

## Bijlage 2 – Meetmethoden

### **Zware metalen.**

#### **Metalen (Pb, Cd, Mn, Cu, Tl) in bloed**

De zware metalen **lood (Pb)**, **cadmium (Cd)**, **mangaan (Mn)**, **koper (Cu)** en **thallium (Tl)** werden bepaald in volbloed na een zuurdigestie om de organische matrix af te breken. De uiteindelijke analyse gebeurde met behulp van een hoge resolutie inductief gekoppelde plasma spectrometer (HR-ICP-MS), zoals beschreven door Schroijsen et al. (Schoijsen, Baeyens et al. 2008).

500 µL bloed werd met behulp van 500 µL gedestilleerd salpeterzuur (ultrapuur 65%, pro analyse) en 100 µL waterstofperoxide gedigesteerd in een gesloten buizen systeem (PFA-tubes). Deze tubes werden als volgt onderworpen aan een verhoogde temperatuur: 8 minuten stijging tot 70 °C, 8 minuten houden op 70 °C, 8 minuten stijgen tot 100 °C, 8 minuten houden op 100 °C, 8 minuten stijgen tot 120 °C, 20 minuten houden op 120 °C en 10 minuten afkoelen. Tijdens het digestieprogramma werd de druk beneden de 75 psi gehouden. Na digestie werd 3,9 mL Milli Q water toegevoegd aan de stalen vooraleer de analyse met de HR-ICP-MS werd uitgevoerd.

De detectielimiet (Limit of Detection, LOD) voor Pb, Cd, Mn, Cu en Tl bedroeg respectievelijk 1,499 µg/L, 0,056 µg/L, 0,712 µg/L, 1,207 µg/L en 0,0015 µg/L.

Als kwaliteitscontrole werd de methode gevalideerd aan de hand van gecertificeerde referentiematerialen (Sero A.S.). Bij de analyse van de bloedstalen werden in elke batch twee seronormen (seronorm 1 en seronorm 2) mee geanalyseerd en werden ook stalen gespiked met standaarden in verschillende concentraties. Er werd succesvol deelgenomen aan ringtesten van G-EQUAS (German External Quality Assessment Scheme) voor milieublootstelling (Cd, Pb) en voor occupationele blootstelling (Cd, Mn, Pb).

#### **Metalen (Cd, Cu, Tl, Ni en Sb) in urine**

De zware metalen **Cd**, **Cu**, **Tl**, **Ni** en **antimoon (Sb)** werden bepaald in urine na een éénvoudige 1/10 dilutie. De analyse gebeurde met behulp van een hoge resolutie inductief gekoppelde plasma spectrometer (HR-ICP-MS). De methode, eerder beschreven door Peter Heitland en Helmut D. Köster (2004), werd aangepast aangezien een 1/5 verdunning zoals gebruikt door Heitland et al. zorgde voor een vestopping van de HR-ICP-MS.

Aan 500 µL urine werd 100 µL gedestilleerd salpeterzuur (ultrapuur 65%, pro analyse) toegevoegd om de organische matrix af te breken. Vervolgens werd het staal aangelengd tot 5 mL door toevoeging van Milli Q water. De LOD voor Cd, Cu, Tl, Ni en Sb bedroeg respectievelijk 0,012 µg/L, 0,492 µg/L, 0,001 µg/L, 0,275 µg/L en 0,037 µg/L.

Als kwaliteitscontrole werd de methode gevalideerd door bij iedere analyse gecertificeerde referentiematerialen mee te nemen (Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Urine en Lyphochek<sup>®</sup> Urine Metals Control). Voor een externe kwaliteitscontrole werd er succesvol deelgenomen aan de ringtesten van G-EQUAS (German External Quality Assessment Scheme) voor milieublootstelling (Cd en Ni) en beroepsblootstelling (Cd, Cu, Tl en Sb).

**Arseen en toxisch relevant arseen (TRA) in urine.**

Meting van **totaal arseen** (As75) **in urine** gebeurde met ICP-DRC-MS (Perkin Elmer).

De LOD bedroeg 1 µg/L.

De interne kwaliteitscontrole bestond uit: 1) eerstelijnscontrole; 2) tweedelijnscontrole Seronorm urine; 3: derdelijnscontrole SKML Urine en Lyphocheck; 4) beoordeling reagensblanco (contaminatiecontrole). Externe kwaliteitscontrole bestond uit deelname aan ringtesten van G-EQUAS.

