

BTO 2020.032 | Juli 2020

BTO rapport

Karakteriseren van
biodegradeerbaar
organisch koolstof in
drinkwater

BTO

Karakteriseren van biodegradeerbaar organisch koolstof in drinkwater

BTO 2020.032 | Juli 2020

Opdrachtnummer

402045/104

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch verkennend onderzoek -
Biologische veiligheid
BTO - Bedrijfsonderzoek Evides

Kwaliteitsborger

Anthony Verschoor (i.o.m. Gertjan Medema)

Auteurs

Paul van der Wielen & Dennis Vughs

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.
Een jaar na publicatie is het openbaar.

Jaar van publicatie
2020

Meer informatie

Dr. P.W.J.J. van der Wielen

T 030 6069642

E paul.van.der.wielen@kwrwater.nl

Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

F +31 (0)30 60 61 165

E info@kwrwater.nl

I www.kwrwater.nl



BTO 2020.032 | Juli 2020 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

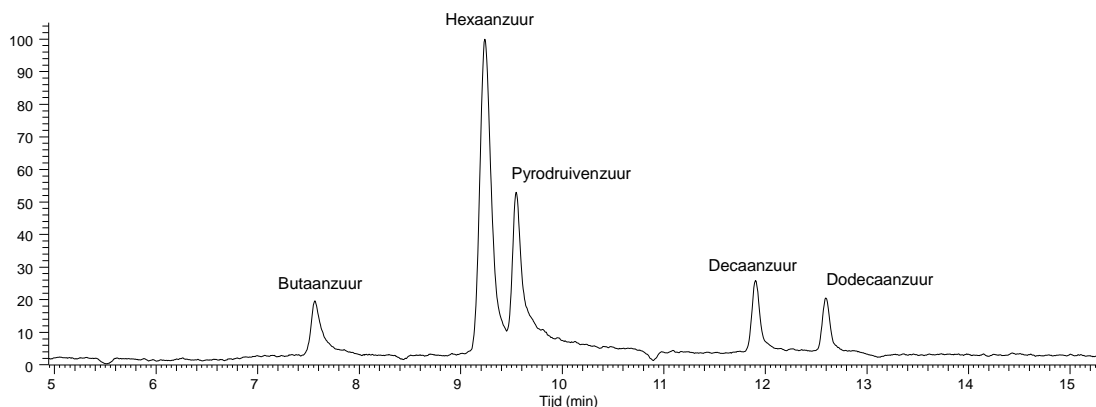
Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

BTO Managementsamenvatting

Chemische methoden voorlopig te ongevoelig voor kwantificering afzonderlijke carbonzuren in drinkwater

Auteurs Dr. P.W.J.J. van der Wielen en D. Vughs MSc

Chemische methoden die op grond van literatuuronderzoek zijn geselecteerd, blijken bij implementatie en validatie in het laboratorium in staat om afzonderlijke carbonzuren met een gevoeligheid van 0,20 – 6,3 µg C/l in drinkwater te kunnen meten. Toepassing van deze methoden op drinkwatergerelateerde monsters laat echter zien dat ze nog te ongevoelig zijn voor het afzonderlijke kwantificeren van carbonzuren in drinkwater. Daarom blijven voor het aantonen van gemakkelijk biodegradeerbaar organische koolstof voorlopig nog de gebruikelijke AOC- of BPP-methoden de standaard.



Vloeistofchromatografie – massaspectrometrie chromatogram van een aantal carbonzuren in water.

Belang: opheldering welke organische verbindingen nagroei veroorzaken.

Drinkwater bereid uit oppervlaktewater na reservoirpassage leidt op veel locaties tot relatief veel nagroei in het distributiesysteem. Dit resulteert in overschrijdingen van de wettelijke norm voor *Aeromonas*. Onderzoek wijst uit dat dit drinkwatertype relatief veel deeltjesgebonden en/of hoogmoleculair organisch koolstof (PHMOC) en AOC bevat, wat waarschijnlijk (in)direct de verhoogde groei veroorzaakt. Doordat PHMOC en AOC bulkparameters zijn, blijft onduidelijk welke afzonderlijke organische stoffen verantwoordelijk zijn voor de verhoogde microbiële groei. Wanneer deze stoffen bekend zouden zijn, kan gericht in de zuivering worden ingegrepen om de stoffen te verwijderen. Daarom is het doel van dit onderzoek

te achterhalen of het karakteriseren en kwantificeren van biodegradeerbaar organisch koolstof (BDOC) in (drink)water met chemische methoden mogelijk is.

Aanpak: meest geschikte chemische methoden getest op praktijkmonsters.

Met een beknopt literatuuronderzoek is achterhaald welke chemische methoden geschikt zijn voor het detecteren en kwantificeren van afzonderlijke BDOC-verbindingen in drinkwater. Vervolgens zijn hieruit de drie meest geschikte methoden geselecteerd voor het bepalen van carbonzuren, welke behoren tot de AOC-fractie, en werden deze in het chemisch laboratorium getest en gevalideerd. Tot slot werd in drinkwatermonsters uit de praktijk achterhaald of de gevalideerde

methoden geschikt zijn om hierin afzonderlijke carbonzuren te bepalen.

Resultaten: chemische methoden te ongevoelig voor detectie carbonzuren in drinkwater

Uit het literatuuronderzoek blijkt dat momenteel alleen chemische methoden zijn ontwikkeld om gevoelig genoeg carbonzuren en aminozuren in drinkwater te kunnen meten. Het implementatie- en validatieonderzoek in het laboratorium toont aan dat twee van de drie geteste methoden in staat zijn om een groot deel van de 15 geselecteerde carbonzuren te detecteren met een gevoeligheid die over het algemeen hoger ligt dan de gewenste detectiegrens van $1 \mu\text{g C/l}$. Met deze methoden konden azijnzuur, propaanzuur en oxaalzuur niet betrouwbaar in drinkwater worden gedetecteerd. In drinkwatermonsters uit de zuivering en het distributiesysteem van verschillende productielocaties van Evides ligt de detectiegrens voor de 12 gemeten carbonzuren tussen 0,20 tot $6,3 \mu\text{g C/l}$. Deze resultaten betekenen dat de methoden in dit geval nog te ongevoelig zijn voor toepassing op het Nederlandse drinkwater.

Toepassing: AOC-methode of BPP-methode blijven voorlopig de standaard

De geteste chemische methoden zijn momenteel nog te ongevoelig om afzonderlijke carbonzuren in drinkwater te kwantificeren. Waarschijnlijk is het mogelijk om met omgekeerde osmose de detectiegrens te verlagen, maar daarvoor is aanvullend onderzoek nodig. Tot die tijd blijven de AOC-methode en de BPP-methode de standaard voor het meten van gemakkelijk BDOC in drinkwater. Tevens blijft het nodig om de wetenschappelijk literatuur ten aanzien van BDOC detectie in drinkwater te volgen. Op die manier kunnen nieuwe methoden voor de afzonderlijke detectie van BDOC-stoffen in drinkwater snel worden opgepikt en onderzocht voor hun toepasbaarheid in het Nederlandse drinkwater.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *Karakteriseren van biodegradeerbaar organisch koolstof in drinkwater* (BTO 2020.032).

Meer informatie

Dr. P.W.J.J. van der Wielen

T 030 6069642

E paul.van.der.wielen@kwrwater.nl

KWR

PO Box 1072

3430 BB Nieuwegein

The Netherlands



Inhoud

Inhoud	2
1 Introductie	3
1.1 Aanleiding	3
1.2 Doel	4
2 Literatuuronderzoek	5
2.1 Opzet	5
2.2 Chemische methoden voor NOM karakterisering	5
2.3 Chemische methoden voor gedetailleerde karakterisering van carbonzuren, aminozuren, eiwitten, suikers en polysachariden	8
2.4 Conclusies literatuuronderzoek en aanbeveling voor fase 2	15
3 Methodeontwikkeling voor carbonzuren in water	17
3.1 Selectie van carbonzuren	17
3.2 Aanpak methodeontwikkeling	18
3.3 Validatie mixed-mode en C18 methode	22
3.4 Conclusie en aanbevelingen methodeontwikkeling	24
4 Monstercampagne	25
4.1 Monstercampagne	25
4.2 Resultaten en Discussie	28
5 Conclusies en Aanbevelingen	33
5.1 Conclusies	33
5.2 Aanbevelingen	34
6 Referenties	35
Bijlage I Analyse condities derivatiseringsmethode	38
Derivatisering	38
Bijlage II Analyse condities mixed-mode methode	39
Monstervoorbewerking	39
Bijlage III Analyse condities C18 methode	40
Monstervoorbewerking	40

1 Introductie

1.1 Aanleiding

Onderzoek naar de nieuwe meetmethoden om de biologische stabiliteit van het drinkwater te bepalen, heeft laten zien dat verschillende biologische stabiliteitsparameters in het reinwater een relatie hebben met de aantallen KG22 en *Aeromonas* in het drinkwaterdistributiesysteem (van der Wielen, 2018). Voor drinkwater bereid uit grondwater of oppervlaktewater, bleek dat de biomassa-productie in de eerste zeven dagen (BP_7 of BP_7-BP_0 van de biomassa-productie (BPP) test voor water) relateert aan KG22 en/of *Aeromonas* in het distributiesysteem. Doordat de BP_7 of de BP_7-BP_0 wordt bepaald door de concentratie gemakkelijk afbreekbare stoffen (van der Kooij & Veenendaal, 2014; van der Wielen, 2018), is het aannemelijk dat gemakkelijk afbreekbare stoffen (die bijvoorbeeld worden bepaald met de AOC P17/Nox methode) in het water een belangrijke rol spelen bij de mate van groei in het distributiesysteem. Welke verbindingen dit precies zijn blijft echter onduidelijk, hoewel onderzoek in het buitenland heeft laten zien dat carbonzuren daarbij een belangrijke rol kunnen spelen (Jurado-Sanchez et al., 2014; Hammes et al., 2006).

Bij de locaties waar drinkwater is bereid uit oppervlaktewater, bleek naast de gemakkelijk afbreekbare stoffen ook de concentratie deeltjesgebonden en/of hoogmoleculair organisch koolstof (PHMOC) een relatie te hebben met groei van *Aeromonas* en/of KG22 in het distributiesysteem (van der Wielen, 2018). Vooral het drinkwater bereid uit oppervlaktewater na reservoirpassage leidt op veel locaties tot relatief veel groei in het distributiesysteem en in de zomerperiode en worden in de meeste van deze voorzieningsgebieden overschrijdingen van de wettelijke norm voor *Aeromonas* waargenomen (van der Wielen & van der Kooij, 2011; ILT, 2019). De laatste jaren is relatief veel onderzoek uitgevoerd naar de mogelijke oorzaak van deze verhoogde groei bij een aantal van deze locaties en ook uit die resultaten bleek dat het reinwater op deze locaties een relatief hoge concentratie PHMOC bevatten (van der Kooij et al., 2011; Hijnen et al., 2013). Op een aantal van deze locaties wordt eindstandige chloordioxide toegepast. Eindstandige nadesinfectie met chloordioxide leidde tot hogere AOC-concentraties gemeten met stam P17 en Nox (Hornstra et al., 2012). Aanvullend onderzoek heeft laten zien dat de AOC-P17/Nox concentratie in het reinwater op deze locaties dan ook relatief hoog is ($> 10 \mu\text{g C/l}$), maar ook de concentratie PHMOC was hoog ($>45 \mu\text{g C/l}$) (Hijnen et al., 2018). De concentratie PHMOC in het reinwater bleek daarbij een betere correlatie te geven met groei van KG22 en *Aeromonas* in het distributiesysteem dan de concentratie AOC-P17/NOX in het reinwater.

Hoewel deze analyses laten zien welke biologische stabiliteitsparameters mogelijk verantwoordelijk zijn voor de verhoogde groei (zowel gemakkelijk afbreekbare verbindingen als PHMOC), blijft het onduidelijk welke organische stoffen precies de verhoogde groei veroorzaken. Dit komt doordat met de analyse op PHMOC alle organische stoffen met een hoger molecuulgewicht dan 35 kDa of die gebonden zijn aan deeltjes worden bepaald, terwijl met AOC-P17/Nox of de BP_7/BP_7-BP_0 een hele range aan, in ieder geval, carbonzuren en aminozuren worden bepaald. Daarmee zijn zowel PHMOC, BP_7 , BP_7-BP_0 als AOC bulkparameters en geven daardoor geen informatie over de precieze samenstelling van het organisch koolstof. Het is daardoor ook onbekend in

welke zuiveringsprocessen de stoffen die verantwoordelijk zijn voor nagroei worden verwijderd of gevormd, waardoor het moeilijk is om gerichte beheersmaatregelen in de zuivering te nemen. De stoffen die door bacteriën worden omgezet zijn vaak in μg per liter concentratie in drinkwater aanwezig, wat in het verleden te laag was om met chemische analysemethoden te kunnen bepalen. De afgelopen decennia zijn de chemische methoden om organische verbindingen in water te meten echter sterk verbeterd, waardoor veel ongewenste (organische) stoffen (bv bestrijdingsmiddelen, medicijnresten) tot zeer lage concentraties (ng per liter niveau) gemeten kunnen worden. Een recente studie heeft laten zien dat het ook mogelijk is om bepaalde AOC-verbindingen (o.a. azijnzuur, mierenzuur, oxaalzuur, propionzuur, pyrodruivenzuur, benzoëzuur, oliezuur, toluenezuur) op μg per liter niveau te kunnen meten (Jurado-Sanchez et al., 2014; Hammes et al., 2006). Daarnaast worden voor de bepaling van PHMOC de deeltjes en hoogmoleculaire organische stoffen geconcentreerd met behulp van ultrafiltratie (hemoflow), waardoor concentraties in de orde van mg C per liter concentraat aanwezig zijn (Hijnen et al., 2015). De verwachting is daarom dat het met behulp van chemisch-analytische methoden het mogelijk moet zijn om biologisch afbreekbare organische (BDOC) verbindingen die verantwoordelijk zijn voor nagroei te karakteriseren.

1.2 Doel

Het doel van het onderzoek is om te achterhalen of afzonderlijke BDOC verbindingen in (drink)water met chemische methoden kan worden gekarakteriseerd en gekwantificeerd. Daarvoor wordt (i) achterhaald welke chemisch-analytische methoden beschikbaar zijn om afzonderlijke BDOC-verbindingen bij lage concentratie te meten, met name afzonderlijke carbonzuren, aminozuren, eiwitten, koolhydraten of langketenige vetzuren, (ii) onderzocht of de meest veelbelovende methoden toepasbaar zijn voor drinkwater.

2 Literatuuronderzoek

2.1 Opzet

Er is gekozen om een beknopt literatuuronderzoek uit te voeren naar (i) chemische methoden die worden toegepast om BDOC in drinkwater te bepalen en (ii) karakteriseringmethoden voor carbonzuren, vetzuren, aminozuren, eiwitten en koolhydraten. Voor onderdeel (i) zijn met name recente reviewartikelen doorgenomen, die een goed beeld geven over de huidige mogelijkheden ten aanzien van BDOC karakterisering, terwijl voor onderdeel (ii) een iets diepere literatuuranalyse is gedaan.

2.2 Chemische methoden voor NOM karakterisering

Verschillende methoden zijn beschikbaar voor het karakteriseren van natuurlijk organisch materiaal (NOM) in drinkwater en deze zijn recent beschreven in reviewartikelen van Matilainen et al. (2011) en Pan et al. (2016). Deze methoden meten over het algemeen een bepaalde fractie van de NOM en worden hieronder kort beschreven voornamelijk op basis van de tekst in beide reviews.

2.2.1 Analysemethoden voor algemene parameters

2.2.1.1 Opgelost organisch koolstof (DOC)

Drinkwaterbedrijven in Nederland bepalen al decennialang de concentratie opgelost organisch koolstof (DOC) in drinkwater. DOC zijn daarbij organische stoffen die een 0,45 µm filter kunnen passeren en worden na filtratie gemeten met een TOC analyzer.

2.2.1.2 Opgelost organisch stikstof (DON)

Evenals DOC, wordt de DON ook bepaald na filtratie door een 0,45 µm filter. Daarbij wordt de concentratie ammonia, nitriet en nitraat van de totale stikstofconcentratie afgetrokken.

