

Samenvatting

De grote uitdaging van dit moment op het gebied van milieuchemisch onderzoek is de toenemende complexiteit van de te analyseren monsters. Dagelijks worden nieuwe chemicaliën ontwikkeld en op de markt gebracht and vele van deze stoffen vinden hun weg naar het milieu. Daarmee wordt de uitdaging voor analytische milieuchemici om te bepalen welke contaminanten mogelijk schadelijk zijn steeds ingewikkelder. Non-target analyse wordt daarom steeds populairder. Dit onderzoek laat zien dat comprehensive tweedimensionale vloeistofchromatografie (LC × LC) gekoppeld met hoge resolutie massaspectrometrie (HRMS) een veelbelovend hulpmiddel is voor het uitvoeren van non-target en effect-gestuurde analyse (EDA) van complexe milieumonsters.

De achtergrond en de doelstellingen van dit onderzoek zijn toegelicht in Hoofdstuk 1. Bij toepassing van vloeistofchromatografie gekoppeld met massaspectrometrie (LC-MS) voor non-target analyse wordt de identificatie van milieucontaminanten in complexe monsters bemoeilijkt door het gebrek aan scheidend vermogen. Hoewel EDA middels de combinatie van bioassays, fractionering en chemische analyse een bruikbare methode is voor de evaluatie van complexe milieumonsters (b.v. effluent, sediment, huisstof en biota) wordt op vergelijkbare wijze de bredere toepassing van EDA in milieuonderzoek beperkt door de resolutie van de fractionering en door de doorvoer van de bioassays. LC × LC is een techniek die in ontwikkeling is en die zich kenmerkt door een hoog scheidend vermogen en de toepassing van meervoudige selectiviteit door de combinatie van twee HPLC kolommen met verschillende stationaire fases. Hoewel er binnen het milieuonderzoek tot nu toe slechts een handvol LC × LC toepassingen gepubliceerd is, heeft de techniek een geweldig potentieel voor de analyse van complexe milieumonsters. Het doel van dit onderzoek was derhalve om LC × LC toe te passen voor zowel non-target analyse als EDA om te komen tot een verdere ontrafeling van de samenstelling van complexe milieumonsters.

De non-target analyse met behulp van LC × LC is succesvol toegepast in de karakterisering van een effluentmonster van een rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI) zoals beschreven in Hoofdstuk 2, maar ook in matrices zoals huisstof en textielpluis uit een wasdroger (Hoofdstuk 3). LC × LC is gekoppeld met hoge resolutie 'time of flight'

Samenvatting

massaspectrometrie (ToF-MS) met een electrospray (ESI) ionisatiebron. Om de flowsnelheid na de tweede dimensie van het LC × LC systeem te transformeren naar een flowsnelheid die compatibel is met het ESI-ToF MS interface is gebruik gemaakt van een flow splitter. Verschillende combinaties van stationaire fases zijn getest en er is aandacht is besteed aan de herhaalbaarheid van de retentietijd en de orthogonaliteit van de LC × LC scheiding. Voor het RWZI-effluent leverde de combinatie van stationaire fases gebaseerd op C18 en PFP de beste orthogonaliteit. Vanwege de grote compatibiliteit van de oplosmiddelen en het complementaire scheidingsmechanisme is de combinatie van hydrofiele interactie vloeistofchromatografie (HILIC) en C18 of andere typen reversed phase vloeistofchromatografie een mogelijke invalshoek voor toekomstig onderzoek. Vermeldenswaard is dat bij de toepassing van LC × LC een significante vermindering van het matrix effect optrad, wat bijdroeg aan een essentieel aspect van milieuchemische analyse, namelijk een betere en gemakkelijkere identificatie met behulp van HRMS op basis van de gemeten accurate massa en het isotopenpatroon. De mogelijke molecuulformules voor identificatie van contaminanten zijn gescreend in online databases (b.v. KEGG, Chempid, Metlin) om te juiste stoffen te vinden. Met deze aanpak zijn tientallen interessante milieucontaminanten geïdentificeerd in RWZI-effluent, huisstof en wasdrogerpluis. Voor de kandidaatstoffen die commercieel verkrijgbaar waren als analytische standaard is ter bevestiging van hun identiteit en voorkomen in de onderzochte monsters een methode ontwikkeld waarbij de retentietijd in de beide dimensies aan strikte criteria moest voldoen.

