



Brede chemische screening voor het monitoren van de waterkwaliteit

Ton van Leerdam (KWR), Bernard Bajema (Vitens), Bendert de Graaf (Vitens), Jan van der Kooi (WLN), Leo Puijker (KWR)

Wereldwijd worden steeds meer stoffen geproduceerd. Een deel van die stoffen komt uiteindelijk in het milieu terecht. Het aantal is te groot om elke stof te monitoren en risico's te beoordelen. Daarom bestaat de behoefte aan een methode die relatief eenvoudig een zo compleet mogelijk beeld geeft van de aanwezigheid van antropogene stoffen. Vitens, WMD & WLN en KWR hebben een zogenoemde 'brede' screeningsmethode met behulp van vloeistofchromatografie-hoge resolutie massaspectroscopie (LC-HR-MS) gebruikt. Bij onderzoek van watermonsters van kwetsbare winningen bleek de methode voldoende gevoelig en effectief te zijn. Bovendien zijn enkele niet eerder bekende stoffen in het grondwater aangetoond.

In de huidige wettelijke regelingen wordt een groot aantal chemische doelstoffen genoemd, waarvan de concentraties regelmatig gemeten dienen te worden in drinkwaterbronnen en het daaruit bereide drinkwater. Voorbeelden zijn bestrijdingsmiddelen en oplosmiddelen. Soms moeten maatregelen worden genomen door drinkwaterbedrijven om de drinkwaterkwaliteit te beschermen. Er komen echter steeds meer nieuwe stoffen op de markt, die met een analyse van specifieke stoffen buiten beeld blijven. Drinkwaterbedrijven streven daarnaast naar een optimale bescherming van de drinkwaterkwaliteit en zoeken continu naar nieuwe methoden die een zo compleet mogelijk beeld opleveren. Dit is ook wettelijk vastgelegd in de drinkwaterwetgeving, die drinkwaterbedrijven verplicht 'overige antropogene stoffen' te rapporteren indien de signaleringwaarde van 1,0 µg/l per stof wordt overschreden in het drinkwater [1]. In de afgelopen jaren is de monitoring dan ook continu uitgebreid.

In dit onderzoek gebruiken we hiervoor een zogenaamde 'brede' screeningsmethode met behulp van 'vloeistofchromatografie-hoge-resolutie-massaspectroscopie' (LC-HR-MS). Met vloeistofchromatografie (LC) worden stoffen op basis van hun eigenschappen gescheiden en komen ze een voor een terecht in de hoge resolutie-massaspectrometer (HR-MS). In de HR-MS worden de stoffen geïoniseerd en wordt de accurate massa gemeten. Dit resulteert in een chromatogram met pieken. De massa is karakteristiek voor een chemische stof en de intensiteit en retentietijd van de stoffen geeft een indruk van de concentratie. Deze methode geeft een breder beeld dan doelstofanalyse, die gericht is op een beperkt aantal specifieke stoffen [2-4]. Eigenlijk wordt met één techniek de aanwezigheid van zowel bekende als onbekende stoffen in beeld gebracht. De opgedane ervaringen met deze aanpak en de daarbij horende voordelen en beperkingen zijn in overleg gedeeld met andere drinkwaterlaboratoria, RIVM en Rijkswaterstaat.

Aanpak voor harmonisatie van de methoden

Aanleiding en uitgangspunten

Al decennia lang ontwikkelt KWR, samen met drinkwaterlaboratoria en in opdracht van drinkwaterbedrijven, methoden om efficiënt de waterkwaliteit te screenen. KWR is in 2003 gestart met brede screening op basis van accurate massa en in 2006 is een Orbitrap massaspectrometer

aangeschaft. Deze techniek van brede screening bleek dermate waardevol en aanvullend op het reguliere doelstoffenonderzoek, dat Vitens en WLN rond 2010 vergelijkbare instrumenten hebben aangeschaft. In 2013 is gezamenlijk een project opgezet om van elkaar te leren, de analysemethoden op elkaar af te stemmen en op een hoger plan te tillen. Het uitgangspunt hierbij is geweest dat de uiteindelijke screeningsmethode toepasbaar moet zijn in elk drinkwaterlaboratorium. Het is uiteindelijk de bedoeling om deze brede screeningstechniek in te bedden in de nationale en internationale standaardisatie (NEN-ISO) en wettelijk te verankeren. De methode moet niet gebonden zijn aan één type apparaat van een bepaalde leverancier of specifieke software en het analyseresultaat moet wel voldoen aan minimale kwaliteitseisen. Om dit te kunnen toetsen is een vorm van kwaliteitsborging ontwikkeld en getoetst.

