

Bijlage 1 – Meetmethoden

Zware metalen.

Metalen (Pb, Cd, Mn, Cu, Tl, As) in bloed

De zware metalen **lood (Pb), cadmium (Cd), mangaan (Mn), koper (Cu), thallium (Tl) en arseen (As)** 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 Schroyen et al. (Schroyen, Baeyens et al. 2008).

500 µL bloed wordt met behulp van 500 µL gedestilleerd salpeterzuur (ultrapuur 65%, pro analyse) en 100 µL waterstofperoxide gedigereerd in een gesloten buizen systeem (PFA-tubes). Deze tubes worden 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 wordt de druk beneden de 75 psi gehouden. Na digestie wordt 3,9 mL Milli Q water toegevoegd aan de stalen vooraleer de analyse met de HR-ICP-MS wordt uitgevoerd. De LOD voor Pb, Cd, Mn, Cu, Tl en As bedraagt respectievelijk 1,9 µg/L, 0,06 µg/L, 0,86 µg/L, 2,04 µg/L, 0,001 µg/L en 0,028 µg/L. De respectievelijke LOQ's bedragen 6,2 µg/L, 0,201 µg/L, 2,9 µg/L, 6,8 µg/L, 0,005 µg/L en 0,093 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).

Cadmium in urine

Cadmium (Cd114) in urine werd gemeten door middel van ICP-DRC-MS (Perkin Elmer).

De LOD bedroeg 10 ng/L; de LOQ bedroeg 100 ng/L.

De interne kwaliteitscontrole bestond 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.

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 0,04 µg/L; de LOQ bedroeg 0,1 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 0,7 µg/L; de LOQ bedroeg 1 µg/L.

De interne kwaliteitscontrole bestond 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 methykwik 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 en de LOQ 0,005 µg/g.

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

De LOD bedroeg 0,00004 µg/g en de LOQ 0,0001 µg/g.

Persistente gechloreerde pollutanten

PCB congenen 138, 153 en 180; p,p'-DDE en HCB in serum/plasma

De polygechloreerde bifenylyl - merker **PCB138, 153 en 180** - en de organochloorpesticiden - **hexachlorobenzeen (HCB) en p,p'-DDE** - werden bepaald in plasma (navelstrengbloed) en in serum (jongeren). 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 worden geëxtraheerd uit plasma/serum door middel van vaste-fase extractie (SPE) op OASIS HLB cartouches en zo weerhouden op de kolom. Vervolgens wordt er geëluëerd met 10 mL dichloromethaan. Het extract wordt 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 worden met 8 mL hexane:dichloromethaan (1:1, v/v) geëluëerd. Het opgezuiverde extract wordt drooggedampt onder stikstof en gereconstitueerd in 80 µL iso-octane.

Het extract wordt gescheiden van de andere nog aanwezige componenten door middel van gas chromatografie en gedetecteerd met een massaspectrometer operatief in electron impact ionisatie. Er wordt 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) bedraagt de LOD 10 ng/L en 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 of plasma

De **dioxine-achtige activiteit** in plasma en serum werd bepaald door middel van de Calux assay. De som van alle dioxine-achtige stoffen in navelstrengbloed (plasma) werd gemeten met de BDR-Calux® (rattencelijn). Bij de jongeren werden dioxine-achtige PCB's en dioxines (PCDD's en PCDF's) apart gemeten in serum door middel van de UDC-Calux (muizencelijn).

Dioxineachtige stoffen in navelstrengplasma werden bepaald met de dioxin-responsive **DR-CALUX[®] assay** (BioDetection Systems, Nederland) volgens de methode zoals beschreven in Koppen et al. (Koppen, Covaci, et al. 2001). Vier mL navelstrengplasma werd toegevoegd aan een gelijk volume isopropanol voor denaturatie van de eiwitten in het plasma. Dit werd gevolgd door een 2-staps vloeistof/vloeistof extractie met telkens toevoeging van 8 mL n-hexaan, centrifugatie en collectie van de bovenstaande hexaanfase. De bekomen vetfractie in hexaan werd vervolgens ingedampt onder een N₂-stroom bij 37°C. De tube met het droog vet werd gewogen voor gravimetrische vetbepaling. De extracten werden opgelost in 3 x 1 mL n-hexaan en geëluëerd over een silicakolom (33%, w/v H₂SO₄/silica met bovenaan de kolom gedroogde Na₂SO₄) gevolgd door een elutie met 7 mL n-hexaan. Het eluaat werd ingedampt en overgebracht in 7,5 µL DMSO. Dit extract werd 1/100 verdund in medium en gedoseerd aan H4IIE rat hepatoma cellen gedurende 24 uur. Honderd µL in medium verdund extract of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) standaard werd in triplicaat toegediend aan de cellen in een 96-well cultuurplaat. De DR-CALUX[®] assay cellijn is getransfecteerd met een aryl hydrocarbon receptor (AhR)-gecontroleerd luciferase reporter genconstruct. Als dioxine-achtige stoffen binden op de receptor, wordt luciferase geproduceerd en kan de activiteit gemeten worden met een luminometer. De lichtproductie van de standaardconcentraties van 2,3,7,8 TCDD wordt als referentie gebruikt. De resultaten worden uitgedrukt in picogram (10⁻¹² g) toxicologische equivalenten (TEQ) van 2,3,7,8 TCDD per gram plasmavet of per mL plasma.

