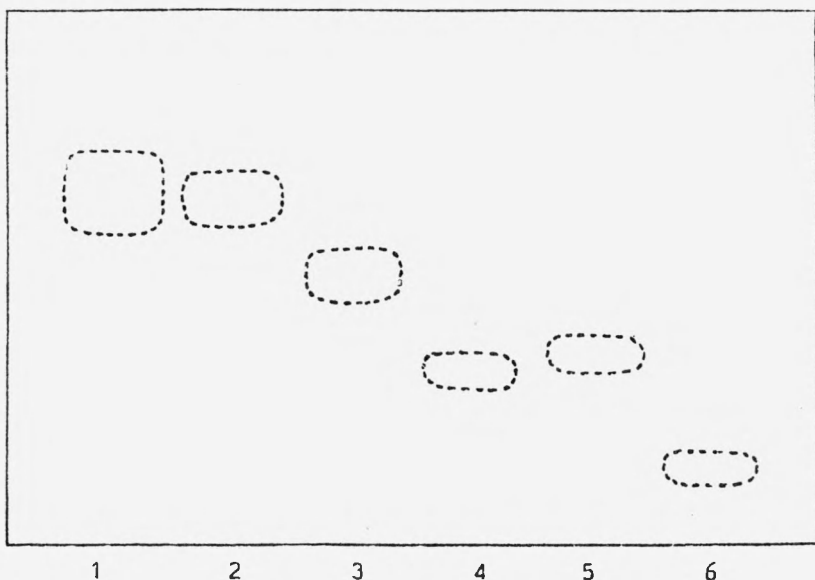


fig. 2 DUNNELAAGCHROMATOGRAM VAN PCB EN PESTICIDEN.  
 Loopmiddel: hexaan.  
 Adsorbens: Aluminiumoxide type E.  
 1: Aroclor 1254, 2: DDE, 3: DDT, 4: DDD,  
 5: lindaan, 6: diëldrin.

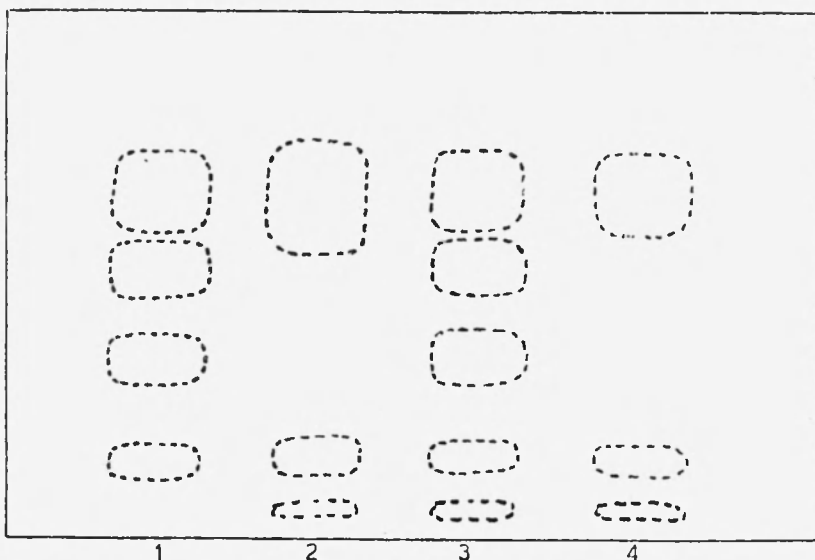


fig. 3 DUNNELAAGCHROMATOGRAM VAN EEN MENGSEL BESTAANDE UIT AROCLOR 1254 EN ORGANOCHELOORPESTICIDEN.  
 Loopmiddel: hexaan.  
 Adsorbens: Aluminiumoxide type E.  
 1. Mengsel: PCB+DDE, DDT, DDD+lindaan, diëldrin.  
 2. Mengsel behandeld met KOH: PCB+DDE+DDMU, diëldr.,  $C_6H_3Cl_3$ .  
 3. Mengsel behandeld met  $CrO_3$ : PCB, DDT, DDD+lindaan, diëldrin, DCBP.  
 4. Mengsel behandeld met KOH en  $CrO_3$ : PCB, diëldrin, DCBP + trichloorbenz.



Tabel 3 - Tweedimensionale dunnelaagchromatografie.