Inventarisatie van bestaande methoden

Allereerst is een inventarisatie van de toegepaste werkwijzen gemaakt. Hier bleken aanzienlijke verschillen in te bestaan. Daarom moesten de werkwijzen voor onder andere bemonstering, conservering van het monster, voorkomen van contaminatie, analysecondities, dataopslag en uitwisselbaarheid van meetgegevens geharmoniseerd en geoptimaliseerd worden. Hierop is het vervolg van het project gebaseerd.

Verwerking van de meetdata

Het is belangrijk om antropogene stoffen in kaart te kunnen brengen tegen een achtergrond van natuurlijke stoffen. De screening levert een grote hoeveelheid data op. Om daar conclusies uit te kunnen trekken is software nodig die in staat is om statistisch significante en relevante veranderingen in de waterkwaliteit vast te stellen. Uitgangspunt is het Drinkwaterbesluit, waarin een signaalwaarde staat voorgeschreven van 1,0 µg/l voor ‘overige antropogene stoffen’. Om ruimschoots onder deze normen te kunnen meten is een minimale concentratie van 0,01 µg/l gehanteerd. Door het ontbreken van referentiestoffen zijn concentraties berekend ten opzichte van een interne standaard (referentiestof) en uitgedrukt in equivalenten van deze interne standaard. Binnen het onderzoek zijn twee verschillende softwarepakketten onderzocht die op de meeste onderdelen goed bleken te voldoen, maar een verdere optimalisatie is wel nodig.

Onderlinge vergelijking van resultaten

Om de accurate massaspectra binnen één laboratorium en tussen de verschillende laboratoria te vergelijken, zijn vaste referentiepunten in het LC-MS-chromatogram nodig. Voor dit doel wordt een retentietijd-index gebruikt, de zogeheten Kreti. Deze Kreti wordt al meer dan 15 jaar door diverse drinkwaterlaboratoria gebruikt bij de high-performance vloeistofchromatografie (HPLC-UV) fingerprint screening om retentietijden van aangetroffen stoffen onderling te kunnen vergelijken [5,6]. Als referentiestoffen zijn fenuron en neburon gebruikt. De maximale variatie tussen laboratoria voor deze referentiestoffen mag hooguit 0,05-0,3 minuut zijn.

Om de bruikbaarheid van deze Kreti verder te toetsen, als maat voor de relatieve retentietijd voor brede chemische screening, zijn metingen van ongeveer 30 stoffen bij Vitens, WLN en KWR onderling vergeleken. Het bleek dat de relatieve retentietijden onderling goed overeenkomen (correlatiecoëfficiënt tussen 0,94 en 0,98). De Kreti is dus goed bruikbaar als indicatie voor het onderling vergelijken van aangetroffen bekende en onbekende stoffen. Voor stoffen met een retentietijd buiten het retentiegebied van de referentiestoffen moet de methode wel nog geoptimaliseerd worden.

Optimalisatie van de methode en borging

Bemonstering en conservering van monsters

Vooraf bij een chemische screening, waarbij een zo breed mogelijk palet van (onbekende) organische stoffen wordt gescreend, is het belangrijk om, tijdens bemonstering en het gehele proces van opwerking tot en met analyse, contaminatie te voorkomen. Daarom is het noodzakelijk om altijd een correctie uit te voeren voor de stoffen die in een blanco analyse worden aangetroffen. Bij vergelijkend onderzoek zijn door de drie laboratoria geen significante verschillen aangetoond tussen de gemeten stoffen in dezelfde monsterflessen. In een protocol is deze geoptimaliseerde werkwijze vastgelegd met specifieke aandacht voor schoon werken, contaminatierisico's, het juist vullen van de monsterfles en het registreren van eventuele bijzonderheden bij de bemonstering. Om ongewenste vorming van nieuwe stoffen te voorkomen wordt geen conservering toegepast, maar worden de watermonsters koel en donker bewaard en binnen 7 dagen geanalyseerd.

Isolatie van de stoffen uit water

Naast de bemonstering is het rendement voor het isoleren van de stoffen uit water geoptimaliseerd en onderling vergeleken. Hiervoor zijn 56 doelstoffen aan een (drink-) watermonster toegevoegd, waarna het opgewerkt en geanalyseerd werd. Bij Vitens en WLN wordt het watermonster direct geanalyseerd, bij KWR wordt eerst een isolatie- en concentratiestap toegepast (met een concentratiefactor van 1.000). Voor de onderlinge vergelijking zijn het isolatierendement en bijbehorende spreiding berekend uit de resultaten van 3 herhalingsmetingen. Het gemiddelde isolatierendement van de 56 stoffen ligt tussen de 93 en 111% (met een spreiding van 18-47%). Dit moet nog verder geoptimaliseerd worden, maar is voorlopig wel bruikbaar.

