GC/MS-SCREENING VAN RWZI-EFFLUENTEN

Fractionering met vloeistofchromatografie naar log Kow en identificatie van verbindingen in de fracties met behulp van GC/MS en AMDIS

RIWA
Rijnwaterbedrijven

G. Rinia
drs. R.P.M. Berbee

December 2006
Vereniging van Rivierwaterbedrijven

GC/MS-SCREENING VAN RWZI-EFFLUENTEN

Fractionering met vloeistofchromatografie naar log Kow en identificatie van verbindingen in de fracties met behulp van GC/MS en AMDIS

G. Rinia
drs. R.P.M. Berbee

Uitgever Vereniging van Rivierwaterbedrijven RIWA

ISBN-10: 90-6683-122-7 ISBN-13: 978-90-6683-122-3

Inhoudsopgave

1 Samenvatting **3**

2 Werkwijze **5**

2.1 Bemonstering 5

2.2 Vloeistof / vloeistof extractie van de monsters 5

2.3 HPLC-preconcentrering en fractionering 5

2.4 Extractie van fracties 5

2.5 Screening 6

3 Resultaten **7**

3.1 Vloeistof extractie van de monsters 7

3.2 HPLC-preconcentrering en fractionering 7

3.3 Extractie van fracties 8

3.4 Screening 8

3.5 Interpretatie analyseresultaten 8

3.5.1 Aantallen stoffen in de monsters 8

3.5.2 Geïdentificeerde stoffen bij de fractioneringen 9

3.5.3 Aangetroffen stoffen in fractie 2 en fractie 3 10

3.6 Wat zijn de meest relevante stoffen? 14

4 Conclusie en aanbevelingen **15**

5 Referenties **16**

5 Bijlagen **17**

1 Samenvatting

In het verantwoord kunnen gebruiken van rivierwater als bron voor de drinkwaterbereiding ligt voor RIWA en RIZA een gezamenlijk belang.
In eerdere projecten ziet RIWA polaire persistente verbindingen die moeilijk verwijderbaar zijn bij de drinkwaterbereiding. Dit project richt zich dan ook op de problematiek rond polaire stoffen en in het bijzonder de rol die emissies uit communale rwzi's daarin spelen. De uitvoering van het project ligt bij het RIZA terwijl RIWA de opdrachtgever is van dit project.

Voor dit project is men met name geïnteresseerd in polaire stoffen. Daarom is een methode ontwikkeld voor HPLC-preconcentratie en fractionering op basis van log Kow (‹2, 2-4 en › 4). De fractie met laagste log Kow bevat de meest polaire stoffen.
De fracties worden opgevangen, doorlopen vervolgens een screening met behulp van GC/MS en AMDIS en worden vervolgens ingelezen in de RIZA-GC/MS-database. Zeer polaire stoffen die niet door de HPLC-kolom zijn afgevangen blijven met deze methode overigens buiten beeld.

Bij de rwzi Nieuwgraaf (regio Arnhem), Culemborg en Renkum, zijn in twee verschillende weken monsters genomen en deze monsters zijn met de ontwikkelde methode geanalyseerd.

In totaal zijn in de drie log Kow-fracties 343 stoffen geïdentificeerd. Zeventien stoffen zijn regelmatig aanwezig in alle drie onderzochte rwzi-effluenten. Hieronder bevinden zich enkele in potentie bioaccumulerende stoffen (log Kow ›4): isomethylionon en versalide® (geurstoffen) en het conserveringsmiddel trichlosan dat in deodorant wordt gebruikt. Deze stoffen zijn vanuit milieuoogpunt gezien relevant.

Daarnaast zijn er enkele polaire stoffen aangetroffen die een aandachtspunt kunnen zijn voor de drinkwaterbereiding. Dit zijn 4-methoxyacetophenon (smaakstof), methylsalicylaat (middel tegen spierpijn) en carbamazepine (antiepilepticum). Daarnaast zijn een tweetal sulfonamides en sporen van het oplosmiddel N-methylpyrrolidon aangetroffen. De sulfonamides (4-methylbenzeensulfamide en N-ethyl-4-methylbenzeensulfonamide) worden gebruikt als weekmaker in kunststoffen.
Het strekt tot aanbeveling om de aanwezigheid van deze stoffen in oppervlaktewater, maar ook in effluenten nader te onderzoeken (nader bronnenonderzoek). De drinkwaterbedrijven kunnen nagaan of deze stoffen een probleem zijn voor de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater en of ze in voldoende mate verwijderd worden in de drinkwaterzuiveringsinstallaties.

In het verantwoord kunnen gebruiken van rivierwater als bron voor de drinkwaterbereiding ligt voor RIWA en RIZA een gezamenlijk belang.
In eerdere projecten ziet RIWA polaire persistente verbindingen die moeilijk verwijderbaar zijn bij de drinkwaterbereiding. Dit project richt zich dan ook op de problematiek rond polaire stoffen en in het bijzonder de rol die emissies uit communale rwzi's daarin spelen. De uitvoering van het project ligt bij het RIZA en RIWA is de opdrachtgever.

Voor dit project is men met name geïnteresseerd in polaire stoffen. Daarom is een methode ontwikkeld voor HPLC-preconcentratie en fractionering op basis van log Kow. De fractie met laagste log Kow bevat de meest polaire stoffen.
De fracties worden opgevangen, doorlopen vervolgens een screening met behulp van GC/MS en AMDIS en worden vervolgens ingelezen in de RIZA-GC/MS-database.

Omdat dit onderzoek zich met name richt op polaire verbindingen behoort in principe identificatie van de aan te treffen verbindingen ook plaats te vinden met een techniek die polaire verbindingen kan identificeren. Tot op heden bestaat zo'n techniek echter niet. Men zou kunnen denken aan LC/MS. Maar hierbij is hoge resolutie vereist om enig identificerend vermogen te hebben. Dergelijke apparatuur is voor dit onderzoek niet beschikbaar en zou ook in de beperkte tijd niet voldoende resultaten opleveren. Daarom is gekozen voor GC/MS als identificatietechniek. GC/MS is in principe gericht op minder polaire verbindingen, maar door standaardisatie van de spectra en een voortdurende verdere ontwikkeling is het identificerend vermogen goed ontwikkeld. De techniek is ook inzetbaar voor redelijk polaire verbindingen maar kan alleen de meest polaire verbindingen niet zien. Om deze redenen is het dan ook gebruikelijk (onder andere in TIE/EDA ('toxiciteit, identificatie en evaluatie' ook wel genoemd 'effect directed analysis') om voor zowel apolaire als ook redelijk polaire verbindingen de combinatie van HPLC-fractionering en GC/MS identificatie toe te passen. Alleen indien gerichte vragen naar polaire verbindingen bestaan en veel tijd en geld geinvesteerd kan worden kan identificatie met andere technieken (NMR, LC-hoge resolutie MS) zinvol zijn.

