

B4D

RIVO

BIBLIOTHEEK
RIJKSINSTITUUT VOOR
VISSERIJONDERZOEK

CA 83-11

VISSTERFTE TE HARDENBERG (APRIL 1983)
VEROORZAAKT DOOR "TOLKAN S" LOZING.

A. de Vries.

CA 83-11

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

IJMUIDEN

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

Haringkade 1 - Postbus 68 - IJmuiden - Tel. (02550) 1 91 31

Afdeling: CHEMISCH ONDERZOEK.

Rapport: CA 83-11
VISSTERFTE TE HARDENBERG (APRIL 1983)
VEROORZAAKT DOOR "TOLKAN S" LOZING.

Auteur: A. de Vries.

Project: 2-7136 "Gehalogeneerde fenolen onderzoek".

Projectleider: H. Pieters.

Datum van verschijnen: December 1983.

Inhoud: SAMENVATTING.
I INLEIDING.
II METHODE.
III RESULTATEN EN DISCUSSIE.
IV CONCLUSIES.
V REFERENTIE.
FIGUREN.
BIJLAGEN.

**DIT RAPPORT MAG NIET GECITEERD WORDEN ZONDER TOESTEMMING VAN DE
DIRECTEUR VAN HET R.I.V.O.**

/MV

E-508907

VISSTERFTE TE HARDENBERG
(APRIL 1983) VEROORZAAKT
DOOR "TOLKAN S" LOZING.

A. DE VRIES

VISSTERFTE TE HARDENBERG (APRIL 1983) VEROORZAAKT DOOR "TOLKAN S" LOZING.

SAMENVATTING.

Naar aanleiding van een plotselinge vissterfte in het waterschap "Het Ommerkanaal" te Hardenberg (Ov.) werd een watermonster en een vismonster (blankvoorn) onderzocht op de aanwezigheid van "dinoterb", één van de twee werkzame bestanddelen van het herbicide "Tolkan S".

Met behulp van kolomchromatografie en HPLC kon dinoterb aangetoond worden in het water, afkomstig van de vermoedelijke lozingsplaats.

In het eetbare deel van de vis werd geen dinoterb aangetroffen.

De kieuwen van de blankvoorn echter, bleken deze stof wel te bevatten.

I INLEIDING.

Op 16 april 1983 vond een plotselinge vissterfte plaats in waterleiding nr. 1 van het waterschap "Het Ommerkanaal" te Hardenberg. De oorzaak hiervan was vermoedelijk een lozing van Tolkan-S, een herbicide met de werkzame bestanddelen "dinoterb" (4,6-dinitro, 2-tert-butylfenol, en "isoproturon" (N,N-dimethyl-N'-4-isopropylfenylureum), zie brief d.d. 20-04-1983 van de Gemeentepolitie Hardenberg aan het Centraal Diergeneeskundig Instituut (C.D.I.) te Lelystad. (Zie bijlage I)

De aanwezigheid van Tolkan-S in het water werd aangetoond door de Stichting Waterlaboratorium Zwolle (Zie brief d.d. 24-06-1983 van Stichting Waterlaboratorium Zwolle aan het RIVO). (Zie bijlage II).

Ten behoeve van de bewijsvoering diende echter onderzocht te worden of met name dinoterb in de dode vis kon worden aangetoond.

Via het CDI werden de volgende monsters verkregen:

- monster water, afkomstig van de lozingsplaats - code 1138
- monster van "Tolkan-S", via Agriben B.V. te Ettenleur - code 1139
- 3 vissen (blankvoorn) - code 1162
- zuiver "dinoterb", eveneens via Agriben B.V. diende als standaard.

Het onderzoek van deze monsters werd ingepast in de ontwikkeling van een analysemethode voor het bepalen van gehalogeneerde- en nitrofenolen in weefsel van mariene organismen.

II METHODE.

1. Bereiding mengmonsters:

De blankvoorn werd gefileerd waarbij zoveel mogelijk van het "eetbare" deel werd verwijderd, waarna werd gehomogeniseerd met behulp van een Sorvall Omnimixer.

Tevens werden de kieuwen verwijderd, waarvan eveneens een homogenaat werd gemaakt.

2. Extractie:

De volgende hoeveelheden zijn in bewerking genomen (totaal 4 monsters):

- 25 g visfilet-homogenaat (2x) (I en II)
- 7,3 g homogenaat van de kieuwen (III)
- 100 ml watermonster (IV)

Visfilet en kieuwen werden geëxtraheerd met behulp van een Sorvall Omnimixer. Het watermonster werd in een 250 ml scheidrecther geëxtraheerd. Voor extractie werden de monsters aangezuurd met 5 ml 10 % H₂SO₄.

Geëxtraheerd werd met 2 x 40 ml hexaan-isopropanol 3 : 1.

Aan het extract van monster II werd een spike van 10,8 µg dinoterb toegevoegd (2 ml oplossing van 5,4 µg/ml).

Tenslotte werden de extracten uitgeschud met 2 x 15 ml 3 % NaOH oplossing waarbij de fenolen overgaan naar de loofase als de overeenkomstige fenolaationen.