2.2.1.3 UV/VIS

UV/VIS refereert naar de adsorptiespectroscopie in het ultraviolet-zichtbaar (visible) lichtspectrum. Doordat NOM verschillende chromoforen kan bevatten en chromoforen verschillende UV-adsorptiegolflengtes hebben, kan een specifieke UV-golflengte worden gebruikt om de bijbehorende chromofoor in NOM te identificeren. Voorbeelden hiervan zijn adsorptie van aromatische chromoforen en chromoforen van carbonzuren bij 220 nm, en adsorptie van aromatische groepen met verschillende mate van activiteit bij 254 nm. Daarnaast kunnen adsorptieratio's tussen twee golflengte ook informatie geven over NOM-verbindingen (bv bron van NOM, relatieve proportie van aromatisch versus alifatisch, aromaticiteit en polariteit van NOM) (Hur et al., 2006; Li et al., 2009), maar deze zijn (nog) niet uitgebreid getest met drinkwater. Een nadeel is dat er interferentie kan optreden in het gebied van 200 tot 230 nm door anorganische ionen (bv nitraat, sulfaat), waardoor metingen in dat gebied minder betrouwbaar worden.

2.2.1.4 Specifieke ultraviolet adsorptie (SUVA)

SUVA is een indicator voor de aromaticiteit van NOM en is de quotiënt van de UV-adsorptie bij 254 nm gedeeld door de DOC-concentratie. Een SUVA van > 4 duidt op de aanwezigheid van voornamelijk hydrofobe en dan met name aromatische NOM-verbindingen, terwijl een SUVA < 3 duidt op met name hydrofiele NOM-verbindingen.

2.2.1.5 Fluorescentie-excitatie-emissiematrix (EEM) spectroscopie

Fluorescentie-EEM is een spectrochemische methode waarbij de te analyseren moleculen worden aangeslagen door bestraling met een bepaalde golflengte, waarna de emissie van licht wordt gemeten bij een andere golflengte. De specifieke excitatie- en emissiegolflengten zijn de karakteristieken van een bepaalde moleculaire conformatie, de zogenoemde fluoroforen. De fluoroforen kunnen worden gebruikt om de structurele samenstelling van de humusverbindingen te beschrijven. Het belangrijkste voordeel van fluorescentietechnieken ten opzichte van meer traditionele methoden (inclusief UV-VIS) is de betere gevoeligheid en selectiviteit. 3D-EEM fluorescentiespectroscopie is meer recent ontwikkeld en de met deze methode verkregen fluorescentie-excitatie-emissiematrixspectra kunnen worden onderverdeeld in vijf domeinen, te weten aromatische eiwitten I, (excitatie 220-250 nm, emissie 280-332 nm), aromatische eiwitten II (excitatie 220-250 nm, emissie 332-380 nm), fulvinezuurachtig (excitatie 220-250 nm, emissie 380-580 nm), microbiële bijproducten (excitatie 250-470 nm, emissie 280-380 nm) en huminezuurachtig (excitatie 250-470 nm, emissie 380-580 nm).

2.2.2 Analysemethoden voor elementaire en structurele identificatie

2.2.2.1 Elementaire analyse

Met behulp van elementaire analyse kunnen de verschillende elementen in NOM (bv koolstof, waterstof, stikstof, zwavel) zowel kwalitatief als kwantitatief worden vastgesteld. Normaliter wordt de elementaire analyse uitgevoerd door verbrandingsanalyse met elementaire analyzers of door inductief gekoppelde plasmaspectroscopie.

2.2.2.2 Nucleaire magnetische resonantiespectroscopie (NMR)

NMR wordt toegepast om de functionele groepen in NOM te exploreren. Deze techniek is vooral nuttig in combinatie met elementaire compositiedata, data over het moleculair gewicht, of infrarood spectroscopiedata van gefractioneerde NOM. NMR spectroscopie van NOM kan worden gedaan met vaste-stofstadium NMR of vloeistofstadium NMR. Vloeistofstadium NMR wordt minder vaak toegepast voor NOM-karakterisering, maar kan worden gebruikt voor een snelle screening van aromaticiteit en mate van humificatie van NOM. Vaste-stofstadium NMR wordt vaker toegepast voor NOM-karakterisering doordat er minder snel verstoring van de metingen optreedt, er geen concentratielimiet is, vaste stof een hoge monsterstabiliteit heeft en ook geschikt is voor onoplosbare NOM-fracties. Een variant van de laatste techniek is ¹³C NMR, die geschikt is om details van de koolstofstructuur te bepalen. Deze ¹³C NMR techniek is minder geschikt voor kwantitatieve analyse. De techniek is met name geschikt om een grof idee te krijgen van de chemische samenstelling (regionen met alifatische verbindingen, alkoxyverbindingen, onverzadigde koolstofverbindingen en carbonylverbindingen). Meer recent zijn 2- of multidimensionale NMR technieken geïntroduceerd, die beter geschikt zijn om de structuur van meer complexe moleculen (zoals NOM) te bepalen.

2.2.2.3 Fourier-transformatie-infraroodspectroscopie (FTIR)

FTIR wordt toegepast om specifieke informatie over de chemische bindingen, moleculaire milieu en moleculaire verbindingen van NOM te verkrijgen. Wanneer monsters worden blootgesteld aan infrarood licht, adsorbeert het NOM in de monsters energie dat correspondeert met de vibratie-energie van de atomische verbindingen die in NOM aanwezig zijn. De op deze manier verkregen adsorptiespectra zijn een unieke vingerafdruk van de NOM-verbindingen en geven daarmee informatie over de

identificatie van zowel organische als anorganische functionele groepen in het NOM. De interpretatie van de spectra is echter een uitdaging, doordat de spectrale karakteristieken van de functionele groepen vaak overlappen.

2.2.2.4 Pyrolyse gaschromatografie/massaspectrometrie (Py-GC-MS)

Py-GC-MS is een effectieve methode om NOM te karakteriseren, door het gemak en hoge analytische snelheid. Gedurende de pyrolyse wordt het NOM afgebroken tot kleine fragmenten, die geschikt zijn om te bepalen met GC-MS analyse. Hierdoor wordt een vingerafdruk van het organisch materiaal verkregen. PY-GC-MS is geschikt voor kwantitatieve en kwalitatieve analyse van NOM.

2.2.2.5 Vloeistofchromatografie – hoge-resolutiemassaspectrometrie (LC-HRMS)

Vloeistofchromatografie-massaspectroscopie (LC-MS) is een techniek die de fysieke scheidingsmogelijkheden van vloeistofchromatografie combineert met de massa-analysemogelijkheden van massaspectrometrie. LC-MS is een krachtige methode met een zeer hoge gevoeligheid, waardoor de methode geschikt is om NOM kwantitatief en kwalitatief te karakteriseren. Recent is deze techniek verbeterd door vloeistofchromatografie te combineren met hoge-resolutiemassaspectrometrie (LC-HRMS), waarmee het mogelijk is om NOM in verschillende bulkfracties onder te verdelen (bv. eiwitten, koolhydraten, lignine, tannine). Deze methodiek is onlangs ook door KWR voor het eerst toegepast om NOM van drinkwater verder te karakteriseren, maar aanvullend onderzoek is nodig om de volledige mogelijkheden van deze analysetechniek voor het karakteriseren van NOM te achterhalen.

2.2.2.6 Vloeistofchromatografie – organisch koolstof detectie (LC-OCD)

LC-OCD is een techniek waarbij NOM-moleculen chromatografisch worden gescheiden, gevolgd door een organisch koolstof detector. Met deze methode kunnen NOM-fracties worden onderverdeeld in biopolymeren, humuszuren, bouwstenen, zuren met laag moleculair gewicht, en 'neutrals' met laag moleculair gewicht.

2.2.3 NOM-karakteriseringmethoden voor bepalen BDOC in drinkwater

Sommige van bovenstaande methoden zijn ook gebruikt voor het karakteriseren van de BDOC-fractie van NOM in het Nederlandse drinkwater. De resultaten daarvan worden kort beschreven.

De verwijdering van AOC tijdens verschillende drinkwaterbehandelingsprocessen van een pilotlocatie van Waternet is gemeten met UV/VIS sensoren die voor en na het behandelingsproces werden geïnstalleerd (van den Broeke et al., 2008). De resultaten laten zien dat UV-VIS een te ongevoelige methode is om de AOC-concentratie in drinkwater direct te kunnen meten. Daarom werd getracht de AOC-concentratie, bepaald met de traditionele AOC-methode, te correleren aan karakteristieken van de adsorptiespectra en dat model te gebruiken om de AOC-concentratie te schatten op basis van de UV/VIS adsorptiespectra. Hoewel de resultaten positief waren, blijft een groot nadeel dat veranderingen in NOM niet gekoppeld zijn aan AOC, en dat verschil in NOM-samenstelling tussen watertypen kan leiden tot afwijkingen van de werkelijke AOC-concentratie. Deze methode is daarom ook niet veel vaker toegepast om AOC-concentratie in drinkwater te bepalen.

Baghoth et al. (2009) pasten SUVA, EEM fluorescentiespectroscopie en LC-OCD om te onderzoeken hoe NOM-fracties werden verwijderd door verschillende zuiveringsprocessen van productielocatie Weesperkarspel van Waternet. De SUVA analyses lieten zien dat een flinke reductie van SUVA werd bereikt met actieve

koolfiltratie (AKF), het proces waarbij een groot gedeelte van het door ozon gevormde AOC wordt verwijderd. Daarentegen waren EEM fluorescentiespectroscopie analyses niet gevoelig genoeg om veranderingen in NOM-fracties door AKF waar te nemen. LC-OCD analyses lieten zien dat een significante afname van de neutrals fractie werd bereikt met AKF. Het lijkt er dus op dat SUVA en LC-OCD mogelijk geschikt zijn om BDOC-fracties in drinkwater te bepalen, hoewel een deel van de NOM-verwijdering in AKF door adsorptie wordt bepaald en onduidelijk blijft of de afname in SUVA en neutrals valt te relateren aan niet-BDOC dat adsorbeert aan de kool of aan de BDOC die door bacteriën wordt afgebroken. Promotieonderzoek van Eveline Sack heeft echter laten zien dat LC-OCD te ongevoelig was om BDOC-concentraties in de grootteorde van $\mu\text{g C/l}$ in drinkwater te bepalen (niet gepubliceerd). Ander onderzoek heeft ook laten zien dat de correlaties tussen AOC en de verschillende LC-OCD fracties in Nederlands drinkwater zwak zijn (Grefte, 2013). Daarnaast blijft de analyse met SUVA en LC-OCD informatie geven over bulkparameters van BDOC (SUVA geeft informatie over aromaticiteit van NOM, terwijl LC-OCD komt tot biopolymeren, neutrals, etc). Dit geldt overigens ook voor de meeste overige methoden die hierboven zijn beschreven. Uitzonderingen hierop zijn 2D-NMR en met name LC-HRMS. De laatste is in staat om NOM tot op chemische verbindingenniveau te karakteriseren (bv eiwitten, koolhydraten), maar de dataverwerking van deze methode is behoorlijk complex.

2.3 Chemische methoden voor gedetailleerde karakterisering van carbonzuren, aminozuren, eiwitten, suikers en polysachariden

2.3.1 Carbonzuren

Carbonzuren zijn veel voorkomende organische verbindingen die een zure carboxygroep bevatten. In dit onderzoek ligt de focus vooral op relatief kleine carbonzuren die mogelijk verantwoordelijk zijn voor verhoogde nagroei in distributiesystemen. De analyse van deze relatief kleine carbonzuren is vaak complex vanwege het polaire karakter van deze verbindingen. In 2012 is door Jurado-Sánchez et al. (2012) een GC-MS methode ontwikkeld waarmee 35 carbonzuren op ng/L niveau kon worden bepaald in water met behulp van GC-MS. Een groot deel van deze 35 verbindingen is ook daadwerkelijk teruggevonden in ruw water. De lijst met deze stoffen wordt gebruikt als referentie voor een mogelijk nieuw te ontwikkelen methode bij KWR. Deze lijst bestaat uit korte-keten carbonzuren (bv azijnzuur en propionzuur), midden- en lange-keten carbonzuren (bv oliezuur), en aromatische carbonzuren (bv benzoëzuur en fenylazijnzuur). Daarnaast kunnen de carbonzuren ook geclassificeerd worden in mono-, di- (bv oxaalzuur) en tricarbonzuren (bv benzeen-1,2,3-tricarbonzuur).

Het nadeel van de GC-MS methode van Jurado-Sánchez et al. (2012) is dat deze vrij arbeidsintensief is. Om de verbindingen op een laag niveau (ng/L) te detecteren is een uitgebreide monstervoorbewerking met vaste fase extractie (SPE) noodzakelijk en de verkregen extracten dienen ook gederiviseerd te worden om tailing van de pieken van de di- en tricarbonzuren tegen te gaan. Daarom is besloten om verder literatuuronderzoek uit te voeren naar de meeste geschikte analysemethode voor met name de kleine carbonzuren in (drink)water. Hierbij is vooral gezocht naar analysemethoden waarbij beperkte monstervoorbewerking noodzakelijk is. Omdat een uitgebreide monstervoorbewerking voor GC-MS-analyses noodzakelijk is, is er vooral gezocht naar analysemethoden die gebruik maken van LC-MS. Van de midden- en lange-keten carbonzuren en aromatische carbonzuren is het algemeen bekend dat deze met LC-MS met omgekeerde fase C18 chromatografie goed geanalyseerd kunnen

worden, zonder derivatisering. Vandaar dat er tijdens het literatuuronderzoek vooral gefocust is op de kleine-keten carbonzuren.

In Tabel 2.1 wordt een overzicht gegeven van relevante analysemethoden voor kortketenige carbonzuren die in de literatuur zijn gevonden. Uit dit literatuuronderzoek blijkt dat carbonzuren met verschillende analytische technieken en detectoren goed geanalyseerd kunnen worden, zoals GC/MS (Jurado-Sanchez et al., 2012, Han et al., 2018, He et al., 2018), LC-Orbitrap (Jin et al., 2018), LC-MS (van Eijk et al., 2009), LC-MS/MS (Chan et al., 2017, Han et al., 2015, Zeng & Cao, 2018). Uit de methode van Han et al. (2018) blijkt dat kleine monocarbonzuren goed kunnen worden geanalyseerd met GC-MS zonder dat derivatisering nodig is. Hierdoor is echter de piekvorm wel breder dan gewenst, waardoor er geen lage aantoonbaarheidsgrenzen ($< 0,03$ mg/L) gehaald kunnen worden. Daarnaast is het niet mogelijk om met deze methode di- of tricarbonzuren te analyseren. Een andere methode met LC-MS en zonder derivatisering, waarmee succesvol kleine carbonzuren geanalyseerd kunnen worden, is beschreven door van Eijk et al. (2009). Het nadeel van deze methode is dat er een agressieve mobiele fase wordt toegepast (HCl) en postkolom ammoniumhydroxide moet worden toegevoegd om een redelijke gevoeligheid ($3 - 6$ $\mu\text{g/L}$) te verkrijgen. Han et al. (2015) heeft recentelijk een LC-MS/MS methode ontwikkeld waarbij carbonzuren voor de analyse worden gederiviseerd met 3-nitrofenylhydrazine en waarmee goede detectiegrenzen zijn gehaald ($0,02 - 3$ $\mu\text{g/L}$). Een beperking van deze methode is dat de hydrazinegroepen die reageren met carbonylgroepen kunnen leiden tot E en Z isomeren, waardoor dubbele pieken kunnen ontstaan. Een ander minpunt van deze methode is de bewerkelijkheid van de derivatisering. Recentelijk is door Zeng & Cao (2018) ook een LC-MS/MS methode ontwikkeld, waarbij een andere derivatisering wordt toegepast. Bij deze methode wordt er gebruikt gemaakt van O-benzylhydroxylamine voor de derivatisering. Het voordeel van deze methode is dat de derivatisering eenvoudig en relatief snel is (1 uur) en niet leidt tot extra isomeren. Daarnaast wordt met deze methode ook een goede gevoeligheid behaald ($\sim 0,01 - 0,5$ $\mu\text{g/L}$). De methode van Zeng & Cao (2018) is daarom een goed startpunt voor de methodeontwikkeling om carbonzuren in drinkwater te kwantificeren op het chemisch laboratorium bij KWR. Hierbij dient wel rekening worden gehouden dat deze methode alleen getest is op kleine-keten carbonzuren. De midden- en lange-keten carbonzuren en aromatische carbonzuren kunnen mogelijk niet worden geanalyseerd met deze methode, doordat deze teveel retentie ondervinden op de analytische kolom vanwege de extra benzylgroep(en) afkomstig van de O-benzylhydroxylaminederivatisering. Deze verbindingen hebben echter zonder derivatisering al voldoende retentie, en kunnen daardoor ook in een aparte run worden geanalyseerd. De toegepaste derivatiseringsmethode is nog niet getest op di- en tricarbonzuren, maar de verwachting is dat deze methode goed toepasbaar is voor de kleine di- en tricarbonzuren (bv oxalaat).

