

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU
BILTHOVEN

Rapport nr. 529102 005

**Het ontwikkelen en valideren van een
analysemethode voor arseen in urine**

E. van Heerde, A. van Ooik, J.W. van Loon
en R. Ritsema

januari 1997

Dit onderzoek werd verricht ten behoeve en ten laste van de Inspectie voor de Gezondheidszorg (IGZ) en is beschreven in project 529102: "Monitoring van contaminanten, humaan" van het MAP Volksgezondheid.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven,
Tel. 030-2749111, fax 030-2742971.

VERZENDLIJST

- 1 - 2 Inspectie Gezondheidsbescherming
- 3 - 4 Inspectie voor de Gezondheidszorg + Bestuursraad
- 5 Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
- 6 - 7 Veterinaire Inspectie
- 8 Voorzitter van de Gezondheidsraad
- 9 Hoofddirecteur Gezondheidsbescherming
- 10 Directie Preventie Algemene Gezondheidszorg en Opleidingen
- 11 Directie Voeding en Veiligheid van Producten
- 12 - 13 Hoofdinspectie Milieuhygiëne
- 14 Directeur-Generaal Milieubeheer
- 15 Redactie "De Ware(n)-Chemicus"
- 16 Depot van Nederlandse publikaties en Nederlandse bibliografie
- 17 Directie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
- 18 J.J.L. Pieters, Ministerie van VWS/IGZ
- 19 Prof. Dr. Ir. D. Kromhout
- 20 Dr. H.A. van 't Klooster
- 21 Dr. Ir. E. Lebret
- 22 Dr. C.E.J. Cuijpers
- 23 Ir. H. van de Wiel
- 24 - 28 Laboratorium voor Anorganisch-analytische Chemie (LAC)
- 29 - 30 Laboratorium voor Analytisch Residu-onderzoek (ARO)
- 31 - 34 Auteurs
- 35 Hoofd Voorlichting en Public Relations
- 36 Bibliotheek RIVM
- 37 Bureau Rapportenregistratie
- 38 - 57 Bureau Rapportenbeheer

INHOUDSOPGAVE

	bladzijde
Verzendlijst	2
Abstract	4
Samenvatting	5
1. Inleiding	6
2. Monstermateriaal	8
3. Selectie van een destructiemethode	9
4. Optimaliseren van de UV-destructie	11
5. Validatie van de UV-destructie / FIA-AAS meting	14
5.1 Validatie parameters	14
5.2 Resultaten van de validatie	14
6. Conclusie	19
Literatuur	20
Bijlage: arseenspeciëatie in urine met HPLC - ICP/MS	21

NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT
BILTHOVEN

Report number 529102 005

**Development and validation of an
analytical method for arsenic in urine**

E. van Heerde, A. van Ooik, J.W. van Loon
and R. Ritsema

January 1997

ABSTRACT

The development and validation of a method for analysing arsenic in urine samples of general population is described. Measurements were performed by FIA-AAS based on reduction of inorganic arsenic to arsine. In this way only inorganic arsenic could be quantified. For total arsenic determination in urine a digestion should be performed in order to convert organic-bound arsenic into its inorganic form.

A method of UV-photodestruction was optimised followed by establishing the performance characteristics of the entire procedure. The limit of detection was found to be 0.35 µg As/l urine; repeatability and within lab reproducibility were better than 5% and 8% respectively (calculated as relative standard deviation) for arsenic concentrations above 3 µg/l. The method was also validated with certified reference materials of human urine. Results obtained were well within the certified intervals. For reasons of comparison several urine samples, analysed with the developed method, were analysed by HPLC - ICP/MS. Arsenic concentrations in the urine samples, measured by both methods, did not differ significantly.

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU
BILTHOVEN

Rapport nr. 529102 005

**Het ontwikkelen en valideren van een
analysemethode voor arseen in urine**

E. van Heerde, A. van Ooik, J.W. van Loon
en R. Ritsema

januari 1997

SAMENVATTING

Beschreven is het onderzoek voor het ontwikkelen en valideren van een gevoelige analyse-methode voor de bepaling van de concentratie aan totaalarseen in urine in de algemene bevolking. De metingen werden verricht met hydride FIA-AAS gebaseerd op vorming van arseenhydrides. Daar alleen anorganisch arseen middels deze techniek gemeten kon worden is een geschikte monstervoorbewerkingsstap nodig voor de omzetting van organisch gebonden arseen in anorganisch arseen.

Een UV-destructiemethode werd geoptimaliseerd waarna de prestatiekenmerken van de gehele procedure werden vastgesteld. De aantoonbaarheidsgrens werd bepaald op 0,35 µg As/l urine; de herhaalbaarheid en de binnenlaboratorium reproduceerbaarheid waren beter dan respectievelijk 5 en 8% (uitgedrukt als relatieve standaarddeviatie) voor arseenconcentraties van meer dan 3 µg/l. De methode werd tevens gevalideerd met gecertificeerde referentiematerialen humane urine. De gemeten resultaten lagen ruim binnen de gecertificeerde intervallen.

Diverse monsters urine, gemeten met de ontwikkelde methode, werden ter vergelijking gemeten met HPLC - ICP/MS. De met deze beide methoden gemeten arseenconcentraties in de monsters urine verschilden niet significant.

1. INLEIDING

Het hier beschreven onderzoek is onderdeel van het bewakingsprogramma "Mens en Voeding" en wordt uitgevoerd in opdracht van de Inspectie voor de Gezondheidszorg (IGZ). De doelstelling van dit humane deel van het bewakingsprogramma is het vaststellen van de gehalten aan contaminanten in lichaamsmateriaal van een goed gedefinieerde populatie uit de Nederlandse bevolking. Enerzijds vindt periodiek onderzoek plaats teneinde veranderingen te kunnen waarnemen: de trendmeting; anderzijds wordt door een eenmalig onderzoek een referentiewaarde van een contaminant verkregen bij niet specifieke blootstelling.