Bij iedere reeks van 10 stalen werd een procedureblanco en een gepoold serumstaal gemeten als kwaliteitscontrole. Tevens worden op iedere Calux celplaat in triplicaat (3 wells) een calibratiecurve (6 standaardconcentraties in het meetbereik van 0,013-0,400 pg Calux TEQ/well), 1 kwaliteitscontrolestandaard (0,100 pg/well), en 3 DMSO blanco's gemeten. Per reeks van 10 platen werd een volledige calibratiecurve (0,013-3,219 pg Calux TEQ/well) meegenomen. De standaardcurves diende aan volgende kwaliteitseisen te voldoen: R²>0,98, een minimale lichtinductie van ≥4 bij 12,5 pM, bij elke standaardreeks dient het aantal triplicaatwells met een variatiecoëfficiënt >15% lager te zijn dan N=2. De EC-50 waarde van de volledige standaardcurve dient tussen 0,0267 en 0,583 pg Calux TEQ/well te liggen.

De detectielimiet (LOD) wordt bepaald a.d.h.v. de DMSO blanco plus 3 maal de standaarddeviatie van het blankosignaal op elke plaat. De LOD bedroeg gemiddeld 0,0128 pg Calux TEQ/well. De kwantificatielimiet (LOQ) wordt bepaald door de ondergrens van het "lineaire" werkgebied van de sigmoïdale curve en is hoger of gelijk aan de LOD. De LOQ bedroeg gemiddeld 9,7 pg Calux TEQ/g vet (voor 5 mL plasma met een vetgehalte van 200 mg/dL). Het meetbereik is gelegen tussen LOD en de EC50-waarde van de standaardcurve.

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 Schroyen et al. (2006). De dioxine-achtige stoffen worden eerst geëxtraheerd uit het serum (5 mL) met aceton (20 mL) en hexaan (3 x 5 mL). De hexaanfractie wordt op een celite kolom (1.3cc celite en 4.3cc natriumsulfaat) gebracht om de proteïnen te verwijderen en de vetfractie wordt gecollecteerd door elutie met hexaan (10 mL). Na bepaling van het vetgehalte (gravimetrisch), wordt 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 worden de kolommen gespouwd met 30 mL hexaan. Nadien wordt de silica kolom wordt

verwijderd en wordt de koolstof kolom gespoeld met 8 mL hexaan/acetone (9/1), waarna de PCB- en dioxine fractie geëluëerd worden met resp. 15 mL hexaan/ethylacetaat/tolueen (8/1/1) en 20 mL tolueen.

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

Voor de bepaling van de PCB fractie wordt gebruik gemaakt van de nieuw ontwikkelde en gevoeligere H1L7.5c1 muizencellijn. 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 worden ook een procedureblanco en een gepoold serumstaal gemeten als kwaliteitscontrole. Tevens worden op iedere Calux celplaat een calibratiecurve (10 standaarden), 3 kwaliteitscontrolestandaarden, en 3 DMSO blanco's gemeten.

De detectielimiet (LOD) wordt bepaald a.d.h.v. de DMSO blanco plus 3 maal de standaard deviatie van het blancosignaal. Voor de H1L7.5c1 cellijn bedraagt de LOD 16.5% inductie of 0,1 pg BEQ/well, voor de H1L6.1c3 cellijn 11,4% inductie of 0,25 pg BEQ/well. De kwantificatielimiet (LOQ) wordt bepaald door de ondergrens van het "lineaire" werkgebied van de sigmoidale curve en is hoger of gelijk aan de LOD. Voor de gevoelige H1L7.5c1 cellijn bedraagt deze 0,1 pg BEQ/well, voor de H1L6.1c3 cellijn bedraagt de LOQ 0,3 pg BEQ/well.

Gebromeerde vlamvertragers

Polygebromeerde difenylethers (PBDEs), hexabromocyclododecaan (HBCD) en tetrabromobisfenol A (TBBPA) werden bepaald in plasma (navelstrengbloed) en in serum (jongeren). 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 worden gelijktijdig gemeten met de PCB's en gechlorideerde pesticiden. De methode is dus analoog aan de procedure zoals hierboven beschreven, namelijk extractie uit plasma/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 wordt voor de GC-analyse een derivatisatie uitgevoerd. Het extract wordt drooggedampt en heropgelost in methanol en 1% trimethylsilyldiazomethane wordt als derivatisatiereagens toegevoegd. De methylering vindt gedurende 30 minuten plaats bij 60°C. Hierna wordt het extract opnieuw drooggedampt en gereconstitueerd in iso-octaan.

De LOD bedraagt 1 ng/L voor BDE28, BDE47, BDE99, BDE100, BDE153, BDE154 en BDE183, 10 ng/L voor BDE209, 5 ng/L voor HBCD en 3 ng/L voor TBBPA. De LOQ bedraagt 2 ng/L voor BDE28, BDE100, BDE153, BDE154 en BDE183, 3 ng/L voor BDE47 en BDE99 en 40 ng/L voor BDE209. De LOQ bedraagt 20 ng/L voor HBCD en 10 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).

