



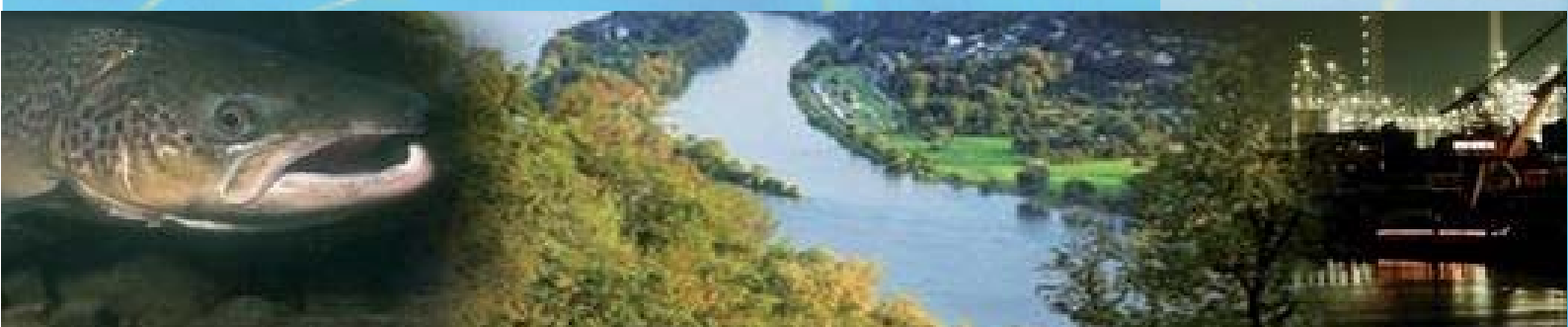
Rijnmeetprogramma chemie buitengewoon onderzoek met HPLC MS/MS in 2013

Internationale
Kommission zum
Schutz des Rheins

Commission
Internationale
pour la Protection
du Rhin

Internationale
Commissie ter
Bescherming
van de Rijn

Rapport Nr. 221



Colofon

Uitgegeven door de

Internationale Commissie ter Bescherming van de Rijn (ICBR)

Kaiserin-Augusta-Anlagen 15, 56068 Koblenz, Duitsland

Postbus 20 02 53, 56002 Koblenz, Duitsland

Telefoon: +49-(0)261-94252-0, fax +49-(0)261-94252-52

E-mail: sekretariat@iksr.de

www.iksr.org

ISBN 3-941994-68-9

© IKS-CIPR-ICBR 2015

1. Inleiding

In het kader van het Rijmeetprogramma chemie van 2013 is er een buitengewoon meetprogramma uitgevoerd, teneinde met behulp van de in Zwitserland ontwikkelde HPLC MS/MS-analysemethode (hogedrukvloeistofchromatografie/massaspectrometrie) nieuwe stoffen aan te tonen in het Rijnwater. De bemonstering vond plaats in het meetjaar 2013, waarbij er op elk van de volgende meetlocaties een viertal monsters is genomen:

- Weil am Rhein (zie foto 1);
- Karlsruhe/Lauterbourg;
- Koblenz-Rijn (zie foto 2);
- Koblenz-Moezel;
- Bad Honnef;
- Bimmen-Lobith (zie foto 3);
- Bischofsheim-monding van de Main;
- Mannheim-Neckar;
- Maassluis.

Foto 1: Meetstation Weil am Rhein (beeldrechten: AUE BS)



Foto 2: Meetlocatie Koblenz/Rijn (fotograaf: Schwandt, beeldrechten: BfG)



Foto 3: Meetstation Bimmen (beeldrechten: LANUV-NRW)



2. Actuele stand van de HPLC-MS/MS-analysemethode

Milieuanalyses zijn een belangrijk instrument om ongewenste spoorelementen, zoals huishoud-, landbouw- en industriële chemicaliën, pesticiden of geneesmiddelen, te kunnen aantonen in afvalwater, oppervlaktewater en grondwater. De grootste uitdaging zijn de lage concentraties en de diversiteit van de stoffen, die daarenboven met uiterste nauwkeurigheid moeten worden gedetermineerd. Het is daarom van doorslaggevend belang dat er voortdurend nieuwe specifieke en gevoelige detectiemethodes worden ontwikkeld en geoptimaliseerd.