Een onderdeel van dit onderzoek, met name ten aanzien van de elementcontaminanten, is het vaststellen van een referentiewaarde voor de concentratie aan arseen in humane urine. Gekozen is hiervoor de "worst case" benadering door een bepaling van de concentratie aan totaalarseen, hetgeen overeen komt met de uitgescheiden hoeveelheid arseen in de urine die volledig biologisch beschikbaar is ongeacht de bindingsvorm.

De concentratie aan totaalarseen in urine van mensen die in de voorgaande drie dagen geen vis(producten) hebben gegeten varieert van 1 tot 20 µg/l [1,2].

In voedsel komt arseen deels in anorganische vorm voor hetgeen in het lichaam kan leiden tot een omzetting in dimethylarsinezuur $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})]$. In urine van personen die vis- of visproducten hebben geconsumeerd zijn daarentegen arseenconcentraties tot 200 µg/l geregistreerd in de vorm van arsenobetaine $[(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-]$ [3,4,5].

Een methode om de concentratie aan totaalarseen in biologisch materiaal te bepalen is reeds beschikbaar en bestaat uit een natte ontsluiting gevolgd door een reductie van het arseen tot As (III) waarna arseenhydride wordt gevormd. Na een kleurreactie met dit hydride vindt een spectrofotometrische meting plaats. Deze methode, beschreven in SOP nr ARO/019, is ten eerste arbeidsintensief en ten tweede dient relatief veel monstermateriaal, 30 ml urine, in bewerking te worden genomen om een aantoonbaarheidsgrens van 5 µg As/l haalbaar te maken. In het kader van het beoogde bevolkingsonderzoek is dus een alternatieve methode gewenst met een grotere gevoeligheid die tevens minder arbeidsintensief is.

Voor de bepaling van arseen in urine is gekozen voor een meting op basis van hydride Flow Injection Analysis-Atomic Absorption Spectrometry (hydride FIAS-AAS) [1,6]. De meetmethode wordt toegepast voor waterige oplossingen en is onder SOP nr LAC/M108 reeds enkele jaren operationeel. De procedure is relatief eenvoudig toe te passen en heeft een aantoonbaarheidsgrens van 0,10 µg As/l. Het nadeel van hydride FIA-AAS meting is dat alleen met anorganisch arseen hydrides gevormd kunnen worden en een extra monstervoorbewerkingsschap nodig is om het organisch gebonden arseen om te zetten in anorganisch arseen [7].

De oxidatiepotentiaal van salpeterzuur, die in verschillende destructie-omstandigheden wordt toegepast, blijkt onvoldoende voor een kwantitatieve arseenbepaling. Veelal wordt deze

potentiaal verhoogd door toevoeging van een krachtiger oxidatiemiddel zoals perchloorzuur [1,8]. Recent is een UV-destructieapparaat ter beschikking gekomen waarmee het organisch gebonden arseen in de vloeibare fase omgezet kan worden in anorganisch arseen en op deze wijze geschikt te maken voor de hydride FIA-AAS meting [9].

Het onderzoek beschreven in dit rapport omvat het ontwikkelen van een methode voor de bepaling van de concentratie aan totaalarseen in urine gericht op de haalbaarheid van een UV-destructie in combinatie met de hydride FIA-AAS meting. Validatie van de analysemethode vindt plaats aan de hand van de criteria: aantoonbaarheidsgrens, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid, juistheid en terugvindingspercentage. Het onderzoek werd in 1996 uitgevoerd volgens het onderzoeksplan 96/LAC/529102/Cons.urine/00.

2. MONSTERMATERIAAL

De methode gebaseerd op een UV-ontsluiting gevolgd door de hydride FIA-AAS meting werd uitvoerig getest met monsters "spot"-urine die werden verzameld door enkele vrijwilligers. Een deel van de vrijwilligers had op de dag voorafgaand aan de monstername vis geconsumeerd. De monsters "spot"-urine werden verzameld in, met salpeterzuur en gedeïoniseerd water gereinigde, polyetheen verzamelvaten.

De meetresultaten werden gerelateerd aan standaardoplossingen arseen gemaakt uit een As(V)-oplossing van 1000 µg/l in 2% HNO₃ (Perkin Elmer). Verdunningen van deze oplossing werden tevens gebruikt voor terugvindingsexperimenten waarbij anorganisch arseen werd toegevoegd aan monsters urine.

Ten aanzien van metingen en terugvindingsexperimenten met organisch-gebonden arseen werd uitgegaan van een dimethylarsinezuur-oplossing (DMA) van 4,98 µg As/l, bereid uit de vaste stof dimethylarsinezuur van Merck, en van een arsenobetaine-standaardoplossing van 409 µg As/l, afkomstig van een BCR-ringonderzoek van 1991. De arseenconcentratie van deze oplossing werd gecontroleerd volgens SOP nr LAC/M259 waarbij Inductively Coupled Plasma - Atomaire Emission Spectrometry (ICP-AES) werd toegepast.