Silicagelplaat :

	1ste dimensie	2de dimensie
Loopmiddel	heptaan	heptaan-aceton (95:5)
Komponent	$R_f$	$R_f$
PCBs	0,59	0,67
DDE	0,56	0,67
Loopmiddel	petroleumether	heptaan-aceton (95:5)
Komponent	$R_f$	$R_f$
PCBs	0,65	0,68
DDE	0,65	0,68

Aluminiumoxideplaat :

	1ste dimensie	2de dimensie
Loopmiddel	heptaan	hexaan
Komponent	$R_f$	$R_f$
PCBs	0,69	0,74
DDE	0,68	0,71
DDT	0,60	0,60
DDD	0,46	0,48
Diëldrin	0,26	0,26

Uit de resultaten vermeld in tabel 3 bleek dat globaal gezien analoge resultaten als bij de ééndimensionale bepalingen werden bekomen. Ook hier werd geen volledige scheiding PCBs-DDE bekomen.

Op te merken valt dat in overeenstemming met Bush en Fa-Chun Lo (5) tussen de verschillende PCBs zelf geen scheiding mogelijk was. Tabel 4 geeft de resultaten voor aluminiumoxide- en silicagelplaten (loopmiddel : hexaan).

Tabel 4 -  $R_f$ -waarden voor verschillende PCBs.

Produkt	Aluminiumoxideplaat	Silicagelplaat
	$R_f$	$R_f$
Aroclor 1232	0,62	0,52
Aroclor 1242	0,63	0,54
Aroclor 1245	0,64	0,55
Aroclor 1248	0,64	0,55
Aroclor 1254	0,65	0,56
Aroclor 1269	0,73	0,62

Een mengsel van PCBs gaf aldus een vrij langgerekte vlek. Dit kan vooral van belang zijn bij onderzoek van industriële monsters waar heel wat verschillende PCBs samen kunnen aanwezig zijn. Bij dierlijke monsters, vooral bij vis, werd vastgesteld dat praktisch uitsluitend Aroclor 1254 en 1260 teruggevonden worden waardoor de vlek heel wat kompakter wordt (7) (9) (26).

### 3.1.3. Invloed van het reveleermiddel.

Een aantal in de literatuur opgegeven reveleermiddelen werden getest (5) (6) (16) (17) (18) (24).

Bij het gebruik van sproeimiddel A was het nodig de plaat verschillende malen afwisselend te besproeien en te belichten met UV om duidelijk bruine vlekken te bekomen.

Het sproeimiddel B gaf lichte grijze vlekken hetgeen de detektiemogelijkheid bemoeilijkt daar vaak rekening diende te worden gehouden met een licht verdonkeren van het adsorbens zelf.

Het sproeimiddel C was moeilijk te gebruiken voor semi-kwantitatieve doeleinden daar de vlektheid voor 1, 2 en 3  $\mu\text{g}$  praktisch gelijk was en 6  $\mu\text{g}$  praktisch even duidelijk was als 10  $\mu\text{g}$ .

De sproeimiddel D gaf bevredigende resultaten zowel op aluminiumoxide als op silicagel. De detektie was mogelijk tot 0,04  $\mu\text{g}$  PCB en verder was een relatief goed onderscheid tussen de verschillende concentraties te maken.

Met sproeimiddel E werden geen bruikbare resultaten bekomen. De vlekken waren bijna niet waar te nemen in de blauwe achtergrond.

Het tolidine (F) bleek goed bruikbaar met de silicagelplaat voor kwalitatieve doeleinden daar met dit sproeimiddel gekleurde vlekken verkregen worden die afhankelijk waren van de aard van de organochloorverbinding (zie tabel 5).

Op te merken valt dat de gebruikte platen een fluorescerende verbinding bevatten. Daardoor was het mogelijk PCBs, DDE en DDT duidelijk in UV-licht waar te nemen zonder gebruik te maken van een reveleermiddel.