3. Anionenwisselaarschromatografie:

Gebruik werd gemaakt van Sephadex QAE A25. Na zwellen in bidest tot constant volume, werden hiervan kolommen gegoten met een bedvolume van 6 ml.

Per monster werden de loofphasen van de extractie-stap verzameld (2 x 15 ml) en over de Sephadex kolommen geleid.

De anionenwisselaar werd vervolgens geëlueerd met 30 ml 0,2 M HCl/KCl buffer pH 1,5 (25 ml 0,2 M HCl + 20,7 ml 0,2 M KCl).

Het eluaat van de filetmonsters (I en II) werd verdeeld in twee 15 ml aliquots, waarbij per monster één aliquot werd aangezuurd tot pH = 1 à 2 met 10 % H₂SO₄ (Ia en IIa).

Het eluaat van het watermonster en het monster van de kieuwen werd op dezelfde wijze aangezuurd.

4. Preconcentrering en zuivering:

Hiertoe werd gebruik gemaakt van 320 µl Chrom-Prep PRP-1 cartridges (HAMILTON).

Deze PRP-1 patronen werden voor gebruik geactiveerd met 3 ml MeOH gevolgd door 3 ml bidest.

Met behulp van een 10 ml injectiespuit werden de volgende monsters over PRP-1 cartridges geleid:

- Ia visfilet - zonder spike - aangezuurd.
- Ib visfilet - zonder spike - niet aangezuurd.
- IIa visfilet - met spike - aangezuurd.
- IIb visfilet - met spike - niet aangezuurd.
- III kieuwen.
- IV water.

5. HPLC:

De PRP-1 patronen werden geëlueerd met 1 ml MeOH.

Het eluaat werd geïnjecteerd in een SP 8100 vloeistofchromatograaf onder de volgende omstandigheden:

Kolom : HIBAR RT 250-4, 5 µm Lichrosorb RP-18 (Merck).
Mobiele fase : A - CH₃CN + 1 % HAc
 B - H₂O + 1 % HAc
 C - MeOH + 1 % HAc
Gradiënt : 0 min - A 20 % - B 70 % - C 10 %.
(lineair) 50 min - A 45 % - B 10 % - C 45 %.
 60 min - A 20 % - B 70 % - C 10 %.
Flow rate : 0,8 ml/min.
Temperatuur : 30 °C.
Detector : UV ABS (280 nm).

Opmerking 1:

Bij boven beschreven ternaire gradiëntelutie heeft dinoterb een relatief grote retentietijd (40 min), zodat bij een bepaling van dinoterb alleen door wijziging van de mobiele fase ongetwijfeld een snellere elutie kan worden verkregen.

Met de gebruikte gradiënt echter, heeft het HPLC systeem een groot scheidend vermogen (alle chloorfenolen kunnen zo worden gescheiden) zodat zo min mogelijk informatie verloren gaat.

Opmerking 2:

Een UV-spectrum van dinoterb opgelost in MeOH liet zien dat het absorptiemaximum bij 249 nm ligt, doch detectie bij deze golflengte geeft bij gebruik van genoemde ternaire gradiënt een te grote basislijndrift.

III RESULTATEN EN DISCUSSIE.

In de visfiletmonsters kon geen dinoterb aangetoond worden. Dit betekent dat een eventueel aanwezige hoeveelheid dinoterb kleiner was dan de geschatte detectiegrens van 5 ppb. De spike werd echter volledig teruggevonden, waaruit bleek dat tijdens de clean-up procedure geen verliezen optraden. Dit gold zowel voor het aangezuurde (IIa) als het niet aangezuurde monster (IIb). Zie figuur 3 en 4. Opvallend was echter dat in de chromatogrammen van de aangezuurde monsters Ia en IIa (figuur 1 en 3) een aantal pieken ontbraken welke wel voorkwamen in de chromatogrammen van de niet aangezuurde monsters Ib en IIb (figuur 2 en 4). Mogelijk betrof het hier componenten welke bij lage pH irreversibel aan het PRP-1 materiaal gebonden werden.

Het watermonster bevatte in tegenstelling tot de filet, wel dinoterb. Het gehalte aan deze stof bedroeg 600 µg/l (figuur 6).

Het chromatogram van de kieuwen, tenslotte, gaf eveneens een dinoterbpiek te zien, overeenkomend met een gehalte van 0,5 ppm (figuur 5).

IV CONCLUSIES.

Water, afkomstig van de vermoedelijke lozingsplaats bevat in ieder geval één der werkzame bestanddelen van het herbicide Tolkan-S, nl. dinoterb.

Daar deze verbinding eveneens werd aangetoond in de kieuwen van dode blankvoorn uit datzelfde gebied, mag een verband tussen lozing en vissterfte verondersteld worden.

