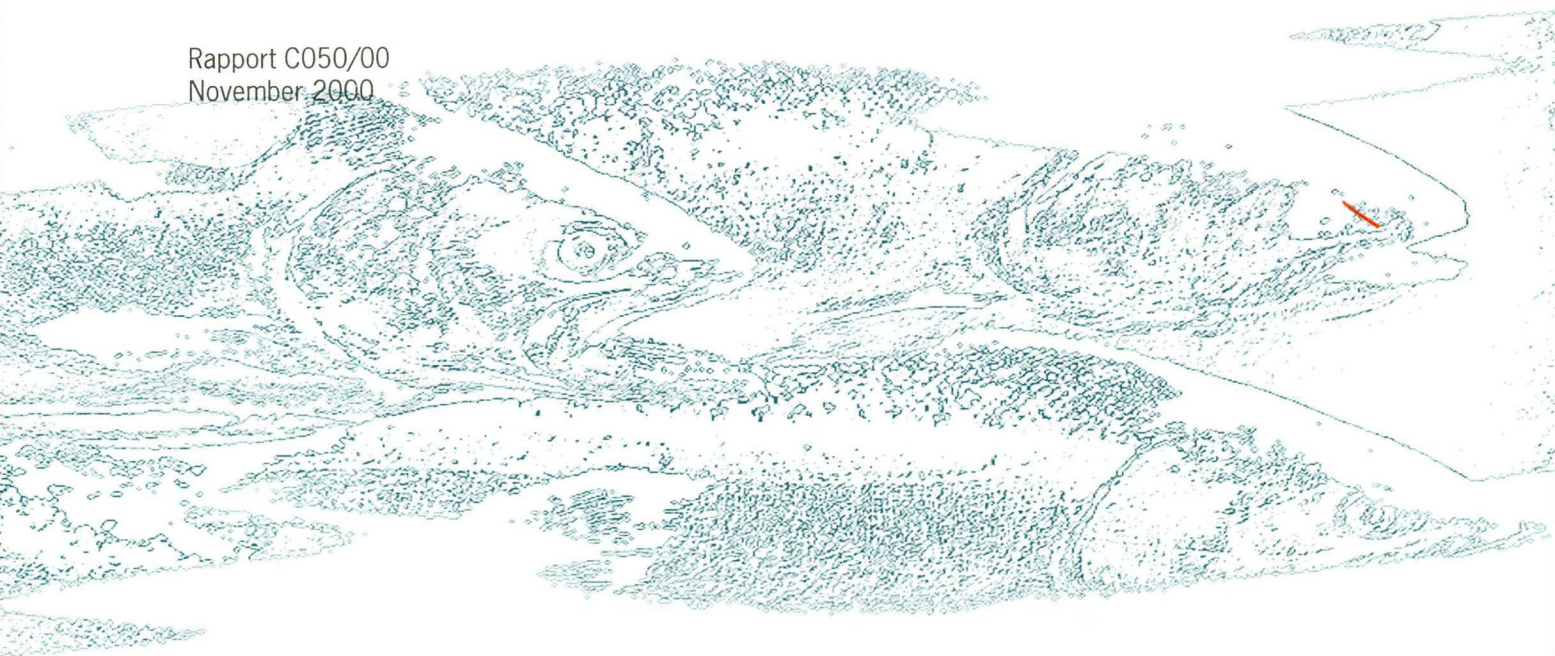


## SPME-onderzoek; potentieel bioaccumuleerbare gehalten van stoffen in afvalwater

Dr. P.E.G. Leonards en ing. J.M. van Hesselingen

Rapport C050/00  
November 2000



**RIVO Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek**

# Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek (RIVO) B.V.