Een referentiemateriaal urine met gecertificeerde concentraties voor arseen, analoog aan de verwachte normaalwaarden van 1 - 20 µg As/l bij niet-viseters, bleek niet beschikbaar. De analysemethode voor arseen werd daarom getoetst met het referentiemateriaal "Kontroll-Urin für Metalle 2", lotnr. 625302, Lanonorm/Behring Institute/Duitsland (gecertificeerde waarde aan arseen: 199 ± 13 µg /l) en met het standaardreferentiemateriaal SRM-2670 van NIST/USA (gecertificeerde waarde aan arseen: 480 ± 100 µg /l). Verder werd het referentiemateriaal "Trace Elements Urine", lotnr. 403125 van Seronorm/Noorwegen met een indicatieve waarde van 101 µg As/l eveneens geanalyseerd. De drie referentiematerialen zijn gevriesdroogde monsters urine van humane oorsprong die na reconstitutie met water geschikt zijn voor analyse. De aangegeven concentraties aan totaal arseen zijn berekend op basis van de gereconstitueerde urine.

3. SELECTIE VAN EEN DESTRUCTIEMETHODE

Een meetmethode die gevoelig genoeg is om anorganisch arseen te meten op het beoogde niveau is reeds operationeel en staat beschreven in SOP nr LAC/M108/02: "Bepaling van de concentratie aan arseen in grond- en drinkwater met behulp van hydridegeneratie- en flow injectietechniek en atomaire absorptiespectrometrie". Uitgaande van As(III) in de meetoplossing wordt met deze methode het hydride AsH_3 gevormd dat uit de oplossing met een stikstofstroom door een verwarmde kwarts cuvet wordt geleid waar de atomaire absorptie bij 193,7 nm wordt gemeten. Aanwezig As(V) wordt vooraf in de meetoplossing gereduceerd tot As(III) met kaliumjodide/ascorbinezuur.

In urine kan arseen echter in verschillende organisch gebonden vormen voorkomen zoals b.v. arsenobetaine. Teneinde de concentratie aan totaalarseen van een monster te kunnen meten werd getracht de methode uit te breiden met een ontsluitingsprocedure waarmee organisch gebonden arseen omgezet werd in het meetbare anorganisch arseen.

In eerste instantie werd de haalbaarheid bekeken van een drukvatontsluiting. Een analyseportie van het monstermateriaal werd met salpeterzuur in een drukvat bij 150°C gedestruëerd waarna de resulterende oplossing met perchloorzuur in een destructiekolf werd ingedampt tot perchloorzuurdampen ontweken. Na verdunnen werd gemeten met hydride FIA-AAS. Een relatief hoge blancobijdrage, lage opbrengsten en een grote spreiding in de resultaten werden gevonden. Zowel mogelijke contaminatieproblemen als de uitgebreide en arbeidsintensieve bewerkingstijd maakten de procedure ongewenst.

Een alternatief vormde de destructie met een microgolfoven. Hierbij werd een analyseportie van het monster met een zuurmengsel in een afgesloten kunststof vat verhit met microgolffenergie van 2450 Mhz. Ter optimalisering van de ontsluiting werd het toegepaste vermogen alsmede de destructietijd gevarieerd. Tevens werden meerdere zuurmengsels getest variërend van verdund tot geconcentreerd salpeterzuur, terwijl ook mengsels werden getest van 5 ml salpeterzuur met een toevoeging van waterstofperoxyde (5+2) of van perchloorzuur (5+1).

De experimenten werden uitgevoerd met de monsters standaardreferentiemateriaal "Kontroll-Urin für Metalle 2" van Lanonorm en "Mussel tissue", BCR-278 alsmede met een oplossing DMA van 20,1 $\mu\text{g As/l}$. Destructie met salpeterzuur bleek voor het urinemonster voldoende te zijn om meetresultaten te verkrijgen aan de ondergrens van het lineaire gebied.

De terugvindingspercentages voor de DMA oplossing waren echter teleurstellend en varieerden van 6 - 12% ongeacht het gebruikte destructiemengsel. De resultaten toonden aan dat organisch gebonden arseen niet of nauwelijks omgezet werd in de anorganische vorm.

Recent is een destructiemethode ter beschikking gekomen waarmee met een UV-bestraling organo-arseen verbindingen zijn te ontleden tot anorganisch arseen [10,11,12]. Deze UV-destructor bestaat uit een centraal geplaatste 'high pressure' kwiklamp van 500 W waaromheen

kwarts reactievaten geplaatst worden. De reactievaten worden met water van 18°C gekoeld, waarbij de inhoud een temperatuur bereikt van $90 \pm 5^\circ\text{C}$, en zijn zodanig afgesloten dat ze gevrijwaard zijn van een overdruk. Aan het monster wordt waterstofperoxyde en zwavelzuur toegevoegd voor het katalytisch initiëren en het vormen van radicalen.

De destructiecapaciteit van de UV-structor werd getest door standaardoplossingen van twee organisch-gebonden arseenverbindingen te meten als zijnde monsters. Vijf porties DMA met een concentratie van $4,98 \mu\text{g As/l}$ werden gedestruëerd en gemeten. Gemiddeld werd $5,33 \mu\text{g As/l}$ gemeten hetgeen overeenkwam met een opbrengst van 106,9% ten opzichte van de initiële hoeveelheid. De spreiding in de meetresultaten (RSD) bedroeg 1,3%.

Op dezelfde wijze werden tien porties van een arsenobetaine-standaard gemeten. Van deze verbinding bedroeg de opbrengst 104,4% met een RSD van 2,6% waarbij werd uitgegaan van een initiële concentratie van $4,09 \mu\text{g As/l}$. De geteste UV-destructiemethode bleek de organo-arseen verbindingen in voldoende mate te ontleden.