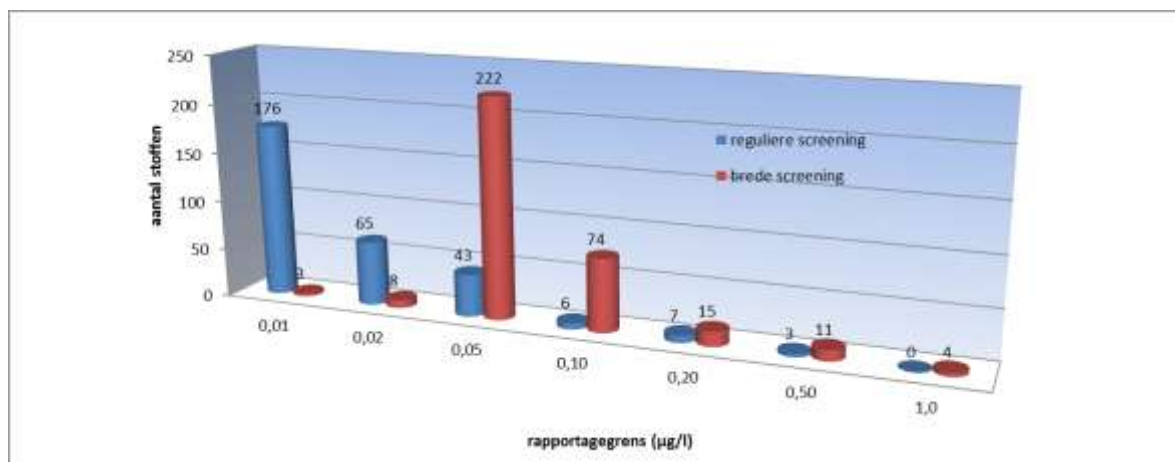
Kwaliteitsborging van de analysemethode

Het doel van de kwaliteitsborging is het toetsen van het functioneren van de analyseapparatuur en software, zodat zeker is dat de methode effectief is. Deze borging zorgt dat over een langere tijd dezelfde resultaten worden verkregen, wat essentieel is om de methode wettelijk te verankeren. Voor de kwaliteitsborging is een mengsel van stoffen en interne standaarden toegevoegd aan een watermonster en vervolgens met de screeningsmethode geanalyseerd. Hierbij wordt erop gelet dat onder andere een minimum aantal stoffen wordt teruggevonden met de juiste gevoeligheid, een minimale massanauwkeurigheid wordt gemeten en de retentie-index (KretI) binnen nauwe grenzen valt. Voor de vaststelling of een stof in het monster aanwezig is, moet het signaal in het monster minimaal vijf maal hoger zijn dan het signaal in de blanco. Deze vorm van kwaliteitsborging is een eerste stap en dient nog verder geoptimaliseerd te worden.

Vergelijk met bestaande stofspecifieke analysemethoden

Er is ook onderzoek gedaan in hoeverre de brede screeningsmethode in staat is om een breed palet aan doelstoffen te analyseren. Daarvoor zijn aan een drinkwatermonster 337 stoffen op een concentratieniveau van 0,05 – 0,1 µg/l toegevoegd. Vervolgens is dit monster onderzocht met zowel brede screening (LC-HR-MS Triple ToF-instrument) als met een doelstoffenmethode, die specifiek deze 337 stoffen (LC-Triple Quad-instrument) analyseert, en die vaak wordt gebruikt bij reguliere screening.

Deze 337 stoffen bestrijken een zeer breed polariteitsgebied ($\log K_{ow} = -3$ tot 9) zodat een goed beeld wordt verkregen van de effectiviteit van de screeningsmethode ten opzichte van het reguliere doelstoffenonderzoek. In onderstaande afbeelding is het aantal aangetoonde stoffen van de twee toegepaste analysemethoden uitgezet tegen de rapportagegrens.



Afbeelding 1. Aantal stoffen uitgezet tegen de rapportagegrens voor de brede screeningsmethode (Triple ToF instrument) en de reguliere monitoring (Triple Quad instrument).

De brede chemische screening is in staat om ruim 90 procent van de toegevoegde stoffen te meten (307 van de 337) tot op het normniveau voor veel individuele antropogene stoffen (0,1 µg/l). De screening evenaart hiermee de reguliere doelstoffenmonitoring. Bij minder dan 10 procent van de stoffen ligt de aantoonbaarheidsgrens tussen de 0,1 en 1,0 µg/l. Dit zijn onder andere enkele kunstmatige zoetstoffen en stoffen die snel afbreken in water.