De wens om zoveel mogelijk stoffen te analyseren in multimethodes en tegelijkertijd ook onbekende verbindingen te registreren, heeft ertoe geleid dat er in milieuanalyses gebruik wordt gemaakt van nieuwe hoge resolutie massaspectrometers, zoals

bijvoorbeeld Orbitrap. In het hier bekeken buitengewone programma is een dergelijk systeem toegepast.

Het internationaal meetstation Weil am Rhein past deze nieuwe analysemethode sinds drie jaar dagelijks toe. Er worden elke dag watermonsters gemeten om zowel langetermijntrends in de waterkwaliteit als acute, incidentele lozingen en scheepsongelukken te kunnen registreren. Hiervoor heeft de Eawag (universitair instituut voor wateronderzoek) samen met de Dienst voor milieu en energie van Bazel-stad een analysestrategie in meer stappen ontwikkeld:

Targetanalyse

Monsters worden binnen één dag onderzocht op bekende stoffen. Op de lijst van bekende stoffen staan op dit moment driehonderd chemicaliën (stand: september 2014) en hun metabolieten uit de groep van de pesticiden, biociden, geneesmiddelen, anesthetica, industriële chemicaliën (ICBR-rapport 202), corrosiewerende middelen (ICBR-rapport 183) en zoetstoffen. De lijst wordt voortdurend geactualiseerd (op basis van meetresultaten van nationale en internationale monitoringsprogramma's).

Deze multicomponentmethode is ook toegepast in het kader van het buitengewone onderzoek.

Non-targetanalyse

Ondanks de brede waaier van stoffen die wordt meegenomen in de targetscreening blijft onduidelijk welk aandeel van de stoffen in de Rijn daadwerkelijk wordt geregistreerd. Om ook de onbekende stoffen aan te tonen, heeft de Eawag een programma ontwikkeld dat alle aanwezige stofsignalen extraheert uit de massaspectrometriegegevens. Na eliminatie van achtergrondgruis en blancosignalen blijven er wel achtduizend onbekende stoffen over. In een eerste stap kan aan de hand van de exacte massa en de isotopenverhouding de vermoedelijke chemische formule worden toegewezen aan een stof. Vervolgens wordt er in gespecialiseerde gegevensbanken gezocht naar passende stofstructuren. Deze afzonderlijke stappen kunnen vooralsnog niet worden geautomatiseerd en zijn bijgevolg zeer tijdrovend. Toch kunnen er steeds weer nieuwe stoffen worden aangewezen en geïdentificeerd. Bij wijze van voorbeeld wordt de detectie van methadon beschreven: Op drie opeenvolgende dagen werd een bepaalde massa aangetroffen, wat aanleiding gaf tot nader onderzoek. De chemische formule werd bepaald en er werden gegevensbanken in openbare spectrumbibliotheken geraadpleegd, waarna er een structuur kon worden toegekend aan de onbekende stof. De uiteindelijke identificatie lukte door vergelijking met referentiemateriaal. Het bleek te gaan om methadon en na de identificatie kon ook de emittent worden achterhaald.

Op dit moment wordt er een nieuwe softwaretool voor non-targetanalyses geïmplementeerd. Met deze tool wordt gestreefd naar een betere prioritering van de gegevens en zodoende naar een betere herkenning van "interessante" massa's.

Nieuwe stoffen voor het uitgebreide Rijnmeetprogramma chemie 2015-2020 zijn uitsluitend afkomstig van de "targetlijst". Non-targetanalyses zullen steeds belangrijker worden naarmate meer laboratoria aan de Rijn de methode gaan toepassen.

3. Buitengewoon onderzoek van monsters uit de Rijn (genomen in de lengterichting van de rivier) en zijn zijrivieren door middel van HPLC-MS/MS

De resultaten van de vier monsternemingen zijn samengevat in hoofdstuk 3.

3.1 Evaluatie op basis van frequentie van voorkomen

De gedetailleerde, gevalideerde meetgegevens van het buitengewone onderzoek zijn inclusief statistische evaluatie opgenomen in een Excel-tabel, die kan worden opgevraagd bij het secretariaat.

De evaluatie van het buitengewone onderzoek met betrekking tot de stoffen die op alle meetlocaties boven de bepalingsgrens zijn gemeten, is weergegeven in tabel 1. De geneesmiddelen zijn de stofgroep met de meeste afzonderlijke waarnemingen.