Bisfenol A

In een prevalidatie studie werd nagegaan of **bisfenol A (BPA)** kan gemeten worden in serum en/of in urine. Uit de meting van 20 serumstalen van jongeren en 3 plasmastalen van navelstrengbloed bleek dat de waarden van bisfenol A in respectievelijk 18 van de 20 serumstalen en 3 van de 3 plasmastalen onder de LOQ van 0,5 ng/mL lagen. In urine is de LOQ iets lager (0,2 ng/mL) en bleken alle metingen van 20 stalen uit de prevalidatiestudie boven de LOQ te liggen. Daarom werd beslist om de meting van BPA uit te voeren in urine van jongeren.

De methode voor de meting van **BPA in urine** werd beschreven door Geens et al. (Geens, Neels et al., 2009). BPA kan in de urine voorkomen onder zijn vrije én geglucuronideerde vorm. Om het totale BPA te meten wordt het geglucuronideerd BPA eerst vrijgezet door middel van enzymatische hydrolyse met 50 µL β-glucuronidase/arylsulfatase. Aangezien deze enzymatische hydrolyse optimaal plaatsvindt bij pH 4.5-5 wordt ook 0.75 mL acetaatbuffer 2M toegevoegd.

BPA wordt vervolgens geëxtraheerd uit de urine door middel van vaste-fase extractie (SPE) op OASIS HLB cartouches (60 mg, 3 mL). BPA wordt weerhouden op de kolom en vervolgens geëluëerd met 5 mL methanol:dichloromethaan (1:1, v/v). Het extract wordt volledig drooggedampt en heropgelost in 1 ml water en 2 ml hexaan. Na ioniseren van BPA met KOH en vervolgens toevoegen van het derivatisatiereagens pentafluorobenzoylchloride (PFBCI) verdelen de gevormde derivaten zich naar de hexaanfase. Deze hexaanfase wordt vervolgens opgezuiverd op 0.2 g zure silica (10% w/w, geconc. zwavelzuur), waarna het BPA-derivaat met 6 ml dichloromethaan geëluëerd wordt. Tenslotte wordt het opgezuiverde extract drooggedampt onder stikstof en gereconstitueerd in 100 µl iso-octaan.

Het extract wordt gescheiden van de andere nog aanwezige componenten door middel van gas chromatografie en gedetecteerd met een massaspectrometer operatief in negatieve chemische ionisatie. Er wordt gebruik gemaakt van een 30 m × 0.25 mm × 25 µm DB-5 kolom.

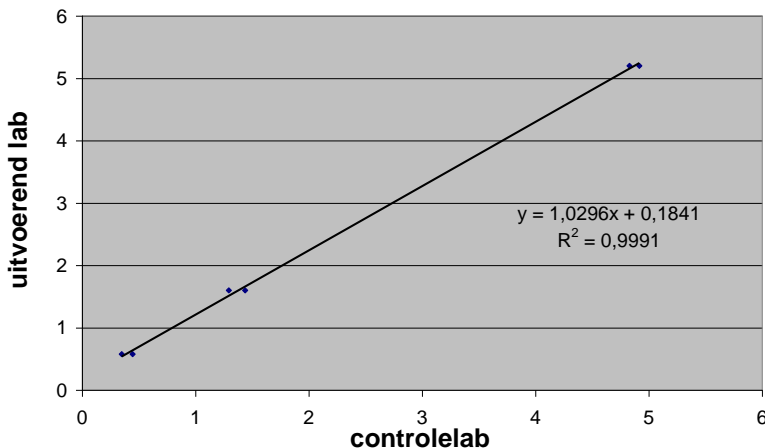
De LOQ bedraagt 0,2 µg/L en de LOD 0,1 µg/L.

Simultaan met de meting van BPA gebeurt ook de analyse van triclosan in urine (zie verder).

De kwaliteitscontrole is gebaseerd op bepalingen van recoveries van analieten en interne standaarden in gespikete urinestalen en controle van procedureblanco's.

Er werden 3 stalen uit de studie naar een extern controlelab (Dr. Holger Koch, Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (BGFA), Institut der Ruhr-Universität Bochum, Bochum, Duitsland) gestuurd voor een dubbelblinde vergelijking van de metingen.

De metingen werden in duplo uitgevoerd door het controlelab. De resultaten waren zeer sterk gecorreleerd ($R^2=0.9991$), maar lagen systematisch lager in het controlelab, namelijk 6% voor de hoogste concentratie (5 µg/L) en 23% voor de laagste concentratie (0,5 µg/L) (Figuur 1).



Figuur 1: Vergelijkende meting van bisfenol A (BPA) in 3 urinestalen door uitvoerend lab en controlelab.

Weekmakers: ftalaten

Volgende **ftalaatmetabolieten** werden gemeten in de urine van jongeren en van volwassenen:

- metabolieten van di-2-ethylhexyl ftalaat (DEHP): het primaire metaboliet **mono-2-ethylhexyl ftalaat (MEHP)** en de secundaire metabolieten **mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl ftalaat (5-OH MEHP)** en **mono-2-ethyl-5-oxohexyl ftalaat (5-oxo MEHP)**;
- metabolieten van dibutyl ftalaten: **monobutyl ftalaat (MBP)**;
- metabolieten van benzylbutyl ftalaat: **monobenzyl ftalaat (MBzP)**.