Tabel 2.1 Verschillende methoden voor detectie van kortketenige carbonzuren

Techniek en Chromatografie	Matrix	Monster voorbereiding	Mobiele fase	Kolom	Detectie	LOQ/LOD	Ref ^a
GC-MS	Feces	vortex Geen derivatisering	Nvt	J&W scientific HP-FFAP 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	GC-EI-MS	0,03 – 0,26 mg/L	1
GC-MS	Water	SPE LiChrolut EN- Supelclean ENVI-18 (1:1) Derivatisering: Trimethylchlorosilane	Nvt	J&W DB-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	GC-EI-MS	1 – 15 ng/L	2
GC-MS	Feces	Soneren + centrifugeren Derivatisering: pentafluorobenzyl bromide	Nvt	1: J&W DB-225ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm 2: J&W DB-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm	GC-EI-MS	~ 10 – 80 µg/L	3
LC-LTQ-Orbitrap	Longvloeistof	Vortex + centrifugeren Derivatisering: 3-NPH	A: Water + 0,01% mierenzuur B: Acetonitril + 0,01% mierenzuur	Acquity BEH C18 100 x 2,1 mm, 1,7 µm	ESI-Orbitrap	~ 0.2 – 2 µg/L	4
LC-MS	Bloed	Centrifuge + vortex Geen derivatisering	A: Water + 1,5 mM HCl B: Ethanol/water (95/5: v/v %) + 0,75 mM HCl	Alltima ODS kolom 250 x 2,1 mm, 5 µm	ESI-MS	~ 3 – 6 µg/L	5
LC-MS/MS	Feces	Centrifuge + Derivatisering: 3NPH	A: Water + 0,01% mierenzuur B: Acetonitril + 0,01% mierenzuur	Acquity BEH C18 100 x 2.1 mm, 1,7 µm	ESI-MS/MS	~ 0,02 – 3 µg/L	6
LC-MS/MS	Bloedplasma	Centrifuge + vloeistof extractive Derivatisering: O-BHA	A: Water + 0,1% mierenzuur + NH ₄ HCO ₂ B: Methanol/IPA (9/1: v/v %) + 0,1% mierenzuur	Kinetex C18 100 x 2,1 mm, 2,6 µm	ESI-MS/MS	~ 0,01 – 0,5 µg/L	7
LC-MS/MS	Ontlasting	Vloeistofextractie + centrifuge Derivatisering: aniline	A: Water + 0,1% mierenzuur B: IPA + 0,1% mierenzuur	Acquity UPLC HSS T3 100 x 2,1 mm, 1,8 µm	ESI-MS/MS	~ 0,03 – 0,3 µg/L	8

^a 1: Han et al. (2018), 2: Jurado-Sanchez et al. (2012), 3: He et al. (2018), 4: Jin et al. (2018), 5: van Eijk et al. (2009), 6: Han et al. (2015), 7: Zeng & Cao (2018), 8: Chan et al. (2017),

2.3.2 Amino-zuren

Amino-zuren kunnen met veel verschillende analysetechnieken worden geanalyseerd (bv GC-MS, high performance vloeistofchromatografie (HPLC), capillaire elektroforese (CE), ionchromatografie (IC)) in veel verschillende typen matrices (bv serum, water, fruit). De analyse van amino-zuren blijft echter vaak uitdagend vanwege de hydrofiliciteit en het zwitterionische karakter van deze verbindingen. Een aanpak die regelmatig wordt toegepast is het gebruik van derivatiseringstechnieken om de scheiding en/of detectie van deze verbindingen in biologische en milieu-matrices te verbeteren.

Derivatiseringstechnieken hebben echter ook veel nadelen, zoals instabiele derivaten, lage derivaatopbrengst en dat ze arbeidsintensief zijn. Dit is ook de reden dat directe analysetechnieken populairder worden door gebruik te maken van technieken zoals Capillaire Elektroforese met massaspectrometrische detectie (CE-MS) (Desiderio et al., 2010), High-Performance Anion-Exchange Chromatografie met Pulsed Amperometric Detectie (HPAEC-PAD) (Martens & Loeffelmann, 2003), ion-paar chromatografie (Le et al., 2014), mixed-mode chromatografie (Choi et al., 2017) en Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) (Gao et al., 2016). Om de totale hoeveelheid amino-zuren in een monster te analyseren, wordt vaak een zure of basische hydrolyse gebruikt voor de chromatografische analyse. Voor de analyse van vrij opgeloste amino-zuren is deze handeling niet nodig.

De klassieke manier om amino-zuren te analyseren voor klinische doeleinden is om gebruik te maken van een toegewijde AA analyzer (bv biochrom 20 AA analyzer), waarbij ion-exchange vloeistofchromatografie (IEX-LC) met postkolom ninhydrinderivatisering wordt toegepast (Spackman et al., 1958, Waterval et al., 2009). Kwantitatieve analyse van amino-zuren met de klassieke methode kost veel tijd (2-3 uur per monster) en is daarom niet geschikt voor de analyse van grote hoeveelheden monsters. Daarnaast is bekend dat deze methode leidt tot veel verstoringen, waarbij ook niet alle verbindingen gescheiden kunnen worden met behulp van deze techniek. Vanwege deze redenen is er de laatste 10 tot 20 jaar veel onderzoek uitgevoerd om amino-zuren te analyseren met behulp van vloeistofchromatografie en tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS).

In dit literatuuronderzoek is vooral gefocust op analytische methoden die gebruik maken van LC-MS/MS, omdat deze techniek tegenwoordig de voorkeur krijgt voor de analyse van amino-zuren vanwege de snelheid, gevoeligheid, en ondubbelzinnige identificatie in vergelijking met andere technieken. Daarnaast is vooral gezocht naar analytische methoden die geen gebruik maken van derivatisering van de monsters, omdat een derivatiseringstap vaak arbeidsintensief is. De resultaten van het literatuuronderzoek staan weergegeven in Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Verschillende methoden voor detectie van aminozuren

Chromatografie	Matrix	Vorbewerking	Mobiele fase	Kolom	Detectie	LOQ/LOD	Ref ^a
C8 reversed phase	Ultrapuur water	Derivatisering: Butylering met butanol	Water/acetonitril (80/20% v/v) + 0,1% mierenzuur (Isoctatisch)	Zorbax Eclipse XDB-C8 150 x 4,6 mm, 5 µm	ESI-LC-MS/MS	-	1[9]
C18 reversed phase	Natuurlijk water	SPE Strata-X-C	A: Water + 0,5 % mierenzuur B: Methanol + 0,1 mierenzuur	Gemini C18 250 x 3,0 mm, 3 µm	ESI-LC-MS/MS	0,1 – 100 µg/L	2[10]
C18 reversed phase	Rijst	Vloeistof extractie	Water/methanol (90/10% v/v)+0,1% mierenzuur; Water/methanol (50/50% v/v)+0,1% mierenzuur	Zorbax Eclipse C18 100 x 4,6 mm, 5 µm	ESI-LC-MS/MS	0,4 – 1,0 mg/kg	3[8]
Ion-paar	Plasma en urine	Vortex mixing	A: Water + 0,5 mM TDFHA; B: Acetonitril + 0,5 mM TDFHA	Acquity BEH C18 100 x 2,1 mm, 1,7 µm	ESI-LC-MS/MS	-	4[7]
Ion-paar	Ultrapuur water	-	A: Water + 1 mM TDFHA B: Acetonitril + 1 mM TDFHA	Halo C18 100 x 2,1 mm,	ESI-LC-MS/MS	~ 2 – 300 µg/L	5[3]
Ion-paar	Plasma en urine	Precipitatie + vortex mixing	A: Water + 0,5 mM TDFHA B: Acetonitril	Uptisphere BioP II 50 x 2,1 mm, 3 µm	ESI-LC-MS/MS	~ 0.2 – 100 µg/L	6[11]
HILIC	Bodem	SPE MCX	A: Water/acetonitril (90/10% v/v)+ 8 mM NH ₄ CO ₂ + 0,12% mierenzuur; B: Acetonitril/water 90/10% v/v)+8 mM NH ₄ CO ₂ + 0,12% mierenzuur	Acquity BEH AMIDE 100 x 2,1 mm, 1,7 µm	ESI-LC-MS/MS	5 – 100 µg/L	7[5]
HILIC	Fruit	Vloeistof extractie + Ultrasoneren + centrifugeren	A: Water + 10 mM NH ₄ HCO ₂ +0,15% mierenzuur, pH 3,0; B: Acetonitril +2 mM NH ₄ HCO ₂ +0,15% mierenzuur	Acquity BEH AMIDE 100 x 2,1 mm, 1,7 µm	ESI-LC-MS/MS	0,6 – 80 µg/L	8[12]
HILIC	Ademcondensaat	Vacuüm verdamping	A: Water + 10 mM NH ₄ HCO ₂ , pH 3,0 B: Acetonitril + 10 mM NH ₄ HCO ₂ , pH 3,0	Xbridge Amide 300 x 3.0 mm, 3,5 µm	ESI-LC-MS/MS	0,15 – 1,5 µg/L	9[13]
Mixed-mode	Schimmel-cultuur en bodem	-	A: Water+20 mM NH ₄ CO ₂ , pH 2,97; B: Acetonitril +20 mM NH ₄ CH ₃ CO ₂ , pH 6,0	Primesep 100 150 x 2,1 mm, 5 µm	ESI-LC-MS/MS	~ 80 – 800 µg/L	10[14]
Mixed-mode	Serum	Vortex mixing	A: Water + 50 mM NH ₄ HCO ₂ B: Acetonitril + 0,1% mierenzuur	Intrada Amino Acid kolom 150 x 3 mm, 3 µm	ESI-LC-MS/MS	~ 2 – 200 µg/L	11[4]

^a1: Dietzen et al. (2008), 2: How et al. (2014), 3: Liyanaarachchi et al. (2018), 4: Waterval et al. (2009), 5: Le et al. (2014), 6: Piraud et al. (2005), 7:Gao et al. (2016), 8:Guo et al. (2013), 9: Konieczna et al. (2018), 10: Vilches et al. (2017), 11: Choi et al (2017)

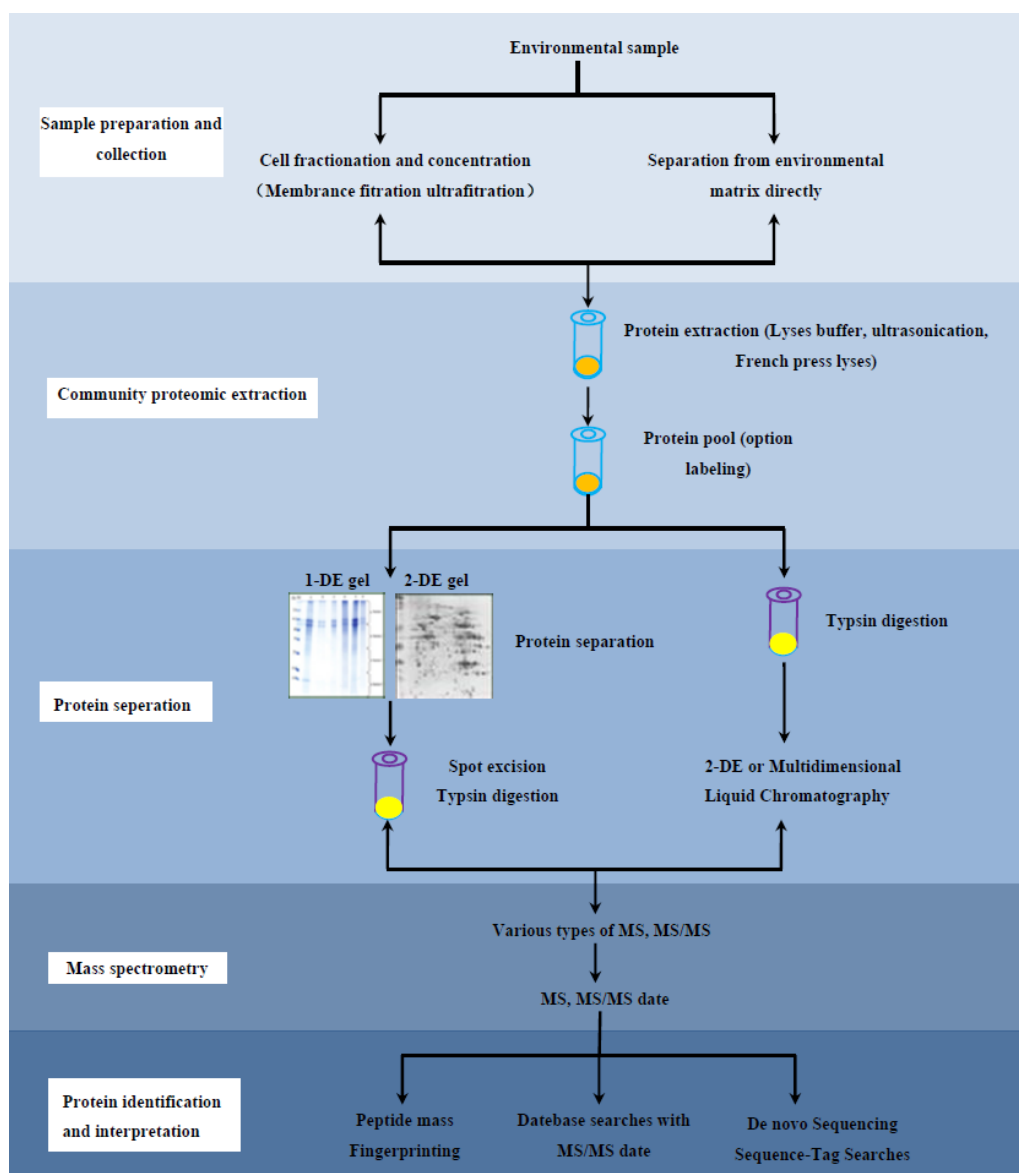
Uit het literatuuronderzoek blijkt dat veel verschillende vloeistofchromatografie-methoden worden gebruikt in combinatie met tandem massaspectrometrie. Van de onderzochte methoden is de methode van Liyanaarachchi *et al.* (2018) in eerste instantie het meest veelbelovend, aangezien bij deze methode een klassieke omgekeerde fase C18 kolom wordt gebruikt in combinatie met een lage flow en daarbij een goede retentie heeft voor de aminozuren. Het voordeel hiervan is dat er geen additieven (bijv. buffers en zouten) gebruikt wordt voor de mobiele fase. Hierdoor vindt signaalonderdrukking van de aminozuren niet plaats, wat een positief effect heeft op de gevoeligheid. Daarnaast is C18 omgekeerde fase chromatografie zeer robuust. In het geval dat deze methode niet goed werkt heeft ion-paar chromatografie de voorkeur. Ion-paarchromatografie heeft als nadeel dat een "tegenion" in de mobiele fase aanwezig moet zijn, wat voor vervuiling kan zorgen in de LC-MS en mogelijk ook signaalonderdrukking geeft voor aminozuren. De ion-paarchromatografie methode van Waterval *et al.* (2009) gebruikt tridecafluoroheptaanzuur als "tegenion" en een klassieke C18 kolom, waardoor deze methodiek relatief eenvoudig te implementeren is bij KWR. Wanneer met de omgekeerde fase C18 of ion-paarchromatografie onvoldoende gevoeligheid wordt gehaald ($> 10 \mu\text{g/L}$) met een directe injectie van het watermonster, is vastefase-extractie (SPE) met MXC of strata-X-C (beide kationwisselaars) een goede optie als monstervoorbewerking om de gevoeligheid te verbeteren.

2.3.3 Eiwitten

De totale concentratie eiwitten kan worden bepaald met een colorimetrische methode, waarbij Coomassie briljantblauw, na binding aan eiwitten, naar een blauwe kleur verandert en waarvan de intensiteit met een spectrometrische methode wordt gemeten (Bradford, 1976). Deze methodiek is toegepast op drinkwatergerelateerde monsters (Hijnen *et al.*, 2018; van Bel, 2018) en is dus al beschikbaar om eiwitten in drinkwatermonsters te bepalen (eventueel na concentratie door ultrafiltratie [hemoflow]). Het nadeel van deze methode is echter dat geen informatie wordt verkregen over de eiwitsamenstelling. Onderzoek naar de eiwitsamenstelling van biomassa in het milieu wordt proteomics genoemd. Recent zijn twee reviewartikelen verschenen over toepassing van proteomics (Wang *et al.*, 2016 en Siggins *et al.*, 2012), die als basis zijn gebruikt voor deze paragraaf.