Meting van **toxisch relevant arseen** (As75) **in urine** gebeurde met flow-injectie – hydride generatie – atoomabsorptie spectrofotometrie.

De LOD bedroeg 0,3 µg/L.

De interne kwaliteitscontrole beston uit: 1) eerstelijnscontrole; 2) tweedelijnscontrole Seronorm urine; 3: derdelijnscontrole Clincheck 1; 4) beoordeling reagensblanco (contaminatiecontrole). Externe kwaliteitscontrole bestond uit deelname aan ringtesten van G-EQUAS.

**Kwik en methylkwik in haar**

**Totaal Hg** werd bepaald met Atomaire Absorptiespectrometrie (AAS) na verbranding van het haarstaal. Het apparaat dat daartoe gebruikt werd is een AMA (Advanced Mercury Analyser 254) dat over een interne calibratie beschikt. Tijdens elke analysereeks werden blanco's, standaarden en een CRM (IAEA-086) geanalyseerd.

De LOD bedroeg 0,0015 µg/g.

Voor de analyse van **methylkwik** werd HS-GC-AFS (Headspace-Gas Chromatografie-Atomaire Fluorescentie Spectrometrie) toegepast na een zure extractie van het methylkwik uit het haarstaal, en een derivatisatie (ethylatie) van het geëxtraheerde methylkwik in de headspace vial. Tijdens elke analysereeks werden blanco's, standaarden en een CRM (IAEA-086) geanalyseerd.

De LOD bedroeg 0,00004 µg/g.

**Persistente gechloreerde polluenten****PCB congenen 138, 153 en 180; p,p'-DDE en HCB in serum**

De polygechloreerde bifenylyl - **merker PCB138, 153 en 180** - en de organochloorpesticiden - **hexachlorobenzeen (HCB) en p,p'-DDE** - werden bepaald in serum. De gebruikte procedure is gebaseerd op de procedures beschreven in twee publicaties van Covaci et al. (Covaci and Schepens 2001; Covaci and Voorspoels 2005).

PCB's, HCB en p,p'-DDE werden geëxtraheerd uit plasma/serum door middel van vaste-fase extractie (SPE) op OASIS HLB cartouches en zo weerhouden op de kolom. Vervolgens werd er geëluëerd met 10 mL dichloromethaan. Het extract werd geconcentreerd tot ~0,5 mL en daarna opgezuiverd op 0,5 g zure silica (44% w/w, geconc. zwavelzuur). PCBs, HCB en p,p'-DDE werden met 8 mL hexaan:dichloromethaan (1:1, v/v) geëluëerd. Het opgezuiverde extract werd droog gedampt onder stikstof en gereconstitueerd in 80 µL iso-octaan.

Het extract werd gescheiden van de andere nog aanwezige componenten door middel van gas chromatografie en gedetecteerd met een massaspectrometer operatief in electron impact ionisatie. Er werd gebruik gemaakt van een 25 m × 0.22 mm × 0.25 µm HT-8 kolom.

Voor elke van de gemeten componenten (afzonderlijke PCB congenen, HCB en p,p'-DDE) bedroeg de LOQ 20 ng/L.

De kwaliteitscontrole is gebaseerd op regelmatige bepalingen van recoveries van analieten en interne standaarden in gespikete serum en water stalen, regelmatige

controle van procedureblanco's en succesvolle deelname aan internationale ringtesten (Arctic Monitoric Assessment Program AMAP – 3 maal per jaar).

### **CALUX bio-assay op serum**

De **dioxine-achtige activiteit** in serum werd bepaald door middel van de Calux assay. Bij de jongeren werden dioxine-achtige PCB's en dioxines (PCDD's en PCDF's) gemeten in serum door middel van de UDC-Calux (muizencelijn).