De ontwikkelde methode op basis van de combinatie van HPLC en GC/MS is toegepast op in totaal 6 monsters (representatieve monsters op 2 verschillende tijdstippen bij 3 rwzi's).

2 Werkwijze

2.1 Bemonstering

Voor het project zijn in april en mei 2005 op vier aaneensluitende dagen (ma, di, woe en do) op een vast tijdstip (10.00 uur) steekmonsters met bekerglazen genomen bij 3 rwzi's. Gekozen is voor steekmonsters met bekerglazen omdat bij debietproportionele etmaalbemonstering gebruik moet worden gemaakt van apparatuur waarin kunststoffen aanwezig zijn. Uitloging van organische microverontreinigingen uit de kunststoffen kan een onjuist beeld geven van de analyseuitkomsten. Per rwzi en per week zijn mengmonsters gemaakt, zodat uiteindelijk 6 monsters overblijven, waarmee het project is uitgevoerd.

In tabel 1 is een overzicht opgenomen van de bemonsterde rwzi's. Deze zuiveringsinstallaties lozen in het Rijnstroomgebied.

Tabel 1: Gegevens van de bemonsterde rwzi's

	Culemborg	Nieuwgraaf[a]	Renkum
capaciteit rwzi ve	52.000	300.000	160.000
huishoudens (ve)[b]	n.b.	225000 (75%)	128000 (80%)
industrie (ve)	n.b.	75000 (25%)	32000 (20%)
lozing op	Lek	IJssel	Nederrijn
gem. debiet 18 t/m 21 april (m3/etm)	13778	81025	19000
gem. neerslag 18 t/m 21 april (mm/etmaal)	2.5	6.5	4.3
gem. debiet 23 t/m 26 mei (m3/etm)	9924	41175	10862
gem. neerslag 23 t/m 26 mei (mm/etmaal)	0.5	0	0

[a] Arnhem en omgeving [b] verontreinigingseenheden

2.2 Vloeistof / vloeistof extractie van de monsters

Het totale monster is geëxtraheerd met vloeistof / vloeistof extractie met dichloormethaan (methode: afvalwater GC/MS (W 8140 5.396, W 8140 5.398[3,2])). Het doel hiervan is om een vergelijking van de gevonden stoffen in de totaal extractie te kunnen maken met de stoffen die in de fracties gevonden worden.

2.3 HPLC-preconcentrering en fractionering

Doel van het project is een overzicht te krijgen van veel voorkomende polaire stoffen in effluenten van rwzi's. Hiertoe is een methode ontwikkeld waarbij een HPLC-kolom wordt beladen met monster. De beladen kolom wordt vervolgens geëlueerd met een water/methanol-gradiënt. Gekozen is voor een grote kolom en een pompsysteem, die grote hoeveelheden kan verpompen. Voordeel hiervan is dat een grotere intake van het monster in bewerking kan worden genomen. Hierdoor worden ook grotere fracties verkregen.

2.4 Extractie van fracties

Na het verkrijgen van de fracties is het overbrengen van de polaire stoffen van de fracties naar een ander oplosmiddel nodig om de extracten geschikt te maken voor screening met GC/MS. De extractie is uitgevoerd met dichloormethaan, bij verschillende pH (2 en 10). Dit om mogelijk aanwezige zure en basische organische microverontreinigingen volledig uit de fracties te kunnen extraheren en te meten.

2.5 Screening

De geëxtraheerde fracties zijn gemeten met GC/MS in de full scan mode en vervolgens zijn de chromatogrammen gedeconvuleerd met AMDIS. De resultaten worden vervolgens ingelezen in de RIZA-GC/MS-database. Op deze manier is een semi-automatische identificatie van componenten mogelijk.

3 Resultaten

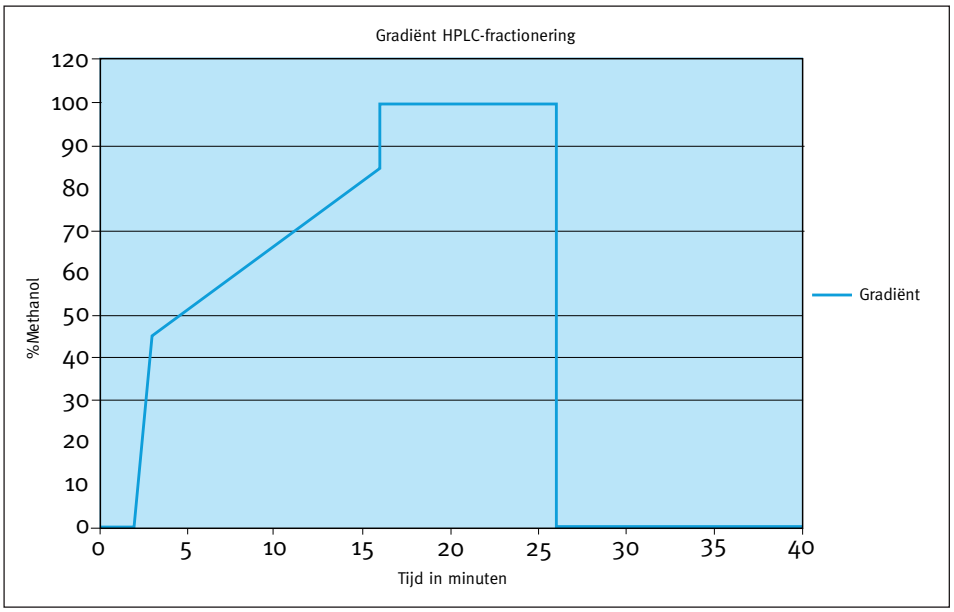
3.1 Vloeistof / vloeistof extractie van de monsters

De monsters zijn geëxtraheerd volgens plan. De chromatogrammen konden goed gedeconvolueerd worden met AMDIS. De aangetroffen pieken zijn met de AMDIS algoritmes en met de NIST search algoritmes zo goed mogelijk geïdentificeerd. Omdat slechts een kleine monsterhoeveelheid in bewerking is genomen (zie hoofdstuk 3.4) werden veel minder stoffen aangetroffen dan bij de fractioneringen. Het bleek dat de uitkomsten niet zinvol binnen het tijdsbestek van dit project vergeleken konden worden met de fractioneringen. Daarom is besloten dit onderdeel te schrappen.

3.2. HPLC-preconcentrering en fractionering

Een preparatieve HPLC-kolom is met behulp van een externe pomp beladen met 100 ml monstermateriaal. Vervolgens is de beladen kolom in een HPLC-systeem geplaatst en geëlueerd middels een water/methanol-gradiënt. De gradiënt is weergegeven in figuur 1.