De methodiek om eiwitten te karakteriseren met proteomics omvat verschillende stappen (Figuur 2.1). De eerste stap is de voorbehandeling van het monster (monster verzamelen en prepareren). Het voorbeeld van Figuur 2.1 richt zich specifiek op eiwitten die in micro-organismen aanwezig zijn, maar ook voor andere eiwitten geldt dit schema, al is de voorbehandeling waarschijnlijk anders. Na deze voorbehandeling worden de eiwitten geëxtraheerd (community proteomic extraction). Vervolgens kunnen twee strategieën worden toegepast voor eiwitscheiding (protein separation) en -identificatie (protein identification and interpretation). Bij de ene strategie worden de eiwitten gescheiden met behulp van één- of tweedimensionale polyacrylamide gel elektroforese, waarna de bandjes van de gescheiden eiwitten worden uitgesneden en verder afgebroken tot peptides met trypsine of andere enzymen. De gescheiden peptides worden vervolgens geanalyseerd met massaspectrometrie (MS) of tandem MS (MS/MS). Bij de andere strategie wordt het gehele proteoom direct afgebroken naar complexe peptide-mixtures met behulp van proteases als trypsine. De peptides worden vervolgens gescheiden met behulp van kationenwisselingchromatografie of microcapillaire reverse-fase. De gescheiden peptides worden vervolgens geanalyseerd met vloeistofchromatografie met MS/MS (LC-MS/MS). De verkregen resultaten worden vervolgens met identificatiesoftware geïnterpreteerd om de eiwitten te identificeren. De

tweede strategie heeft als voordeel dat het in staat is om high-throughput screening toe te passen, waardoor duizenden eiwitten in korte tijd kunnen worden geïdentificeerd. De limitatie van deze tweede strategie is dat er problemen kunnen optreden met reproduceerbaarheid, dynamisch bereik en beschikbaarheid van databases voor identificatie. De beschreven methodiek is voornamelijk kwalitatief. Met behulp van labeling met isotopen is het mogelijk om deze methodiek kwantitatief te maken, maar in complexe milieus is dit erg lastig om toe te passen. Daarom wordt veelal een semi-kwantitatieve methode gebruikt, waarbij piekintensiteit van hetzelfde eiwit of spectrale aantal (dit is het totale aantal spectra die van een eiwit zijn geïdentificeerd) van hetzelfde eiwit worden toegepast. Deze laatste techniek wordt momenteel het meest toegepast.



Figuur 2.1 Workflow voor proteomicsanalyses. Uit Wang et al. (2016).

Hoewel proteomics zijn toegepast op monsters uit aquatische milieus (met name zeewater) en bodemmilieus om inzicht te krijgen in de microbiële processen die daar plaatsvinden, zijn er nog genoeg uitdagingen om betrouwbare informatie hieruit te

verkrijgen. Een eerste uitdaging is dat relatief veel (bio)massa nodig is voor proteomics, waardoor concentratiemethoden nodig zijn voor oligotrofe milieus zoals drinkwater. Tijdens deze concentratietechnieken is het echter mogelijk dat de eiwitsamenstelling van het monster verandert, doordat micro-organismen bijvoorbeeld stresseiwitten gaan aanmaken. Daarom worden watermonsters vaak gefixeerd met chemische methoden of met de magnetron, voordat ze worden gefiltreerd. Een andere uitdaging is dat verschillende extractiemethoden zijn ontwikkeld voor verschillende milieus, maar voor bijvoorbeeld drinkwater is nog onbekend welke extractiemethode het meest efficiënt is. Daarnaast worden bijvoorbeeld humuszuren ook geëxtraheerd, en deze kunnen vervolgens de identificatie en kwantificatie van eiwitten verstoren. Wanneer de gelgebaseerde scheidingsmethode wordt toegepast dan worden bepaalde eiwitten (sterk basische of zure eiwitten, zeer kleine of grote eiwitten) gemist. Een laatste uitdaging is de identificatie van de eiwitten, welke afhankelijk is van de grootte en kwaliteit van de referentiedatabase. Daarnaast worden referentiedatabases steeds groter, waardoor een grote computercapaciteit nodig is om de vele duizenden eiwitten uit monsters te screenen tegen dergelijke referentiedatabases. Een aanvullend voordeel van eiwitidentificatie met proteomics is overigens dat de geïdentificeerde eiwitten ook gebruikt kunnen worden om de actieve functionele microbiële processen (bijvoorbeeld metabolische processen, afbraakroutes van bepaalde stoffen) in het monster te onderzoeken.

2.3.4 Glycanen

Glycanen is een ander woord voor koolhydraten die zijn gebonden aan allerlei andere moleculen zoals bijvoorbeeld eiwitten (glycoproteïnes) of lipiden (glycolipiden), maar die ook onderling lange ketens kunnen vormen (polysachariden). Een colorimetrische methode, de Dubois-methode, is beschikbaar om het totaal aan verschillende koolhydraten (suikers, oligosachariden en polysachariden) te bepalen (Dubois et al., 1956). Deze methode is in het verleden al succesvol toegepast op drinkwater-gerelateerde monsters (Hijnen et al., 2018; van Bel, 2018), en is dus al beschikbaar om eiwitten in drinkwatermonsters te bepalen (eventueel na concentratie met hemoflow-ultrafiltratie). Het nadeel van deze methode is echter dat onduidelijk is welke glycanen zijn bepaald. Onderzoek naar de glycanensamenstelling van biomassa in het milieu wordt glycomics genoemd.

Verschiede methoden zijn beschreven om glycanen te identificeren. Zo worden koolhydraten veelal geïdentificeerd met high performance vloeistofchromatografie (HPLC) of gaschromatografie (GC) technieken (Li et al., 2018). Deze technieken worden ook toegepast om de belangrijkste koolhydraten in polysachariden te bepalen. Daarnaast zijn er ook methoden, zoals ^1H of ^{13}C NMR (zie paragraaf 2.2.2.1) die de koolhydraten kan identificeren die aanwezig zijn in glycoproteïnes of glycolipiden. Deze NMR methoden zijn echter kwalitatief of semi-kwantitatief, waardoor betrouwbare kwantificatie moeilijk is met deze methodiek (Lundborg & Widmalm, 2011). Studies waarin HPLC, GC of NMR methoden zijn toegepast om koolhydraten en polysachariden in lage concentratie te karakteriseren en kwantificeren in aquatische milieumonsters zijn echter niet aangetroffen met een zoekopdracht in de internationale literatuurdatabank (Scopus).

2.4 Conclusies literatuuronderzoek en aanbeveling voor fase 2

In dit hoofdstuk is een beknopt overzicht gegeven van chemische methoden die worden toegepast om de samenstelling van organisch koolstof in drinkwater te achterhalen. Veel van deze methoden (bv UV-Vis, SUVA, FEEMS, LC-OCD) zijn alleen in staat om organisch koolstof grof te karakteriseren, waarbij onduidelijk blijft welke precieze

organische stoffen in het water aanwezig zijn. Aangezien het doel van dit kraamkamerproject is om organisch koolstof tot op stofniveau te karakteriseren, zullen deze technieken verder niet onderzocht worden.

In het laatste deel van het literatuuronderzoek (paragraaf 2.3) zijn methoden beschreven waarmee bepaalde stoffen van stofgroepen kunnen worden geïdentificeerd en gekwantificeerd. Voor eiwit- en glycaanverbindingen blijken de methoden echter nog niet voldoende uitontwikkeld om ze te implementeren voor snelle en betrouwbare detectie van gedefinieerde eiwitten of glycanen. Het is wel aanbevelingswaardig om de ontwikkeling van proteomics en glycomics de aankomende jaren in de gaten te houden in relatie tot toepassing in drinkwater of andere waterige matrices met lage gehalten organische stoffen. De methoden om bepaalde carbonzuren, vetzuren en aminozuren te meten zijn verder doorontwikkeld en worden al mondjesmaat toegepast op drinkwatergerelateerde monsters. Binnen dit VO/BO project wordt daarom begonnen met implementatie van methoden om bepaalde carbonzuren, vetzuren en aminozuren in drinkwater te meten. Doordat het lastig te voorspellen is hoe gemakkelijk bepaalde methoden kunnen worden geïmplementeerd, wordt vooralsnog gestart met implementatie van methoden die bepaalde carbonzuren en vetzuren kunnen bepalen in drinkwater. Wanneer na implementatie van deze methoden nog budget beschikbaar is, wordt gestart met implementatie van methoden voor meten van bepaalde aminozuren in drinkwatermonsters.

3 Methodeontwikkeling voor carbonzuren in water

In dit hoofdstuk zijn de resultaten beschreven van de ontwikkeling van een analytische methode voor de detectie van carbonzuren in water.

3.1 Selectie van carbonzuren

Voor de methodeontwikkeling is getracht een representatieve selectie te maken van carbonzuren die mogelijk kunnen voorkomen in drinkwater. Als basis hiervoor is het onderzoek van Jurado-Sánchez et al. (2012) gebruikt, waarin het voorkomen van 35 carbonzuren in water is onderzocht. Van deze 35 verbindingen zijn 15 verbindingen geselecteerd voor de methodeontwikkeling in het huidige onderzoek. Hierbij zijn vooral de carbonzuren gekozen die in relevante concentraties zijn gedetecteerd ($>1 \mu\text{g C/L}$) en/of verschillende structureigenschappen bevatten om de methode zo breed mogelijk te kunnen opzetten. Tabel 3.1 toont de selectie van stoffen met bijbehorende eigenschappen.

Tabel 3.1 Geselecteerde verbindingen voor de methodeontwikkeling

Verbindingen	Cas nr	Brutoformule	Molecuulmassa (g/mol)
Azijnzuur	64-19-7	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	60,05
Propaanzuur	79-09-4	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$	74,08
Butaanzuur	107-92-6	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	88,11
Hexaanzuur	142-62-1	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$	116,16
Decaanzuur	334-48-5	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$	172,26
Dodecaanzuur	143-07-7	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$	200,32
Oxaalzuur	144-62-7	$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$	90,03
2-oxopropaanzuur (pyrodruivenzuur)	127-17-3	$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$	88,06
Glycolzuur	79-14-1	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$	76,05
Benzoëzuur	65-85-0	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	122,12
O-tolueenzuur	118-90-1	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$	136,15
Fenylazijnzuur	103-82-2	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$	136,15
Ftaalzuur	88-99-3	$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}$	118,32
1,2,3-benzeentricarbonzuur	732304-21-1	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_6$	210,14
Salicylzuur	69-72-7	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	138,12

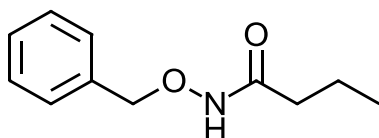
Op voorhand is de verwachting dat de methodeontwikkeling voor azijnzuur en propaanzuur uitdagend zal zijn, omdat deze stoffen zeer kleine verbindingen zijn. Hierdoor zijn ze lastiger te analyseren, ook doordat ze mogelijk volop in de achtergrond aanwezig zullen zijn (azijnzuur wordt vaak gebruikt in de mobiele fase van verschillende chemische methoden die op het lab worden toegepast).

3.2 Aanpak methodeontwikkeling

Het literatuuronderzoek (2.3.1) heeft laten zien dat er verschillende strategieën mogelijk zijn om carbonzuren in water te analyseren. Hieruit bleek dat een methode met vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie (LC-MS) de voorkeur heeft vanwege de eenvoudige monstervoorbewerking. Daarnaast heeft een methode waarbij de carbonzuren gederivatiseerd worden de voorkeur, omdat daardoor de analyse hierdoor gevoeliger wordt. Dit komt doordat de carbonzuren dan beter ioniseren in de massaspectrometer en meer retentie hebben op de analytische kolom. De mogelijkheden van deze methode worden als eerste onderzocht. Ook wordt een LC-MS methode onderzocht zonder derivatisering. Bij deze methode worden de carbonzuren geanalyseerd met behulp van reversed phase (RP) C18 LC-MS. Tot slot wordt ook de methode voor zeer polaire zuren en anionische stoffen onderzocht, die in het BTO project “zeer polaire stoffen” is ontwikkeld (Vughs et al. 2019). Het doel is om uiteindelijk een methode te ontwikkelen waarmee zoveel mogelijk carbonzuren op een relevant concentratieniveau in drinkwater (< 1 µg C/L) kunnen worden gedetecteerd. Afhankelijk van de gevonden resultaten worden er één of mogelijk twee methoden gekozen om verder te ontwikkelen, te valideren en voor de monstercampagne (zie hoofdstuk 4) in te zetten.

3.2.1 Derivatiseringsmethode

De derivatiseringsmethode is ontwikkeld aan de hand van de methode van Zeng & Cao (2018), waarbij O-benzylhydroxylamine (O-BHA) wordt gebruikt als derivatiseringsreagent. Het voordeel van deze methode is dat deze eenvoudig en snel is en weinig bijproducten geeft. Bij de derivatisering van een carbonzuur met O-BHA reageert de zuurgroep van het carbonzuur met de aminegroep van O-BHA, waardoor een amideverbinding ontstaat (condensatiereactie). Hierdoor ontstaat een groter molecuul welke een phenylring en aminegroep bevat (zie figuur 3.1).



Figuur 3.1: Reactieproduct van O-BHA met butaanzuur

Het voordeel hiervan is dat de kleine carbonzuren meer retentie hebben op de analytische kolom waardoor ze niet onvertraagd gedetecteerd worden. Daarnaast heeft de aminegroep als voordeel dat deze goed ioniseert in de massaspectrometer (positieve mode) waardoor de carbonzuren gevoeliger gedetecteerd kunnen worden.

3.2.1.1 Ontwikkeling derivatiseringsmethode – initiële experimenten

Voor de start van de methodeontwikkeling werd er voor gekozen om de derivatiseringscondities te hanteren zoals beschreven door Zeng & Cao (2018), en vervolgens te testen of deze condities zouden functioneren voor de geselecteerde carbonzuren. Hiervoor werden de carbonzuren individueel opgelost in methanol (100 mg/L) en vervolgens werden de stockoplossingen gebruikt om de derivatiseringsmethode van Zeng & Cao (2018) te testen. De derivatiseringsmethode werd getest met individuele referentiestandaarden van 100 µg/L, welke vervolgens geanalyseerd werden met een vloeistofchromatograaf gekoppeld aan een quadrupool time-of-flight massaspectrometer (LC-QToF). Het voordeel van een hoge resolutie massaspectrometer is dat de initiële methodeontwikkeling sneller kan worden uitgevoerd en daarnaast ook de mogelijkheid heeft om te screenen op andere aanwezige carbonzuren.

De derivatisering van de carbonzuren werd als volgt uitgevoerd: aan 500 µL carbonzuurstandaard (100 µg/L) werd 25 µL 0,1 M O-BHA in methanol en 10 µL 0,25 M N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide zoutzuur (EDC; koppelingsreagent) toegevoegd. Vervolgens werd het extract 1 uur geïncubeerd bij 25°C.

De extracten werden na incubatie dezelfde dag geanalyseerd met de LC-QToF. Hiervoor is een reversed phase C18 chromatografische methode toegepast, die gebruik maakt van een Xbridge BEH C18 XP kolom, met ultrapuur water met 0,05% mierenzuur als eluens A en methanol met 0,05% als eluens B. In Bijlage 1 staat de analytische methode beschreven.

De resultaten van de derivatisering van de referentiestandaarden na LC-QToF analyse staan vermeld in Tabel 3.2.