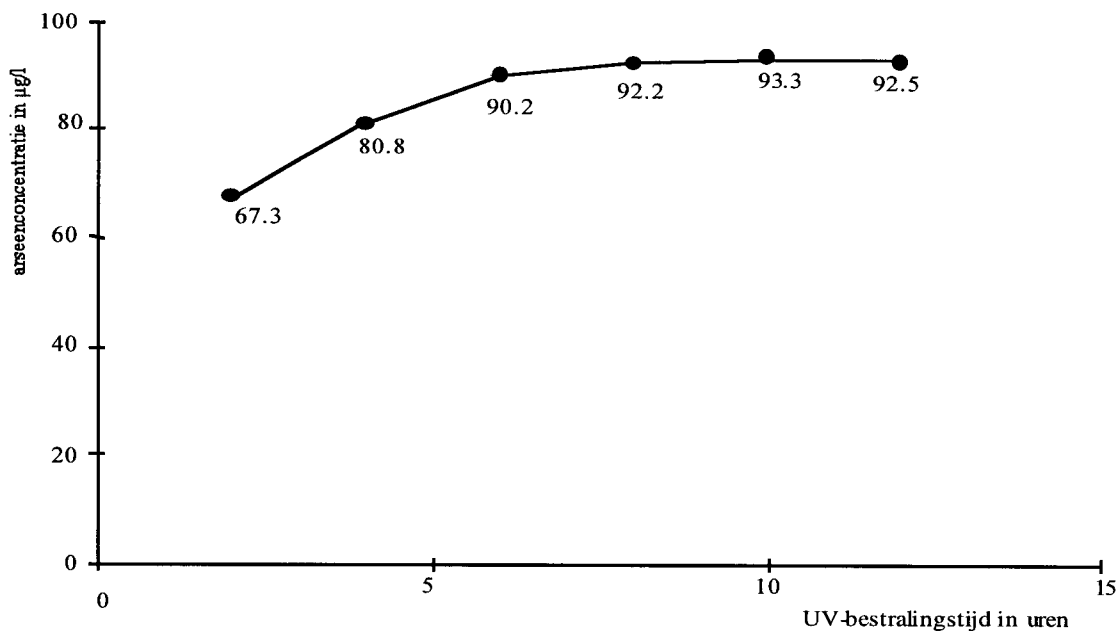
4. OPTIMALISEREN VAN DE UV-DESTRUCTIE

Teneinde een volledige UV-destructie van monsters urine te verkrijgen werden de volgende parameters geoptimaliseerd: a) de UV-bestralingstijd, b) de hoeveelheid H_2O_2 en c) de matrixafhankelijkheid.

a) UV-bestralingstijd

Aan 10 ml analyseporties van een vijfmaal verdund monster urine werd arsenobetaine toegevoegd tot een concentratie van ongeveer 90 μg As per liter. Per portie werden telkens de gestandaardiseerde hoeveelheden van 100 μl H_2SO_4 (40% w/v) en 200 μl H_2O_2 (30% w/v) toegevoegd. Het volume dat initieel 10,3 ml bedroeg werd door weging vóór en ná de UV-bestraling gecontroleerd. Voor het geringe verlies door verdamping werd gecorrigeerd waarbij werd aangenomen dat er geen verlies aan arseen optrad. De bestralingstijd werd gevarieerd en bedroeg 2, 4, 6, 8, 10 en 12 uur.

In Figuur 1 zijn de gemiddelden van duplo meetresultaten per bestralingstijd grafisch weergegeven.



FIGUUR 1 Arseenconcentraties gemeten na verschillende bestralingstijden in het UV-destructieapparaat.

Uit Figuur 1 kwam duidelijk naar voren dat na acht uur UV-bestraling geen toename van het meetbare anorganisch arseen werd waargenomen en het arsenobetaine derhalve kwantitatief werd teruggevonden. De destructietijd werd vastgesteld op acht uur hetgeen bij alle verdere experimenten ongewijzigd is gebleven.

b) hoeveelheid H₂O₂

Aan porties van 10 ml van een vijfmaal verdunde urine, met een hoge concentratie aan organisch arseen, werd telkens 100 µl H₂SO₄ (40% w/v) en H₂O₂ (30% w/v) toegevoegd waarna op de hiervoor beschreven wijze werd gedestruëerd. De toegevoegde hoeveelheden H₂O₂ bedroegen 200, 400, 600, 800 en 1000 µl. Als eindvolume werd voor iedere destructie 10 ml aangehouden. In de volgende tabel zijn de resultaten van de arseenmetingen vermeld die verkregen werden na genoemde foto-oxydatie.

TABEL 1 *Gemeten arseenconcentraties in urine na acht uur UV-destructie met wisselende hoeveelheden waterstofperoxyde (30% w/v).*

Hoeveelheid H ₂ O ₂ in µl	Arseenconcentratie in µg/l
200	74,3
400	74,2
600	67,0
800	68,1
1000	69,2

Een verband tussen de toegevoegde hoeveelheid H₂O₂ en de gemeten hoeveelheid anorganisch arseen in de destruataten werd niet gevonden. De spreiding in de meetresultaten was in dezelfde orde van grootte als de spreiding die onder herhaalbaarheidsomstandigheden verwacht kon worden. De hoeveelheid H₂O₂ werd bij de verdere experimenten arbitrair op 500 µl per destructie vastgesteld.

c) matrix afhankelijkheid

Teneinde mogelijke matrixeffecten te kunnen bestuderen werd een geconcentreerde ochtendurine geanalyseerd nadat analyseporties hiervan in verschillende verhoudingen waren verdund. De urine werd vooraf verrijkt met 40 µg As/l in de vorm van arsenobetaine. De verdunde porties (10 ml) werden gedurende acht uur met UV-licht gedestruëerd op de hiervoor aangegeven wijze. De toegepaste verdunningsfactoren waren: 0, 1, 2, 5 en 10 maal. Per verdunning werd het gemiddelde van het duplo meetresultaat, berekend als de arseenconcentratie van de oorspronkelijke urine, in Tabel 2 weergegeven.