Figuur 1: Overzicht van gradiënt bij HPLC-fractionering



In het systeem bevindt zich een fractioneringtoestel, waarmee op gezette tijdstippen fracties zijn opgevangen. De fractionering is zo uitgevoerd dat van 2 tot 21 minuten één fractie per minuut werd afgevangen en er dus 19 fracties ontstaan van 30 ml (flow is 30 ml/min). Een aantal fracties is samengevoegd zodat uiteindelijk 3 eindfracties zijn verkregen, nl. tot ca. log Kow 2 (f1 t/m f5), van log Kow 2 tot ca. log Kow 4 (f6 t/m f12) en hoger dan log Kow 4 (f13 t/m f19). De meest polaire stoffen zullen als eerste van de kolom af zijn gekomen, omdat ze meer affiniteit met het eluens hebben. Meer apolaire stoffen zijn sterker aangetrokken tot de stationaire fase en zullen daarom langer in de kolom blijven.

Om de fracties op basis van log Kow te bepalen zijn 2 referentiestoffen toegevoegd, te weten metoxuron (log Kow = 2,11) en fluoreen (log Kow = 4,02). De log Kow-waarden zijn bepaald met behulp van het programma Episuite[1]). Deze stoffen geven een piekmaximum bij respectievelijk

6,3 en 13,5 minuten.
Bijlage 1 bevat een voorbeeld van chromatogram, waarbij de fractionering is aangegeven.

3.3 Extractie van fracties

Er is gebruik gemaakt van vloeistof-vloeistof-extractie met dichloormethaan bij pH 2 en pH 10. Er is gekozen voor een lage en hoge pH om ook geladen stoffen (zowel zuur als basisch) te kunnen extraheren. Deze extracten zijn niet samengevoegd, maar afzonderlijk gemeten. Zo zijn van elke samengevoegde fractie twee extracten verkregen, nl. bij pH 2 en 10.
De hoeveelheid dichloormethaan is ongeveer een derde van de totale hoeveelheid in de fractie. De verkregen extracten zijn nog uitgeschud met water om restanten methanol te verwijderen. Het eindvolume van de fracties is ongeveer 1 ml. Een gedetailleerde werkwijze is opgenomen in bijlage 2.

3.4 Screening

In de chromatogrammen is duidelijk dat er veel matrix (humuszuren etc.) aanwezig is. Dat klopt, omdat feitelijk een equivalent van 5 ml afvalwater is geïnjecteerd. Dat is 5000x zo veel als bij de normale afvalwateranalyse (AWCOMP-methode) en 2x zo veel als bij de oppervlaktewateranalyse (MPV-methode) feitelijk geïnjecteerd wordt. In tabel 2 zijn de equivalente injectiehoeveelheden op een rij gezet.

Tabel 2: Equivalente injectiehoeveelheden in µl

methode	hoeveelheid monster dat wordt opgewerkt (ml)	volume eindextract (ml)	GC-injectie (µl)	equivalente injectie (µl)
fractionering (per fractie)	100	1	50	5000
normale oppervlaktewateranalyse MPV	200	4	50	2500
normale afvalwateranalyse AWCOMP	10	10	1	1

De chromatogrammen konden goed gedeconvolueerd worden met AMDIS. De aangetroffen pieken zijn met de AMDIS algoritmes en met de NIST search algoritmes zo goed mogelijk geïdentificeerd.

3.5 Interpretatie analyseresultaten

Alle analyseresultaten zijn ingelezen in een access database. Vervolgens is in deze database nagegaan welke individuele stoffen zijn aangetroffen in alle analyses van alle monsters. Dit betreft in totaal 519 stoffen (vloeistof/vloeistof extractie en fractioneringen).
De cas-nummers van deze stoffen zijn ingelezen in het Episuite-programma (Kowwin)[1]. In dit programma is voor een groot aantal stoffen de berekende (m.b.v. QSAR-rekenmodel) en soms ook experimentele log Kow te vinden. Voor 60% van de aangetroffen stoffen was dit het geval. Het QSAR-model bepaalt daarbij op basis van structuurkenmerken van organische stoffen de log Kow.

Uit de informatie in de database met analysegegevens en log Kow-waarden zijn vervolgens verschillende doorsneden gemaakt van de gevonden resultaten.

3.5.1. Aantallen stoffen in de monsters

In tabel 3 is een overzicht opgenomen van het totale aantal met GC/MS en AMDIS geïdentificeerde stoffen. Duidelijk is dat er na het fractioneren veel meer stoffen zijn geïdentificeerd dan na vloeistof / vloeistof-extractie. Dit komt waarschijnlijk om dat er bij de vloeistof / vloeistof-extractie veel

minder vloeistof in behandeling is genomen en omdat die monsters alleen bij neutrale pH zijn geëxtraheerd.

Tabel 3: Aantallen gedetecteerde stoffen

	alle rwzi-effluenten		Culemborg		Nieuwgraaf		Renkum	
	lle	fraction.	lle	fraction.	lle	fraction.	lle	fraction.
aantal stoffen	177	344	65	160	72	169	66	166

3.5.2. Geïdentificeerde stoffen bij de fractioneringen

De fractioneringen hadden ten doel om de stoffen te verdelen in de volgende fracties:

- log Kow ‹ 2 (de in potentie weinig bioaccumulerende en behoorlijk water oplosbare stoffen)
- log Kow 2-4 (de middelmatig bioaccumulerende stoffen)
- log Kow ›4 (sterk bioaccumulerende en slecht water oplosbare stoffen)

De resultaten van de analyses beperken zich tot informatie over de piekhoogtes van stoffen in het GC/MS chromatogram.

De analyseresultaten geven informatie over extractie bij twee pH's (2 en 10). Bij de uitwerking is ervoor gekozen om voor elke stof per fractie, per meetlocatie en voor beide meetperioden de gemeten piekhoogtes voor beide pH's uit te middelen. Dit klinkt ingewikkeld. Daarom is dit in een fictief rekenvoorbeeld uitgewerkt voor een stof A die voorkomt in fractie 1.

Stof A is alleen in fractie 1 in rwzi Renkum aangetroffen. Dit leverde de volgende meetwaarden op:

meet periode 1:
extractie pH 2: resultaat analyse --› piekhoogte 100
extractie pH 10: resultaat analyse --› piekhoogte 200

meetperiode 2:
extractie pH 2: resultaat analyse --› piekhoogte 400
extractie pH 10: resultaat analyse --› piekhoogte 100

Het gemiddelde resultaat voor stof A in rwzi Renkum voor beide pH's komt dan uit op
(100 + 200 + 400 +100)/4 = 200

Deze wijze van uitwerking is gevolgd voor alle stoffen in de verschillende fracties. Per fractie worden de resultaten nu toegelicht.