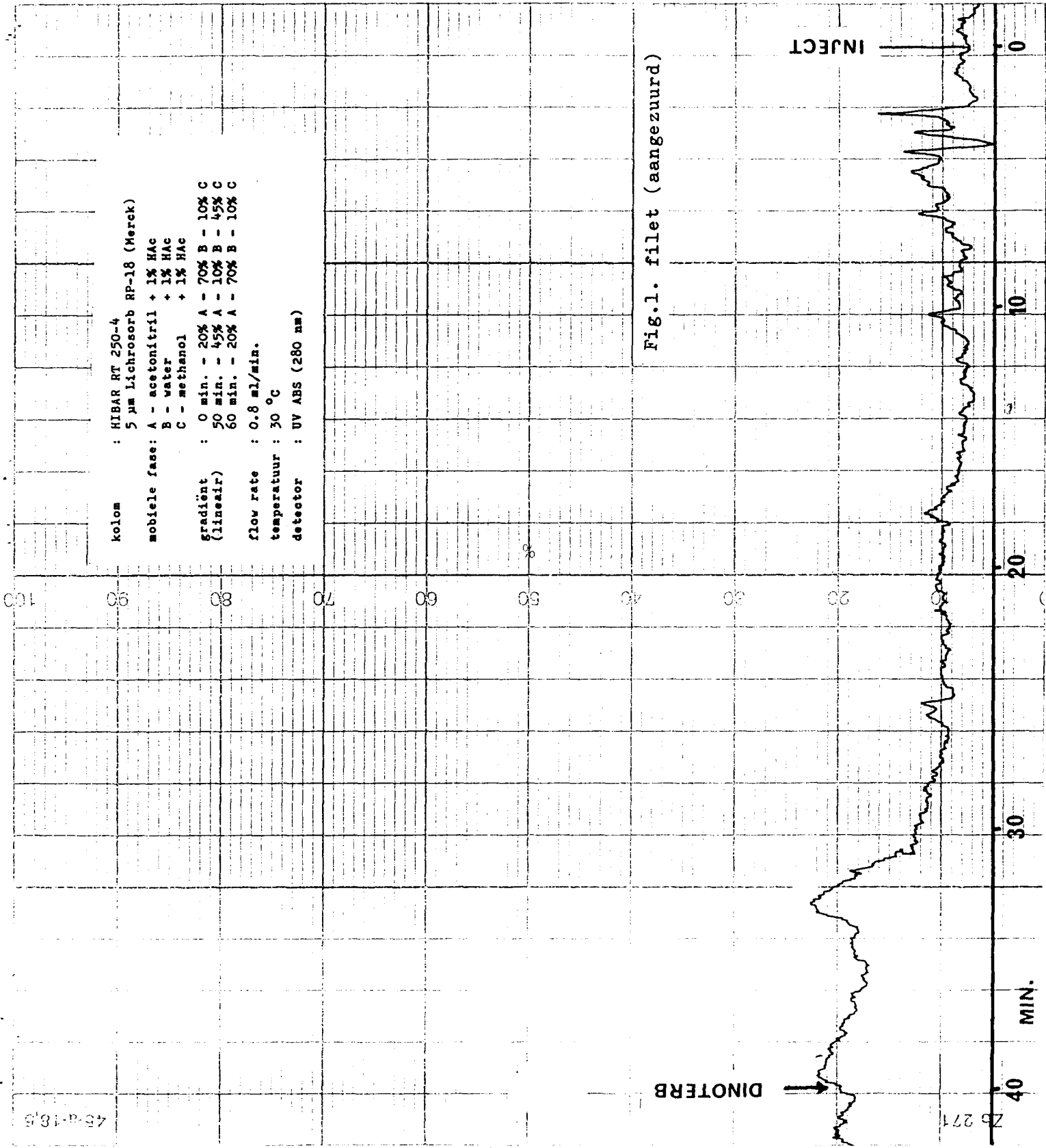
Het feit dat dinoterb wel in de kieuwen doch niet in de filet werd aangetroffen, duidt op een hoge acute toxiciteit van dinoterb voor deze vissoort waardoor geen bio-accumulatie in met name het eetbare deel van de vis kon plaatsvinden.

Voor de secundaire butylverbinding (dinoseb) is reeds een hoge acute toxiciteit voor vis geconstateerd (1).

Volgens het R.I.V. te Bilthoven is de schadelijke werking van beide verbindingen goed vergelijkbaar.