TABEL 2 *Gemiddelde (n=2) arseenconcentratie van een monster ochtendurine, verrijkt met arsenobetaine, gemeten na UV-destructie van diverse verdunningen.*

Verdunningsfactor	Arseenconcentratie in µg/l
0	109,3
1	112,3
2	108,0
5	113,9
10	105,8

Uit de resultaten bleek duidelijk dat de gemeten arseenconcentraties onafhankelijk waren van de toegepaste verdunningen. Matrixeffecten traden niet op en de geconstateerde spreiding in de meetresultaten viel binnen de verwachte spreiding van de methode. Afhankelijk van de arseenconcentratie konden monsters urine onverdund of verdund tot een verhouding 1:10 gemeten worden om het meetsignaal binnen het lineaire gebied te brengen. In de praktijk zullen urinemonsters vijfmaal verdund worden waarmee een afdoende lage aantoonbaarheidsgrens en een adequaat lineair bereik verkregen worden.

De uiteindelijke methode voor de bepaling van de concentratie aan totaalarseen in urine staat uitvoerig beschreven in twee standaard procedures. In SOP nr LAC/M372 is de UV-destructie procedure met de Metrohm 705 UV-digestor weergegeven terwijl de Hydride FIA-AAS meting van de destruat met de Perkin Elmer 2100, voorzien van een geautomatiseerd hydridegeneratiesysteem, is beschreven in SOP nr LAC/A371. Kort weergegeven wordt de analyse als volgt uitgevoerd:

Een analyseportie urine van 2,00 ml wordt in een kwarts destructievat gepipetteerd. Na toevoeging van 8,00 ml water, 100 μl H_2SO_4 (40% w/v) en 500 μl H_2O_2 (30% w/v) wordt het destructievat gedurende 8 uur bestraald met UV-licht van 254 nm. Met koelwater van 18°C wordt de temperatuur van het mengsel op $90 \pm 5^\circ\text{C}$ gehandhaafd. Het gewichtsverlies tijdens de destructie wordt gemeten waarvoor in het eindresultaat wordt gecorrigeerd.

In 5 ml van het destruaat wordt het As(V) met een oplossing van kaliumjodide en ascorbinezuur in zoutzuur milieu gereduceerd tot As(III) dat met natriumboorhydride omgezet wordt in het vluchtige arseenhydride. Met een stikstofstroom wordt het arsine door een verwarmde kwarts cuvet geleid en de atomaire absorptie bij 193,7 nm gemeten. De absorptie bij deze FIA-AAS meting is een maat voor de hoeveelheid arseen.

5. VALIDATIE VAN DE UV-DESTRUCTIE / FIA-AAS METING

5.1 Validatie parameters

Teneinde de prestatiekenmerken van de methode voor het bepalen van de concentratie aan totaalarseen in urine vast te stellen werden de volgende parameters bepaald [13]:

- aantoonbaarheidsgrens: gedefinieerd als $3s$ waarbij s de standaarddeviatie is van herhaalde analyses van een monster urine met een arseenconcentratie in de nabijheid van de aantoonbaarheidsgrens
- herhaalbaarheid: gedefinieerd als $r = 2s_r\sqrt{2}$ waarbij s_r de standaarddeviatie is van tenminste 10 meetresultaten van één monster verkregen uit analyses uitgevoerd onder gelijke omstandigheden in één meetsessie
- reproduceerbaarheid: gedefinieerd als $R = 2s_R\sqrt{2}$ waarbij s_R de standaarddeviatie is van tenminste 10 meetresultaten van één monster. Elke analyse hiervoor werd telkens op een andere dag uitgevoerd
- terugvinding: aan analyseporties urine werden op verschillende concentratieniveau's toevoegingen van standaardoplossingen uitgevoerd en werd de terugvinding aan arseen bepaald. Enerzijds werd anorganisch arseen toegevoegd terwijl in andere gevallen arsenobetaine werd toegevoegd
- juistheid: door onderzoek van gecertificeerd referentiemateriaal werd deze parameter vastgesteld waarbij de verkregen waarden binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval diende te liggen.

De beschreven methode werd naast het onderzoek op de bovenstaande parameters tevens gecontroleerd met een (niet gevalideerde) speciatiemethode, gebaseerd op een HPLC-scheiding gevolgd door meting met ICP/MS. Met de laatst genoemde methode bestond de mogelijkheid om arseen in verschillende bindingsvormen te identificeren en de concentratie daarvan te bepalen. De methode werd recent ontwikkeld en staat in het kort beschreven in de Bijlage (pagina 21).

5.2 Resultaten van de validatie

Voor het vaststellen van de aantoonbaarheidsgrens werd de arseenconcentratie bepaald van 10 identieke deelmonsters urine. Gemiddeld werd $0,250 \mu\text{g As/l}$ gevonden met een standaarddeviatie (s_m) van $0,0220 \mu\text{g/l}$. Tevens werden 10 blancobepalingen uitgevoerd met als resultaat gemiddeld $0,0060 \mu\text{g As/l}$ en een standaarddeviatie (s_b) van $0,0338 \mu\text{g/l}$. De bijdrage van de blanco aan de arseenconcentratie van de onderzochte monsters urine was verwaarloosbaar zodat in het destruaat als aantoonbaarheidsgrens $0,07 \mu\text{g As/l}$ berekend werd.