Aangetroffen stoffen in fractie 1 (log Kow ‹ 2)
In totaal zijn er 196 stoffen aangetroffen in fractie 1. Alleen de 27 stoffen met een Amdis netto fit van groter dan 80% zijn vermeld in tabel 4.

In tabel 4 worden in hoofdzaak stoffen verwacht die een log Kow hebben van ‹2 of in de buurt van 2. Voor veel stoffen is dat inderdaad het geval. Er staan ook enkele stoffen tussen die een

veel hogere log Kow hebben. Dit kan zijn veroorzaakt door een onnauwkeurige identificatie van de stoffen, beperktheid van de log Kow cijfers in het Episuite programma Kow-win of onvoldoende HPLC-scheiding. De verschillen tussen de berekende en experimentele Kow is meestal niet erg groot. De andere oorzaken zijn waarschijnlijk van groter belang.

Tabel 4: Aangetroffen stoffen in fractie 1 (log kow <2) met een AMDIS netto fit > 80% . Vermeld zijn de geschatte log Kow (kow est) en experimentele log kow (kow exp) en de gemiddelde piekhoogte per locatie

casnummer	verbinding	kow est	kow exp	Culemborg	Nieuwgraaf	Renkum
100-06-1	Acetophenone, 4'-methoxy-	1,75	1,74	16837	42531	10299
100-83-4	Benzaldehyde, 3-hydroxy-	1,23	1,29	14162		
102-76-1	Triacetin	0,36	0,25	67169		
103-65-1	Benzene, propyl-	3,52	3,69	25889	26100	7590
108-39-4	Phenol, 3-methyl-	2,06	1,96		5569	
1125-21-9	2,6,6- Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione	1,88			371249	48507
119-36-8	Methyl Salicylate	2,6	2,55			2965
120-72-9	Indole	2,05	2,14	239165	66608	205311
135-77-3	1,2,4-Trimethoxybenzene	1,72				19319
1698-60-8	Pyrazon	0,76	1,14		77649	
2008-58-4	Benzamide, 2,6-dichloro-	0,9	0,77	1303260	1581080	
2409-55-4	Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	3,97				13537
256-96-2	Iminostilbene	4,06		113454		122528
25812-30-0	Gemfibrozil	4,77				218192
260-94-6	Acridine	3,32	3,4	15767	133468	
3112-85-4	Sulfone, methyl phenyl	0,56				41074
3380-34-5	Triclosan	4,66	4,76	8315		13789
37557-96-3	sulfon, 1,1-dichlorodimethyl-	0,81		91499		35056
486-56-6	Cotinine	0,34	0,07	15242		10163
70-55-3	Benzenesulfonamide, 4-methyl-	0,92	0,82	817799		148081
80-39-7	Benzenesulfonamide, N-ethyl-4-methyl-	1,87		113637	42431	78978
872-50-4	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	-0,11	-0,38	180271	12133	
87-86-5	Phenol, pentachloro-	4,74	5,12	26092		
88-06-2	Phenol, 2,4,6-trichloro-	3,45	3,69			267046
88-75-5	Phenol, 2-nitro-	1,91	1,79			7841909
91-22-5	Quinoline	2,14	2,03		50020	
95-48-7	Phenol, 2-methyl-	2,06	1,95		2163	

3.5.3 Aangetroffen stoffen in fractie 2 (log Kow 2-4)

In totaal zijn er 187 stoffen aangetroffen in fractie 2. Alleen de 27 stoffen met een Amdis netto fit van groter dan 80% zijn vermeld in tabel 5.

In tabel 5 worden in hoofdzaak stoffen verwacht die een log Kow hebben tussen 2 en 4. Voor veel stoffen is dat inderdaad het geval. Er staan ook enkele stoffen tussen die een wat hogere of juist lagere log Kow hebben. Net als bij de identificatie van de stoffen in fractie 1 kan dat zijn veroorzaakt door een onnauwkeurige identificatie van de stoffen, beperktheid van de log Kow cijfers in het Episuite programma Kow-win of onvoldoende HPLC-scheiding. De verschillen tussen de berekende en experimentele Kow is meestal niet erg groot. De andere oorzaken zijn waarschijnlijk van groter belang.

Tabel 5: Aangetroffen stoffen in fractie 2 (log kow 2-4) met een AMDIS netto fit › 80% . Vermeld zijn de geschatte log Kow (kow est) en experimentele log kow (kow exp) en de gemiddelde piekhoogte per locatie.

verbinding	kow est	kow exp	Culemborg	Nieuwgraaf	Renkum
Phenol, 3-methyl-	2,06	1,96			3734
Methyl Salicylate-	2,6	2,55	6082	2273	5928
Benzonitrile, 2,6-dichloro-	2,83	2,74	21593	81161	43841
1,3,5-Triazine-2,4-diamine, 6-chloro-N,N'-diethyl-	2,4	2,18		14402	
.alpha. Isomethyl ionone	4,84			43425	
Lidocaine	1,66	2,44	291221	159307	244290
Atrazine	2,82	2,61		137467	
Pirimicarb	1,4	1,7	28339		10779
Iminostilbene	4,06		243991	403114	136287
Acridine	3,32	3,4	31120	23302	
Carbamazepine	2,25	2,45	209572	266400	208029
Triclosan	4,66	4,76		28707	
Triphenylphosphine sulfide	4,86				49755
ethenylbenzaldehyde	2,61				6701
Propyphenazone	2,05	1,94		8305879	
pyrimethanil	3,19		15902		51190
Cyclopenta(def)phenanthrenone	4,14				14712
Naphthalene, 1,6-dimethyl-	4,26			10155	
Benzothiazole, 2-(methylthio)-	3,22	3,15	209079	124830	143648
Benzoyl bromide	1,53			177293	
Triphenylphosphine oxide	3,1	2,83		35230	18501
Benzenesulfonamide, N-ethyl-4-methyl-	1,87			248814	229787
9,10-Anthracenedione	3,34	3,39		1584483	36924
7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin	6,42			207226	
Xanthone	3,84	3,39			50716
Quinoline, 2-methyl-	2,69	2,59	16680	40840	42984
Quinoline, 2,7-dimethyl-	3,24		8174		

Aangetroffen stoffen in fractie 3 (log Kow ›4)

In totaal zijn er 132 stoffen aangetroffen in fractie 3. Alleen de 13 stoffen met een Amdis netto fit van groter dan 80% zijn vermeld in tabel 6.

In tabel 6 worden in hoofdzaak stoffen verwacht die een log Kow hebben ›4. Voor veel stoffen is dat inderdaad het geval. Er staan ook enkele stoffen tussen die een wat lagere log Kow hebben. Net als bij de identificatie van de stoffen in de andere fracties kan dat zijn veroorzaakt door een onnauwkeurige identificatie van de stoffen, beperktheid van de log Kow cijfers in het Episuite programma Kow-win en onvoldoende HPLC-scheiding. De verschillen tussen de berekende en experimentele Kow is meestal niet erg groot. De andere oorzaken zijn waarschijnlijk van groter belang. Een stof kan ook gedeeltelijk in een andere HPLC-fractie terecht komen. Dit duidelijk te zien aan de stof carbamazepine (log Kow 2.45) die in zowel in fractie 2 als 3 geconstateerd wordt.