Het urinestaal wordt gevortexed en 5 min gesoniceerd. De staalinname bedraagt 1 mL. Na additie van enzyme-buffer oplossing (beta-glucuronidase E. Coli type K12) en interne standaarden (13C-MnBP, 13C-MEHP, 13C-OH-MEHP, 13C-oxo-MEHP) wordt gedurende 90 min. bij 37°C geïncubeerd. Het mengsel wordt vervolgens geëxtraheerd d.m.v. SPE (Oasis HLB). De componenten worden geëluëerd met ACN en ethylacetaat. Het extract wordt drooggedampt en opgenomen in 200 µL HPLC-water. De meting gebeurt met UPLC-MS (kolom: phenylfase). De kalibratieoplossingen worden aangemaakt in ACN:HPLC-water (1:9).

In onderstaande tabel zijn de detectielimieten weergegeven, gebaseerd op signaal/ruis-verhouding.

| | MeHP | OH-MeHP | 5-oxoMeHP | MnBP | MBzP |
|-----------------------|-------------|----------------|------------------|-------------|-------------|
| LOQ in monster (µg/L) | 0,029 | 0,087 | 0,060 | 0,041 | 0,149 |
| LOD in monster (µg/L) | 0,014 | 0,044 | 0,030 | 0,021 | 0,074 |

Rekening houdend met de concentratie in de procedureblanco bedragen de rapporteergrenzen :

| | MeHP | OH-MeHP | 5-oxoMeHP | MnBP | MBzP |
|--------------------------|-------------|----------------|------------------|-------------|-------------|
| Rapporteergrens µg/L) | <1,0 | <0,1 | <0,1 | <10 | <0,2 |

De kwaliteitscontrole is gebaseerd op het volgende :

- Opvolging van de procedureblanco (in elke meetreeks)
- Bepaling van de terugvinding a.d.h.v. een gedopeerd staal in water (elke meetreeks)
- Bepaling van de terugvinding a.d.h.v. een gedopeerd urinestaal (elke meetreeks)
- Duplo-bepalingen (1 per meetreeks)
- Deelname aan een internationale ringtest (G-EQUAS)

Perfluorderivaten

Perfluoro-octaansulfonaat (PFOS) en **perfluoro-octaanzuur (PFOA)** werden bepaald in plasma van navelstrengbloed en in serum van de volwassenen.

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) bedoeg 0,5 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.

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's)

Urinair 1-hydroxypyreen - een PAK-metabooliet - werd gemeten bij jongeren en bij volwassenen.

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, wordt eerst overnacht gehydrolyseerd door middel van een enzymes (β -Glucuronidase/Arylsulfatase). In een volgende stap wordt 1-hydroxypyreen geëxtraheerd en verrijkt. Vervolgens wordt het analyt gescheiden van de andere aanwezige componenten en gekwantificeerd via HPLC met een apolaire C-18 'reversed phase'-scheidingskolom. De meting gebeurt met behulp van een fluorescentiedetector.

De LOD bedraagt 6,3 ng/L; de LOQ bedraagt 19 ng/L.

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

Naast de individuele metingen van 1-hydroxypyreen, werden ook nieuwe PAK-metabolieten gemeten in gepoolde urinestalen, namelijk 1- en 2-naftol in urine en benzo(a)pyreen tetrol in urine.

De methode voor de detectie van **1- en 2-naftol in urine** is gebaseerd op de publicatie van Elovaara et al. (Elovaara, Vaananen et al. 2003). De urine wordt eerst overnacht gehydrolyseerd door middel van enzymen (β -Glucuronidase/Arylsulfatase). Na incubatie worden 1- en 2-naftol geëxtraheerd en wordt het extract aangezuurd. Via High Performance Liquid Chromatography (HPLC) worden 1- en 2-naftol gescheiden van de andere aanwezige componenten en gekwantificeerd door een apolaire C-18 'reversed phase'-scheidingskolom. De hoeveelheid 1- en 2-naftol wordt bepaald met behulp van een fluorescentiedetector.

De LOD bedraagt 1,6 $\mu\text{g/L}$ voor 1-naftol en 0,94 $\mu\text{g/L}$ voor 2-naftol; de respectievelijke LOQ bedraagt 4,7 $\mu\text{g/L}$ en 2,8 $\mu\text{g/L}$.

Er was succesvolle deelname aan een internationale ringtest (EQUAS).

De methode voor de detectie van **B(a)P-tetrols in urine** is gebaseerd op de publicaties van Weston et al. en Simpson et al. (Weston, Bowman et al. 1993; Simpson, Wu et al. 2000). Om de B(a)P-tetrols in urine te bepalen wordt de urine eerst overnacht gehydrolyseerd door middel van enzymen (β -Glucuronidase/Arylsulfatase). Na hydrolyse wordt er een eerste opzuivering uitgevoerd door middel van Solid Phase Extraction (SPE) C18 kolom. Het extract van de C18 kolom wordt verder opgeconcentreerd en opgezuiverd via een specifiekere phenyl boronic acid (PBA) kolom. Het extract wordt ingedampt en verder geëxtraheerd (vloeistof-vloeistof-extractie). Het finale extract wordt drooggedampt en in 10% methanol gebracht. In een volgende stap worden de B(a)P-tetrols gescheiden van de andere aanwezige componenten en gekwantificeerd door middel van High Performance Liquid Chromatography (HPLC) met een apolaire C18 'reversed phase'-scheidingskolom. De hoeveelheid B(a)P-tetrols wordt bepaald met behulp van een fluorescentiedetector.