Antropogene stoffen in kwetsbare winningen en reinwater

De brede chemische screening is in de praktijk toegepast op monsters van 29 productielocaties van Vitens en enkele van WMD, zowel ruw- als reinwater. Op basis van de accurate massa van ruim 300 bekende stoffen is gescreend in alle watermonsters. Naast bekende gewasbeschermingsmiddelen zoals atrazine (incl. metabolieten), simazine, bentazon, bromacil, carbendazim en diuron, worden ook industriële verontreinigingen, zoals 1H-benzotriazool en trifenylfosfineoxide aangetroffen.

Verder blijkt dat in de kwetsbare winningen het merendeel van de aanwezige verbindingen door de zuivering wordt verwijderd. In een aantal gevallen zijn nieuwe onbekende verbindingen aangetoond. In reinwater van de 29 productielocaties zijn in totaal 21 stoffen in een concentratie kleiner dan 0,1 µg/l aangetoond. De identiteit van 15 stoffen is uiteindelijk bevestigd met de reguliere LC-MS/MS techniek. Zes van deze 21 stoffen waren nog niet eerder aangetoond. Het betreft de industriële verontreiniging 2,2-dithiobis(benzothiazool), de kunstmatige zoetstoffen acesulfaam, cyclamaat en sacharine en de omzettingsproducten van een geneesmiddel: carbamazepine-10,11-epoxide en trans-10,11-dihydrocarbamazepine.

Bij de brede screening zijn alle bekende en onbekende stoffen boven een drempelwaarde gedetecteerd. Daarvoor moeten ze wel geïsoleerd zijn bij de opwerking van het monster en zijn geïoniseerd in de massaspectrometer. De gehanteerde drempelwaarde is 5 x hoger dan de blanco en komt zeer globaal overeen met 0,01 µg/l interne standaardequivalenten. Bij deze screening worden vele stoffen

aangetoond (vaak meer dan 50 stuks per monster). Door met regelmaat breed te screenen kunnen mogelijke trends in de aan- of afwezigheid van stoffen snel worden herkend.

Aan de hand van het accurate massaspectrum, de daaruit afgeleide brutoformule en externe bibliotheken zoals Chemspider [7] konden diverse onbekende stoffen in de geanalyseerde watermonsters geïdentificeerd worden. Voorbeelden zijn de geneesmiddelen gabapentine en clopidol en de kunstmatige zoetstof cyclohexaamzuur (E952).

Hiermee wordt ook de kracht van de brede chemische screeningstechniek aangetoond: met behulp van alle opgenomen massaspectra kan ook achteraf worden gezocht naar de aanwezigheid van stoffen op basis van hun specifieke accurate massa. Hierdoor wordt de uiteindelijke identificatie van aanwezige onbekende stoffen vergemakkelijkt.

Op basis van de resultaten van het ruwe en reine water van kwetsbare winningen blijkt dat de aangetroffen componenten in het gehele proces gevolgd kunnen worden: van individuele pompput naar gemengd ruw, in proceswater na diverse zuiveringstappen en in drinkwater.

Groslijst van prioritaire antropogene stoffen bij brede screening

Met behulp van deze brede screening kunnen antropogene stoffen in beeld worden gebracht. Samen met de resultaten van doelstoffenonderzoek kan uiteindelijk een groslijst worden opgesteld van stoffen die worden aangetoond in drinkwater(bronnen). Het is dan zaak om te bezien welke stoffen relevant zijn en als “prioritair” kunnen worden benoemd. Hiervoor zijn criteria nodig zoals de gemeten concentraties in relatie tot grenswaarden, hoe vaak ze worden aangetroffen, het aantal locaties, stoffeigenschappen en de aanwezigheid in geleverd drinkwater. Dit laatste geeft ook informatie over de effectiviteit van de drinkwaterzuivering. Daarmee vormt dit onderzoek een noodzakelijke bouwsteen op weg naar een nieuwe vorm van monitoring.

Om de groslijst uniform en ‘up-to-date’ te houden is het nodig dat de analyseresultaten van de drinkwaterlaboratoria gedeeld worden. Dit gebeurt nu ook voor doelstoffen via bijvoorbeeld REWAB [8]. Deze gegevens kunnen opgenomen worden in rapportages over de parameter ‘overige antropogene stoffen’ zoals opgenomen in de Drinkwaterregeling [4]. Voor Vitens, WMD en de laboratoria is de basis gelegd om deze techniek op termijn op te nemen in de reguliere monitoring van de waterkwaliteit. Vitens is begonnen met behulp van deze techniek jaarlijks de kwaliteit van ruw- en reinwater te bepalen.