Voor de verdere ontwikkeling van het gebruik LC × LC in EDA is ter bevordering van de doorvoer een FITC-T4/TTR bindingsassay geminiaturiseerd voor toepassing in 96 well plate formaat, waarmee de bepaling van schildhormoonverstoring in milieumonsters mogelijk werd (Hoofdstuk 4). Om een hoge doorvoer te bereiken in EDA zijn de meer traditionele in vitro assays (b.v. bindingsassays op basis van radioliganden) vanwege de hoge kosten en de omslachtige procedures niet geschikt. De geminiaturiseerde FITC-T4/TTR bindingsassay, waarbij van een fluorescente probe gebruik wordt gemaakt, is succesvol toegepast voor de karakterisering van acht (potentieel) schildklierhormoonverstorende stoffen uit verschillende klassen van verbindingen, zoals de gehydroxyleerde polychloorbifenylen (OH-PCBs), per- en

Samenvatting

polyfluoralkylverbindingen (PFASs), gehydroxyleerde polybroomdifenylethers (OH-PBDEs) en andere gebromeerde vlamvertragers (BFRs). De assay is ook toegepast om de schildklierhormoonverstoring in 22 eieren van zilvermeeuwen afkomstig van twee verschillende locaties in Noorwegen te onderzoeken. De gevoeligheid van de assay was over het algemeen één orde van grootte lager dan de klassieke assay gebaseerd op radioligandbinding, maar de doorvoer was ten minste honderdmaal hoger en de kosten waren substantieel lager. Hoewel de FITC-T4/TTR assay speciaal ontwikkeld was voor toepassing in EDA gebruikmakend van LC × LC fractionering, is gebleken dat de assay ook uitstekend geschikt is voor screeningsdoeleinden waar hoge doorvoer van belang is. De assay is mogelijk een goed alternatief voor de radioligandbindingsassay, bijvoorbeeld voor de screening op schildklierhormoonverstoring van RWZI-effluenten, oppervlaktewater, sediment, bodem en huisstof.

Voor een EDA studie beschreven in Hoofdstuk 5 is een andere hoge doorvoer bioassay gebruikt, namelijk de acetylcholinesterase (AChE) inhibitie assay in combinatie met LC × LC-ToF MS. De hoge piek capaciteit die kenmerkend is voor LC × LC maakte de implementatie mogelijk van een hoge resolutie fractionering na de kolom, waarmee tegelijkertijd verdere fractioneringsstappen voor de identificatie van toxische stoffen vermeden konden worden. Vanwege de veel hogere resolutie van de scheiding en de fractionering van het LC × LC systeem was het mogelijk om voor iedere actieve fractie een veel kleiner aantal kandidaat stoffen in beschouwing te nemen, terwijl ook de ionsuppressie in de massaspectrometer gereduceerd werd. Door het gebruik van een splitter na het kolomsysteem was het mogelijk om de fractionering voor de bioassay en de massaspectrometrische detectie parallel uit te voeren. De toxiciteit in de fracties en de chemische identiteit konden aan elkaar gerelateerd worden via de retentietijd en het nummer van de fractie. Uiteindelijk kon de totale doorlooptijd die nodig was voor een EDA studie van een complex milieumonster worden teruggebracht van enkele maanden tot een paar weken door toepassing van hoge resolutie LC × LC fractionering, parallelle LC × LC-ToF MS identificatie en een hoge doorvoer bioassay.

Ten slotte zijn in Hoofdstuk 6 de in dit proefschrift beschreven resultaten kritisch belicht en zijn de verdere mogelijkheden voor toepassing van LC × LC benoemd . Met de

Samenvatting

ontwikkelde LC × LC techniek is een toename in het scheidend vermogen gerealiseerd, alsmede een hogere doorvoer in non-target en target analyse van milieucontaminanten. Door de toepassing van verschillende combinaties van stationaire fases en koppeling met verschillende MS interfaces is het potentieel van deze techniek groter dan de applicaties die zijn beschreven in dit proefschrift. Tevens kan EDA op basis van LC × LC fractionering worden toegepast voor de screening van biologisch actieve stoffen in andere complexe matrices dan milieumonsters. Echter, LC × LC is mogelijk niet in alle gevallen goed toe te passen in de milieuanalyse. Vanwege de intrinsieke eigenschappen van LC × LC gaat de noodzakelijke, zeer snelle scheiding in de tweede dimensie ten koste van de gevoeligheid. Daarom komt LC × LC het best tot zijn recht in die gevallen waar het monster voldoende complex en geconcentreerd is. Ideale monsters voor LC × LC analyse zijn bijvoorbeeld extracten die zijn verkregen met behulp van passieve sampling en groot volume vaste fase extractie.