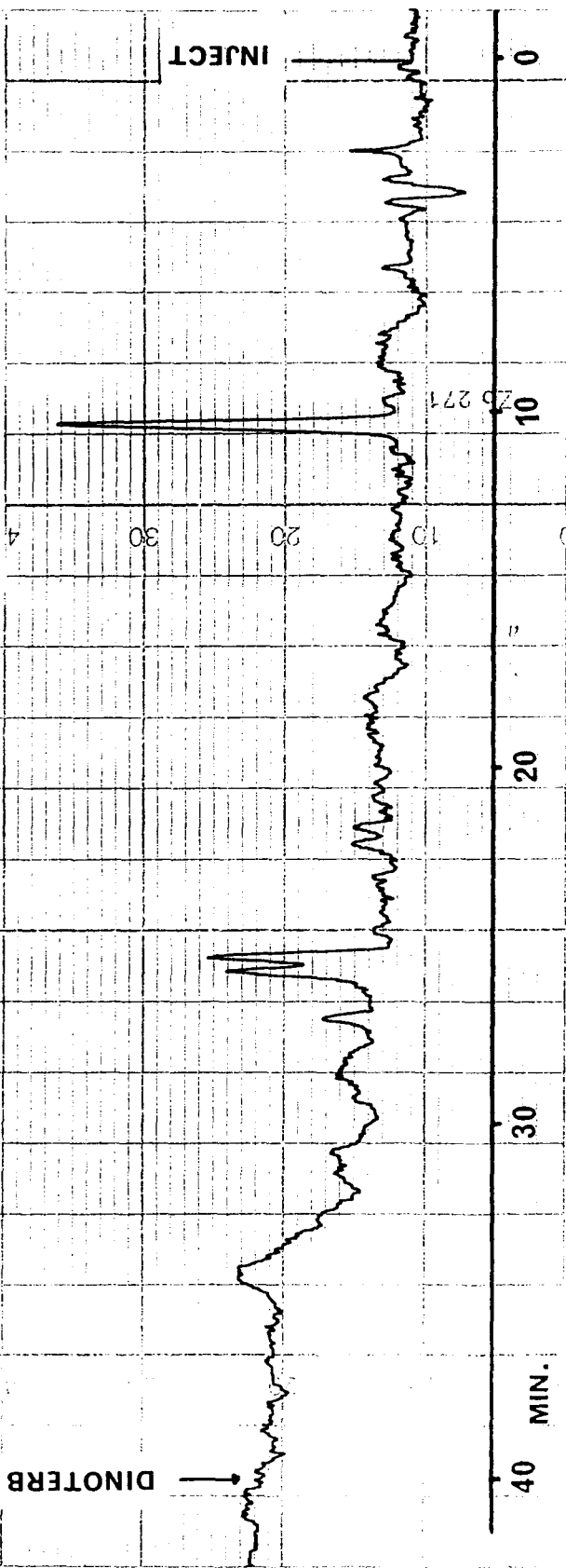
V REFERENTIE.

- (1) Woodward, D.F., 1975 - Toxicity of the herbicides dinoseb and picloram to cutthroat (*Salmo clarki*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). J. Fish. Res. Board Can., 33 : 1671-1676.



kolon : HIBAR RT 250-4
 5 µm Lichrosorb RP-18 (Merck)
 mobiele fase: A - acetonitril + 1% HAC
 B - water + 1% HAC
 C - methanol + 1% HAC
 gradiënt : 0 min. - 20% A - 70% B - 10% C
 (linear) 50 min. - 45% A - 10% B - 45% C
 60 min. - 20% A - 70% B - 10% C
 flow rate : 0.8 ml/min.
 temperatuur : 30 °C
 detector : UV ABS (280 nm)

Fig.2. filet (niet aangezuurd)



kolom : HIBAR RT 250-4
 5 µm Lichrosorb RP-18 (Merck)
 mobiele fase: A - acetonitril + 1% HAC
 B - water + 1% HAC
 C - methanol + 1% HAC
 gradient (lineair) : 0 min. - 20% A - 70% B - 10% C
 50 min. - 45% A - 10% B - 45% C
 60 min. - 20% A - 70% B - 10% C
 flow rate : 0.8 ml/min.
 temperatuur : 30 °C
 detector : UV ABS (280 nm)