Het grootste probleem bij het gebruik van een sproeimiddel was het homogeen besproeien. Voor een semi-kwantitatieve bepaling is het absoluut noodzakelijk dat de plaat gelijkmatig besproeid wordt om de onbekende te kunnen vergelijken met de standaard. Ook de hoeveelheid gebruikte sproeimiddel is van groot belang. Te grote en te kleine volumes verminderen de detektiegevoeligheid. Een hoeveelheid van 6 ml (reagens D) of 5 ml (reagens F) bleek een goede maat te zijn. De duur van de belichting met UV-stralen is verder ook bepalend voor de detektiegevoeligheid. Men moet er naar streven de plaat zolang te belichten tot een maximale dichtheid bekomen wordt waarbij het adsorbens zelf niet verdonkert. Bij het gebruik van reveleermiddel D werd vastgesteld dat een belichtingsduur van 40 min goede resultaten gaf. Betere resultaten werden nog verkregen door de platen een tiental minuten voor het besproeien onder UV-licht te plaatsen.

Met reagens F was de beste belichting 30 min.

#### 3.1.4. Invloed van een chemische voorbehandeling.

Om de scheiding van PCBs en pesticiden (vooral DDE) te verbeteren, kan gebruik gemaakt worden van het feit dat de PCBs chemisch zeer inert zijn.

In de eerste plaats kan het storende DDE tot een niet-storende verbinding worden geoxideerd.

Onder invloed van een sterk oxidatiemiddel als  $\text{CrO}_3$  wordt het DDE immers in het meer polaire DCBP (4,4-dichloorbenzofenon) omgezet (19) (25). Deze methode werd uitgetest.

Twee ml hexaanextract worden in een proefbuis van 20 ml met geslepen stop gebracht. De oplossing wordt dan uitgedampt onder stikstofstroom. Er worden 2,5 ml oxidatiereagens toegevoegd (1,5 g  $\text{CrO}_3$  oplossen in 1 ml water + 59 ml ijsazijn) en een refluxstel wordt op de proefbuis geplaatst. De oplossing wordt gekoeld en 2 ml hexaan worden toegevoegd. Aan het mengsel worden 5 ml water en NaOH 5N tot neutraal toegevoegd. Normaal worden 7 à 8 ml NaOH 5N toegevoegd ; in de praktijk wordt NaOH toegevoegd tot de niet-organische laag helder groen is. Blijven er echter hardnekkige bruine vlekken achter dan duidt dit erop dat de reactie niet beëindigd was. De organische laag wordt onmiddellijk afgenomen.

Met aluminiumoxide als adsorbens en hexaan als loopmiddel werden volgende  $R_f$ -waarden bekomen (fig. 3) :

PCBs	0,65
DDE	-
DDT	0,54
DDD	0,36
Lindaan	0,36

Diëldrin	0,16
DCBP	0,05

In de beschreven proefomstandigheden stooft DDE aldus niet meer.

Bij onderzoek van biologische extracten kunnen de vlekken van PCBs en DDT vrij dicht bij elkaar of zelfs gedeeltelijk in elkaar liggen.

Om de scheiding te verbeteren, kan een dehydrohalogenatie met kaliumhydroxide in alcoholisch midden worden toegepast (15) (25) (26). Hierbij worden DDT in DDE, DDD in DDMU (dichloordifenylnonogechloreerd onverzadigd ethaan) en lindaan in trichloorbenzeen omgezet. Deze methode werd eveneens uitgetest.

In een 10-15 ml proefbuis, met een schroefdop met teflon bekleding worden 2 ml hexaan extract gemengd met 2 ml 95 % ethanol en 4 korrels ( $\pm$  350 mg) kaliumhydroxide. De proefbuis wordt gesloten en 30 min in een waterbad op 50° C gehouden. Na afkoelen worden 5 ml water toegevoegd en één minuut geschud. Na centrifugeren kan de organische laag worden weggenomen.

Met deze werkwijze werd vastgesteld dat de  $R_f$ -waarden van DDT, DDD en lindaan, maar niet deze van PCBs gewijzigd werden. Met aluminiumoxide als adsorbens en hexaan als loopmiddel werden  $R_f$ -waarden bekomen (fig. 3) :

PCBs	0,65
DDE	0,65
DDMU	0,64
Trichloorbenzeen	0,06
Diëldrin	0,16

Er werd aldus vastgesteld dat PCBs, DDE, DDT en DDD zich groeperen.

Uiteraard dient deze dehydrochlorinatie door een oxidatie met  $\text{CrO}_3$  te worden gevolgd, waardoor DDMU naast DDE ook in DCBP wordt omgezet.