Postbus 68  
1970 AB IJmuiden  
Tel.: 0255 564646  
Fax.: 0255 564644  
Internet: postkamer@rivo.dlo.nl

Postbus 77  
4400 AB Yerseke  
Tel.: 0113 672300  
Fax.: 0113 573477

## RIVO Rapport

Nummer: C050/00

### SPME-onderzoek; potentieel bioaccumuleerbare gehalten van stoffen in afvalwater

Dr. P.E.G. Leonards en ing. J.M. van Hesselingen

Opdrachtgever: Ministerie van Verkeer en Waterstaat  
Directie Noord-Holland  
Postbus 3119  
2001 DC Haarlem

Project nummer: 335-76001.66

Akkoord: dr. J.B. Luten  
Afdelingshoofd

Handtekening:

Datum: 14 november 2000

Aantal exemplaren:  
Aantal pagina's:  
Aantal tabellen:  
Aantal figuren:  
Aantal bijlagen:

10  
9  
2  
3  
2

In verband met de  
verzelfstandiging van de  
Stichting DLO, waartoe tevens  
RIVO behoort, maken wij sinds 1  
juni 1999 geen deel meer uit van  
het Ministerie van Landbouw,  
Natuurbeheer en Visserij. Wij zijn  
geregistreerd in het  
Handelsregister Amsterdam  
nr. 34135929BTW nr. NL  
808795053B01

De Directie van het RIVO is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het RIVO; opdrachtgever vrijwaart het RIVO van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets van dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

# Inhoudsopgave:

Samenvatting .....3

1. Inleiding .....3

2. Uitvoering.....4

3. Resultaten en discussie .....5

    3.1 Kritische target concentratie (CTC).....8

4. Conclusies .....9

Referenties.....9

Bijlagen 1 en 2



## Samenvatting

Het doel van het onderzoek was de bepaling van potentieel bioaccumuleerbare gehalten (molaire somgehalte) van stoffen in effluentwatermonsters afkomstig van vijf bedrijven. In het onderhavige onderzoek werd het molaire somgehalte bepaald met behulp van solid phase micro extraction (SPME) gecombineerd met gas chromatografie en massaspectrometrie (GC-MS) in de electron impact (EI) mode. De aangetroffen molaire somgehalten in de SPME-fibers varieerden tussen de 5 en 111 mmol / l (mM). Voor één bedrijf werden op verschillende tijdstippen monsters genomen en de molaire somgehalten varieerden tussen de 13 en 30 mM. Voor twee bedrijven overschrijden de aangetroffen molaire somgehalten in het afvalwater de kritische target concentratie voor acute narcotische toxiciteit van 125 mM.

## 1. Inleiding

De doelstelling van het onderzoek was de bepaling van potentieel bioaccumuleerbare gehalten (molaire somgehalte) van stoffen in afvalwater. De totale hoeveelheid gebioaccumuleerde concentratie is een maat voor narcotische toxiciteit bij organismen. In het onderzoek werd met behulp van solid phase micro extraction (SPME) en gas chromatografie met massa spectrometrie (GC-MS) het molaire somgehalte bepaald. De methode was gebaseerd op het werk van Verbruggen et al. (2000) en het protocol dat door het RIZA (de Maagd, 2000) verder is uitgewerkt. Het molaire somgehalte bepaald met SPME kan vertaald worden naar een zogenoemde totale target concentratie (TTC); de verwachte concentratie van bioaccumuleerbare stoffen in een celmembraan van een organisme bij blootstelling aan het monster. De TTC kan vergeleken worden met de concentratie in de celmembraan waarbij narcotische toxiciteit optreedt (kritische target concentratie, CTC). De kritische target concentratie voor narcotische toxiciteit is gebaseerd op de partitie van stoffen tussen de celmembraan en de waterfase. De SPME-methode veronderstelt dat er geen afbraak (metabolisme) van de verbindingen door organismen plaatsvindt.

## 2. Uitvoering

De monsternamen werden uitgevoerd door de regionale directie Noord-Holland van Rijkswaterstaat. In tabel 1 wordt een overzicht van de onderzochte monsters, bedrijven, bedrijfscodes, afvalwaterstromen en bemonsteringstijden gegeven. Alle bedrijven werden op 2-10-2000 bemonsterd en één bedrijf (Crown van Gelder) werd vier maal bemonsterd (2-10-2000, 11-10-2000, 19-10-2000 en 23-10-2000). De monsterflessen (3x1 liter per bedrijf) werden naar het RIVO getransporteerd en opgeslagen bij 4°C. Tevens werd 1 liter per bedrijf naar het RIZA in Lelystad verzonden. Opgemerkt moet worden dat niet alle flessen tot aan de rand waren afgevuld wat nadelig kan zijn voor vluchtige verbindingen wegens de verdeling van deze stoffen tussen de water- en de luchtfase. In bijlage 1 wordt weergegeven wanneer de monsters voor SPME-extractie werden ingezet. De SPME-extracties werden volgens het RIZA-protocol uitgevoerd. Het volgende protocol werd gevolgd:

Ieder monsterpunt werd in drievoud ingezet, waarbij elke testfles drie maal werd gespoeld met het monster voordat elke testfles tot aan de rand met 250 ml water uit een 1000 ml monsterfles werd gevuld. Een roervlo werd toegevoegd en de fles gesloten met een PTFE seal en gekeken of zich geen bovenstaande lucht in de fles bevond. De SPME-extractie vond plaats met een polyacrylaat fiber (Supelco). Het water werd 24 uur geroerd. Na de extractie werd de fiber voorzichtig met een tissue gedroogd en de fiberhouder werd met een septum afgesloten en in een glazen fles bij 4°C bewaard. Fibers werden splitless bij 275°C geïnjecteerd op een GC-MS systeem (Agilent, MSD 5973) in de EI full scan mode ( $m/z$  34-650). De splitpoort was gedurende de gehele analyse gesloten. Het molaire somgehalte werd bepaald ten opzichte van een externe standaard (50 mM 2,4,5-trichloortolueen) waarvan 1  $\mu$ l werd geïnjecteerd. Het GC-oven programma was 40°C gedurende 2 minuten gevolgd door een stijging tot 290°C met een temperatuurtoename van 30°C/min. De SPME-fiber werd gedurende de gehele GC-analyse in de injectiepoort gelaten. Met behulp van factsheets werden de monsterbehandelingen bijgehouden (zie bijlage 1). De externe standaard werd in drievoud voor de SPME-fibers en in drievoud na de SPME-fibers geïnjecteerd. Aan de hand van de molaire respons van de externe standaard en het polyacrylaatvolume van de fiber (0,521  $\mu$ l) werd het piekoppervlak behorende bij een SPME-extractie omgerekend naar een molair gehalte in de fiber ( $C_{\text{fiber}}$ ).

Tabel 1: Onderzochte monsters

Bedrijf	Datum, tijd bemonstering	Bedrijfscode	Afvalwaterstroom
Crown van Gelder	2-10-2000	04.00	effluent zuivering (04.00.20)
Crown van Gelder	11-10-2000	04.00	effluent zuivering (04.00.20)
Crown van Gelder	19-10-2000, 10:55	04.00	effluent zuivering (04.00.20)
Crown van Gelder	23-10-2000	04.00	effluent zuivering (04.00.20)
IVAIR (Corus Staal)	2-10-2000, 10:30	01.001V-AIR	effluent CAB (01.01.80)
Witco b.v.	2-10-2000	15.06	procesafvalwater riool y (15.06.05)
Cargil Soja	2-10-2000	23.06	lpt4 effluent raffinaderij (23.06.05)
Eurometaal	2-10-2000	19.00	effluent ono-installatie (19.00.03)

### 3. Resultaten en discussie

De volgende opmerkingen moeten worden gemaakt met betrekking tot de extracties en analyses van de SPME-fibers:

- In deze studie werden de SPME-fibers met een septum afgesloten en bij 4°C bewaard. Deze methode lijkt geschikt te zijn om de fibers voor enkele dagen te bewaren, echter geadviseerd wordt om de fibers voor GC-MS analyse nogmaals te drogen met een tissue. Gebleken is dat tijdens de opslag een geringe hoeveelheid water op de fibers condenseert. Deze hoeveelheid is niet zichtbaar maar wel waarneembaar tijdens de GC-MS analyse. Aan het eind van het chromatogram bleek namelijk GC-kolom materiaal aanwezig te zijn (kolom-bleeding), mogelijk veroorzaakt door een geringe hoeveelheid water afkomstig van de SPME-fiber die niet extra gedroogd werd. Het kolom-materiaal is niet waarneembaar als de fibers voor analyse nogmaals gedroogd worden met een tissue. Omdat de pieken van het kolom-materiaal aan het eind van het chromatogram aanwezig waren vormde dit geen of bijna geen probleem bij de kwantificering van het molaire somgehalte. De kolom-bleeding pieken werden niet meegenomen in de kwantificering van het molaire gehalte.
- Tijdens de GC-analyse ging een SPME-fiber van een monster Crown 11-10-2000 verloren.