Tabel 3.2: Resultaten derivatisering referentiestandaarden carbonzuren (100 µg/L)

Verbindingen	Intensiteit Ref. standaard (counts)	Intensiteit Blanco water (counts)	Retentietijd (min)
Azijnzuur	8,8 ⁵	3,4 ⁵	9,61
Propaanzuur	9,2 ⁵	8,0 ⁴	10,55
Butaanzuur	1,3 ⁶	9,9 ⁴	11,57
Hexaanzuur	3,0 ⁶	7,5 ⁵	13,51
Decaanzuur	4,9 ⁶	4,0 ⁴	16,09
Dodecaanzuur	4,4 ⁶	3,0 ⁴	16,93
Oxaalzuur	n.d.	n.d.	n.d.
Pyrodruivenzuur	n.d.	n.d.	n.d.
Glycolzuur	3,7 ⁵	8,0 ³	8,56
Benzoëzuur	2,5 ⁶	6,4 ⁴	12,30
O-tolueenzuur	1,9 ⁶	1,0 ³	12,61
Fenylazijnzuur	2,7 ⁶	7,0 ²	12,74
Ftaalzuur	n.d.	n.d.	n.d.
1,2,3-benzeentricarbonzuur	n.d.	n.d.	n.d.
Salicylzuur	1,4 ⁴	2,2 ³	12.96

n.d. = niet gedetecteerd

Uit de resultaten van het derivatiseringsexperiment blijkt dat 11 van de 15 carbonzuren werden gedetecteerd met de huidige methode. De vier verbindingen met meerdere carbonzuren in het molecuul (oxaalzuur, pyrodruivenzuur, ftaalzuur en 1,2,3-benzeentricarbonzuur) werden in het geheel niet gedetecteerd. Een mogelijke oorzaak hiervoor is dat deze verbindingen niet goed worden gederivatiseerd of dat de gederivatiseerde verbinding te veel retentie heeft op de analytische kolom. De methode liet voor de 11 gedetecteerde verbindingen een goede gevoeligheid zien ($> 5,5^5$), met uitzondering van salicylzuur waarvoor een matig tot slechte gevoeligheid werd waargenomen (slechte gevoeligheid bij 1^4 of lager). Wanneer de intensiteiten van de blanco derivatisering met die van de referentiestandaarden worden vergeleken valt het op dat voor zeven van de 11 gedetecteerde carbonzuren een hoge achtergrondconcentratie ($> 1^4$) werd gedetecteerd. Dit betekent dat voor deze zeven carbonzuren (azijnzuur, propaanzuur, butaanzuur, hexaanzuur, decaanzuur, dodecaanzuur, benzoëzuur) geen lage detectiegrenzen ($< 5 \mu\text{g C/L}$) kunnen worden behaald met de toegepaste methode. Om te onderzoeken waar deze achtergrond vandaan kwam, werden additionele testen uitgevoerd met andere chemicaliën en een

andere type blanco water (ultrapuur water van verschillende leveranciers). Deze additionele testen hebben uiteindelijk niet geleid tot een verbeterde detectie van deze zeven carbonzuren in het blanco water (na derivatisering). Omdat vier van de 15 verbindingen niet gedetecteerd konden worden met deze methode en de verwachte detectiegrenzen te hoog waren, werd besloten niet verder te gaan met de methodeontwikkeling van de derivatiseringsmethode, maar om de mogelijkheden van de mixed-mode en reversed phase methode te onderzoeken.

3.2.2 Mixed-mode methode

Binnen het BTO-onderzoek is recent een methode ontwikkeld voor de detectie van zeer polaire zuren en anionische stoffen die mogelijk ook goed toepasbaar is voor de analyse van carbonzuren in water (Vughs et al, 2019). Bij deze methode wordt een mixed-mode kolom (Acclaim Trinity P1 kolom) gebruikt voor detectie van “zure” verbindingen. De gebruikte Acclaim Trinity P1 kolom heeft een trimodale stationaire fase, die bestaat uit een “reversed phase” C10 alkyldeel, tertiaire amine functionele groepen en sulfonaatgroepen. In een dergelijke mixed-mode kolom zijn verschillende interacties mogelijk tussen de vaste fase van de kolom en het analyt: hydrofobe interacties en elektrostatistische interacties met kationen en anionen. Hierdoor is deze kolom ook geschikt voor de analyse van negatief geladen carbonzuurverbindingen.

3.2.2.1 Test en optimalisatie mixed-mode methode

Om het potentieel van de mixed-mode methode te onderzoeken, werden de carbonzuren geanalyseerd met de al bestaande mixed-mode methode en analysecondities (zie Bijlage II). Deze analyse werd uitgevoerd op de Orbitrap Fusion hoge resolutie massaspectrometer. Hiervoor werden referentiestandaarden bij twee concentraties geanalyseerd (5 en 100 µg/L). Het doel hiervan was om vaststellen of de verbindingen met de mixed-mode methode geanalyseerd kunnen worden en om een inschatting te maken van de gevoeligheid. De resultaten hiervan staan in Tabel 3.3 weergegeven.

Tabel 3.3: Resultaten mixed-mode analyse referentiestandaarden (5 en 100 µg/L)

Verbindingen	Intensiteit	Intensiteit	Intensiteit	Retentietijd (min)
	Ref. standaard (counts) 100 µg/L	Ref. standaard (counts) 5 µg/L	Blanco water (counts)	
Azijnzuur	n.d. ¹	n.d.	n.d.	n.d.
Propaanzuur	1,5×10 ⁵	9,0×10 ⁴	9,0×10 ⁴	6,65
Butaanzuur	2,3×10 ⁵	1,6×10 ⁴	5,0×10 ³	7,70
Hexaanzuur	4,6×10 ⁵	2,3×10 ⁴	4,0×10 ³	9,71
Decaanzuur	1,8×10 ⁵	6,8×10 ³	2,0×10 ³	12,12
Dodecaanzuur	9,0×10 ⁴	3,7×10 ³	1,0×10 ³	12,85
Oxaalzuur	n,d,	n,d,	n,d,	n,d,
Pyrodruivenzuur	2,9×10 ⁶	1,2×10 ⁵	5,5×10 ³	9,58
Glycolzuur ²	6,9×10 ⁵	3,8×10 ⁴	1,0×10 ⁴	8,13
Benzoëzuur	2,7×10 ⁶	2,0×10 ⁵	5,0×10 ⁴	11,7
O-tolueenzuur	4,0×10 ⁶	2,3×10 ⁵	3,0×10 ³	11,59
Fenylazijnzuur	4,6×10 ⁵	2,0×10 ⁴	3,0×10 ³	10,81
Ftaalzuur	3,5×10 ⁶	2,3×10 ⁵	1,5×10 ⁴	19,51
1,2,3-benzeentricarbonzuur	n,d,	n,d,	n,d,	n,d,
Salicylzuur	1,7×10 ⁷	2,6×10 ⁶	8,0×10 ⁴	13,33

¹ n.d. = niet gedetecteerd

² Glycolzuur heeft een matige piekvorm i.v.m. een aanwezige stoorpiek

Met de mixed-mode methode werden 11 van de 15 carbonzuren goed geanalyseerd, en liet voor het merendeel van de verbindingen een redelijke gevoeligheid zien (detectiegrens ligt doorgaans tussen 1-5 µg C/L) met lage bijbehorende blanco. De analyse van azijnzuur, propaanzuur, oxaalzuur en 1,2,3-benzeentricarbonzuur was niet mogelijk met deze methode. Azijnzuur en propaanzuur hadden te veel hinder van achtergrond tijdens de analyse, waardoor ze niet op relevante concentraties gedetecteerd kunnen worden. Dit komt doordat deze stoffen aanwezig zijn als achtergrond op het laboratorium (azijnzuur wordt vaak bij verschillende chemische methoden op het lab toegepast). Oxaalzuur en 1,2,3-benzeentricarbonzuur ondervinden mogelijk teveel retentie op de analytische kolom. Om deze twee stoffen te meten is daarom een andere analytische kolom nodig met zwakkere of minder kationen (anionwisselaar).

Om de gevoeligheid mogelijk verder te verbeteren, werd ook de invloed van pH van de mobiele fase onderzocht. De resultaten lieten zien dat de gevoeligheid van de alifatische carbonzuren erg afhankelijk is van de pH (data niet getoond). De optimale pH lag rond de 4,5 - 5, dat ook de pH is van de gebruikte mobiele fase. Er kon dus geen extra gevoeligheidswinst worden behaald door de pH aan te passen, waardoor de analyse van de carbonzuren uitgevoerd wordt met dezelfde condities als voor de zeer polaire stoffenmethode.

3.2.3 Reversed phase methode

Op voorhand was de verwachting dat niet alle geselecteerde carbonzuren met een reversed phase C18 chromatografiemethode geanalyseerd kunnen worden. Verbindingen zoals azijnzuur, propaanzuur, glycolzuur, pyrodruivenzuur en oxaalzuur zullen zeer waarschijnlijk te polair zijn (m.a.w. geen retentie op de analytische kolom) om goed te kunnen worden gedetecteerd. Het is echter wel verwachten dat de overige carbonzuren met de meer robuustere C18 methode geanalyseerd kunnen worden. Afhankelijk van de gevoeligheid en reproduceerbaarheid, kan dan een keuze worden gemaakt om de carbonzuren deels met de C18 of mixed-mode methode te analyseren.

3.2.3.1 Test en optimalisatie C18 methode

Als startpunt voor de methodeontwikkeling werd de non-target screeningsmethode op de Orbitrap Fusion massaspectrometer gebruikt. Hierbij werden twee verschillende kolommen onderzocht; de Xbridge BEH C18 XP (2,1 x 150 mm; 2,5 µm) en de Hypersil Gold (2,1 x 100 mm; 1,9 µm) kolom. Daarnaast werden ook verschillende mobiele fasen onderzocht (data niet getoond) waarbij wel of geen ammoniumacetaat als buffer werd gebruikt en methanol of acetonitril als organisch oplosmiddel. Uiteindelijk gaf de Hypersil kolom in combinatie met ultrapuur water + 0,05% mierenzuur als eluens A en acetonitril met + 0,05% mierenzuur als Eluens B de beste gevoeligheid en piekvorm voor de verbindingen die een benzeenring bevatten. De resultaten van de analyse van de referentiestandaarden met bovengenoemde condities staan vermeld in Tabel 3.4.

Met de C18 methode is het mogelijk om zes van de 15 verbindingen op een laag detectieniveau te analyseren. De analyse van de alifatische carbonzuren ging onder de toegepaste condities matig tot slecht (standaard van 5 µg/L werd niet gedetecteerd), maar deze stoffen kunnen weer met de mixed-mode methode geanalyseerd worden. Pyrodruivenzuur en glycolzuur kwamen onvertraagd van de analytische kolom af en kunnen daarom niet met de C18 methode geanalyseerd worden. De carbonzuren die een benzeenring bevatten kunnen echter wel goed met de C18 methode geanalyseerd worden.

Tabel 3.4: Resultaten C18 analyse referentiestandaarden (5 en 100 µg/L)

Verbindingen	Intensiteit Ref. standaard 100 µg/L	Intensiteit Ref. standaard 5 µg/L	Intensiteit Blanco water	Retentietijd (min)
Azijnzuur	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Propaanzuur	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Butaanzuur	4,0 ³	n.d.	n.d.	3,40
Hexaanzuur	1,4 ⁴	n.d.	n.d.	8,56
Decaanzuur	1,2 ⁴	n.d.	n.d.	12,46
Dodecaanzuur	1,2 ⁴	n.d.	n.d.	14,03
Oxaalzuur	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pyrodruivenzuur	1,0 ⁷	9,7 ⁵	2,0 ⁴	1,27
Glycolzuur	3,4 ⁵	3,6 ⁶	3,1 ⁴	1,19
Benzoëzuur	2,6 ⁶	2,4 ⁵	9,0 ³	5,55
O-tolueenzuur	2,6 ⁶	4,3 ⁴	2,0 ³	8,49
Fenylazijnzuur	6,0 ⁴	3,0 ³	2,2 ³	7,59
Ftaalzuur	2,2 ⁷	2,7 ⁶	1,9 ⁴	5,57
1,2,3-benzeentricarbonzuur	7,5 ⁶	4,9 ⁵	1,0 ⁴	4,75
Salicylzuur	3,5 ⁷	4,2 ⁶	3,0 ⁴	7,71

n.d. = niet gedetecteerd

3.3 Validatie mixed-mode en C18 methode

Om een goed beeld te krijgen van de toepasbaarheid en prestaties van de ontwikkelde methoden voor de analyse van carbonzuren (zie paragraaf 3.2), werd een korte validatie uitgevoerd om de prestatiekenmerken voor de methoden vast te stellen. De validatie is uitgevoerd voor 12 van de 15 geselecteerde carbonzuren omdat azijnzuur, propaanzuur en oxaalzuur met de ontwikkelde methoden niet (goed) geanalyseerd konden worden. Voor de verbindingen ftaalzuur, 1,2,3-benzeentricarbonzuur en salicylzuur werden de prestatiekenmerken met de C18 methode vastgesteld. Voor de overige carbonzuren werden de prestatiekenmerken met de mixed-mode methode bepaald.

De volgende prestatiekenmerken werden vastgesteld voor drinkwater (kraanwater Nieuwegein) en oppervlaktewater (Lekkanaal): recovery, herhaalbaarheid, aantoonbaarheidsgrens (AG) en rapportagegrens (RG). De aantoonbaarheidsgrens, ook vaak de detectielimiet genoemd, is de laagste concentratie die met een bepaalde waarschijnlijkheid (statistisch) kan worden aangetoond. De rapportagegrens is de laagste concentratie van een stof die gekwantificeerd kan worden. De resultaten van deze validatie staan weergegeven in Tabel 3.5 en 3.6.

Tabel 3.5: Overzicht: prestatiekenmerken (n=5) van de C18 en mixed-mode (MM) methode in drinkwater

	Methode	AG	RG	RG	Herhaalbaarheid (%)		Recovery (%)
		µg/L	µg/L	µg C/L	5 µg/L	25 µg/L	25 µg/L
Butaanzuur	MM	1,4	5,0	2,7	4,4	1,9	108,5
Hexaanzuur	MM	0,17	5,0	3,1	2,6	2,4	87,6
Decaanzuur	MM	0,27	2,0	1,4	1,8	0,8	101,9
Dodecaanzuur	MM	0,28	2,0	1,4	0,2	0,9	105,6
Pyrodruivenzuur	MM	0,16	2,0	0,8	1,4	1,9	106,9
Glycolzuur	MM	4,3	20	6,3	-	4,4	122,7
Benzoëzuur	MM	0,22	3,0	2,1	1,4	1,4	106,8
O-tolueenzuur	MM	0,15	0,50	0,40	1,6	1,6	104,7
Fenylazijnzuur	MM	0,60	2,0	1,4	4,5	1,6	99,9
Ftaalzuur	C18	0,07	1,0	0,80	1,6	1,0	62,3
1,2,3-benzeentricarbonzuur	C18	0,08	3,0	1,5	3,3	3,1	19,1
Salicylzuur	C18	0,01	0,25	0,20	0,5	0,4	102,0

Tabel 3.6: Overzicht: prestatiekenmerken (n=5) van de C18 en mixed-mode (MM) methode in oppervlaktewater

	Methode	AG	RG	RG	Herhaalbaarheid (%)		Recovery (%)
		µg/L	µg/L	µg C/L	5 µg/L	25 µg/L	25 µg/L
Butaanzuur	MM	0,85	5,0	2,7	3,0	1,8	105,2
Hexaanzuur	MM	0,10	5,0	3,1	2,7	1,7	91,1
Decaanzuur	MM	0,47	2,0	1,4	3,1	2,0	106,6
Dodecaanzuur	MM	0,39	2,0	1,4	2,7	1,3	98,4
Pyrodruivenzuur	MM	0,06	2,0	0,8	3,1	1,1	96,4
Glycolzuur	MM	2,8	20	6,3	-	2,8	101,8
Benzoëzuur	MM	0,50	3,0	2,1	2,9	0,7	102,9
O-tolueenzuur	MM	0,03	0,50	0,40	1,2	0,5	99,6
Fenylazijnzuur	MM	0,26	2,0	1,4	1,9	1,1	95,1
Ftaalzuur	C18	0,09	1,0	0,80	1,1	1,7	67,3
1,2,3-benzeentricarbonzuur	C18	0,61	3,0	1,5	8,2	1,7	24,5
Salicylzuur	C18	0,01	0,25	0,20	0,5	0,4	95,2

De validatie van de C18 en mixed-mode methoden is goed verlopen. De vastgestelde rapportagegrenzen variëren van 0,20 tot 6,3 µg C/L en liggen veelal hoger dan de tot doel gestelde rapportagegrens van 1 µg C/L. De rapportagegrens van glycolzuur valt met 6,3 µg C/L erg hoog uit, wat veroorzaakt wordt door een stoorpiek. De 'recovery' van de meeste geteste carbonzuren in drinkwater en oppervlaktewater ligt in de range van 75 - 125 %, wat acceptabel is. Uitzonderingen hierop zijn ftaalzuur (62,3 en 67,3 %) en 1,2,3-benzeentricarbonzuur (19,1 en 24,5 %). Voor 1,2,3-benzeentricarbonzuur ligt de recovery te laag voor een goede en betrouwbare kwantificatiemethode.

De prestatiekenmerken van de C18 en mixed-mode methode zijn voor de meeste carbonzuren voldoende, zodat de methoden kunnen worden toegepast op verschillende drinkwatermonsters. Het is echter de verwachting dat de rapportagegrens voor diverse carbonzuren mogelijk te hoog is om deze carbonzuren in praktijkmonsters uit het drinkwatersysteem te kunnen detecteren.