Uitgaande van een verdunningsfactor van 5,3 betekende dit een aantoonbaarheidsgrens van 0,35

$\mu\text{g As/l}$ in de oorspronkelijke urine. Gezien de verwachte normaalwaarden aan arseen in urine van 10 - 20 $\mu\text{g/l}$ bij niet blootgestelde personen bleek deze ondergrens voldoende laag te zijn.

De herhaalbaarheid van de methode werd onderzocht door vijf monsters urine met een verschillende arseenconcentratie elk tienmaal te analyseren. De monsters waren zodanig geselecteerd dat het te verwachten concentratiebereik voor normaalwaarden aan arseen in urine bestreken werd. De resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in Tabel 3.

TABEL 3 Herhaalbaarheid van arseenanalyses in urine bepaald op vijf concentratieniveau's met 10 analyses per niveau.

Gemiddelde concentratie $\mu\text{g As/l}$	Standaarddeviatie		Herhaalbaarheid $\mu\text{g As/l}$
	absoluut ($\mu\text{g As/l}$)	relatief (%)	
3,00	0,14	4,7	0,40
11,9	0,23	1,9	0,64
22,6	0,56	2,5	1,51
116	2,8	2,4	8,00
208	5,5	2,7	15,6

De herhaalbaarheid uitgedrukt als de relatieve standaarddeviatie (RSD) van de meetuitkomsten was beter dan 5% voor arseenconcentraties groter dan 3,00 $\mu\text{g/l}$. Concentraties aan totaalarseen op natuurlijk niveau konden voldoende nauwkeurig bepaald worden.

De binnenlaboratorium reproduceerbaarheid werd bepaald door analyse van drie monsters urine op drie verschillende concentratieniveau's. Van elk monster werd op tien verschillende dagen door dezelfde analist en met dezelfde apparatuur de concentratie aan arseen in tienvoud bepaald. In Tabel 4 zijn enkele kengetallen van de meetresultaten en de reproduceerbaarheid R weergegeven.

TABEL 4 Reproduceerbaarheid van arseenanalyses in urine, bepaald op drie concentratieniveau's (10 analyses per niveau) en gemeten op tien verschillende dagen.

Gemiddelde concentratie $\mu\text{g As/l}$	Standaarddeviatie		Binnenlaboratorium reproduceerbaarheid ($\mu\text{g As/l}$)
	absoluut ($\mu\text{g As/l}$)	relatief (%)	
3,54	0,26	7,4	0,75
22,4	1,6	6,9	4,4
109	5,0	4,6	14

De binnenlaboratorium reproduceerbaarheid is ongeveer een factor twee hoger dan de herhaalbaarheid. Uitgedrukt als relatieve standaarddeviatie (RSD) van de meetresultaten is voor arseenconcentraties groter dan 3,5 $\mu\text{g/l}$ de reproduceerbaarheid beter dan 8% en is voor het beschouwde concentratiegebied acceptabel.

Terugvindingsexperimenten werden uitgevoerd door verrijking van analyseporties van verschillende urinemonsters met arsenobetaine of anorganisch arseen. Arsenobetaine werd toegevoegd aan drie porties van een monster urine, dat initieel 115 µg As/l bevatte, waarbij de concentratie aan arseen werd verhoogd met respectievelijk 40, 80 en 160 µg/l. Van elke portie werd de concentratie aan totaalarseen in duplo bepaald. De gemiddelde terugvinding van de toegevoegde 40 µg/l bedroeg 94,2%. Opbrengsten van 93,3 en 94,3% werden gevonden voor de toevoegingen van respectievelijk 80 en 160 µg/l.

Aan een tweede urinemonster dat 110 µg As/l bevatte werd eveneens arsenobetaine toegevoegd op een verrijkingsniveau van 80 µg As/l. Dit terugvindingsexperiment werd achtmaal uitgevoerd met als gemiddeld resultaat een opbrengst van 98,2% met een spreiding (RSD) van 3,5%. Het bereik van de resultaten varieerde van 95,1 tot 101,4%.

Anorganisch arseen werd achtmaal toegevoegd op een niveau van 25 µg/l. Een monster urine met een concentratie van 3,5 µg As/l diende als monstermateriaal.

Gemiddeld werd 100,5% teruggevonden met een bereik van 98,7 tot 102,8%. De herhaalbaarheid (RSD) bedroeg 1,2%.

Van alle toevoegingen aan de oorspronkelijke urine, voorafgaand aan de destructie, werd met de methode van onderzoek 93% of meer teruggevonden.

De validatie van de methode als combinatie van de juistheid en herhaalbaarheid werd bepaald door van analyseporties gereconstitueerde gecertificeerde referentiematerialen urine (SRM-2670, NIST, USA en "Kontroll-Urin für Metalle 2", lotnr. 625302, Lanonorm/Behring Institute/ Duitsland) de concentratie aan arseen te bepalen. Hiernaast werd ook het referentiemateriaal van Seronorm met een indicatieve concentratie aan arseen geanalyseerd. Naast de gecertificeerde waarden met een 95% betrouwbaarheidsinterval zijn in Tabel 5 de gemiddeld gemeten concentraties aan arseen weergegeven met een 95% betrouwbaarheidsinterval t.o.v. het gemiddelde.

TABEL 5 Arseenconcentraties van drie gereconstitueerde referentiematerialen humane urine. De spreiding is aangegeven als het 95% betrouwbaarheidsinterval t.o.v. het gemiddelde.