De bekomen  $R_f$ -waarden werden dan in figuur 3 weergegeven :

PCBs	0,65
DDE	-
DDMU	-
Trichloorbenzeen	0,05
DCBP	0,05

Door deze dubbele chemische voorbehandeling waren de PCBs aldus zeer goed van de organochloorpesticiden gescheiden. Dit kan van belang zijn wanneer de PCBs aan verder onderzoek (bv. gaschromatografisch) dienen te worden onderworpen.

### 3.2. Semi-kwantitatief onderzoek.

#### 3.2.1. Op zuivere PCBs.

De kwantitatieve analyse kan op de dunnelaagplaat zelf of na verwijdering van de componenten gebeuren. Daar het hier de bedoeling was een vlugge routine-metode op punt te stellen, werd alleen aandacht aan de eerste techniek besteed.

De rechtstreekse densitometrie van met zilvernitraat gereveleerde spots (densitometer Photovolt) bleek geen afdoende resultaten op te leveren. Ook de spotoppervlakte zoals voorgesteld door Abbott et al. (1) en Viswesvariah en Jayaram (24) bleek voor PCBs moeilijk toepasselijk.

De kleurvariatie-metode van laatstgenoemde gaf anderszijds positieve resultaten ook voor PCBs. Het betreft reveleermiddel F (1 % tolidine in aceton). Deze methode kon alleen met silicagelplaten worden gebruikt.

Tabel 5 geeft de bekomen resultaten weer.

De kleurschakeringen van de pesticiden kwamen goed overeen met deze door Visweswariah en Jayaram (24) opgegeven. Deze auteurs hebben evenwel PCBs niet onderzocht.

Het o-tolidine bleek een goede hulp voor routine semi-kwantitatieve bepalingen te zijn. De kleur is enkele dagen houdbaar. Daardoor kan een standaardplaat klaar gemaakt en moeten niet bij iedere bepaling standaardmengsels meegespot worden.

### 3.2.2. Op visextrakten.

#### - Eerste semi-kwantitatieve bepaling.

Uit verschillende reeksen oriënterende proeven bleek dat volgende werkwijze de meest praktische resultaten gaf.

Een aluminiumoxide- en een silicagelplaat worden gebruikt. Op ieder van de platen worden de te bepalen visextrakten (20  $\mu$ l) aangebracht en één standaardoplossing die 2  $\mu$ g van ieder van volgende componenten bevat : Aroclor 1254, DDE, DDT, lindaan, DDD en diëldrin. De aluminiumoxide- en silicagelplaten worden respectievelijk met sproei-middelen D (zilvernitraat) en F (tolidine) behandeld.

In principe kan alleen de aluminiumoxide-plaat gebruikt worden wanneer de semi-kwantitatieve bepaling op de detektielimit gebaseerd is (zie verder). Een bijkomend dunnelaagchromatogram op

Tabel 5. - Kleurvariatie na besproeiing van organochloorverbindingen met 1 % tolidine in aceton.

Organochloor- verbinding	Detektie limiet $\mu\text{g}$	Kleur bij konc. 0,01 - 0,5 $\mu\text{g}$	Kleur bij konc. 0,5 - 2 $\mu\text{g}$	Kleur bij konc. 2 - 5 $\mu\text{g}$	Kleur bij konc. 5 - 10 $\mu\text{g}$
PCBs (Aro- clor 1254)	0,1	gebroken wit	zwak grijs	grijs	grijzig groen
DDE	0,05	geel grijs	licht beige	beige	geelbruin
DDT	0,01	zwak geel	groenachtig geel	geelachtig groen	groen
DDD	0,5	-	licht beige	beige	bruin
Lindaan	0,01	zwak dauw- achtig grijs	groenachtig blauw	blauw	donkerblauw
Diëldrin	0,3	zwak geel	geel	groenachtig geel	licht groen



silicagel biedt echter het voordeel dat een supplementaire schatting van de hoeveelheid PCBs mogelijk wordt en dat ook kwalitatief gezien door de kleurvariaties nuttige informatie over eventueel aanwezig pesticiden (o.m. het overlappend DDE) kan worden bekomen. Tenslotte is het verschil in gevoeligheid (0,1 µg t.o.v. 0,04 µg voor aluminiumoxide) eveneens nuttig voor de semi-kwantitatieve bepaling.