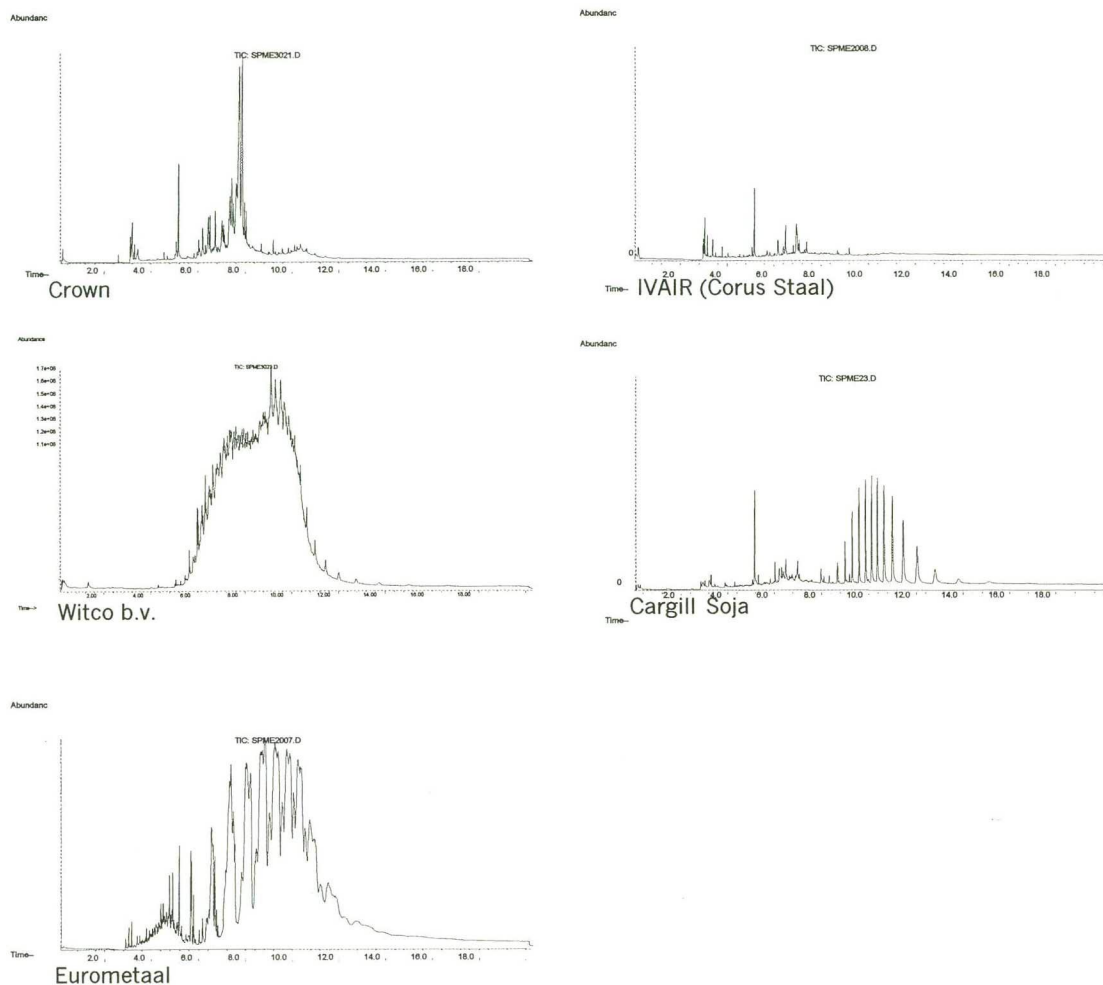
De analyseresultaten van de monsters en de standaarden zijn opgenomen in bijlage 2. De gehalten in de fibers zijn uitgedrukt in mmol/l (mM). In figuur 1 wordt voor elk bedrijf een voorbeeld van een SPME-chromatogram getoond. De gemiddelde molaire somgehalten ( $C_{\text{fiber}}$ )