3.4 Conclusie en aanbevelingen methodeontwikkeling

De methodeontwikkeling voor de detectie van carbonzuren in het $\mu\text{g C/L}$ bereik in water is uitdagend gebleken, wat mede komt doordat dit een brede groep van verbindingen is met verschillende chemische eigenschappen. Er zijn diverse analytische methoden onderzocht waarvan de C18- en mixed-mode methoden het meest geschikt bleken te zijn. De vastgestelde rapportagegrenzen zijn hoger dan gewenst voor de meeste geteste carbonzuren, maar zijn wel vaak lager dan de concentraties die in de literatuur zijn gerapporteerd voor Spaans drinkwater (Jurado-Sánchez et al. 2012). Één van de redenen dat de rapportagegrenzen voor sommige carbonzuren hoger zijn dan verwacht is dat verschillende carbonzuren een hogere achtergrond of blanco hebben dan vooraf voorzien. Dit komt weer doordat deze carbonzuren aanwezig zijn in gebruikte chemicaliën en/of aanwezig zijn als achtergrond op het chemische laboratorium bij KWR. Deze achtergrond in het laboratorium kan mogelijk in de toekomst verder gereduceerd worden door andere chemicaliën te gebruiken. Een andere reden voor de hoge rapportagegrenzen is dat bij de mixed-mode methode een hoge bufferconcentratie van ammoniumacetaat gebruikt dient te worden om een goede scheiding te krijgen op de analytische kolom. Het nadeel hiervan is dat dit voor zeer veel signaalonderdrukking zorgt in de massaspectrometer, waardoor de gevoeligheid substantieel daalt. Dit kan zeer waarschijnlijk verholpen worden door andere typen analytische kolommen (met anionwisselaar) te testen die ook goed functioneren voor carbonzuren met een lage bufferconcentratie. Verder kan derivatisering een nuttige strategie zijn, mits er een eenvoudige methodiek kan worden gevonden die voor een zeer brede groep van carbonzuren werkt, of wanneer er maar enkele carbonzuren geanalyseerd dienen te worden.

4 Monstercampagne

4.1 Monstercampagne

In november 2019 werd een monstercampagne uitgevoerd, waarbij watermonsters zijn genomen na verschillende zuiveringsprocessen, van verschillende reinwaters en uit het distributiesysteem bij drinkwaterbedrijf Evides (Tabel 4.1). Deze monsters zijn genomen op 27 november 2019 in AOC-vrije kolven die door KWR zijn aangeleverd. Vervolgens zijn de concentraties van de verschillende carbonzuren gemeten zoals hierboven is beschreven.

Tabel 4.1. De plekken van de verschillende productielocaties waar (drink)watermonsters zijn genomen voor analyse op de verschillende carbonzuren met chemische methoden.

Productielocatie	Monsterpunt	Productielocatie	Monsterpunt
Berenplaat	Voor UV	Braakman	Verzameld koolfiltraat
Berenplaat	Na UV	Braakman	Na reinwaterkelder
Berenplaat	Verzameld koolfiltraat	Proefinstallatie	Ruwwater Biesbosch
Berenplaat	Na reinwaterkelder	Proefinstallatie	Effluent CAPNF (1 kDa)
Berenplaat	Oud-Beijerland voor UF	Proefinstallatie	Koolfiltraat na convent. voorzuivering
Berenplaat	Oud-Beijerland na UF	Proefinstallatie	Koolfiltraat na CAPNF voorzuivering
Kralingen	Voor UV	Proefinstallatie	RO permeaat
Kralingen	Na UV	Dunea/Evides	Evides DW Monster
Kralingen	Verzameld koolfiltraat	Dunea/Evides	Dunea DW Monster
Kralingen	Na reinwaterkelder	Dunea/Evides	Evides DW Bruinisse
		Dunea/Evides	Haamstede DW Bruinisse

Naast deze monsters zijn er ook vier monsters genomen waarvan ook het AOC-gehalte werd bepaald met stammen P17 en Nox volgens KWR labmethode LMB-004. Van stam P17 is bekend dat deze bij voorkeur groeit op aminozuren, terwijl stam Nox bij voorkeur groeit op kleine carboxyzuren. De volgende monsters werden ingezet op AOC: Productielocatie Kralingen, koolfiltraat en na reinwaterkelder; Productielocatie Kralingen, voor en na UV bij West-Voorne. Deze monsters zijn genomen op 11 november 2019 in AOC-vrije kolven. Voordat de AOC-P17/Nox werd bepaald van deze monsters werd een deelmonster van iedere kolf genomen na pasteurisatie en ingevroren bij -20°C. Vervolgens is de AOC-P17/Nox bepaald volgens KWR huisvoorschrift LMB-004. Na afloop van de AOC-bepaling is wederom een watermonster genomen en ingevroren bij -20°C. Van de ingevroren monsters zijn vervolgens de carbonzuren gemeten met de C18 en mixed-mode methode zoals beschreven in hoofdstuk 3.

Tabel 4.2A. Concentraties van zes verschillende carbonzuren die zijn gemeten in de drinkwatermonsters genomen bij verschillende locaties van Evides

	Butaanzuur (µg C/L)	Hexaanzuur (µg C/L)	Decaanzuur (µg C/L)	Dodecaanzuur (µg C/L)	Pyrodruivenzuur (µg C/L)	Glycolzuur (µg C/L)
Berenplaat voor UV	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Berenplaat na UV	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Berenplaat koolfiltraat	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Berenplaat reinwater	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Oud-Beijerland voor UF	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Oud-Beijerland na UF	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Kralingen voor UV	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Kralingen na UV	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Kralingen koolfiltraat	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Kralingen reinwater	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Braakman koolfiltraat	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Braakman reinwater	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Pilot Ruwwater Biesbosch	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Pilot Effluent CAPNF	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Pilot koolfiltraat na convent. voorzuiivering	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Pilot koolfiltraat na CAPNF voorzuiivering	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Pilot RO permeaat	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Evides drinkwater Monster	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Dunea drinkwater Monster	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Evides drinkwater Bruinisse	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3
Haamstede drinkwater Bruinisse	< 2,7	< 3,1	< 1,4	< 1,4	< 0,80	< 6,3

Tabel 4.2B. Concentraties van zes verschillende carbonzuren die zijn gemeten in de drinkwatermonsters genomen bij verschillende locaties van Evides

	Benzoëzuur (µg C/L)	O-tolueenzuur (µg C/L)	Fenylazijnzuur (µg C/L)	Ftaalzuur (µg C/L)	1,2,3- benzeentricarbonzuur (µg C/L)	Salicylzuur (µg C/L)
Berenplaat voor UV	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Berenplaat na UV	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Berenplaat koolfiltraat	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Berenplaat reinwater	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Oud-Beijerland voor UF	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Oud-Beijerland na UF	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Kralingen voor UV	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Kralingen na UV	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Kralingen koolfiltraat	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Kralingen reinwater	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Braakman koolfiltraat	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Braakman reinwater	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Pilot Ruwwater Biesbosch	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Pilot Effluent CAPNF	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Pilot koolfiltraat na convent. voorzuijing	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Pilot koolfiltraat na CAPNF voorzuijing	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Pilot RO permeaat	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Evides drinkwater Monster	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Dunea drinkwater Monster	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Evides drinkwater Bruinisse	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20
Haamstede drinkwater Bruinisse	< 2,1	< 0,40	< 1,4	< 0,80	< 1,5	< 0,20

4.2 Resultaten en Discussie

De concentraties van de twaalf verschillende carbonzuren die zijn gemeten in twintig verschillende (drink)watermonsters uit de zuivering en/of distributiesysteem van productielocaties Berenplaat, Kralingen en Braakman lagen allemaal onder de detectiegrens (Tabel 4.2). Doordat de detectiegrens van de verschillende stoffen meestal onder de 5 µg C/L ligt, zijn deze twaalf stoffen dus niet of in zeer lage concentraties aanwezig in drinkwater of water bemonsterd tijdens de drinkwaterbehandeling.

Bij vier andere monsters (Kralingen koolfiltraat, Kralingen reinwater, Westvoorne voor UV en Westvoorne na UV) werd naast het bepalen van deze twaalf stoffen ook de AOC-concentratie bepaald (Tabel 4.3). De twaalf stoffen werden bepaald voor de drinkwatermonster direct na pasteuriseren voor de AOC-test en nadat de AOC test was afgelopen. Voor deze monsters werd waargenomen dat alle twaalf carbonzuren beneden de detectiegrens van deze chemische bepaling lagen voor zowel de drinkwatermonsters na pasteurisatie alsook voor de watermonsters nadat de AOC-bepaling was afgelopen. De resultaten laten dus zien dat pasteurisatie van de drinkwatermonsters niet resulteerde in concentraties van de twaalf carbonzuren die boven de detectiegrens van de chemische methoden zijn. Daarmee lijkt de invloed van pasteurisatie op de afzonderlijk gemeten carbonzuurconcentratie laag.

De totale AOC-concentratie in de drinkwatermonsters varieerde tussen de 4,2 en 14,0 µg C/L, maar met de chemische methoden kon dus niet worden achterhaald welke carbonzuren hier voor verantwoordelijk waren. Bij Kralingen werd waargenomen dat de dosering van chloordioxide aan het actief koolfiltraat leidde tot vorming van 6,9 µg C/l AOC (verschil tussen AOC reinwater en AOC koolfiltraat). Met de chemische methoden was het dus ook niet mogelijk om te achterhalen welke AOC-verbinding precies werd verhoogd door de chloordioxidedosering. De gemeten AOC-concentraties werden voornamelijk bepaald door de AOC-fractie die door bacteriestam *Spirillum* spp. Nox wordt omgezet. Deze bacteriestam is voornamelijk gespecialiseerd in de afbraak van carbonzuren bij lage concentraties (µg C/L range)(van der Kooij & Hijnen, 1984). Groei van stam Nox is in het verleden getest met vijf van de twaalf carbonzuren die in de hier beschreven studie zijn bepaald (glycolzuur, pyrodruivenzuur, benzoëzuur, salicylzuur en ftaalzuur). Van die vijf carbonzuren werden alleen glycolzuur en pyrodruivenzuur omgezet door stam Nox. Bij drie van de vier monsters was de AOC-concentratie ≤ 7,0 µg C/l, dat rond of onder de detectiegrens van glycolzuur (6,3 µg C/L) is (Tabel 4.3). Daardoor is te verwachten dat de glycolzuurconcentratie in deze drie monsters lager is dan de detectiegrens van 6,3 µg C/l. In het andere monster (Kralingen, reinwater) is de detectiegrens van glycolzuur beduidend lager dan de gemeten AOC-Nox concentratie (14,0 µg C/l). Dit betekent dat glycolzuur niet de dominante AOC-verbinding is die door stam AOC-Nox in dit monster wordt afgebroken.

De detectiegrens van pyrodruivenzuur met de chemische methode is 0,80 µg C/L, dat lager is dan de AOC-Nox concentratie gemeten in dezelfde vier watermonsters (Tabel 4.3). Daaruit kan worden geconcludeerd dat een groot deel van de AOC-Nox concentratie in deze vier geteste monsters niet uit pyrodruivenzuur bestaat. Twee redenen kunnen ten grondslag liggen aan het feit dat met de AOC-methode AOC-concentraties werden verkregen die deels hoger zijn dan de detectiegrens voor de twaalf carbonzuren die met chemische methoden zijn bepaald. Ten eerste kan het zijn dat stam Nox organische stoffen omzet die niet met de chemische methoden zijn bepaald. Dit kunnen zowel bepaalde carbonzuren zijn die niet met de chemische methoden zijn bepaald (bv oxaalzuur, azijnzuur), alsook andere organische

koolstofverbindingen die mogelijk door stam Nox worden omgezet. Daarnaast kan het zijn dat stam Nox in drinkwater een groot aantal verschillende stoffen (waaronder carbonzuren) tegelijk omzet, wat leidt tot een hoge AOC-Nox concentratie, maar per carbonzuur kan de concentratie in het water laag zijn en onder de detectiegrens van de chemische methoden vallen.

Tabel 4.3. Concentraties van de AOC-concentraties (P17/Nox) en de verschillende carbonzuren gemeten met chemische methoden (C18 of mixed-mode) in vier verschillende watermonsters. De resultaten van de chemische methoden zijn hetzelfde voor de drinkwatermonsters genomen direct na pasteurisatie voor de AOC-methode en nadat de AOC-bepaling was uitgevoerd.

	Kralingen koolfiltraat	Kralingen reinwater ^a	Westvoorne voor UV	Westvoorne na UV
AOC-P17 (µg C/L)	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00
AOC-Nox (µg C/L)	7,0 ± 1,3	13,9 ± 0,0	4,1 ± 0,0	5,8 ± 0,8
AOC-Tot (µg C/L)	7,0 ± 0,9	14,0 ± 0,0	4,2 ± 0,0	5,9 ± 0,6
Butaanzuur (µg C/L) C4	< 2,7	< 2,7	< 2,7	< 2,7
Hexaanzuur (µg C/L) C6	< 3,1	< 3,1	< 3,1	< 3,1
Decaanzuur (µg C/L) C10	< 1,4	< 1,4	< 1,4	< 1,4
Dodecaanzuur (µg C/L) C12	< 1,4	< 1,4	< 1,4	< 1,4
Pyrodruivenzuur (µg C/L) C3	< 0,80	< 0,80	< 0,80	< 0,80
Glycolzuur (µg C/L) C2	< 6,3	< 6,3	< 6,3	< 6,3
Benzoëzuur (µg C/L) C7 ring	< 2,1	< 2,1	< 2,1	< 2,1
O-tolueenzuur (µg C/L) C8 ring	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40
Fenylazijnzuur (µg C/L) C8 ring	< 1,4	< 1,4	< 1,4	< 1,4
Ftaalzuur (µg C/L) C8 ring	< 0,80	< 0,80	< 0,80	< 0,80
1,2,3-benzeentricarbonzuur (µg C/L) C9 ring	< 1,5	< 1,5	< 1,5	< 1,5
Salicylzuur (µg C/L) C7 ring	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20

^a Watermonster is genomen na dosering van chloordioxide

In een Spaanse studie werden de carbonzuurconcentraties bepaald van monsters genomen na verschillende processen in de drinkwaterzuivering en van het gedistribueerde drinkwater van twee verschillende productielocaties (Jurado-Sanchez et al., 2014). Op de ene locatie (productielocatie I) werd drinkwater geproduceerd van oppervlaktewater dat werd behandeld met preoxidatie/coagulatie en filtratie, waarna chloor werd toegevoegd, voordat het water werd gedistribueerd. Op de andere locatie (productielocatie II) werd drinkwater ook geproduceerd van oppervlaktewater, maar dit water werd behandeld met actieve-koolfiltratie, coagulatie, ozonisatie, chloortoevoeging en zandfiltratie, waarna het werd gedistribueerd. De carbonzuurconcentraties van de verschillende watermonsters gemeten in dat onderzoek zijn weergegeven in Tabel 4.4 en 4.5.

Tabel 4.4 Concentratie carbonzuren in watermonsters uit een drinkwaterzuivering en distributiesysteem van productielocatie I in Spanje (uit: Jurado-Sanchez et al., 2014).