Als voorbeeld worden in tabel 6 de resultaten vermeld bekomen met twee vette vissoorten, nl. haring (*Clupea harengus* L.) en makreel (*Scomber scombrus* L.) en twee magere vissoorten, nl. wijting (*Merlangius merlangus* L.) en kabeljauw (*Gadus morhua* L.) van onbekende herkomst. De vetgehalten waren respectievelijk 11,4 ; 10,4 ; 0,1 en 0,2 %.

Tabel 6 - Semi-kwantitatieve bepaling van PCBs op vier vissoorten (R<sub>f</sub>-waarden)

Aluminiumoxideplaat :

Haring	Makreel	Standaard	Wijting	Kabeljauw
0,66	0,65	0,65 (PCB+DDE)	0,67	-
0,54	0,54	0,54 (DDT)	0,55	0,54
0,37	0,36	0,37 (DDD)	0,38	-
-	-	0,36 (Lindaan)	-	-
-	-	0,16 (Diëldrin)	-	-

Silicagelplaat :

Haring	Makreel	Standaard	Wijting	Kabeljauw
0,56	0,57	0,56 (PCB+DDE)	-	-
grijs + geel	heel zwak	grijs + beige		
0,42	0,43	0,42 (DDT)	0,43	0,42
groen-geel	geel	geel-groen	zwak geel	zwak geel
0,27	0,27	0,26(DDD,Lindaan)	0,27	-
groen-blauw	groen-blauw	(blauw) groen	groenachtig blauw	
-	-	0,08 (Diëldrin)	-	-
		geel		

In drie van de vier gevallen werd een relatief grote vlek met  $R_f$ -waarde  $\pm 0,65$  op de aluminiumoxideplaat vastgesteld, waardoor de aanwezigheid van PCBs werd aangetoond. Op de silicagelplaat kwam deze slechts op twee van de drie gevallen voor. Op te merken valt dat in die vlekken de aanwezigheid van een tweede vlek nl. van DDE, duidelijk waar te nemen was wegens verschillende kleur. Voor wijting werd een relatief grote, maar zeer zwakke vlek op de aluminiumplaat bekomen. De concentratie was hierbij echter zeker lager dan  $0,1 \mu\text{g}$  in de spot hetgeen overeenstemt met  $0,1 \text{ ppm}$  in de vis. In kabeljauw werd in geen van beide gevallen PCBs waargenomen. Indien deze aanwezig waren, bedroeg de concentratie minder dan  $0,04 \text{ ppm}$ .

Zonder rekening te houden met het overlappend DDE liet de kleurintensiteit van de spots op de silicagelplaat toe te schatten dat haring en makreel respectievelijk  $1$  en  $0,1 \text{ ppm}$  PCB bevatten. De afwezigheid van een vlek op de silicagelplaat leidde tot het besluit dat  $0,05 \text{ ppm}$  PCB in wijting aanwezig was. Voor kabeljauw was deze hoeveelheid kleiner dan  $0,04 \text{ ppm}$ .

- Tweede semi-kwantitatieve bepaling.

Het verder verloop van de analyse hangt af van het vooraf gestelde doel. Is het de bedoeling alleen een algemeen semi-kwantitatief inzicht te hebben in de hoeveelheid aanwezig PCBs (en pesticiden), dan kan de bepaling hier worden beëindigd. Onderzoekt men daarentegen of een bepaalde PCB-grens niet werd overschreden dan heeft men er belang bij een tweede meer nauwkeurige semi-kwantitatieve bepaling uit te voeren. Is deze grens bv. op  $0,8 \text{ ppm}$  gesteld, dan dient in de hier uitgevoerde modelproef alleen haring ( $1 \text{ ppm}$ ) verder onderzocht te worden. Het extract wordt eerst met  $\text{CrO}_3$  geoxydeerd, ten einde het storend DDE te elimineren (zie 3.1.4.). Op te merken valt dat in geval veel DDT aanwezig is (vlek dicht bij PCBs), men er, zoals reeds vermeld, belang bij heeft vbr de oxydatie een dehydrohalogenatie uit te voeren.

Een tweede ontwikkeling wordt nu op aluminiumoxide uitgevoerd. Het spotten van het extrakt gebeurt op volgende wijze : 10, 20, 30, 40 en 50  $\mu\text{l}$  ; ook 0,04  $\mu\text{g}$  Aroclor 1254 wordt aangebracht. Aan de hand van de detektielimiet wordt een nieuwe semi-kwantitatieve bepaling uitgevoerd. In het hier behandelde geval bevatte haring aldus 0,7 ppm PCBs hetgeen lager uitviel dan de (als voorbeeld) gestelde grens van 0,8 ppm.