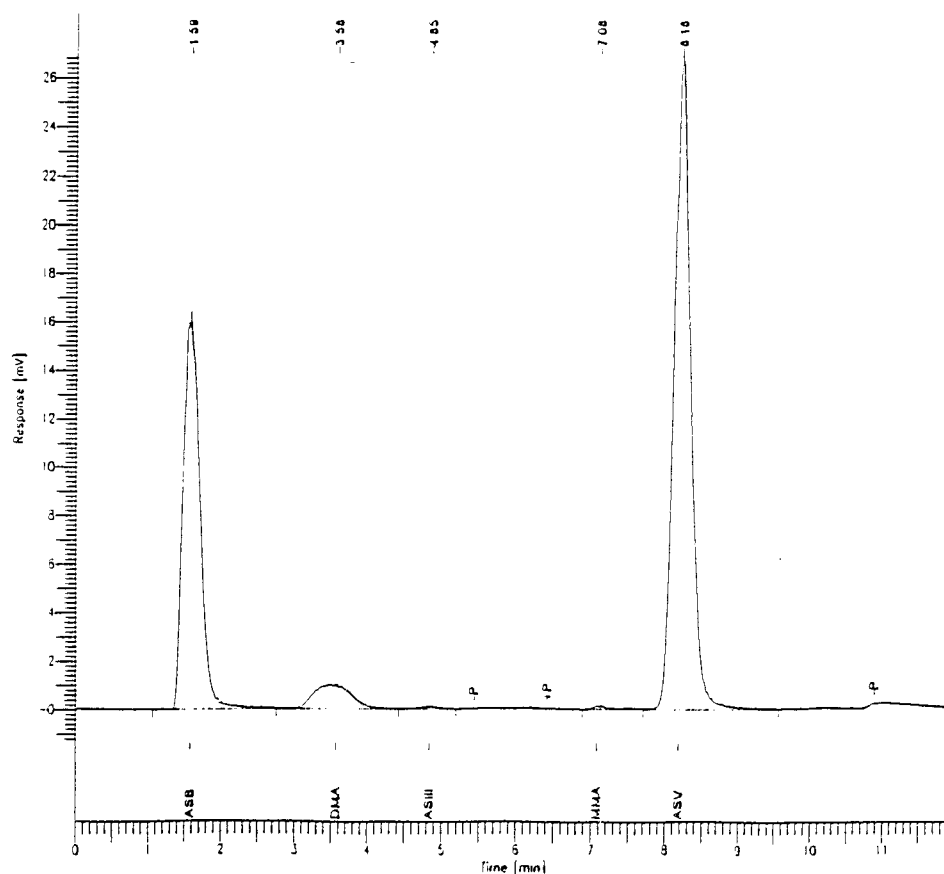
Referentiemateriaal	Arseenconcentratie in µg/l	
	gecertificeerd	gemeten
SRM-2670, NIST	480 ± 100	545 ± 47 (n=11)
Lanonorm, Behring Institute	199 ± 13	194 ± 11 (n=7)
Seronorm	101 ± 6 ^a	145 ± 8 (n=9)

^a indicatieve waarde.

De gemiddeld gemeten arseenconcentraties van het gecertificeerde referentiemateriaal SRM-2670, NIST en van het referentiemateriaal van Lanonorm bleken ruim binnen het gecertificeerde interval te vallen. Een significant verschil tussen de meetwaarden en de gecertificeerde concentratie aan arseen werd voor deze materialen dan ook niet gevonden.

In het (niet gecertificeerde) referentiemateriaal van Seronorm werd daarentegen ongeveer 40% meer arseen gemeten dan de indicatieve waarde aangeeft. In de certificeringsfase is deze indicatieve waarde echter gebaseerd op analyseresultaten van slechts één laboratorium met gebruikmaking van één enkele techniek (hydride-AAS). Het materiaal, waaraan anorganisch arseen werd toegevoegd op het niveau van 100 µg/l, leek daarom niet geschikt als referentiemateriaal voor de bepaling van totaalarseen.

Mogelijk bevat het referentiemateriaal van Seronorm ongeveer 45 µg/l arseen in een organisch gebonden vorm zoals arsenobetaine. Uit het beschreven onderzoek blijkt zonder UV-destructie voornamelijk het anorganisch arseen gemeten te worden. Ter bevestiging werd het materiaal gemeten met een HPLC - ICP/MS methode (Bijlage), waarmee concentraties aan anorganisch alsmede aan diverse organisch-gebonden vormen konden worden vastgesteld. Het referentiemateriaal van Seronorm bleek anorganisch arseen, dimethylarsinezuur en arsenobetaine te bevatten in de verhouding 20:1:10 zoals blijkt uit het chromatogram van Figuur 2. De concentratie aan totaalarseen werd op basis hiervan vastgesteld op 150 µg/l.



FIGUUR 2 Chromatogram van arseenverbindingen in het referentiemateriaal gevriesdroogde urine van Seronorm, verkregen met HPLC - ICP/MS.

In zeven verschillende monsters "spot"-urine werd de concentratie aan totaalarseen bepaald met de beschreven analysemethode met UV-destructie / hydride FIA-AAS meting. Dezelfde monsters werden ook gemeten met de HPLC - ICP/MS methode (Bijlage) waarbij uit de concentraties aan de verschillende arseenbevattende analyten de concentratie aan totaalarseen werd berekend. De monsters waren zodanig geselecteerd dat een groot concentratiegebied bestreken werd. In Tabel 6 zijn de resultaten van beide methoden naast elkaar geplaatst.

TABEL 6 *De concentratie aan totaalarseen in µg/l van zeven monsters urine bepaald met twee verschillende methoden.*

Monstercode	A	B	C	D	E	F	G
UV / FIA-AAS	2,66	25,3	41,9	96,2	200	263	435
HPLC - ICP/MS	3,7	28	44	95	200	260	420

De verkregen resultaten werden onderworpen aan de zogenoemde Deming regressie-analyse [15] waarmee twee onafhankelijke methoden, met vergelijkbare spreiding, met elkaar vergeleken konden worden. Uit de regressie berekening bleek dat beide methoden een gering verschil in analyseresultaten opleverden. Toepassing van de UV / FIA-AAS methode resulteerde in 2 - 5% (95%, df=5) lagere meetresultaten dan de HPLC - ICP/MS methode. Het verschil was echter gering in vergelijking met de reproduceerbaarheid van beide methoden.