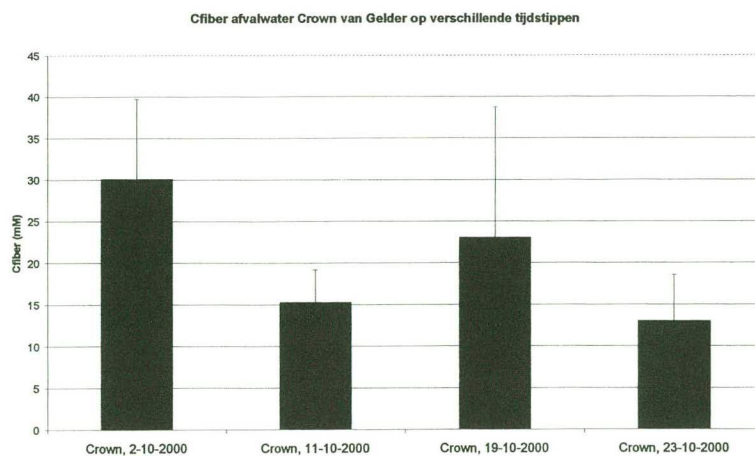
varieerden tussen de 5 tot 111 mM, tabel 2. De relatieve standaard deviatie (RSD) varieerde tussen de 2 en 68%. Opvallend zijn de hoge molaire somgehalten in de afvalwatermonsters van Eurometaal en Witco b.v. Voor het afvalwater van Eurometaal waren de aangetroffen gehalten hoger dan de maximale respons van de MS detector. Hierdoor zijn de gehalten van Eurometaal als groter dan gerapporteerd. Er is niet besloten om dit monster te verdunnen met demi-water en het verdunde monster te analyseren omdat de milieuchemische eigenschappen van het monster daardoor mogelijk te veel veranderd. Daarnaast ligt het aangetroffen TTC-gehalte van dit monster boven de kritische target concentratie (CTC) van 125 mM waarbij acute narcotische toxiciteit wordt verwacht.

Tabel 2: Gemiddelde, standaarddeviatie (SD) en relatieve standaarddeviatie (RSD) van het molaire somgehalte in de SPME-fibers ( $C_{\text{fiber}}$ ) van de onderzochte afvalwatermonsters. Tevens is de totale target concentratie (TTC) berekend met behulp van vergelijking [1] en de ratio TTC/CTC.

Monster	Datum	Gemiddelde $C_{\text{fiber}}$ (mM)	SD $C_{\text{fiber}}$ (mM)	RSD (%) $C_{\text{fiber}}$ (mM)	Gemiddelde TTC (mM)	Ratio TTC / CTC
Crown van Gelder	2-10-2000	30	9.6	32	62	0.50
Crown van Gelder	11-10-2000	15	3.9	26	32	0.26
Crown van Gelder	19-10-2000	23	15.7	68	48	0.38
Crown van Gelder	23-10-2000	13	5.5	43	27	0.22
IVAIR (Corus Staal)	2-10-2000	5.4	1.9	36	11	0.09
Witco b.v.	2-10-2000	111	36.8	33	229	1.83
Cargill Soja	2-10-2000	7.8	2.3	30	16	0.13
Eurometaal	2-10-2000	>80	1.9	2	167	1.34



Figuur 1: Totaal ion GC-MS chromatogrammen van de SPME-analyses van de onderzochte afvalwatermonsters. Bij Cargill Soja is het effect van kolom-bleeding vanaf 9 minuten zichtbaar.





Figuur 2: Gemiddelde  $C_{\text{fiber}}$  gehalten in afvalwater van Crown van Gelder bemonsterd op 2-10-2000, 11-10-2000, 19-10-2000 en 23-10-2000.

Voor Crown van Gelder werden op verschillende tijdstippen monsters genomen van het afvalwater. In figuur 2 zijn de aangetroffen gemiddelde molaire somgehalten en de standaard deviaties van de metingen in de tijd weergegeven. De  $C_{\text{fiber}}$  gehalte varieerden tussen de 13 en 30 mM.