De LOD bedraagt 1,4 ng/L voor benzo(a)pyreen, r-7, t-8, t-9, t-10-hydratetrol en 2,3 ng/L voor benzo(a)pyreen, r-7, t-8, t-9, c-10-tetrahydryol; de respectievelijke LOQ bedraagt 4,1 ng/L en 6,9 ng /L.

Benzeen

Urinaire t,t'-muconzuur - een metaboliet van benzeen - werd gemeten bij jongeren en bij volwassenen.

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

De LOD bedraagt 5,8 $\mu\text{g/L}$; de LOQ bedraagt 17,3 $\mu\text{g/L}$.

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

Pesticiden

Metaboliëten van organofosfaatpesticiden: DEP, DETP, DEDTP, DMP, DMTP, DMDTP) in urine

In de urine van jongeren en volwassenen werden zes dialkyl fosfaat metaboliëten gemeten, namelijk:

- dimethylfosfaat (DMP);
- dimethylthiofosfaat (DMTP);
- dimethyldithiofosfaat (DMDTP);
- diethylfosfaat (DEP);
- diethylthiofosfaat (DETP);
- diethyldithiofosfaat (DEDTP).

De meetmethode is gebaseerd op de publicatie van Hardt & Angerer (Hardt and Angerer 2000). Het urinestaal wordt ontdooid, 5 min. gevortexed en 5 min gesoniceerd. Aan 5 mL staal worden interne standaarden toegevoegd (D10-DEP, D10-DETP, D6-DMP en D6-DMTP). Na aanzuren met HCl wordt het staal vloeistof-vloeistof geëxtraheerd met diethylether/ACN. Het extract wordt ingedampt tot droog en opgenomen in waterrij ACN. Na additie van K₂CO₃ wordt gederivatiseerd met PFBBr (40 °C, 18 hr). De derivaten worden geëxtraheerd met n-hexaan. Het hexaanextract wordt ingedampt tot 150 µL (met solventwissel naar toluen. De meting gebeurt met GC/MS (DB5MS-kolom). De kalibratiestandaarden worden aangemaakt in urine en worden opgewerkt zoals de stalen.

In onderstaande tabel zijn de detectielimieten weergegeven, gebaseerd op signaal/ruis-verhouding:

| | DMP | DEP | DMTP | DETP | DMDTP | DEDTP |
|-----------------------|------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| LOD in monster (µg/L) | 0,47 | 0,86 | 0,25 | 0,49 | 0,26 | 0,70 |
| LOQ in monster (µg/L) | 0,94 | 1,72 | 0,50 | 0,97 | 0,52 | 1,39 |

Rekening houdend met de concentratie in de procedureblanco bedragen de rapporteergrenzen:

| | DMP | DEP | DMTP | DETP | DMDTP | DEDTP |
|------------------------|------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Rapporteergrens (µg/L) | <3 | <2 | <1 | <1 | <1 | <2 |

De kwaliteitscontrole is gebaseerd op het volgende :

- Opvolging van de procedureblanco (in elke meetreeks)
- Bepaling van de terugvinding a.d.h.v. een gedopeerd urinestaal (elke meetreeks)
- Duplo-bepalingen (1 per meetreeks)
- Deelname aan een internationale ringtest (G-EQUAS)

Een metabolië van *para*-dichloorbenzeen, nl. *para*-dichlorofenol (2,5-DCP)

werd gemeten **in de urine** van jongeren en volwassenen.

Het urinestaal wordt ontdooid, 5 min. gevortexed en 5 min. gesoniceerd. De staalinname bedraagt 2 tot 5 mL. Enzyme-buffer oplossing wordt toegevoegd (beta-glucuronidase Helix Pomata type H1) en het staal wordt gedurende 17 hr. bij 37°C geïncubeerd. Aan het mengsel wordt vervolgens interne standaard toegevoegd (13C-

2,4-dichlorophenol); de pH wordt op < 4 gebracht met azijnzuur en 2,5-DCP wordt geëxtaheerd d.m.v. SPE op een C18-kolommetje. Elutie gebeurt met methanol en met K₂CO₃ buffer. Aansluitend wordt gederivatiseerd met azijnzuuranhydride; het derivaat wordt geëxtraheerd met n-hexaan. Het finale extract wordt ingedampt tot 250 µL. De meting gebeurt met GC/MS (DB-XLB kolom). De kalibratiereeks wordt aangemaakt in urine en worden opgewerkt zoals de stalen.

In onderstaande tabel zijn de detectielimieten weergegeven, gebaseerd op signaal/ruis-verhouding:

| | 2,5-DCP |
|-----------------------|----------------|
| LOD in monster (µg/L) | 0,10 |
| LOQ in monster (µg/L) | 0,18 |

Rekening houdend met de concentratie in de procedureblanco bedragen de rapporteergrenzen:

| | 2,5-DCP |
|------------------------|----------------|
| Rapporteergrens (µg/L) | <0,4 |

De kwaliteitscontrole is gebaseerd op het volgende :

- Opvolging van de procedureblanco (in elke meetreeks)
- Bepaling van de terugvinding a.d.h.v. een gedopeerd urinestaal (elke meetreeks)
- Duplo-bepalingen (1 per meetreeks)
- Deelname aan een internationale ringtest (G-EQUAS)

Metabooliet van chlorophenoxypesticiden: 2,4 dichlorofenoxy-azijnzuur (2,4-D) in urine

De meting van 2,4-D gebeurde enkel op gepoolde stalen van jongeren en volwassenen.