Tabel 6: Aangetroffen stoffen in fractie 3 (log kow ›4) met een AMDIS netto fit › 80% . Vermeld zijn de geschatte log Kow (kow est) en experimentele log kow (kow exp) en de gemiddelde piekhoogte per locatie

casnummer	verbinding	kow est	kow exp	Culemborg	Nieuwgraaf	Renkum
100-44-7	Benzyl chloride	2,79	2,3		13370	9685
105-75-9	2-Butenedioic acid (E)-, dibutyl ester	4,16		1038536		
1194-65-6	Benzonitrile, 2,6-dichloro-	2,83	2,74		12598	
127-51-5	.alpha. Isomethyl ionone	4,84		6125	12333	11389
256-96-2	Iminostilbene	4,06			132865	
298-46-4	Carbamazepine	2,25	2,45		71897	
3380-34-5	Triclosan	4,66	4,76	17765	47917	23499
67306-03-0	Morpholine, 4-[3-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-2-methylpropyl]-2,6-dimethyl-	5,5			46154	
7560-83-0	Cyclohexanamine, N-cyclohexyl-N-methyl-	4,58	3,71		43287	
791-28-6	Triphenylphosphine oxide	3,1	2,83		39590	
80-39-7	Benzenesulfonamide, N-ethyl-4-methyl-	1,87			36159	
88-29-9	7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin	6,42		13250	91327	103310
93-37-8	Quinoline, 2,7-dimethyl-	3,24		15834		

Meest frequent aangetroffen stoffen

Het GC/MS-Amdis systeem geeft een betrouwbaarheid aan van de identificatie (netto fit). Als criterium is gekozen om alleen de stoffen te rapporteren met een net fit › 80%. Dit wordt beschouwd als een redelijk optimum tussen de kans op vals positieve resultaten (een stof verkeerd benoemen) en vals negatieve resultaten (een stof missen omdat de identificatie criteria te streng zijn).

Om een beter beeld te krijgen is nagegaan welke stoffen in de analyses van de fracties heel vaak zijn aangetroffen (tabel 7). Normaliter zou één stof hooguit één keer in een fractie aanwezig kunnen zijn. Er zijn echter GC/MS analyses uitgevoerd op 3 fracties bij 2 pH-waarden en in twee bemonsteringsperioden. Wanneer GC/MS-Amdis vaak een stof constateert dan geeft dat vertrouwen dat de juiste stof wordt geïdentificeerd. Op zich kan een stof in één fractie bij één rwzi maximaal vier keer worden geconstateerd (2x bemonsterd en bij 2 pH-waarden geëxtraheerd). Omdat er drie fracties zijn geanalyseerd en drie rwzi's zijn bemonsterd kan een stof dus 36 keer worden gesignaleerd. Uit de analysegegevens van de fracties in de database is afgeleid welke stoffen in een frequentie

hoger dan vijf keer (een arbitraire keuze!) zijn waargenomen in de analyses van de verschillende fracties, zie tabel 7. Dit zijn de stoffen die in dit project vermoedelijk met de hoogste zekerheid zijn geïdentificeerd. Tevens is nagegaan of deze stoffen op alle locaties zijn aangetroffen. Voor alle stoffen was dit het geval.

Tabel 7: 17 stoffen die meer dan vijf keer zijn aangetroffen in de gefractioneerde monster

verbinding	toepassing	aan-tal	kow est	kow exp	Culem-borg	Nieuw-graaf	Renkum
Acetophenone, 4'-methoxy-	smaakstof in boter chocolade	10	1,75	1,74	+	+	+
Benzene, propyl-	oplosmiddel	7	3,52	3,69	+	+	+
Methyl Salicylate	middel tegen spierpijn	7	2,6	2,55	+	+	+
Benzonitrile, 2,6-dichloro-	herbicide	12	2,83	2,74	+	+	+
alpha. Isomethyl ionone	geurstof zeep	12	4,84		+	+	+
Lidocaine	lokaal anaesteticum	6	1,66	2,44	+	+	+
Benzo[h]quinoline	verbrandingsproduct	7	3,32	3,43	+	+	+
(Iminostilbene (carbamazepine breekt in de GC injector af tot iminostilbeen))	kraakproduct carbamazepine)	(19)	(4,06)		+	+	+
Acridine	verbrandingsproduct	11	3,32	3,4	+	+	+
Carbamazepine	antiepilepticum	14	2,25	2,45	+	+	+
Triclosan	conserveermiddel deodorant	12	4,66	4,76	+	+	+
Pyrimethanil	fungicide	7	3,19		+	+	+
Benzothiazole2 -(methylthio)-	rubberchemicaliïen	13	3,22	3,15	+	+	+
Benzenesulfonamid4-methyl-	weekmaker	6	0,92	0,82	+	+	+
Benzenesulfonamide, N-ethyl-4-methyl-	weekmaker	13	1,87		+	+	+
2-Pyrrolidino1-methyl-	oplosmiddel	9	-0,11	-0,38	+	+	+
7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4, 4-tetramethyltetralin	geurstof versalide®	11	6,42		+	+	+
Quinoline, 2-methyl-	verdovingsmiddel vis	6	2,69	2,59	+	+	+

De zeventien stoffen in tabel 7 zijn zeer geregeld in het afvalwater geconstateerd. Een nadere controle op de identificatie is echter nog mogelijk.

Zijn de stoffen qua chemische structuur in de juiste log Kow fracties terecht gekomen? M.a.w.: klopte de experimentele en of theoretisch afgeleide log Kow waarde met het al dan niet aantreffen van deze stoffen in de juiste fracties? Dit is niet direct uit de tabel af te leiden. Voor de cursief geschreven namen in tabel 7 is dit nagegaan en bleek dit het geval te zijn. Alleen voor de stof iminostilbeen klopte dit niet. Deze stof heeft een hoge log Kow, maar wordt meestal in fractie 1 (log Kow <2) of fractie 2 (log Kow 2-4) gevonden. Dit kan worden verklaard doordat deze stof ontstaat door gedeeltelijke thermische pyrolyse van carbamazepine in de injectiepoort van de GC/MS-apparatuur. Carbamazepine wordt meestal in fractie 2 aangetroffen. Het is dus goed verklaarbaar dat in die fractie ook iminostilbeen wordt gevonden.