Tenslotte kan erop gewezen worden dat deze tweede bepaling de PCBs voor verder onderzoek (bv. gaschromatografisch) geschikt maakt.

Literatuur.

1. Abbott, D., Tatton, J. en Wood, N. : J. Chromatogr. 42, 83 (1969).
2. Armour, J. en Burke, J. : J. A.O.A.C. 53, 761 (1970).
3. Bagley, G., Reichel, W. en Chromartie, E. : J. A.O.A.C. 53, 251 (1970).
4. Bishara, R., Born, G. en Christian, J. : J. Chromatogr. 64, 135 (1972).
5. Bush, B. en Fa-Chun Lo : J. Chromatogr. 77, 377 (1973).
6. de Vos, R. en Peet, E. : Bull. Envir. Contam. Toxicol. 6, 164 (1971).
7. Edwards, R. : Chem. Ind. 1340 (1971).
8. Fehringer, N. en Westfall, J. : J. Chromatogr. 57, 397 (1971).
9. Fishbein, L. : J. Chromatogr. 68, 345 (1972).
10. Hattula, M. : Bull. Envir. Contam. Toxicol. 12, 331 (1974).
11. Hutzinger, O., Safe, S. en Zitko, V. : Analabs Research Notes 12 (2), 1 (1972).
12. International Council for the Exploration of the Sea : Report of Working Group for the international study of the pollution of the North Sea and its effects on living resources and their exploration. Cooperative Research Report no. 39 (1974).
13. Ismail, R. en Bonner, F. : J. A.O.A.C. 57, 1026 (1974).
14. Jensen, S. : New Sci. 32, 612 (1966).
15. Jensen, S. en Renberg, L. : Accumulation of some organo-chlorine compounds from water and their subsequent elimination. Scientific Report to the Oslo Commission, Working Group on Degradability, National Swedish Environment Protection Board, Wallenberg Laboratory, Stockholm, March 1974.
16. Katz, D. : J. Chromatogr. 15, 269 (1964).
17. Kovacs, M. : J. A.O.A.C. 46, 884 (1963).
18. Morley, H. en Chiba, M. : J. A.O.A.C. 47, 306 (1964).
19. Mulhern, B., Cromartie, E., Reichel, W. en Belisle, A. : J. A.O.A.C. 54, 548 (1971).

20. Portmann, J. en Preston, A. : Preliminary results of ICES coordinated monitoring programme in the North Sea, ICES CM 1975/E : 21.
21. Reinke, J., Uthe J. en O'Brodovich, H. : Environmental Letters 4, 201 (1973).
22. Reynolds, L. : Residue Rev. 34, 27 (1971).
23. Stahl, E. : Dünnschicht-Chromatographie, 2de Uitg., Springer Verlag, Berlin (1967).
24. Visweswariah, K. en Jayaram, M. : J. Chromatogr. 62, 479 (1971).
25. Westöb, G. en Norén K. : Acta Chem. Scand. 24, 1939 (1970).
26. Young, S. en Burke, J. : Bull. Environ. Contam. Toxicol. 7, 160 (1972).

Samenvatting.

Een eenvoudige semi-kwantitatieve methode gebaseerd op de kleurvariatie en intensiteit van de met dunnelaagchromografie gescheiden vlekken werd op punt gesteld. Vooraf werden de drie voornaamste variabelen nl. adsorbens, loopmiddel en reveleermiddel systematisch bestudeerd teneinde de optimale werkomstandigheden te bepalen.

De beste resultaten werden bekomen met silicagel en aluminiumoxide als adsorbentia, n-hexaan als loopmiddel, zilvernitraat en o-tolidine als reveleermiddel. De detektielimieten bedroegen 0,1 en 0,04 µg voor respectievelijk silicagel en aluminiumoxide. Deze limieten alsmede de kleurvariaties laten toe een eerste semi-kwantitatieve bepaling uit te voeren. Indien een meer nauwkeurige bepaling gewenst is, wordt DDE, dat niet van de PCBs gescheiden is, vooraf verwijderd door oxidatie met chroomtrioxide. Met magere vissen kan een hexaanextract rechtstreeks worden gebruikt ; voor vette vissen is een eenvoudige voorreiniging met zwavelzuur aangewezen.