De meetmethode is gebaseerd op de referentie van Olsson et al. (Olsson, Baker et al. 2004). Het urinestaal wordt ontdooid, gevortexed en 5 min gesoniceerd. De staalinname bedraagt 2 mL. Na additie van enzyme-buffer oplossing (beta-glucuronidase Helix Pomata type H1) en interne standaard (13C-2,4D) wordt gedurende 17 hr. bij 37°C geïncubeerd. Het mengsel wordt vervolgens geëxtraheerd d.m.v. SPE (Oasis HLB). De componenten worden geëlueerd met methanol. Het extract wordt drooggedampt en opgenomen in 50 µL acetonitrile. De meting gebeurt met LC-MS (kolom: phenylfase). De kalibratieoplossingen worden aangemaakt in verdunde urine (= een 1:1 mengsel van HPLC-water en blanco-urine). Deze oplossingen worden op dezelfde manier opgewerkt als de stalen.

In onderstaande tabel zijn de detectielimieten weergegeven, gebaseerd op signaal/ruis-verhouding.

| | 2,4-D |
|-----------------------|--------------|
| LOD in monster (µg/L) | 0,056 |
| LOQ in monster (µg/L) | 0,028 |

De rapporteergrens bedraagt (na afronding):

| | 2,4-D |
|------------------------|--------------|
| Rapporteergrens (µg/L) | <0,03 |

De kwaliteitscontrole is gebaseerd op het volgende :

- Opvolging van de procedureblanco (in elke meetreeks)
- Bepaling van de terugvinding a.d.h.v. een gedopeerd staal in water (elke meetreeks)
- Bepaling van de terugvinding a.d.h.v. een gedopeerd urinestaal (elke meetreeks)
- Duplobepalingen (1 per meetreeks)

Metabooliet van carbamaatpesticiden: ethyleenthioureum (ETU) in urine

De meting van ETU gebeurde op gepoolde urinestalen van jongeren (n=5) en volwassenen (n=5).

De meting gebeurde volgens de methode beschreven door Lindh et al. (Lindh, Littorin, et al. 2008) en kan worden samengevat als volgt: ethyleenthioureum in urine werd gederivatiseerd met pentafluorobenzyl bromide en vervolgens geëxtraheerd. Ethyleenthioureum werd geanalyseerd d.m.v. LC-QQQ-MS op de 2 MRM transitities (463-263 en 463-282) die de hoogste selectiviteit vertoonden. Kwantificatie van ETU gebeurde d.m.v. standaardadditie (urinestaal + 3 gespikte niveaus). De LOD werd bepaald op het staal met de laagste concentratie, er werd een signaal-ruis verhouding bekomen van 4 voor een berekende concentratie van 0,1 ng/mL ETU in urine. De LOD van de methode werd gesteld op 0,1 ng/mL; de LOQ bedraagt 0,5 ng/mL.

Metaboolieten van pyrethroïde pesticiden: 3-PBA en FPBA in urine

De meting van de pyrethroïde pesticiden gebeurde op gepoolde urinestalen van jongeren (n=5) en volwassenen (n=5).

Het doel van dit project was de bepaling van metaboolieten van pyrethroid pesticiden in urine. Aanvankelijk werd de analyse van een 5-tal metaboolieten vooropgesteld (3-PBA, FPBA, *c-/t*-DCVA, DBVA, MPBA). Slechts 2 pyrethroid metaboolieten zijn echter commercieel beschikbaar: 3-phenoxybenzoic acid (PBA) en 4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid (FPBA). Deze componenten zijn de belangrijkste metaboolieten. 3-PBA is een gemeenschappelijk metabooliet afkomstig van permethrin, cypermethrin, fenvalerate, deltamethrin, cyhalothrin en phenotrin. FPBA is afkomstig van cyfluthrin. Voor de analyse werd gebruik gemaakt van een stir bar sorptive extractie (SBSE) gecombineerd met GC-MS. SBSE werd uitgevoerd in combinatie met in-situ derivatisatie met ethylchloroformate. Hierbij worden de zuren omgezet naar ethylesters. Na derivatisatie wordt hoger extractie-rendement, betere piekvorm en hogere MS gevoeligheid bekomen.

Na IS additie (2 µL van 10 ng/µL) werd 2 mL urinemonsters monster eerst aangezuurd met 0,5 mL HCl (37%). De monsters werden gedurende 2h bij 90°C geplaatst. Hierbij treedt zure hydrolyse op en de geconjugeerde metaboolieten worden vrijgesteld. Vervolgens werd 1 mL ethanol en 0,5 mL pyridine toegevoegd. De monsters werden gevortexed voor homogenisatie en 0,5 mL ECF werd toegevoegd. SBSE werd uitgevoerd met een 1 cm x 0,5 mm PDMS Twister gedurende 1 h onder roeren bij 850 rpm. De analyse gebeurde vervolgens via thermische desorptie en GC-MS in SIM mode.

De LOD werd bepaald op een blanco monster gespiked op 0,25 ppb niveau. De LOD voor 3-PBA was 0,12 ng/mL; de LOQ bedroeg 0,24 ng/mL. Voor FPBA waren LOD en LOQ respectievelijk 0,06 ng/ml en 0,12 ng/ml.