Een andere controle is of de stoffen bij de juiste pH zijn geëxtraheerd. Amines bijvoorbeeld worden juist bij hoge pH geëxtraheerd en zure verbindingen bij lage pH. Voor die verbindingen waarvan het casnr. ook cursief vermeld is in tabel 7 werd die stof geëxtraheerd bij de juiste pH en daarna geïdentificeerd. Geconcludeerd kan worden dat vrijwel alle cursief geschreven stoffen in tabel 7 met een grote mate van waarschijnlijkheid correct zijn geïdentificeerd. Alleen de juistheid van de identificatie van propyleenbenzeen is twijfelachtig.

3.6 Wat zijn de meest relevante stoffen?

Deze vraag kan slechts tot op zekere hoogte worden beantwoord. Voor een echte beoordeling is informatie nodig over de gehalten van stoffen in het afvalwater en liefst ook het oppervlaktewater. Deze gegevens zijn niet beschikbaar. Toch geeft de laatste tabel uit de vorige paragraaf aanknopingspunten t.a.v. de relevantie van de geïdentificeerde stoffen.
Vanuit milieuoogpunt kunnen de meeste vragen worden gezet bij de stoffen met een hoge log Kow die kunnen bioaccumuleren. De geurstoffen isomethylionone en versalide, en het conserveringsmiddel Triclosan kunnen worden genoemd.

Vanuit de drinkwaterhoek zijn de meer polaire stoffen (log Kow <2,5) vaak een probleem. Deze slippen mogelijk wat gemakkelijker door de drinkwaterzuiveringen heen. De meest relevante stoffen lijken te zijn:
- 4-methoxyacetophenone (smaakstof);
- methylsalicylate (middel tegen spierpijn);
- carbamazepine (antiepilepticum);
- de twee sulfonamides (kennen toepassing als als weekmaker)
- N-methylpyrrolidone (polair oplosmiddel).

4

Conclusie en aanbevelingen

Met de fractioneringmethode worden door AMDIS, een flink aantal stoffen aangetroffen in de fracties.

In de analyses van de gefractioneerde monsters zijn in totaal 344 stoffen aangetroffen. Het merendeel van die stoffen is slechts één keer aangetoond. Zeventien stoffen zijn geregeld in het afvalwater aangetroffen en met zeer grote waarschijnlijkheid goed geïdentificeerd. Het grootste deel van die stoffen is in de juiste log Kow-fracties aangetroffen en vaak was er ook een zeer goede overeenstemming met de pH waarbij ze werden geëxtraheerd en vervolgens geïdentificeerd.

Binnen de hiervoor genoemde groep van zeventien stoffen zijn stoffen welke in potentie bioaccumuleren (log Kow >4). Daarbij moet worden gedacht aan de geurstoffen isomethylionone en versalide, en het conserveringsmiddel Triclosan dat o.a. in deodorant wordt gebruikt.

Daarnaast zijn er polaire stoffen die een aandachtspunt kunnen zijn voor de drinkwaterbereiding. Dit betreft 4-methoxy- acetophenon (smaakstof), methylsalicylaat (middel tegen spierpijn) en het antiepilepticum carbamazepine. Daarnaast zijn er polaire sulfonamides (4-methylbenzeensulfamide en N-ethyl-4-methylbenzeensulfonamide) en sporen van het oplosmiddel N-methylpyrrolidone aangetroffen. De genoemde sulfonamides worden wel als weekmaker in kunststoffen gebruikt.

Aanbevolen wordt om de HPLC-methode en –fractionering uit te voeren met een kleiner monstervolume. Waarschijnlijk is 5 ml voldoende en kan gebruik worden gemaakt van een fractioneringsysteem voor kleinere hoeveelheden. Voordeel hiervan is dat de extractie van de fracties minder arbeidsintensief is dan bij een monstervolume van 100 ml. Dit levert dus tijdswinst op.

Waarschijnlijk zijn niet alle interessante polaire verbindingen zichtbaar op de GC. Niet alle polaire stoffen zullen immers gaschromatografeerbaar zijn en blijven met deze analysemethode buiten beeld. Een optie is de extracten in te vriezen en eventueel later te analyseren met LC-MS. Identificatie van onbekenden vindt dan plaats met LC- (hoge resolutie) MS.

Aanbevolen wordt om tijdens reguliere monitoring in oppervlaktewater, afvalwater en bij drinkwaterbereiding oog te hebben voor de aanwezigheid van de zeventien gevonden stoffen. De in deze studie uitgevoerde screeningen zouden vaker moeten worden uitgevoerd. Bepaling van de concentraties is ook een aandachtspunt. Wanneer daar meer inzicht in is, dan kunnen de consequenties voor organismen in oppervlaktewater en de betekenis voor de drinkwaterbereiding beter in kaart worden gebracht.

5 Referenties

1. Programma Episuite, te downloaden via Internet. http://www.epa.gov/oppt/exposure/docs/episuitedl.htm

2. Van Delden, E., van Kuijck, S., van Duijn, P., 2004. “De bepaling van SIVEGOM componenten in AW met GC/MS.”, W8140-5.398

3. Van Kuijck, S., van Delden, E.F., 2003. “De bepaling van enkele organische componenten in AW met GC/MS.”, W8140-5.396.