Carboxylic acid	Table 1 – Carboxylic acids concentrations ($\mu\text{g/L}$) from the DWTP 1 (chloramination) samples collected in different seasons.									
	Sampling point									
	Raw (1)		Preoxidation/coagulation (2)		Filtration and chloramination (3)		Tanks (4)		Distribution system (5)	
	n ^a	Min–Max ^b	n	Min–Max	n	Min–Max	n	Min–Max	n	Min–Max
<i>Autumn (October 2011)</i>										
Butyric	0	<0.040	0	<0.040	4	0.60–1.2	4	0.50–1.0	4	0.52–0.97
Dodecanoic	3	8.0–18	3	7.9–19	3	6.8–18	3	6.6–15	3	6.4–14
Glycolic	4	8.6–13	4	9.0–12	4	7.0–11	4	8.0–12	4	7.2–12
Hexanoic	4	2.8–3.8	4	2.5–4.0	4	2.9–3.8	4	2.5–3.0	4	2.6–3.6
2-Methylbutyric	0	<0.015	0	<0.015	4	1.8–4.0	4	1.6–3.5	4	1.4–3.4
Oleic	3	0.53–0.98	3	0.40–1.0	3	0.10–0.28	3	0.09–0.24	3	0.08–0.23
Oxalic	4	2.7–3.6	4	2.5–3.9	4	2.0–3.8	4	2.1–3.5	4	2.4–3.7
Propionic	3	0.40–0.78	3	0.42–0.92	3	0.51–0.82	3	0.50–0.72	3	0.55–0.82
Pyruvic	4	10–16	4	9.8–19	4	8.9–18	4	9.0–16	4	8.0–15
Benzoic	4	1.3–2.9	4	1.5–3.0	4	2.8–4.0	4	2.0–4.1	4	1.9–3.8
3-Hydroxybenzoic	0	<0.020	0	<0.020	4	1.7–2.8	4	1.4–2.5	4	1.2–2.2
2-Nitrobenzoic	0	<0.020	0	<0.020	3	0.43–0.70	3	0.32–0.69	3	0.25–0.55
Phenylacetic	4	0.80–2.0	4	0.85–1.9	4	1.3–2.1	4	0.91–1.4	4	0.80–1.3
Salicylic	2	0.90–1.5	2	1.1–2.2	3	1.9–3.0	3	1.3–2.9	3	1.0–2.0
<i>Winter (January 2012)</i>										
Butyric	0	<0.040	0	<0.040	4	1.7–3.0	4	1.6–2.7	4	1.4–2.5
Dodecanoic	3	12–27	3	11–26	3	10–25	3	9.5–23	3	9.3–20
Glycolic	4	15–22	4	14–17	4	10–16	4	9.0–19	7	12–15
Hexanoic	4	4.3–6.2	4	4.9–6.4	4	4.2–6.9	4	4.8–6.8	4	4.7–6.5
2-Methylbutyric	0	<0.015	0	<0.015	4	2.1–5.1	4	2.9–5.3	4	3.1–5.5
Oleic	3	1.6–2.8	3	1.5–2.2	3	0.20–0.70	3	0.18–0.65	3	0.16–0.40
Oxalic	4	4.0–5.7	4	4.3–6.0	4	3.0–5.6	4	4.5–5.5	4	4.2–5.3
Propionic	3	0.69–1.3	3	0.60–1.1	4	1.0–1.5	4	0.95–1.4	4	0.90–1.2
Pyruvic	4	17–26	4	16–28	4	15–27	4	16–24	4	14–21
Benzoic	4	2.9–4.5	4	2.6–4.6	4	5.8–10	4	5.9–9.4	4	6.6–11
3-Hydroxybenzoic	0	<0.020	0	<0.020	4	2.6–5.0	4	3.2–4.6	4	3.0–4.2
2-Nitrobenzoic	0	<0.020	0	<0.020	4	1.1–1.8	4	0.70–1.6	4	0.72–1.5
Phenylacetic	4	2.0–4.8	4	1.9–5.1	4	2.8–5.6	4	2.6–5.4	4	2.7–5.1
Salicylic	2	1.4–2.0	2	1.5–2.1	3	2.9–5.0	3	3.3–5.1	3	3.9–4.9
m-Toluic	2	0.75–1.0	2	0.74–1.1	2	2.2–3.6	2	2.3–3.5	2	2.1–3.4
o-Toluic	2	2.6–3.0	2	2.7–3.5	2	5.2–7.2	2	5.6–8.0	2	5.3–7.5
p-Toluic	2	1.5–2.1	2	1.4–2.4	2	1.8–2.8	2	1.7–2.5	2	1.6–2.6
<i>Summer (July 2012)</i>										
Butyric	0	<0.040	0	<0.040	4	0.13–0.23	4	0.15–0.31	4	0.14–0.25
Dodecanoic	2	3.1–5.7	2	3.4–5.1	2	3.2–5.2	2	3.3–5.4	2	3.5–5.3
Glycolic	4	1.0–3.0	4	1.1–3.2	4	1.5–3.6	4	1.7–3.8	4	1.6–3.5
Hexanoic	2	0.60–2.5	2	0.50–2.7	2	0.58–2.8	2	0.60–2.6	2	0.59–2.9
2-Methylbutyric	0	<0.015	0	<0.015	4	1.2–3.2	4	1.1–3.1	4	0.80–2.3
Propionic	2	0.30–0.42	2	0.25–0.44	2	0.39–0.55	2	0.33–0.46	2	0.34–0.50

^a Number of positive samples from a total of 4 each season, in triplicate.

^b Minimum and maximum concentrations found.

Bij de eerste Spaanse drinkwaterproductielocatie (zonder ozonisatie in de zuivering) waren de concentraties van de carbonzuren dodecaanzuur, pyrodruivenzuur, benzoëzuur en salicylzuur in watermonsters genomen in oktober 2011, hoger dan de detectiegrens van de chemische methoden gebruikt in onze studie (Tabel 4). Voor de watermonsters genomen in januari 2012 bij deze locatie waren de concentraties van deze carbonzuren ook hoger dan de detectiegrens van de door ons toegepaste chemische methode. Daarnaast waren in januari 2012 de concentratie hexaanzuur, fenylazijnzuur en O-tolueenzuur ook hoger dan de detectiegrens van de door ons toegepaste methodiek. Opvallend is dat op deze Spaanse drinkwaterlocatie de concentraties carbonzuren in het ruwwater (uit reservoir dat water betreft uit een zijrivier die onder invloed staat van afspoeling van landbouw en effluent van varkensboerderijen en olijfindustrie) al hoger zijn dan de detectiegrens gebruikt in onze studie. De carbonzuurconcentraties veranderen ook vrijwel niet tijdens de drinkwaterbehandeling op deze Spaanse locatie. Bij de tweede Spaanse drinkwaterproductielocatie (met ozonisatie) waren de concentraties van glycolzuur, pyrodruivenzuur, 1,2,3-benzeentricarbonzuur, benzoëzuur, fenylazijnzuur, ftaalzuur en salicylzuur in de watermonsters die zijn genomen in oktober 2011 hoger dan de grenswaarde van de methoden die we hebben toegepast om carbonzuren in drinkwater

te bepalen (Tabel 5). In de watermonsters genomen in januari 2012 waren de concentraties van deze carbonzuren en van butaanzuur en O-tolueenzuur ook hoger dan de detectiegrens van de door ons toegepaste methode. Op deze tweede locatie waren de carbonzuurconcentraties van het ruwwater (uit reservoir dat water betreft uit een zijrivier die onder invloed staat van effluent van RWZI, levensmiddelen- en mijnindustrie, en afspooling van landbouw) beduidend lager dan op de eerste locatie en voor de meeste carbonzuren lager dan de detectiegrens gebruikt in onze studie (vooral voor het monster genomen in oktober). De carbonzuurconcentraties in de watermonsters op deze tweede Spaanse locatie nemen sterk toe na het ozonisatieproces in de zuivering.

Tabel 4.5. Concentratie carbonzuren in watermonsters uit drinkwaterzuivering en distributiesysteem van productielocatie II in Spanje (uit: Jurado-Sanchez et al., 2014).

Carboxylic acid	Table 2 – Carboxylic acids concentrations (µg/L) from the DWTP 2 (ozonation/chlorination) samples collected in different seasons.									
	Raw (1)		GAC filtration and sedimentation (2)		Sand filtration and ozonation/chlorination (3)		Tanks (4)		Distribution system (5)	
	n ^a	Min–Max ^b	n	Min–Max	n	Min–Max	n	Min–Max	n	Min–Max
<i>Autumn (October 2011)</i>										
Acetic	3	1.2–4.2	3	1.1–4.0	4	4.1–9.9	4	4.5–9.2	4	4.4–9.0
Butyric	0	<0.040	0	<0.040	4	2.6–4.8	4	2.4–5.0	4	2.5–4.7
Decanoic	3	0.35–0.55	3	0.30–0.57	3	0.52–0.72	3	0.49–0.68	3	0.50–0.64
Dodecanoic	2	0.28–0.45	2	0.20–0.41	2	0.19–0.34	2	0.21–0.40	2	0.22–0.38
Glycolic	4	2.8–4.1	4	2.9–3.9	4	29–62	4	27–59	4	25–60
Oxalic	4	11–20	4	10–19	4	20–56	4	22–54	4	26–51
Propionic	3	1.0–3.0	3	1.1–4.0	3	2.5–6.7	3	2.7–6.5	3	2.6–6.3
Pyruvic	4	4.4–6.2	4	4.0–6.6	4	17–46	4	22–44	4	19–43
1,2,3-Benzenetricarboxylic	0	<0.065	0	<0.065	4	38–46	4	35–44	4	30–45
Benzoic	4	1.1–3.0	4	0.95–2.5	4	4.3–16	4	5.0–17	4	4.9–15
3-Hydroxybenzoic	0	<0.020	0	<0.020	4	2.2–3.9	4	2.0–4.0	4	2.3–3.8
2-Nitrobenzoic	0	<0.020	0	<0.020	3	1.5–2.3	3	1.4–2.7	3	1.3–2.6
4-Nitrobenzoic	0	<0.030	0	<0.030	2	1.3–2.5	2	1.1–2.6	2	1.0–2.4
Phenylacetic	3	1.0–2.3	3	1.1–2.9	4	6.8–19	4	6.6–17	4	6.4–15
Phthalic	0	<0.025	0	<0.025	4	39–75	4	38–73	4	34–72
Salicylic	3	0.40–0.54	3	0.50–0.70	3	2.8–5.9	3	2.9–5.5	3	2.8–5.3
m-Toluic	3	0.30–0.47	3	0.20–0.48	4	1.0–2.2	4	0.95–2.1	4	0.90–2.4
p-Toluic	3	0.33–0.50	3	0.35–0.48	4	1.2–2.8	4	0.96–2.6	4	0.80–2.5
<i>Winter (January 2012)</i>										
Acetic	3	2.7–11	3	3.1–12	4	15–30	4	14–29	4	16–28
Butyric	0	<0.040	0	<0.040	4	5.0–13	4	5.4–15	4	5.3–14
Decanoic	3	0.73–1.5	3	0.72–1.0	3	0.80–1.9	3	0.83–2.0	3	0.77–2.1
Dodecanoic	3	0.78–1.1	3	0.58–0.98	3	0.72–1.4	3	0.60–1.6	3	0.64–1.9
Glycolic	4	4.5–5.0	4	4.8–6.0	4	39–100	4	46–99	4	45–94
Oxalic	4	15–25	4	13–23	4	30–94	4	29–92	4	26–91
Propionic	3	3.3–9.8	3	3.5–10	3	6.0–24	3	7.0–26	3	6.1–25
Pyruvic	4	6.5–8.0	4	7.0–8.5	4	25–77	4	26–75	4	24–76
1,2,3-Benzenetricarboxylic	0	<0.065	0	<0.065	4	42–71	4	48–80	4	45–79
Benzoic	4	1.5–4.3	4	1.7–4.0	4	9.0–43	4	10–44	4	9.0–42
3-Hydroxybenzoic	0	<0.020	0	<0.020	4	3.5–10	4	3.3–9.6	4	3.6–11
2-Nitrobenzoic	0	<0.020	0	<0.020	3	3.7–8.8	3	3.5–8.6	3	2.8–8.4
4-Nitrobenzoic	0	<0.030	0	<0.030	2	3.8–9.8	2	3.7–9.6	2	3.0–9.4
Phenylacetic	3	2.4–4.9	3	1.8–4.9	4	11–44	4	10–40	4	9.0–38
Phthalic	0	<0.025	0	<0.025	4	40–100	4	38–97	4	49–102
Salicylic	2	0.65–0.95	2	0.60–0.70	4	5.0–15	4	5.5–14	4	4.0–13
m-Toluic	3	0.37–0.60	3	0.42–0.55	4	3.8–10	4	3.6–9.9	4	3.7–11
o-Toluic	2	3.0–4.1	2	2.7–4.6	3	6.6–17	3	6.4–18	3	6.5–16
p-Toluic	3	0.40–0.65	3	0.38–0.60	4	3.5–12	4	4.3–15	4	4.2–14
<i>Summer (July 2012)</i>										
Acetic	2	0.90–1.5	2	0.95–1.2	2	1.5–2.1	2	1.4–1.9	2	1.6–1.8
Butyric	0	<0.040	0	<0.040	4	0.13–0.23	4	0.15–0.21	4	0.16–0.20
Decanoic	2	0.15–0.20	2	0.19–0.22	2	0.22–0.33	2	0.20–0.32	2	0.20–0.30
Dodecanoic	2	0.19–0.25	2	0.14–0.25	2	0.15–0.37	2	0.13–0.38	2	0.12–0.30
Glycolic	4	0.10–2.4	4	0.11–2.2	4	1.5–3.6	4	1.4–3.9	4	1.7–3.8
Propionic	2	0.30–0.42	2	0.25–0.44	3	0.40–0.50	3	0.39–0.47	3	0.33–0.50

^a Number of positive samples from a total of 4 each season, in triplicate.

^b Minimum and maximum concentrations found.

Deze resultaten laten zien dat de in deze studie geteste drinkwatermonsters van productielocaties van Evides (zonder desinfectieresidu) lagere concentraties aan carbonzuren bevatten dan de drinkwatermonsters genomen bij twee Spaanse drinkwaterlocaties (met desinfectieresidu). In vergelijking met de eerste Spaanse drinkwaterlocatie heeft het ruwwater dat door de oppervlaktewaterlocaties van Evides wordt gebruikt lagere concentraties carbonzuren, waardoor deze onder de detectiegrens blijven met de chemische methoden die we in dit onderzoek hebben toegepast. In vergelijking met de tweede Spaanse drinkwaterlocatie veroorzaken de waterbehandelingsprocessen van de verschillende oppervlaktewaterlocaties van Evides geen grote toename in de concentratie van de verschillende carbonzuren die zijn bepaald in onze studie. Het grootste verschil tussen beide locaties is dat bij de Spaanse locatie ozonisatie werd toegepast, terwijl bij de Evides locaties UV in plaats van ozonisatie wordt toegepast. Ozon is een zeer sterke oxidator, waardoor verwacht kan worden dat door ozon meer hoogmoleculair organisch koolstof wordt omgezet naar carbonzuren dan door UV.

Tot slot blijkt uit de vergelijking dat de chemische methoden die bij de Spaanse studie zijn gebruikt carbonzuren bij lagere concentraties kunnen detecteren dan de chemische methoden die bij KWR zijn gebruikt. Dit verschil wordt veroorzaakt doordat Jurado-Sanchez et al. (2014) een andere monstervoorbewerking gebruiken (vaste fase extractie gevolgd door derivatisering met trimethylchlorosilane) dan we in onze studie hebben toegepast (alleen derivatisering met O-benzylhydroxylamine, volgens Zeng & Cao, 2018). Voor de laatste voorbewerking is gekozen omdat (i) de voorbewerking en derivatisering volgens Jurado-Sanchez et al. (2014) arbeidsintensief is, wat resulteert in relatief hoge kosten om de carbonzuurconcentratie te meten en (ii) Zeng & Cao (2018) in hun studie met een relatief eenvoudige monstervoorbewerking ook een lage detectiegrens bereikten. Deze detectiegrens is echter onvoldoende laag om deze stoffen ook in de geteste (drink)watermonsters te detecteren.

Om afzonderlijke carbonzuren te detecteren in het Nederlandse drinkwater zijn er dus gevoeliger chemische methoden nodig of dienen de carbonzuren eerst geconcentreerd te worden voordat ze met de in dit rapport beschreven methoden kunnen worden geanalyseerd. Momenteel wordt ultrafiltratie met hemoflow bijvoorbeeld toegepast om deeltjesgebonden en hoogmoleculaire organische koolstofverbindingen te concentreren. Carbonzuren kunnen echter niet met deze concentratiestap worden opgehoopt, omdat carbonzuren door het ultrafiltratiemembraan gaan. Mogelijk dat met omgekeerde osmose (RO) de carbonzuren wel kunnen worden geconcentreerd, omdat carbonzuren niet door RO-membranen gaan.

De analytische methode kan in een vervolgonderzoek verder geoptimaliseerd worden door nieuwe type mixed-mode kolommen te gebruiken (bijv. SIELC Newcrom B analytische kolom). Hiermee kan mogelijk het palet aan carbonzuren verder worden uitgebreid. Daarnaast werken deze type kolommen ook goed met lagere concentraties aan bufferzouten waardoor er voor de carbonzuren lagere detectiegrenzen behaald kunnen worden.

Wanneer vervolgonderzoek wordt uitgevoerd naar deze mogelijkheden is het tevens aan te raden om water na ozonisatie in de drinkwaterbereiding te analyseren, omdat dit watertype naar verwachting de hoogste carbonzuurconcentratie heeft. Wanneer carbonzuren niet worden gedetecteerd in het water na ozonisatie, dan zullen ze waarschijnlijk ook niet gedetecteerd worden in andere (drink)watertypen.