Metabolieten van fungiciden: 3,4-DCA, 3,5-DCA, DCPU en DCPMU in urine

De meting van de metabolieten van fungiciden gebeurde op gepoolde urinestalen van jongeren (n=5) en volwassenen (n=5). Volgende metabolieten werden gemeten:

- 3,4-dichloro aniline (3,4-DCA);
- 3,5-dichloro aniline (3,5-DCA);
- 1-(3,4 dichlorophenyl) ureum (DCPU);
- 1-(3,4-dichlorophenyl)-3 methyl ureum (DCPMU).

DCPU en DCPMU werden rechtstreeks in urine gemeten (1^e analyse). Na derivatisatie geven DCPMU en DCPU aanleiding tot 3,4-DCA en 3,5-DCA (2^e analyse).

De extractie en derivatisatie gebeurt als volgt: aan 1 mL urine wordt 1 mL 10N NaOH toegevoegd. De stalen worden bij 100°C gehydrolyseerd. Na hydrolyse worden de stalen geëxtraheerd met toluëen. De toluëen fase wordt afgezonderd en hierop wordt een derivatisatie uitgevoerd met PFPA (pentafluorpropionische anhydride). Het teveel aan reagens wordt verwijderd d.m.v. een fosfaatbuffer. De organische fase wordt ingedampt, het residu wordt heropgelost in 100 µL acetonitrile en vervolgens geïnjecteerd op een LC-MS/MS. MS analyses worden uitgevoerd op een Agilent Triple quadrupole systeem. Alle componenten worden gemeten in negatieve ionisatie mode.

Voor 3,4-DCA, 3,5-DCA en DCPMU bedraagt de LOD 0,25 ng/mL en de LOQ 1 ng/mL. Voor DCPU zijn LOD en LOQ respectievelijk 0,50 ng/ml en 2 ng/ml.

Persoonlijke hygiëne producten**Musk derivaten (HHCB, AHTN, MX, MK) in bloed**

Galaxolide (HHCB) en tonalide (AHTN) zijn componenten van polycyclische musks. Musk xylene (MX) en musk ketone (MK) zijn afkomstig van nitro musks.

Eén van de problemen bij de analyse van musks is contaminatie (afkomstig van materiaal en van instrument). Om het risico op contaminatie te verminderen werd gewerkt met een nieuwe voorbereidingsmethode, nl. de Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE). Na extractie met SBSE wordt het staal thermisch gedesorbeerd en geanalyseerd met GC-MS.

De LOD bedraagt 20 pg/mL voor HHCB, AHTN en MK en 40 pg/mL voor MX.

Als kwaliteitscontrole werden op regelmatige basis gespikete stalen toegevoegd, en werd de recovery berekend.

In een prevalidatiestudie werden HHCB, AHTN, MX en MK gemeten in 28 stalen (van deelnemers). MK en MX werden in geen enkel van de stalen gedetecteerd. Daarom werd beslist om in de overige stalen enkel de polycyclische musks, HHCB en AHTN, te bepalen.

Metabooliet van parabenen (*p*-hydroxybenzoëzuur) in urine

Para-hydroxybenzoëzuur (HBA) in urine werd gemeten d.m.v. HPLC met MS detectie. Deze methode laat toe om HBA te meten zonder derivatisatie. Door de relatief hoge concentratie waarin de component wordt gedetecteerd kan bovendien de monstervoorbereiding sterk gereduceerd worden. Hierdoor zal de foutenmarge op de analyse beperkt zijn. Er werd vooraf getest wat de invloed is van een bijkomende hydrolysestap met β -glucuronidase (4 stalen). Uit deze analyse blijkt dat de waarden met hydrolyse tussen 90% en 110% van de waarden zonder hydrolyse liggen. Er is dus geen significant verschil tussen analyse van HBA met en zonder hydrolyse.

De finale methode gebeurde als volgt: urinestalen werden gefilterd met een spuitfilter (0,2 µm). Hiervan werd 1 mL genomen er werd een isotoop gelabelde inwendige standaard (¹³C₆-p.hydroxybenzoëzuur) aan toegevoegd. De oplossing

werd rechtstreeks geïnjecteerd in een LC-MS/MS, nl. Agilent 1200 LC – 6410 Triple Quadrupole MS systeem.

De LOD bedroeg 50 µg/L; de LOQ bedroeg 100 µg/mL.

Als kwaliteitscontrole werden op regelmatige basis gespikete stalen toegevoegd, en werd de recovery berekend.

De methode voor de meting van **triclosan (TCS) in urine** werd beschreven door Geens et al. (Geens, Neels et al., 2009). Om het totaal (vrij en geglycuronideerd) TCS te kunnen bepalen, wordt 50 µL β-glucuronidase/arylsulfatase toegevoegd. Deze enzymatische hydrolyse vindt optimaal plaats bij pH 4,5-5. Hiervoor wordt er 0,75 mL acetaatbuffer 2M toegevoegd.

TCS wordt vervolgens geëxtraheerd uit de urine door middel van vaste-fase extractie (SPE) op OASIS HLB cartouches (60 mg, 3 mL). BPA en TCS wordt weerhouden op de kolom en vervolgens geëluëerd met 5 mL methanol:dichloromethaan (1:1, v/v). Het extract wordt volledig drooggedampt en heropgelost in 1 ml water en 2 ml hexaan. Na het toevoegen van het derivatisatiereagens pentafluorobenzoylchloride (PFBCI) verdelen de gevormde derivaten zich naar de hexaanfase. Deze hexaanfase wordt vervolgens opgezuiverd op 0.2 g zure silica (10% w/w, geconc. zwavelzuur), waarna het TCS-derivaat met 6 mL dichloromethaan geëluëerd wordt. Tenslotte wordt het opgezuiverde extract drooggedampt onder stikstof en gereconstitueerd in 100 µL iso-octaan.