4. Watson, RIZA databestand van stoffen in effluenten.

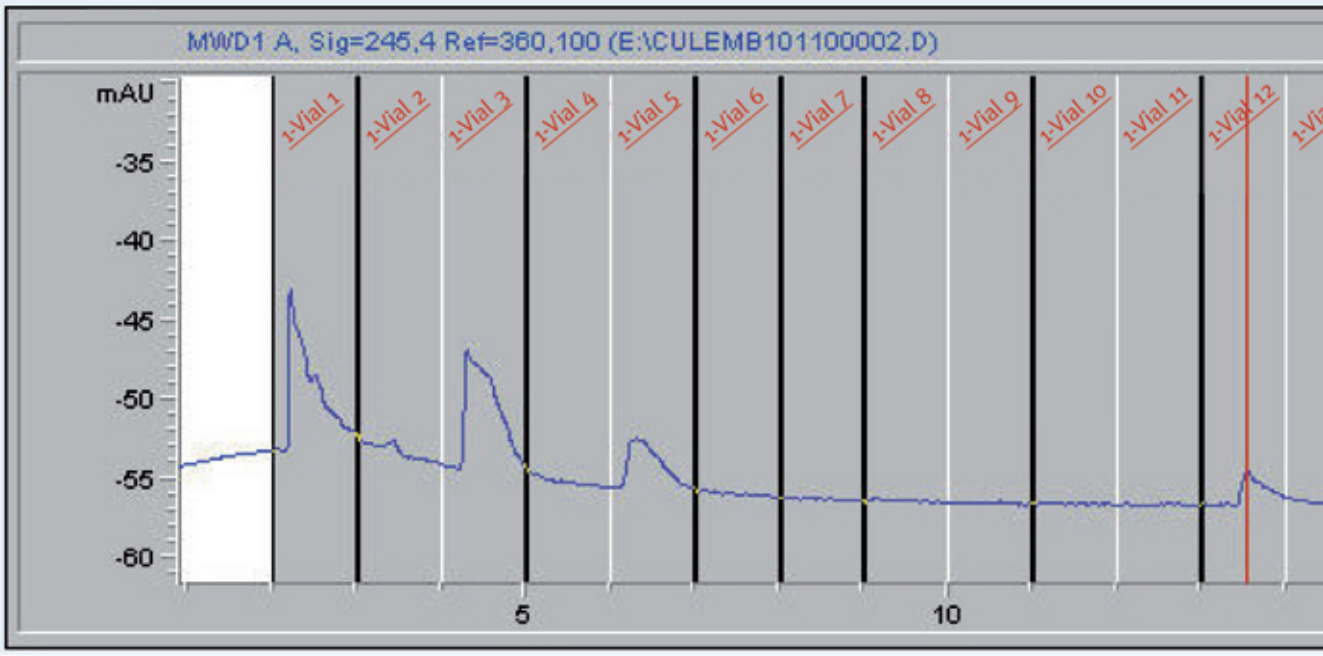
6

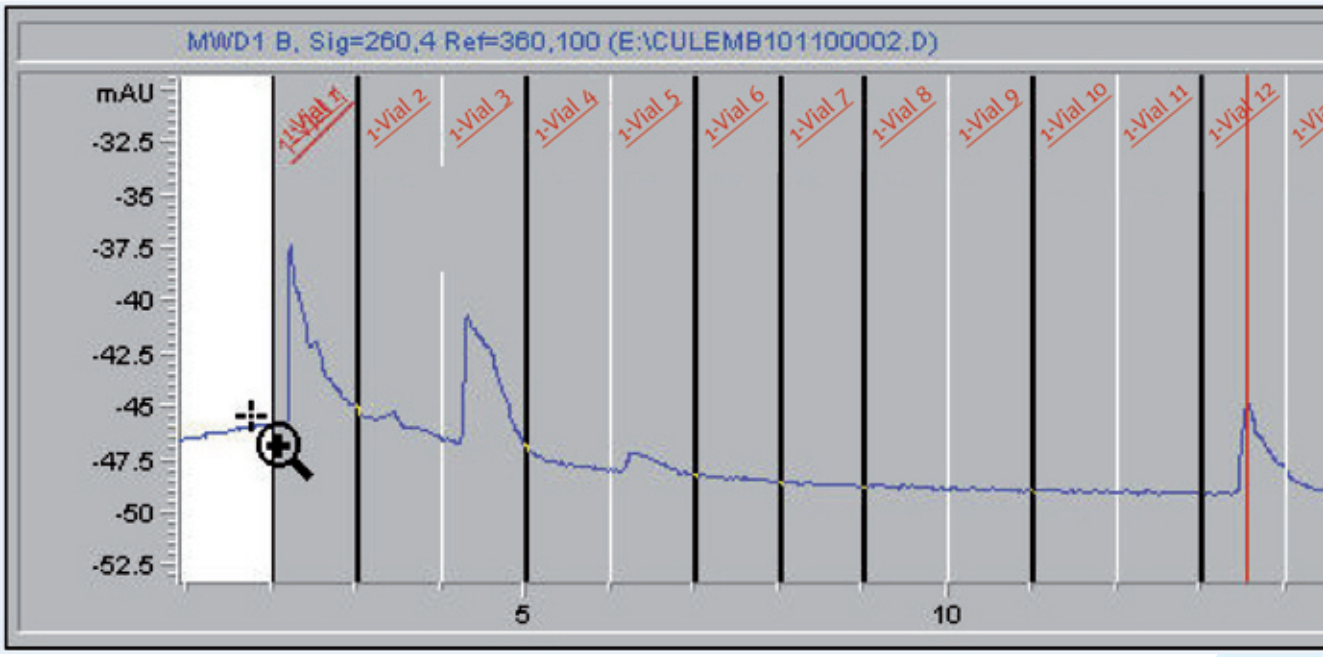
Bijlagen

1. Voorbeeldchromatogram met fractionering
2. Werkwijze voor de extractie van fracties

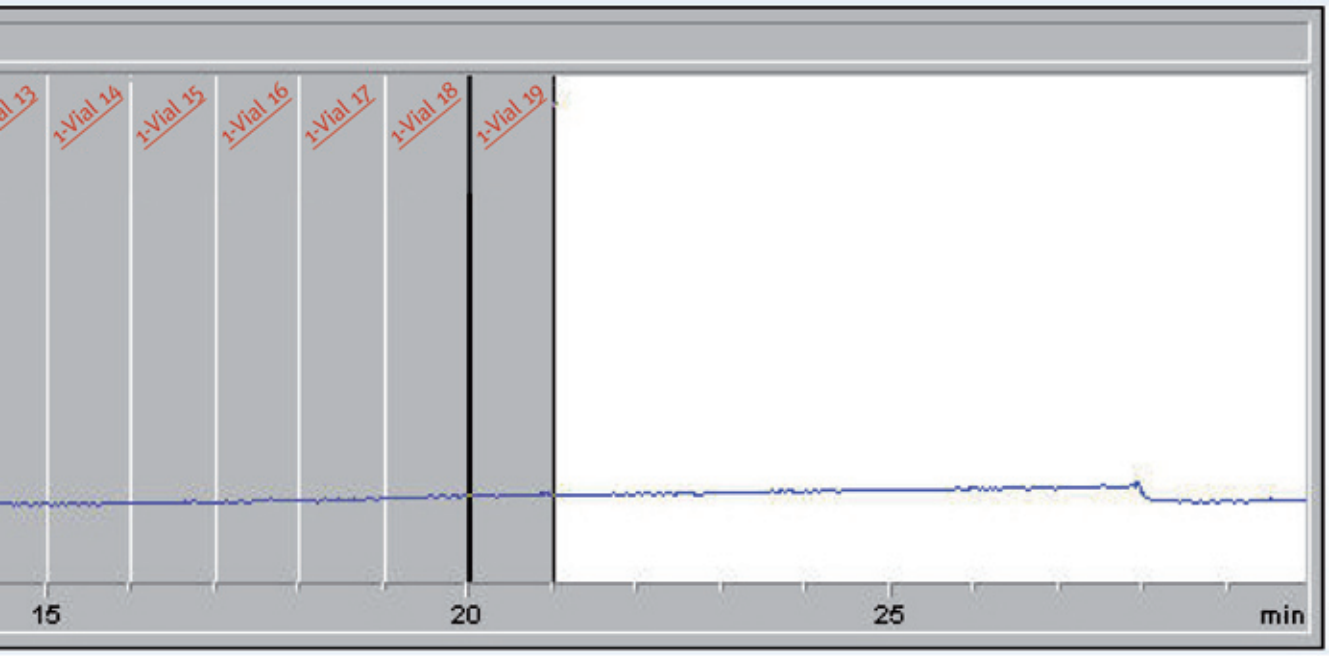
Bijlage 1

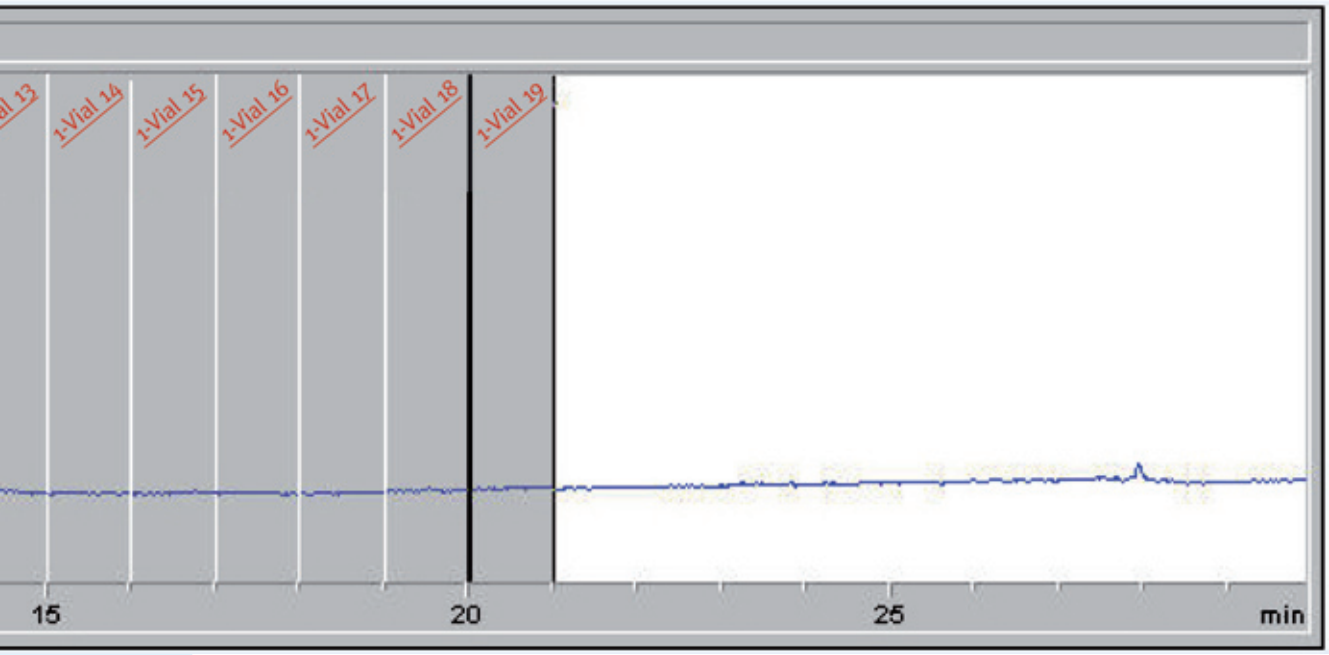
Voorbeeldchromatogram fractionering





fractie 1	fractie 2	fractie3
(1 t/m 5)	(6 tm 12)	(13 t/m 19)
tot log Kow2	log Kow2 tot log Kow4	› log Kow4


1-Vial 14
1-Vial 15
1-Vial 16
1-Vial 17
1-Vial 18
1-Vial 19
15
20
25
min


1-Vial 14
1-Vial 15
1-Vial 16
1-Vial 17
1-Vial 18
1-Vial 19
15
20
25
min

Bijlage 2 Werkwijze voor de extractie van fracties

Voer de volgende handelingen uit voor blanco en monsters:

- Voeg fractie 1 t/m 5 samen in een scheitrechter van 500 ml. Extract hiervan is fractie 1.
- Voeg fractie 6 t/m 12 samen in een scheitrechter van 500 ml. Extract hiervan is fractie 2.
- Voeg fractie 13 t/m 19 samen in een scheitrechter van 500 ml. Extract hiervan is fractie 3.
- Breng met ca. 200 µl HCl (6N) op pH2.
- * Voeg aan de fracties 1,2 en 3 respectievelijk 50 ml, 70 ml en 70 ml dichloormethaan toe (komt overeen met ongeveer een derde deel van de totale hoeveelheid in de fractie).
- Ontlucht de scheitrechter en extraheer de fracties door 10 minuten te schudden in de schudmachine bij 150 slagen per minuut.
- Laat de scheitrechter, zonder stop, circa 2 minuten in de houder staan zodat de lagen kunnen ontmengen. Als er sterke emulievorming optreedt, wordt het extract gecentrifugeerd.