DINOTERB

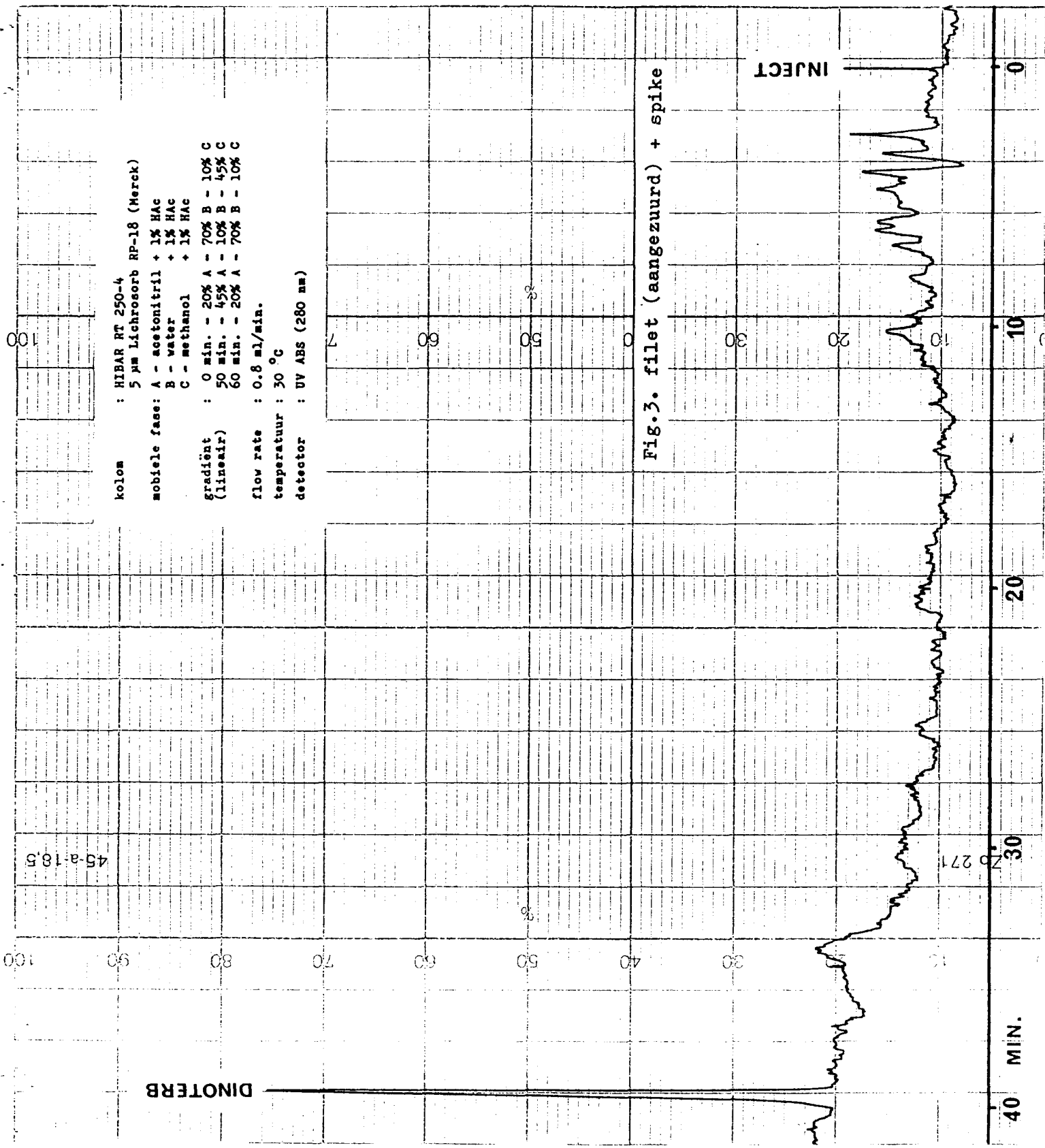


Fig.3. filet (aangezuurd) + spike

43-a-185

DINOTERB

kolon : HIBAR RT 250-4
5 µm Lichrosorb RP-18 (Merck)

mobile fase: A - acetonitril + 1% HAC
B - water + 1% HAC
C - methanol + 1% HAC

gradient : 0 min. - 20% A - 70% B - 10% C
(linear)
50 min. - 45% A - 10% B - 45% C
60 min. - 20% A - 70% B - 10% C

flow rate : 0.8 ml/min.

temperatuur : 30 °C

detector : UV ABS (280 nm)