Conclusies en aanbevelingen

Een gevoelige, brede chemische screening van antropogene organische micro-verontreinigingen met LC-HR-MS combineert doelstoffenonderzoek met onderzoek naar nog onbekende stoffen. Hiermee is het op dit moment de slimste en meest waardevolle manier voor de chemische screening van antropogene stoffen in drinkwater. Een grote kracht van deze methode is ook de mogelijkheid om achteraf doelstoffen op te sporen in al eerder geanalyseerde monsters.

Bij een eerste screening van het grondwater van kwetsbare winningen van Vitens en WMD zijn tientallen tot honderden stoffen per monster aangetoond. In het reinwater van pompstations zijn in totaal 21 verschillende stoffen in lage concentratie aangetoond (<0,01 µg/l). De identiteit van 15 van deze stoffen is bevestigd met het reguliere doelstoffenonderzoek. Het bestaan van zes van de 21 stoffen was nog niet eerder met de reguliere monitoring aangetoond.



Een belangrijke voorwaarde voor het correct breed screenen blijkt software te zijn die de juiste informatie uit de enorme hoeveelheid meetdata kan extraheren. Hier is nog een verbetering nodig. Het project heeft een kwaliteitsborging uitgewerkt die nog geoptimaliseerd zal worden, zeker als het onderdeel wordt van de reguliere monitoringsprogramma's. De uitdaging blijft om met de verschillende apparaten en software dezelfde uitkomsten te genereren.

Daarnaast zal de opslag en uitwisseling van meetgegevens nog meer aandacht moeten krijgen. Hieruit kunnen dan ook prioritair stoffen vastgesteld worden. Dit is momenteel volop in ontwikkeling. De reikwijdte van deze methode, de juiste aanpak bij de identificatie van onbekende stoffen en de uitwisseling van data worden ook internationaal gevolgd via netwerk bijeenkomsten als Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC; en NORMAN[9]).

Voor Vitens, WMD en de laboratoria is met dit onderzoek een goede basis gelegd om de techniek op termijn op te nemen in de reguliere monitoring van de drinkwaterkwaliteit. De verwachting is dat deze brede chemische screening in de toekomst wettelijk verankerd wordt en daarmee een effectievere, snellere en goedkopere screening van de waterkwaliteit mogelijk wordt. Daarbij wordt de kans sterk verkleind dat antropogene chemische stoffen in het (drink)water onopgemerkt blijven.

Dankwoord

Dit project is succesvol geworden dankzij de inzet van Ronny Bosch (Vitens), Erik Emke (KWR), Herman Gerdes (WLN) en Dennis Vughs (KWR). Stefan Kools (KWR) en Ans Versteegh (RIVM) voor hun commentaar.

Referenties

1. Regeling van de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu van 14 juni 2011, nr. BJZ2011046947 houdende nadere regels met betrekking tot enige onderwerpen inzake de voorziening van drinkwater, warm tapwater en huishoudwater (Drinkwaterregeling).
2. Hogenboom, A.C.; Van Leerdam, J.A.; De Voogt, P. (2009). Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-LTQ FT Orbitrap mass spectrometry. *J. Chrom. A* 2009, 1216, 510–519.
3. Laak, T.L. Ter; Puijker, L.M.; van Leerdam, J. A.; Raat, K. J.; Kolkman, A.; de Voogt, P.; van Wezel, A. P. (2012). Broad target chemical screening approach used as tool for rapid assessment of groundwater quality. *Sci. Tot. Environ.* 2012, 427-428, 308-313.
4. Sjerps, R., Vughs, D., Leerdam, T. van, Laak, T. ter, Wezel, A. van, 'Suspect screening' voor datagestuurde prioritering van stoffen in (bronnen van) drinkwater. *H2O*, 2015
5. Bobeldijk, I., Stoks, P.G.M., Vissers, J.P.C., Emke, E., Leerdam, J.A. van, Muilwijk, B., Berbee, R., and Noij, T.H.M., *Journal of Chromatography A*, 2002, 970, 167-181.
6. Kolkman, A., Emke, Erik, Stroomberg, Gerard, Ketelaars, Henk, HPLC-UV-screening: geharmoniseerde analysemethode voor efficiënte waterkwaliteitsbewaking. *H2O*, juli 2013.
7. www.chemspider.com
8. REWAB: Registratie Waterkwaliteitsgegevens Bedrijven. <http://www.kwrwater.nl/rewab.aspx>
9. <https://www.setac.org>, <http://www.norman-network.net>