De procedure voor de bepaling van **dioxine-achtige stoffen in serum van jongeren** is gebaseerd op de procedures beschreven door Van Wouwe et al. (2004) en Schroijen et al. (2006). De dioxine-achtige stoffen werden eerst geëxtraheerd uit het serum (5 mL) met aceton (20 mL) en hexaan (3 x 5 mL). De hexaanfractie werd op een celite kolom (1.3cc celite en 4.3cc natriumsulfaat) gebracht om de proteïnen te verwijderen en de vetfractie werd gecollecteerd door elutie met hexaan (10 mL). Na bepaling van het vetgehalte (gravimetrisch), werd het extract terug opgelost in hexaan (3 x 5 mL) en verder opgezuiverd m.b.v. een zure silica kolom (1.3cc natriumsulfaat, 4.3cc zure silica met 33% gecon. zwavelzuur en 1.3cc natriumsulfaat) in serie geschakeld met een koolstofkolom (0.5cc natriumsulfaat, 1cc X-Carb en 0.5cc natriumsulfaat). Na het opbrengen van het vetextract werden de kolommen gespoeld met 30 mL hexaan. Nadien werd de silica kolom verwijderd en werd de koolstof kolom gespoeld met 8 mL hexaan/aceton (9/1), waarna de PCB- en dioxine fractie geëluëerd werden met resp. 15 mL hexaan/ethylacetaat/tolueen (8/1/1) en 20 mL tolueen.

Beide extracten werden geëvaporeerd en heropgelost in een gekend volume hexaan. Dit opgezuiverde extract werd overgebracht in DMSO en gedoseerd aan de muizencellen.

Voor de bepaling van de PCB fractie werd gebruik gemaakt van de nieuw ontwikkelde en gevoeligere H1L7.5c1 muizencelijn. De dioxinefractie, die een hogere affiniteit heeft voor de celreceptor, kan zowel met de H1L7.5c1 als met de H1L6.1c3 cellijnen gemeten worden.

Bij iedere bepaling werden ook een procedureblanco en een gepoold serumstaal gemeten als kwaliteitscontrole. Tevens werden op iedere Calux celplaat een calibratiecurve (10 standaarden), 3 kwaliteitscontrolestandaarden, en 3 DMSO blanco's gemeten.

De kwantificatielimit (LOQ) wordt bepaald door de ondergrens van het "lineaire" werkgebied van de sigmoïdale curve en is hoger of gelijk aan de LOD en bedroeg 0,05 pg Calux BEQ/g serum.

### **Gebromeerde vlamvertragers**

**Polygebromeerde difenylethers (PBDEs), hexabromocyclododecaan (HBCD) en tetrabromobisfenol A (TBBPA)** werden bepaald in serum. De gebruikte procedure is gebaseerd op de procedures beschreven in 2 publicaties van Covaci et al. (Covaci and Schepens 2001; Covaci and Voorspoels 2005).

PBDEs en HBCD werden gelijktijdig gemeten met de PCB's en gechlloreerde pesticiden. De methode is dus analoog aan de procedure zoals hierboven beschreven, namelijk extractie uit serum door middel van vaste-fase extractie (SPE), opzuivering op zure silica, scheiding van de componenten met gas chromatografie en detectie met een massaspectrometer operatief in negatieve chemische ionisatie. Voor de bepaling van TBBPA werd voor de GC-analyse een derivatisatie uitgevoerd. Het extract werd droog gedampt en heropgelost in methanol en 1%

trimethylsilyldiazomethaan werd als derivatisatiereagens toegevoegd. De methylering vond gedurende 30 minuten plaats bij 60°C. Hierna werd het extract opnieuw droog gedampt en gereconstitueerd in iso-octaan.

De LOQ bedroeg 2 ng/L voor BDE28, BDE100, BDE153, BDE154 en BDE183, 3 ng/L voor BDE47 en BDE99 en 25 ng/L voor BDE209. De LOQ bedroeg 30 ng/L voor HBCD en 15 ng/L voor TBBPA.

De kwaliteitscontrole is gebaseerd op regelmatige bepalingen van recoveries van analieten en interne standaarden in gespikete serum en water stalen, regelmatige controle van procedureblanco's en succesvolle deelname aan internationale ringtesten (Arctic Monitoric Assessment Program AMAP – 3 maal per jaar).

### **Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's)**

**1-hydroxypyreen** - een PAK-metabooliet – werd gemeten bij jongeren in urine.

De analyseprocedure is gebaseerd op de methode van Angerer et al. (Angerer and Schaller 1998) en bestaat uit online-extractie van 1-hydroxypyreen en High Performance Liquid Chromatography (HPLC) met een fluorescentie-detector.

Om het geconjugeerde 1-hydroxypyreen vrij te maken, werd eerst overnacht gehydrolyseerd door middel van enzymen ( $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase). In een volgende stap werd 1-hydroxypyreen geëxtraheerd en verrijkt. Vervolgens werd het analyt gescheiden van de andere aanwezige componenten en gekwantificeerd via HPLC met een apolaire C-18 'reversed phase'-scheidingskolom. De meting gebeurde met behulp van een fluorescentiedetector.