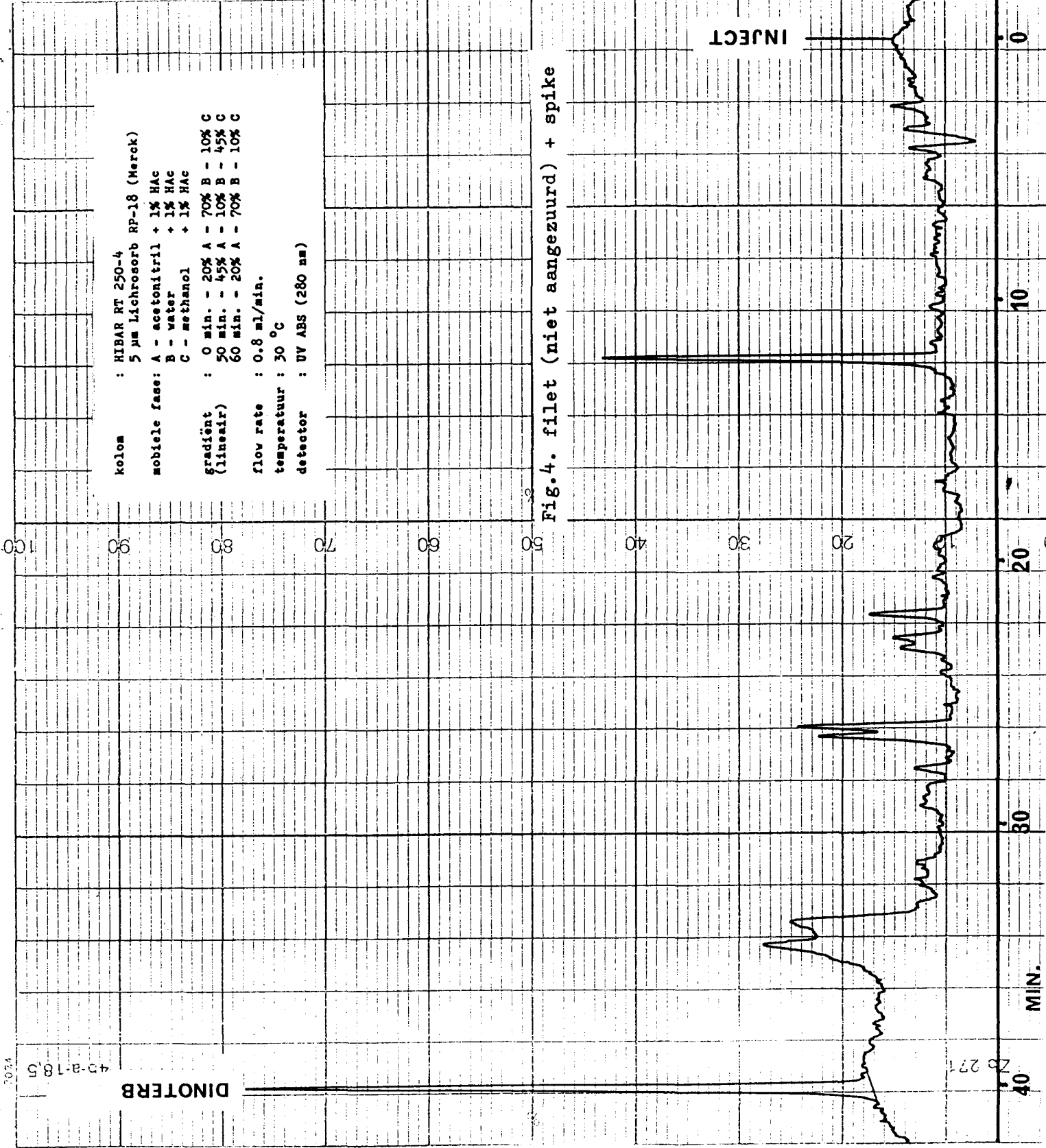
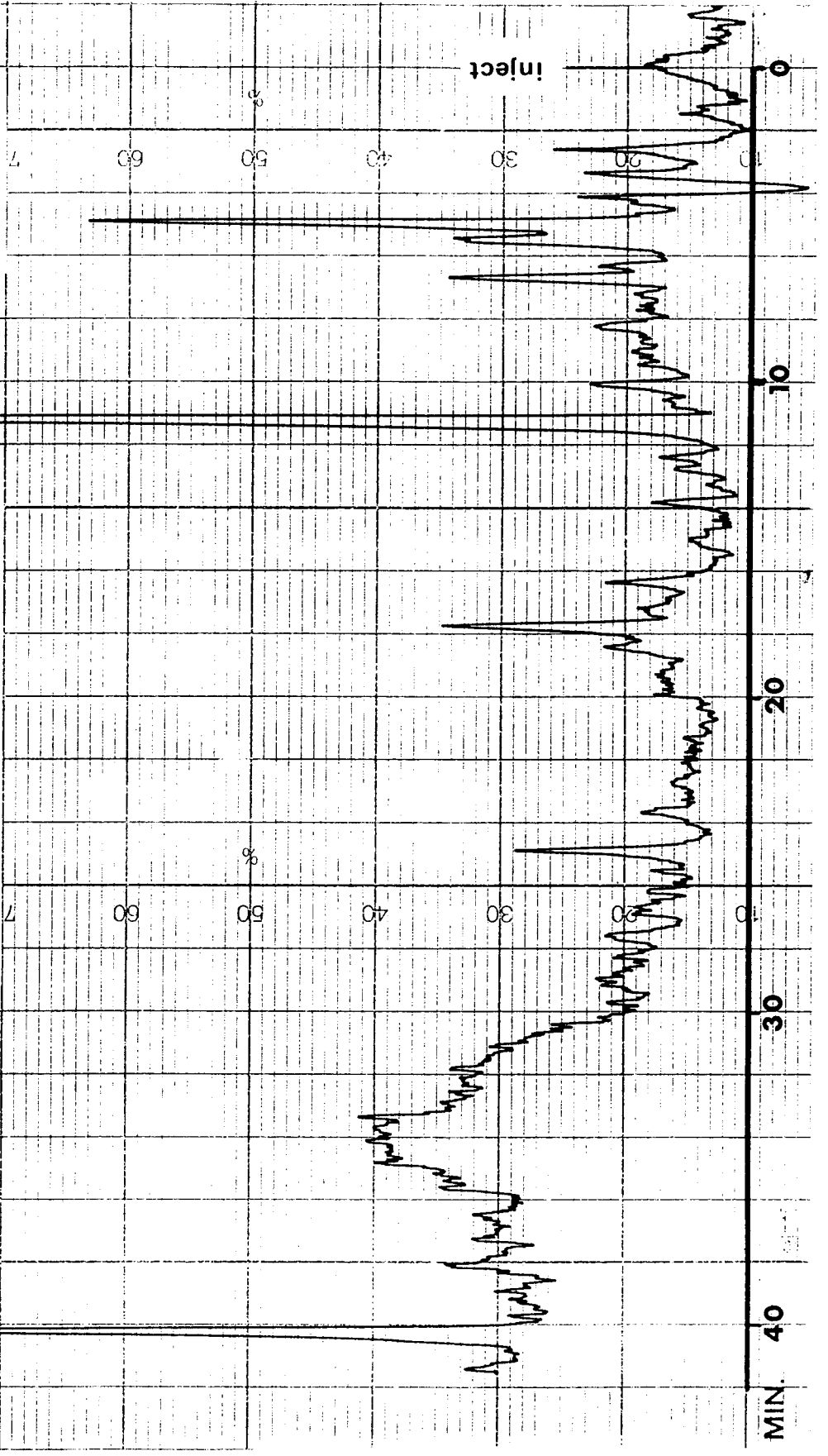