5 Conclusies en Aanbevelingen

5.1 Conclusies

5.1.1 Literatuuronderzoek

Er bestaan chemische methoden waarmee afzonderlijke carbonzuren of aminozuren kunnen worden bepaald in drinkwater.

Veel chemische methoden die worden toegepast om de samenstelling van (complexe) organisch koolstofverbindingen in drinkwater te karakteriseren (bv UV-Vis, SUVA, FEEMS, LC-OCD), zijn in staat om organisch koolstof grof te karakteriseren, maar zijn niet in staat om afzonderlijke verbindingen kwantitatief te detecteren.

Methoden waarmee afzonderlijke eiwit- of glycaanverbindingen kunnen worden bepaald, lijken onvoldoende uitontwikkeld om snel en betrouwbaar toe te kunnen passen op drinkwater.

Op basis van de uitkomsten van het literatuuronderzoek is besloten om de chemische methoden die afzonderlijke carbonzuren in drinkwater kunnen meten te implementeren en valideren op het chemisch laboratorium van KWR.

5.1.2 Implementatie en validatie

Van de drie chemische methoden die zijn getest om carbonzuren te detecteren, blijken de mixed-mode methode en de reversed phase methode geschikt te zijn om de meeste van de geteste carbonzuren te detecteren. Bij de eerste methode wordt vloeistofchromatografie gevolgd door hoge-resolutiemassaspectrometrie (LC-HRMS) gebruikt een mixed mode kolom met trimodale stationaire fase, bij de tweede methode wordt LC-HRMS gebruikt met een reversed phase C18 kolom.

De detectiegrenzen van de gedetecteerde carbonzuren liggen in de range van 0,20 tot 6,3 µg C/L en zijn voor de meeste stoffen hoger dan de gewenste 1 µg C/L.

De recovery van de geteste carbonzuren in drinkwater en oppervlaktewater ligt tussen de 75 en 125%, dat acceptabel is voor een chemische methode.

Azijnzuur, propaanzuur en oxaalzuur kunnen met de geteste methoden niet in water worden gedetecteerd.

5.1.3 Monstercampagne

De concentratie van 12 carbonzuren in drinkwatermonsters genomen bij verschillende productielocaties van Evides (voor en na UV, voor en na chloordioxidedosering, voor en na ultrafiltratie of nanofiltratie en in het distributiesysteem) lagen allen onder de detectiegrens. Met de toegepaste chemische methoden konden afzonderlijke carbonzuren niet gekwantificeerd worden in drinkwatermonsters.

Bij drie van vier drinkwatermonsters (voor en na chloordioxidedosering, voor en na UV), waar ook de AOC-methode (P17/Nox) op is toegepast, is het AOC-gehalte rond de detectiegrens van de meeste carbonzuren. Voor deze monsters is het dus logisch dat carbonzuren niet kunnen worden gekwantificeerd met de chemische methoden. Bij één

drinkwatermonster (na chloordioxide) is het AOC-gehalte hoger dan de detectiegrens van de meeste carbonzuren, maar desondanks kon geen van de geanalyseerde carbonzuren worden gekwantificeerd.

5.2 Aanbevelingen

De geteste chemische methoden zijn momenteel nog te ongevoelig om afzonderlijke carbonzuren in drinkwater te kwantificeren. Daarnaast zijn methoden om afzonderlijke aminozuren bij lage concentraties te bepalen, nog niet getest. Daarom blijft voorlopig de AOC-P17/Nox methode of de BPP-methode om de BP7 te bepalen, de standaard om het gehalte gemakkelijk afbreekbare stoffen in drinkwater te bepalen.

Analyseer water na ozonisatie in de drinkwaterbereiding met de geïmplementeerde chemische methoden voor de detectie van afzonderlijke carbonzuren. Ozonisatie zorgt voor vorming van relatief hoge concentraties AOC-verbindingen, waardoor de verwachting is dat dit type drinkwatergerelateerde monsters de hoogste concentraties carbonzuren heeft. Het is daarom niet ondenkbaar dat de toegepaste methoden de afzonderlijke carbonzuren in water na ozonisatie wel kunnen kwantificeren.

Achterhaal of met behulp van omgekeerde osmose carbonzuren in drinkwater dusdanig geconcentreerd kunnen worden dat ze wel met behulp van de hier beschreven chemische methoden kunnen worden gekwantificeerd.

De LC-HRMS methode met de mixed-mode kolom kan verder doorontwikkeld worden door nieuwe type mixed-mode kolommen te gebruiken. Deze hebben als voordeel dat er mogelijk meer carbonzuren gedetecteerd kunnen worden en daarnaast zou hiermee ook de gevoeligheid van de methode verder kunnen verbeteren.

Achterhaal of chemische methoden die beschikbaar zijn voor het meten van lage concentraties aminozuren, gevoelig genoeg zijn om de concentraties van de afzonderlijke aminozuren in drinkwater te kunnen kwantificeren.

Houdt de ontwikkelingen op het gebied van detectie van afzonderlijke eiwit- en glycaanverbindingen in het milieu in de gaten en test dergelijke methoden voor drinkwatermonsters wanneer uit de literatuur blijkt dat ze voldoende zijn 'uitontwikkeld' om deze verbindingen bij lage concentraties in drinkwater te kunnen bepalen.

6 Referenties

Baghoth SA, Dignum M, Grefte A, Kroesbergen J & Amy GL (2009) Characterization of NOM in a drinking water treatment process train with no disinfectant residual. *Water Supply* **9**: 379-386.

Chan, J.C.Y., et al. (2017) A novel LCMSMS method for quantitative measurement of short-chain fatty acids in human stool derivatized with ¹²C- and ¹³C-labelled aniline. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **138**:43-53.

Choi, M.S., et al. (2017) Development of a mixed-mode chromatography with tandem mass spectrometry method for the quantitative analysis of 23 underivatized amino acids in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **145**:52-58.

Desiderio, C., et al. (2010) Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of amino acids. *Journal of Separation Science* **33**(16):2385-2393.

Dietzen, D.J., et al. (2008) Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**(22): 3481-3488.

Gao, J., et al. (2016) Robust analysis of underivatized free amino acids in soil by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1449**:78-88.

Grefte, A (2013) Removal of natural organic matter fractions by anion exchange. PhD thesis TU Delft, the Netherlands.

Guo, S., et al. (2013) Rapid determination of amino acids in fruits of ziziphus jujuba by hydrophilic interaction ultra-high-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(11):2709-2719.

Hammes, F.; Salhi, E.; Koster, O.; Kaiser, H. P.; Egli, T.; von Gunten, U., Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. *Water Res* **2006**, *40* (12), 2275-86.

Han, J., et al. (2015) An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **854**:86-94.

Han, X., et al. (2018) A fast and accurate way to determine short chain fatty acids in mouse feces based on GC-MS. *Journal of Chromatography B* **1099**:73-82.

He, L., et al. (2018) Simultaneous quantification of straight-chain and branched-chain short chain fatty acids by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **1092**:359-367.

- Hijnen, W., J. Bahlman & R. Schurer. 2013. Oorzaken van verschillen in biologische stabiliteit van het drinkwater van Berenplaat en Braakman. BTO 2013.216(s), KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Hijnen, W., L. Bereschenko & A. van Veen. 2015. Validatie en standaardisatie van de hemoflowbepaling voor deeltjesgebonden hoog-moleculair organische koolstof in water. BTO 2015.057, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Hijnen, W. A. M.; Schurer, R.; Bahlman, J. A.; Ketelaars, H. A. M.; Italiaander, R.; van der Wal, A. & van der Wielen, P. W. J. J. 2018. Slowly biodegradable organic compounds impact the biostability of non-chlorinated drinking water produced from surface water. *Water Research* 129:240-251.
- Hornstra, L., D. van der Kooij, P.W.J.J. van der Wielen & G.J. Medema. 2012. ClO₂ desinfectie van het drinkwater van ps Andijk. KWR 2013.030, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- How, Z.T., et al. (2014) Analysis of free amino acids in natural waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1370:135-146.
- Hur J, Williams MA & Schlautman MA (2006) Evaluating spectroscopic and chromatographic techniques to resolve dissolved organic matter via end member mixing analysis. *Chemosphere* 63: 387-402.
- ILT (Inspectie Leefomgeving en Transport)(2019) Drinkwaterkwaliteit 2018. ILT, Den Haag, Nederland.
- Jin, Y.-Y., et al. (2018) A chemical derivatization based UHPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry method for accurate quantification of short-chain fatty acids in bronchoalveolar lavage fluid of asthma mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 161:336-343.
- Jurado-Sánchez, B., E. Ballesteros, and M. Gallego (2012) Determination of carboxylic acids in water by gas chromatography-mass spectrometry after continuous extraction and derivatisation. *Talanta* 93:224-232.
- Jurado-Sánchez, B., E. Ballesteros & M. Gallego. 2014. Occurrence of carboxylic acids in different steps of two drinking-water treatment plants using different disinfectants. *Water Research* 51:186-197.
- Konieczna, L., et al. (2018) Bioanalysis of underivatized amino acids in non-invasive exhaled breath condensate samples using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1542:72-81.
- Le, A., et al. (2014) A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 944: 166-174.
- Li A, Hu J, Li W, Zhang W & Wang X (2009) Polarity based fractionation of fulvic acids. *Chemosphere* 77: 1419-1426.

Liyanaarachchi, G.V.V., et al. (2018) Development and validation of a method for direct, underivatized analysis of free amino acids in rice using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1568**:131-139.

Martens, D.A. and K.L. Loeffelmann (2003) Soil Amino Acid Composition Quantified by Acid Hydrolysis and Anion Chromatography–Pulsed Amperometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(22):6521-6529.

Matilainen A, Gjessing ET, Lahtinen T, Hed L, Bhatnagar A & Sillanpää M (2011) An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere* **83**: 1431-1442.

Pan Y, Li H, Zhang X & Li A (2016) Characterization of natural organic matter in drinking water: Sample preparation and analytical approaches. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* **12**: 23-30.

Piraud, M., et al. (2005) Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: A new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**(12):1587-1602.

Spackman, D.H., W.H. Stein, and S. Moore (1958) Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Analytical Chemistry* **30**(7):1190-1206.

van der Kooij, D., H. Veenendaal & P.W.J.J. van der Wielen. 2011. Beoordeling van de biologische stabiliteit van het drinkwater van pompstation Andijk. KWR 2010.107, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Kooij, D.; Veenendaal, H. R. *Bepaling van de biomassa-productiepotentie (BPP) van drinkwater.*; BTO 2014.038; KWR Watercycle Research Institute: Nieuwegein, 2014.

van der Wielen, P.W.J.J. & van der Kooij, D. 2011. Inventarisatie van *Aeromonas* en koloniegetal 22°C in drinkwater en relaties met fysisch/chemische parameters. BTO 2011.001, KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

van Eijk, H.M.H., J.G. Bloemen, and C.H.C. Dejong (2009) Application of liquid chromatography–mass spectrometry to measure short chain fatty acids in blood. *Journal of Chromatography B* **877**(8):719-724.

Vilches, A.P., S.H. Norström, and D. Bylund (2017) Direct analysis of free amino acids by mixed-mode chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **40**(7):1482-1492.

Waterval, W.A.H., et al. (2009) Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism. *Clinica Chimica Acta* **407**(1-2):36-42.

Zeng, M. and H. Cao (2018) Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B* **1083**:137-145.

Bijlage I Analyse condities derivatiseringsmethode

Derivatisering

Voeg aan 500 µL monster, 25 µL 0,1 M O-BHA in methanol en 10 µL 0,25 M koppelingsreagent N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide zoutzuur (EDC) toe. Incubeer het extract vervolgens 1 uur bij 25 °C.

LC instellingen (Shimadzu Nexera HPLC systeem)

- Kolom: Agilent Zorbax Hilic plus, 2,1 x 150mm, 1,8µm
- Eluens A: ultrapuur water + 0,05% mierenzuur
- Eluens B: Methanol + 0,05% mierenzuur
- Gradiënt: 1 minuut constant bij 4% B. Daarna in 14 minuten naar 100% B. Vervolgens 5 minuten bij 100% B. Daarna weer in 2 minuten naar 4% B en dan 5 min 4% B.
- Flow: 300 µL/min
- Injectievolumen: 100 µL
- Kolomoven temperatuur: 25°C

QToF-MS instellingen (AB SCIEX TripleTOF 5600+)

- Resolutie: > 30.000 @ m/z 400 (MS en MS/MS mode)
- Massa accuraatheid < 5 ppm
- Massa range 60 – 1000 Da
- Ionisatietechniek: electrospray (ESI)
- TurbolonSpray heater: 500°C
- Ion Spray Voltage: 5000 Volt (positieve mode)
- Declustering potential: 70 Volt
- Curtain gas: 25 psi
- Gas 1: 40 psi
- Gas 2: 50 psi
- Collision energy: 20, 35, 50 eV (gemiddeld)
- Information dependant MS/MS scans: 8 per cycle (50ms)
- IDA threshold: 100 counts

Bijlage II Analyse condities mixed-mode methode

Monstervoorbewerking

Aan 50 mL monster wordt 10 µg/L interne standaard (butaanzuur-d7, dodecaanzuur-d23, pyrodruivenzuur-¹³C₃ en benzoëzuur-¹³C₆) toegevoegd. Vervolgens wordt het monster gefiltreerd met behulp van een 0,20 µm filter en overgebracht in een autosampler vial voor analyse.

LC instellingen (Vanquish HPLC systeem)

- Kolom: Acclaim Trinity P1, 100 x 2,1 mm, 3 µm
- Eluens A: ultrapuur water + 2 mM ammoniumacetaat pH 4,5 (azijnzuur)
- Eluens B: acetonitril-ultrapuur water (80:20, v/v) + 40 mM ammoniumacetaat pH 4,5 (azijnzuur)
- Gradiënt: 1 min constant bij 3% B. Lineair van 3% naar 100% B in 9 min. Vervolgens 14 min constant bij 100% B.
- Flow: 300 µL/min
- Injectievolume: 100 µL
- Kolomtemperatuur: 35°C

Orbitrap Fusion instellingen (ThermoFisher scientific)

- Resolutie full scan: 120.000 FWHM (m/z 200)
- Resolutie MS/MS: 15.000 FWHM (m/z 200)
- Massa afwijking < 5 ppm
- Massabereik 70 – 250 Da
- Ionisatietechniek: electrospray (ESI) negatieve mode
- Capillair temperatuur: 300 °C
- Vaporizer temperatuur: 300 °C
- Spray voltage: 2,5 kV
- Sheath gas: 40 (Arb)
- Auxiliary gas: 10 (Arb)
- Sweep gas: 5 (Arb)
- RF lens: 50 V
- HCD botsingsenergie: afhankelijk per component

Bijlage III Analyse condities C18 methode

Monstervoorbewerking

Aan 50 mL monster wordt 10 µg/L interne standaard (butaanzuur-d7, dodecaanzuur-d23, pyrodruivenzuur-¹³C₃ en benzoëzuur-¹³C₆) toegevoegd. Vervolgens wordt het monster gefiltreerd met behulp van een 0,20 µm filter en overgebracht in een autosampler vial voor analyse.

LC instellingen (Vanquish HPLC systeem)

- Kolom: Hypersil gold, 100 x 2,1 mm, 1,9 µm
- Eluens A: ultrapuur water + 0,05% mierenzuur
- Eluens B: acetonitril + 0,05% mierenzuur
- Gradiënt: 1 min constant bij 3% B. Lineair van 3% naar 100% B in 14 min. Vervolgens 4 min constant bij 100% B. Daarna in 0,5 min naar 3% B en vervolgens 5,5 min constant.
- Flow: 300 µL/min
- Injectievolumen: 100 µL
- Kolomtemperatuur: 25°C

Orbitrap Fusion instellingen (ThermoFisher scientific)

- Resolutie full scan: 120.000 FWHM (m/z 200)
- Resolutie MS/MS: 15.000 FWHM (m/z 200)
- Massa afwijking < 5 ppm
- Massabereik 70 – 250 Da
- Ionisatietechniek: electrospray (ESI) negatieve mode
- Capillair temperatuur: 300 °C
- Vaporizer temperatuur: 300 °C
- Spray voltage: 2,5 kV
- Sheath gas: 40 (Arb)
- Auxiliary gas: 10 (Arb)
- Sweep gas: 5 (Arb)
- RF lens: 50 V
- HCD botsingsenergie: afhankelijk per component