De LOD bedroeg 10 ng/L.

Als kwaliteitscontrole werd er aan een pool urine een gekende hoeveelheid 1-hydroxypyreen toegevoegd om als standaardcurve te dienen. Per reeks van 9 onbekende urines werd er telkens een controle met gekende concentratie 1-hydroxypyreen meegenomen (ClinChek). Daarnaast was er succesvolle deelname aan een internationale ringtest (G-EQUAS 43).

### **Benzeen**

**T,t'-muconzuur** - een metabooliet van benzeen – werd gemeten bij jongeren in urine/

De analyseprocedure is gebaseerd op de methode van Angerer et al. (Angerer and Schaller, 1997). T,t'-muconzuur werd gescheiden van urine door middel van ionenchromatografie (SPE-SAX). T,t'-muconzuur werd weerhouden op de kolom en vervolgens geëluëerd met 10% azijnzuur. Het extract werd gescheiden van de andere nog aanwezige componenten door middel van High Performance Liquid Chromatography (HPLC). De detectie van t,t'-muconzuur gebeurde met een DAD-detector bij een golflengte van 259 nm.

De LOD bedroeg 5  $\mu$ g/L.

Urine standaarden, waaraan een gekende hoeveelheid t,t'-muconzuur was toegevoegd, werden gebruikt voor de kalibratie en als controle werd er een referentie urine-staal meegenomen (ClinChek). Daarnaast was er succesvolle deelname aan een internationale ringtest (G-EQUAS 43).

## **Perfluorderivaten**

**Perfluoro-octaansulfonaat (PFOS)** en **perfluoro-octaanzuur (PFOA)** werden bepaald in het serum van de jongeren.

De gebruikte procedure is gebaseerd op de procedures beschreven in 2 publicaties van Midasch et al. (Midasch, Drexler et al., 2007; Midasch, Schettgen et al., 2006).

De analytische methode bestond uit een offline proteïne precipitatie met acetonitrile, gevolgd door een scheiding d.m.v. HPLC en een MS/MS detectie (Applied Biosystems API2000 triple quadrupole mass spectrometer (Foster City, CA, USA) in negative ionization MS/MS mode met MRM (multiple reaction monitoring)).

De kwantificatielimiet (LOQ) bedraagt 0,3 µg/L, zowel voor PFOA als voor PFOS. Kwaliteitscontroles gebeurden door meenemen van reagentia blanco's, serum blanco's, calibratie standaarden (PFOS en PFOA 10, 50, 100, 500 µg/L) en kwaliteitscontrole stalen (PFOS en PFOA 25 µg/L). Er werd op succesvolle wijze deelgenomen aan internationale ringtesten.

## Referenties

Angerer J, Schaller KH. Analyses of Hazardous Substances in Biological Materials, Wiley-VCH Verlag, 1997, Weinheim: 125-141.

Angerer J, Schaller KH. Analyses of Hazardous Substances in Biological Materials, 1998, Wiley-VCH Verlag, Weinheim: 170-187.

Covaci A, Schepens P. Improved determination of selected POPs in human serum by solid phase disk extraction and GC-MS. Chemosphere 2001; 43: 439-447.

Covaci A, Voorspoels S. Optimization of the determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. J Chromatogr B 2005; 827: 216-223.

Heitland P and Köster HD. Fast, simple and reliable routine determination of 23 elements in urine by ICP-MS. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004, 19, 1552 – 1558.

Koppen G, Covaci A. Comparison of CALUX-TEQ values with PCB and PCDD/F measurements in human serum of the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Toxicology Letters 2001;123:59-67.

Midasch O, Schettgen T, Angerer J. Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population. Int J Hyg Environ Health 2006; 209:489-496.

Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. Int Arch Occup Environ Health 2007; 80:643-648.

Schroijen C, Baeyens W, et al. Internal exposure to pollutants measured in blood and urine of Flemish adolescents in function of area of residence. Chemosphere 2008; 71(7): 1317-25.

Van Wouwe N, Windal I, Vanderperren H, et al. Validation of the CALUX bioassay for PCDD/F analyses in human blood plasma and comparison with GC-HRMS. Talanta 2004;63(5):1157-67.