Fig.4. filet (niet aangezuurd) + spike

dinoterb

kolom : HIBAR RT 250-4
 5 µm Lichrosorb RP-18 (Merck)
 mobiele fase: A - acetonitril + 1% HAC
 B - water + 1% HAC
 C - methanol + 1% HAC
 gradient (lineair) : 0 min. - 20% A - 70% B - 10% C
 50 min. - 45% A - 10% B - 45% C
 60 min. - 20% A - 70% B - 10% C
 flow rate : 0.8 ml/min.
 temperatuur : 30 °C
 detector : UV ABS (280 nm)

Fig.5. kieuw



MIN. 40

30

20

10

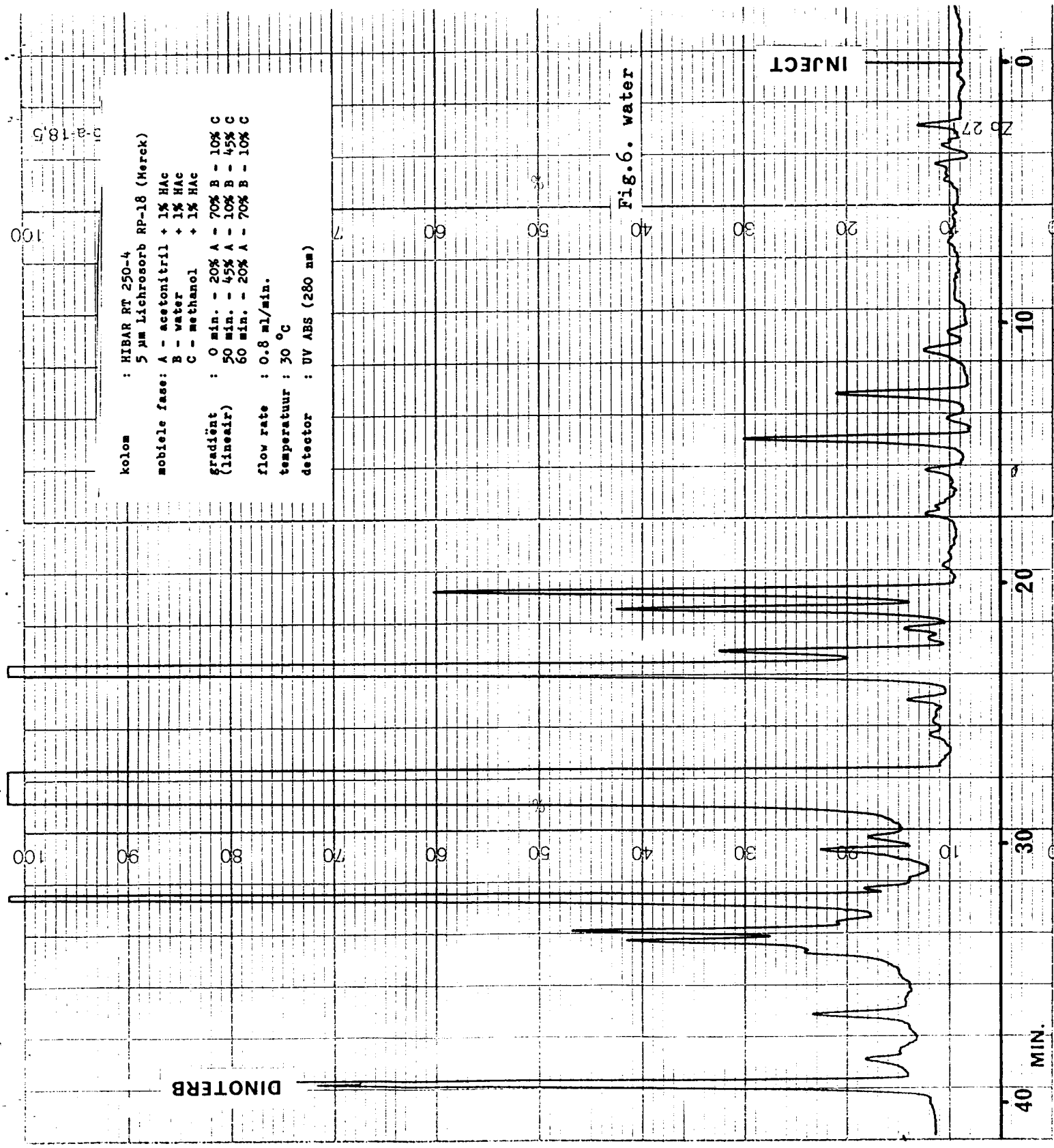
0

kolom : HIBAR RT 250-4
 5 µm Lichrosorb RP-18 (Merck)
 mobiele fase: A - acetonitril + 1% HAC
 B - water + 1% HAC
 C - methanol + 1% HAC
 gradient (lineair)
 0 min. - 20% A - 70% B - 10% C
 50 min. - 45% A - 10% B - 45% C
 60 min. - 20% A - 70% B - 10% C
 flow rate : 0.8 ml/min.
 temperatuur : 30 °C
 detector : UV ABS (280 nm)

DINOTERB

Fig.6. water

INJECT



10-2-18,5

GEMEENTEPOLITIE



HARDENBERG

C. D. I, LELYSTAD		
AFD. AEP1		
Ag. Nr 20769		
Ontv.	Bountw.	Parant
10/1 4/6		
Class Dia		

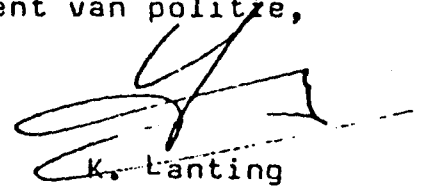
Staple...
...