Tabel 1: Stoffen die op alle meetlocaties voorkomen (> BG)

Geneesmiddelen	Individuele stoffen
candesartan	5-methylbenzotriazool
metoprolol	benzotriazool
sitagliptine	2-naftaleensulfonzuur
carbamazepine	tetraglyme
lamotrigine	
sulfamethoxazol	Metaboliëten
levetiracetam	valsartanzuur
telmisartan	4-formylaminoantipyrine
oxazepam	N-acetyl-4-aminoantipyrine
amisulpride	atenololzuur
venlafaxine	carbamazepine-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy
fenazon	metolachloor-ESA
clarithromycine	clopidogrelzuur
lidocaïne	2-hydroxyatrazine
metformine	
gabapentine	Zoetstoffen
valsartan	acesulfaam
o-desvenlafaxine ¹	cyclohexylsulfamidezuur
tramadol ¹	sucralose
	saccharine
Gewasbeschermingsmiddelen	
DEET	Röntgencontrastmiddelen
carbendazim	iomeprol ²
metolachloor	iopamidol ²

3.2 Evaluatie op basis van concentratie

Voor de evaluatie op basis van concentratie is er gekozen voor de waarde van 0,3 µg/l; dit is de oriënteringswaarde die in het internationaal Waarschuwing- en Alarmplan Rijn is vastgelegd voor biociden, gewasbeschermingsmiddelen en geneesmiddelen (telkens voor individuele stoffen).

De evaluatie van het buitengewone onderzoek op basis van de gevonden concentraties is weergegeven in tabel 2.

¹ Geregistreerd als som van o-desvenlafaxine en tramadol.

² Geregistreerd als som van iomeprol en iopamidol.

Tabel 2: Stoffen met een concentratie > 0,3 µg/l

Geneesmiddelen	Individuele stoffen
furosemide (4,37 µg/l)	tolueen-4-sulfonzuur (1,88 µg/l)
metformine (1,87 µg/l)	5-methylbenzotriazool (1,61 µg/l)
hydrochloorthiazide (0,35 µg/l)	benzotriazool (1,44 µg/l)
gabapentine (0,87 µg/l)	2,7-naftaleendisulfonzuur (0,68 µg/l)
valsartan (0,31 µg/l)	2-naftaleendisulfonzuur (0,44 µg/l)
Metaboliëten	Röntgencontrastmiddelen
valsartanzuur (0,55 µg/l)	iopromid (0,54 µg/l)
metazachloor-OXA (0,41 µg/l)	
metazachloor-ESA (0,54 µg/l)	Zoetstoffen
4-formylaminoantipyriene (0,40 µg/l)	acesulfaam (3,17 µg/l)
N-acetyl-4-aminoantipyriene (0,38 µg/l)	cyclohexylsulfamidezuur (1,29 µg/l)
atenololzuur (0,32 µg/l)	sucralose (0,83 µg/l)
	saccharine (0,41 µg/l)

3.3 Evaluatie op basis van concentratie en frequentie

De bedoeling is om in het aanvullende programma van het Rijnmeetprogramma chemie 2015-2020 ook bijzonder opvallende stoffen uit het buitengewone meetprogramma van 2013 op te nemen. Om dit te bepalen, zijn de resultaten van het buitengewone meetprogramma op een tweetal manieren geëvalueerd (tabel 3):

1. op basis van de maximale concentratie van stoffen;
2. op basis van de frequentie van voorkomen op de onderzochte meetlocaties.

Tabel 3: Puntensysteem voor de beoordeling van het voorkomen van stoffen

Aantal punten voor			
concentraties [µg/l]		frequentie van voorkomen in relatie tot het aantal metingen	
waarde	punten	waarde	punten
> 1	100	100 %	100
> 0,75	75	> 75 %	75
> 0,5	50	> 50 %	50
> 0,3	30	> 25 %	25
> 0,1	10	> 0 %	20
> 0,03	4		
> 0,01	1		

Naargelang van het resultaat van deze evaluatie zijn er punten gegeven aan de stoffen. Een stof kon dus maximaal 200 punten krijgen. De lijst met nieuwe stoffen voor het aanvullende meetprogramma bestaat uit de stoffen die meer dan 100 punten hebben gekregen, plus extra stoffen die de staten of Duitse deelstaten hebben gemeld en die om technische redenen niet konden worden gemeten in het buitengewone meetprogramma, zoals bijv. seizoensgebonden gewasbeschermingsmiddelen.