6. CONCLUSIE

Gezien de grote verschillen in toxiciteit van de verschillende bindingsvormen van arseen verdient het de voorkeur arseenspeciatie in urine toe te passen met HPLC - ICP/MS. Aangezien deze methode nog niet gevalideerd is, werd een analysemethode ontwikkeld voor de bepaling van de concentratie aan totaalarseen (als zijnde de "worst case" benadering), gebaseerd op een UV-fotodestructie gevolgd door een FIA-AAS meting. De destructieprocedure is daarbij geoptimaliseerd zodat organische arseenverbindingen zoals dimethylarsinezuur en arsenobetaine, die in urine kunnen voorkomen, voldoende kwantitatief worden omgezet in anorganisch arseen zodat meting met een FIA-AAS mogelijk is. Ofschoon deze destructiestap ongeveer acht uur duurt is de methode ten opzichte van de "natte" ontsluiting niet arbeidsintensief en is het contaminatieprobleem gering: een arseencontaminatie boven de aantoonbaarheidsgrens is niet waargenomen.

Met de ontwikkelde methode kunnen van nature voorkomende arseenconcentraties in urine voldoende herhaalbaar en reproduceerbaar worden gemeten. Toevoegingen van zowel anorganisch arseen als arsenobetaine aan analyseporties worden voor tenminste 93% teruggevonden. Tevens is de methode gevalideerd aan de hand van verschillende referentiematerialen humane urine en zijn analyseresultaten voor diverse urinemonsters, verkregen met deze methode, vergeleken met de resultaten voor dezelfde monsters, onderzocht met een onafhankelijke techniek.

De prestatiekenmerken van de ontwikkelde methode met UV-destructie, gevolgd door meting met de FIA-AAS, beantwoorden in voldoende mate aan de gevraagde doelstelling: het vaststellen van referentiewaarden van de arseenconcentratie in urine in de algemene bevolking.

LITERATUUR

- 1 Herber R.F.M., Stoeppler M. (eds); "Trace element analysis in biological specimens". Elsevier, Amsterdam (1994).
- 2 Zingaro, R.; *Development International* **19** (1993) 167.
- 3 Stoeppler M., Vahter M.; in: Herber R.F.M., Stoeppler M. (eds); "Trace element analysis in biological specimens". Elsevier, Amsterdam (1994).
- 4 Larsen E.H.; "Arsenic speciation; development of analytical methods and their application to biological samples and food." Thesis. National Food Agency of Denmark (1993).
- 5 Andrea M.O.; in: Craig P.J. (ed); "Organometallic compounds in the environment." Longman, Londen (1986).
- 6 Welz, B. (ed); "Atomic Absorption Spectrometry". 2^e Editie. Weinheim (1985).
- 7 Hanna C.P., Tyson J.F., McIntosh S.; *Clin Chem* **39** (1993) 1662.
- 8 McKenzie H.A., Smythe L.E. (eds); "Quantitative trace analysis of biological materials". Elsevier, Amsterdam (1988).
- 9 Pisch, Schafer J., Frahne D.; *Git Fachz Lab* **37** (1993) 500.
- 10 Atallah R.H., Kalman D.A.; *Talanta* **38** (1991) 167.
- 11 Rauret G., Rubio R., Padro A.; *Fresenius J Anal Chem* **340** (1991) 157.
- 12 Rubio R., Padro A., Alberi J., Rauret G.; *Anal Chim Acta* **283** (1993) 160.
- 13 Wiel H.J. van de, Rooij M.A.F.P. van, Janssens H.; "Prestatiekenmerken voor meetmethoden". RIVM rapport nr. 219101004 (1994).
- 14 Ritsema R., Dukan L.; "Arsenic speciation in urine samples by HPLC-ICP-MS". Publicatie in voorbereiding.
- 15 MacTaggart D.L., Farwell S.O.; *J Assoc Off Anal Chem* **75** (1992) 594.

BIJLAGE: Arseenspeciatie in urine met HPLC - ICP/MS [14].Principe van de methode

Injecteer 175 µl van een 10-voudig verdund urinemonster op een 'anion exchange' kolom. Gebruik een ammoniumcarbonaat buffer als elutiemiddel zodat de verschillende bindingsvormen van arseen worden gescheiden. De detectie vindt plaats met behulp van ICP/MS bij $m/z=75$. Met deze methode is het mogelijk As(III), As(V), methylarseenzuur, dimethylarseenzuur en arsenobetaine te scheiden en te kwantificeren.

Prestatiekenmerken van de methode

In het navolgend overzicht zijn enkele validatieparameters weergegeven.

Voor de aantoonbaarheidsgrens (tevens de ondergrens van het lineaire gebied) is de definitie aangehouden zoals in paragraaf 5.1 van dit rapport is vermeld. De herhaalbaarheid van de methode is onderzocht op een niveau van twintig maal de aantoonbaarheidsgrens.

	Lineair gebied in µg/l	Herhaalbaarheid	
		meetniveau in µg/l	%
As(III)	0,2 - 50	4,0	8,4
As(V)	0,5 - 50	10,0	6,8
Methylarseenzuur	0,6 - 500	12,0	4,1
Dimethylarseenzuur	2,3 - 500	45,0	1,3
Arsenobetaine	0,2 - 5000	4,0	1,8