Het extract wordt gescheiden van de andere nog aanwezige componenten door middel van gas chromatografie en gedetecteerd met een massaspectrometer operatief in negatieve chemische ionisatie. Er wordt gebruik gemaakt van een 30 m × 0.25 mm × 25 µm DB-5 kolom.

De LOQ bedraagt 0,1 µg/L en de LOD 0,05 µg/L.

Simultaan met de meting van TCS gebeurt ook de analyse van bisphenol A (BPA) in urine (zie eerder).

Parabenen in bloed (methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- en benzylparaben)

De meting van de metaboliëten van fungiciden gebeurde op gepoolde urinestalen van jongeren (n=5) en volwassenen (n=5).

De meting gebeurde op basis van de procedure van Kato et al. (Kato, Silva et al. 2003). Aan 400 µL bloed wordt 40 µL fosforzuur (1M), 1 mL ammoniumacetaatbuffer (2,5M; pH 6,5) en 80 µL β-glucuronidase oplossing toegevoegd. Er wordt geïncubeerd bij 37°C gedurende 90 minuten. Na toevoegen van ethylacetaat wordt 30 minuten geschud, waarna de oplossing wordt gecentrifugeerd. De ethylacetaat fase wordt gedroogd onder N₂. Het residu wordt opgelost in water/acetonitrile (50/50) en de parabenen worden gedetecteerd door middel van LC-MS/MS. De analyses worden uitgevoerd op een Agilent Triple Quadrupole systeem. Alle componenten worden gemeten in negatieve ionisatie mode.

De LOD bedraagt 0,3 ng/mL voor methyl- en propylparaben, 0,2 ng/mL voor ethylparaben en 0,1 ng/mL voor butyl- en benzylparaben. De LOQ bedraagt 0,5 ng/mL voor alle parabenen.

UV filters in bloed (BP-3, DHB, DHMB, THB, 4-MBC, HMS, DABI)

De meting van de UV filters gebeurde op gepoolde urinestalen van jongeren (n=5) en volwassenen (n=5).

Volgende componenten werden gemeten: benzofenon-3 (BP-3), 2,4-dihydroxybenzofenon (DHB), 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzofenon (DHMB), 2,3,4-

trihydroxybenzofenon (THB), 4-methylbenzylidenecamfor (4-MBC), homosalate (HMS), en octyl dimethyl amino benzoaat (DABI).

Voor octyl methoxy cinnamaat (OMC), isoamyl p-methoxycinnamaat (IMZ), en 3-benzylidene camfor (3-BC) was geen referentiemateriaal beschikbaar.

2 mL bloed werd geëxtraheerd met 2 mL ethylacetate. De ethylacetaat-fractie werd gedroogd en heropgelost in 200 µL methanol. De analyse werd uitgevoerd met LC-MS/MS in MRM mode.

De LOD/LOQ waarden waren respectievelijk 0,10 ng/mL en 0,21 ng/mL voor HMS; 0,03 ng/ml en 0,06 ng/mL voor DABI; 0,17 ng/ml en 0,34 ng/mL voor 4-MBZ; 0,07 ng/ml en 0,14 ng/mL voor DHMB; 0,25 ng/ml en 0,50 ng/mL voor THB; en 0,02 ng/ml en 0,05 ng/mL voor DHB en BP-3.

Tabakrook

Cotinine in urine werd gemeten met Immulite Nicotine Metabolite kit op Immulite 2000 Analyzer volgens de instructies van de fabrikant. Het betreft hier een kwantitatieve solid-phase chemiluminescent Immunoassay.

De analytische gevoeligheid (LOD) bedroeg 5 ng/mL; de LOQ bedroeg 10 ng/mL.

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.

Elovaara E, Vaananen V, et al. Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with beta-naphthoflavone induction in the rat. *Arch Toxicol* 2003; 77(4): 183-93.

Geens T, Neels H, Covaci A. Sensitive and selective method for the determination of bisphenol-A and triclosan in serum and urine as pentafluorobenzoate-derivatives using GC-ECNI/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009 Dec 1;877(31):4042-6. Epub 2009 Oct 22.

Hardt J, Angerer J. Determination of dialkyl phosphates in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2000;24(8): 678-84.

Kato K, Silva MJ, et al. Quantitative Detection of Nine Phthalate Metabolites in Human Serum Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 2003; 27(5):284-289.

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.

Lindh C, Littorin M, Johannesson G, Jönsson B. Analysis of ETU as a biomarker in human urine using LC-MS-MS (QQQ). *Rapid communications in Mass Spectrometry* 2008; 22:2573-2579.

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.

Olsson AO, Baker SE, et al. A liquid chromatography--tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus

pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and deet in human urine. *Anal Chem* 2004;76(9):2453-61.

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.

Simpson C D, Wu MT, et al. Determination of r-7,t-8,9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in human urine by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 2000;13(4): 271-80.

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.

Weston A, Bowman EB, et al. Detection of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *Carcinogenesis* 1993; 14(5): 1053-5.