Tabel 4: Stoffen uit het buitengewone onderzoek die meer dan 100 punten hebben gekregen

200 punten	> 100 punten
metformine	metazachloor-ESA
5-methylbenzotriazool	o-desvenlafaxine ¹
benzotriazool	candesartan
iomeprol ²	metoprolol
iopamidol ²	sitagliptine
acesulfaam	carbamazepine
cyclohexylsulfamidezuur	lamotrigine
	sulfamethoxazol
> 175 punten	levetiracetam
gabapentine	carbamazepine-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy
tolueen-4-sulfonzuur	metolachloor-ESA
cafeïne	hydrochloorthiazide
sucralose	telmisartan
	oxazepam
> 130 punten	amisulpride
valsartanzuur	venlafaxine
valsartan	fenazon
2-naftaleensulfonzuur	clarithromycine
4-formylaminoantipyrine	clopidogrelzuur
N-acetyl-4-aminoantipyrine	DEET
atenololzuur	carbendazim
saccharine	lidocaine
	tramadol ¹
	2-hydroxyatrazine

4. Belangrijkste bevindingen van het buitengewone onderzoek.

Terwijl het analysebereik van het monitoringsstation op de Rijn in Weil am Rhein tot voor enkele jaren beperkt was tot voornamelijk vluchtige en niet-polaire stoffen (analyse m.b.v. GC-MS-technologie), kon het analysebereik dankzij de introductie van hoge resolutie HPLC-MS/MS worden uitgebreid met polaire spoorelementen, wat betekent dat de bestaande analytische "lacune" is aangevuld. Echter, er zijn analytische grenzen aan de toegepaste HPLC-MS/MS-methode wat de voorbereiding van de methode en het scheidings- en meetprincipe betreft. Zo kunnen er met deze methode alleen organische verbindingen worden geregistreerd die noch zeer vluchtig noch zeer niet-polair dan wel extreem polair zijn. Verder worden er alleen stoffen gemeten waarvan de molmassa groter is dan 114 en die zich laten ioniseren. Bijgevolg kunnen een groot aantal oplosmiddelen en tevens de meeste leden van de groep van de polycyclische aromatische koolwaterstoffen niet worden geregistreerd met de gebruikte multimethode. Desalniettemin is het een waardevolle aanvulling, die de nog steeds gebruikte GC-MS-technologie echter vooralsnog niet volledig kan vervangen.

Met het buitengewone onderzoek, dat is uitgevoerd over de lengte van de Rijn en in een selectie van zijrivieren, konden dankzij de toepassing van de gevestigde HPLC-MS/MS-analysemethode op alle onderzochte meetlocaties voor tal van stoffen concentraties boven 0,1 µg/l worden aangetoond. De meeste van deze stoffen maken tot dusver geen deel uit van het meetprogramma. De resultaten maken duidelijk dat de grootste, continue belasting wordt geloosd via rwzi's. Daarbij gaat het vooral om werkzame stoffen van geneesmiddelen en hun metabolieten (zoals ook is geconstateerd in ICBR-rapport 182). Pesticides behoren niet tot de verbindingen met de grootste, continue vrachten (uitzonderingen zijn de metabolieten metazachloor-ESA en -OXA). Echter, in bepaalde seizoenen / op bepaalde locaties worden er regelmatig vrij hoge concentratie pesticiden gemeten.

De uitkomst van het buitengewone onderzoek is dat er nu voor circa driehonderd stoffen vergelijkbare resultaten zijn voor de gehele lengte van de Rijn. Relevante stoffen kunnen rekening houdend met de beschreven evaluatie worden opgenomen in het aanvullende watermeetprogramma.

Aanbevelingen

De resultaten van dit buitengewone meetprogramma zouden ook moeten worden gebruikt als uitgebreide basis voor de besluitvorming over de vraag of de andere ICBR-lidstaten hun analyses dienen aan te vullen met (hoge resolutie) vloeistofchromatografie/massaspectrometrie (LC-MS/MS).

Daarbij zou de in te zetten methode / meettechniek moeten voldoen aan de volgende criteria:

- De targetstoffen moeten binnen zes uur na ontvangst van het monster kunnen worden geëvalueerd.
- De registratie en identificatie van non-targets vergt hoge resolutie LC-MS die in het relevante massabereik van 150-400 m/z een resolutie van 60.000 kan genereren (in routinetoepassingen) (Singer, H.W. et al., 2009, Multikomponenten-Screening für den Rhein bei Basel – eindrapport).