20 april 198

Behorende bij de vissen, die gestorven zijn door vergiftiging.

De stof die daarbij gebruikt werd is Tolkan S - dinoterb iso - proturon.

De hoofdagent van politie,


K. Lanting

Bijlage behorende bij vismonsters inzake vissterfte te Hardenberg d.d. 16 april 1983 in waterleiding nr. 1 van het waterschap "Het Ommerkanaal".

Vermoedelijk lozing van het herbicide Tolkan-S

leverancier: Agriben Nederland B.V.

Nieuwe Donk 5/Postbus 209,

4879 AC Etten-Leur.

Tel. 01608-13351.

Werkzame bestanddelen:

a. dinoterb ; 2-tertiair-butyl-4,6-dinitro-fenol

b. isoproturon; 3-(4-isopropylfenyl)-1,1-dimethylureum.

Tevens bijgevoegd een monster van op de lozingsplaats nog niet verzonken water, vermoedelijk verontreinigd met het geloosde bestrijdingsmiddel.

Kontaktpersoon:

Gemeentepolite Hardenberg: de heer Lanting 05232-61666

de heer Koekoek.

Zuiveringschap West-Overijssel,

afdeling Controle Lozingen: de heer L. Vasse 038-218803, tst. 52

afdeling Laboratorium : Stichting Waterlaboratorium Zwolle

de heer H. v.d. Zouwen, 038-210660.



ZUIVERINGSCHAP WEST-OVERIJSSSEL
 Technologische dienst
 "Frisia State" Ruiterslaan 7
 Postbus 60, Zwolle
 Telefoon 05200-10003 033-218803

MINISTERIE VAN LANDBOUW EN VISSERIJ R.I.V.O.		
Ar. No. Vo. 2102		
Ontv. 30/6/83	Beaardw.	Paraaf
Class. Nr. 634205/1.36		

Aan: RIVO
 t.a.v. drs. H. Pieters
 Haringkade 1
 1976 CP Ymuiden
 Datum: 24 juni 1983.

Uw kenmerk:

Ons kenmerk: 83-2896

Betreft:

Hierbij ontvangt U / ~~deel ik u mede:~~

de analyse-resultaten van de watermonsters
inzake de vissterfte dd 16-4-1983 te Har-
denberg.

Tevens is bijgevoegd een artikel over de
toxiciteit van de herbicide Dinoseb. Volgens
het R.I.V. te Bilthoven kan de schadelijke
werking van de tertiaire butyl-substituent
(dinoterb) op waterorganismen goed worden
vergeleken met die van de secundaire sub-
stituent (dinoseb). Hopelijk kan dit u van dienst

behandeld door:

L. Dasse

zijn bij het onderzoek van de
aangeboden vismonsters.
 Namens HTD,

Verz: 2416

Afdeling:

Ch.)

STICHTING WATERLABORATORIUM ZWOLLE

Deelnemers Zuiveringschap West-Overijssel en Waterleiding Mij. "Overijssel" N.V.

Zwolle
Oude Veerweg 1
Tel. 05200-11744

uw kenmerk	ons kenmerk	bijlagen	datum
------------	-------------	----------	-------

Onderzoek naar het herbicide Tolkan S.

Naar aanleiding van vissterfte te Hardenberg dd 16-4-1983 in waterleiding nr 1 van het waterschap "Het Ommerkanaal" zijn vier watermonsters onderzocht, nl.:

Va 33	Bovestrooms lozingspunt	lab. code	I 248
Va 34	Schutsweg		I 249
Va 35	Bouwmansweg		I 250
Va 36	op de dam		I 251

De watermonsters zijn geëxtraheerd met dichloormethaan. De extracten zijn geconcentreerd en daarna geïnjecteerd op een gaschromatograaf. Omdat de oorzaak van de vissterfte werd geweten aan een vermoedelijke lozing van het herbicide Tolkan S is ook het originele produkt, geleverd door de firma Agriben Nederland BV., in bewerking genomen. Een hoeveelheid hiervan is opgelost in water en geëxtraheerd met dichloormethaan. Het extract hiervan is onder dezelfde omstandigheden als de extracten van de watermonsters geïnjecteerd op de gaschromatograaf. De extracten van de monsters Va 34, Va 35 en Va 36 gaven dezelfde chromatogrammen als die van het Tolkan S. Met behulp van deze chromatogrammen zijn de concentraties Tolkan S in de watermonsters berekend. Deze vindt U op de desbetreffende analyselijst.