- Voeg aan fractie 3 ca. 100 ml water toe om de laag dichloormethaan te kunnen onderscheiden (methanol mengt met dichloormethaan).
- Laat de onderste (dichloormethaan)laag overlopen in een erlenmeyer van 100 ml, waarin zich een schep natriumsulfaat bevindt. De hoeveelheid natriumsulfaat moet zodanig zijn dat het gaat zweven in het extract. Pas dan is het extract voldoende vrij van water (water zorgt voor klontering).
- Breng met ca. 600 µl NaOH (2.5M) op pH10.
- Voer nogmaals een extractie uit vanaf *. **Let op:** Laat bij deze stap de laag dichloormethaan overlopen in een schone erlenmeyer van 100 ml.
- Damp de extracten in met behulp van de Kuderna-Danish opstelling tot ca. 10 ml.
- Plaats vervolgens de reageerbuizen in de turboevaporator en damp in tot ca. 1 ml.
- Schud alle fracties 2 en 3 nog eens uit met 1 ml water. Dit omdat het extract ook nog methanol bevat.
- Vul alle extracten aan tot 1 ml en breng over in een vial, waarin zich natriumsulfaat bevindt.
- Analyseer de extracten met GC/MS in de full scan mode (volgens MPV-methode).

Colofon

Ministerie van Verkeer en Waterstaat

Auteurs: G. Rinia
drs. R.P.M. Berbee

Projectleider: dr. J. Staeb

Reviewer: dr. M. Ferdinandy

Uitgever: Riwa-Rijn Vereniging van Rivierwaterbedrijven

Ontwerp: Meyson Communicatie, Amsterdam

Druk: ATP Digitale Media

ISBN-10: 90-6683-122-7
ISBN-13: 978-90-6683-122-3

Notities

RIWA
Rijnwaterbedrijven

Groenendael 6
3439 LV Nieuwegein
T +31 (0)30 600 90 30
F +31 (0)30 600 90 39
E riwa@riwa.org
W www.riwa.org

Vereniging van Rivierwaterbedrijven