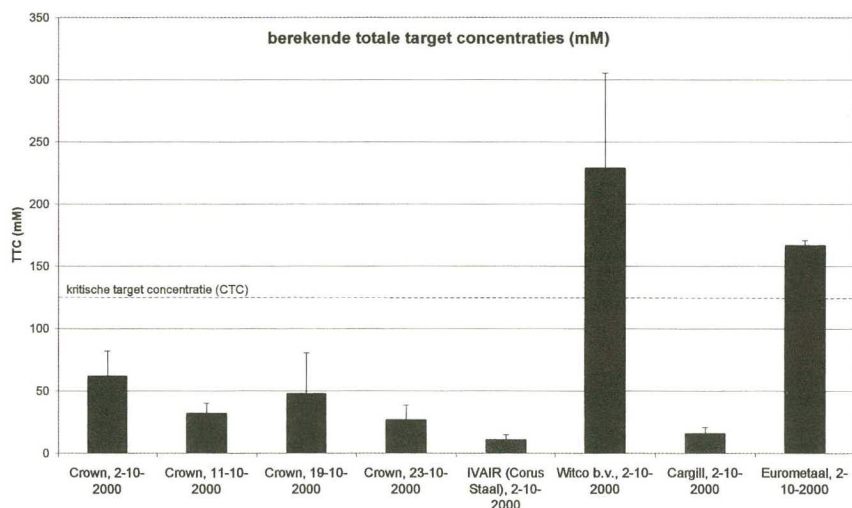
### 3.1 Kritische target concentratie (CTC)

Het aangetroffen molaire somgehalte op de SPME-fiber ( $C_{\text{fiber}}$ ) kan met de volgende vergelijking vertaald worden naar een totale target concentratie (TTC) die het verwachte gehalte van bioaccumuleerbare verbindingen in de celmembraan van organismen bij blootstelling aan het monster weergeeft (Verbruggen et al., 2000):

$$\text{TTC} = 2,07 \cdot C_{\text{fiber}} \quad [1]$$

De totale target concentratie kan vergeleken worden met het gehalte waarbij narcotische toxiciteit wordt verwacht; de kritische target concentratie (CTC). Als CTC-waarde wordt 125 mM aangehouden (Verbruggen et al., 2000). Wanneer de ratio van  $\text{TTC} / \text{CTC}$  in de buurt of hoger is dan 1 dan is acute toxiciteit als gevolg van narcose te verwachten. Bij een ratio in de buurt of groter dan 0,1 is chronische toxiciteit als gevolg van narcose te verwachten.

De aangetroffen  $C_{\text{fiber}}$  gehalten zijn omgerekend met vergelijking [1] naar TTC-gehalten en varieerden tussen de 11 en 229 mM en weergegeven in tabel 2. De afvalwatermonsters Eurometaal en Witco b.v. overschrijden de kritische target concentratie van 125 mM voor acute toxiciteit door narcose (figuur 3). Voor de monsters Crown, Cargill en IVAIR (Corus Staal) liggen de ratio's  $\text{TTC} / \text{CTC}$  in de buurt van of overschrijden de waarde van 0,1 en verwacht wordt dat deze monsters chronisch toxiciteit bij organismen veroorzaken. In deze beredenering wordt geen rekening gehouden met metabolisme van verbindingen door organismen, er kan daarom een overschatting van de werkelijke totale hoeveelheid gebioaccumuleerde verbindingen in de celmembraan van organismen als deze worden blootgesteld aan de onderzochte monsters worden gemaakt.



Figuur 3: Berekende totale target concentratie (mM) voor de afvalwatermonsters.

## 4. Conclusies

De molaire somgehalten in afvalwater van vijf bedrijven (Crown van Gelder, IVAIR, Witco b.v., Cargill Soja en Eurometaal) varieerden tussen de 5 en 111 mM. Het molaire somgehalte aangetroffen in afvalwater van het bedrijf Crown van Gelder bemonsterd op vier tijdstippen varieerden tussen de 13 en 30 mM. Twee afvalwatermonsters overschrijden na omrekening de kritische waarden voor acute narcotische toxiciteit.

## Referenties

- Verbruggen E.M.J., W.H.J. Vaes, T.F. Parkerton and J.L.M. Hermens. 2000. Polyacrylate coated SPME fibers as a tool to simulate body residues and target concentrations of complex organic mixtures for estimation of baseline toxicity. *Environ. Science Technol.* 34 (2), 324-331.
- de Maagd, G-J. 2000. Protocol analyse oppervlaktewater met polyacrylaat fiber – solid phase micro extraction. RIZA.

**Bijlage 1: Factsheets van de SPME-extracties en analyses.**

Code:	Crown 2-10-2000	Crown 2-10-2000	Crown 2-10-2000
serienummer #	1	2	3
Datum inzet monster:	5-10-00	5-10-00	5-10-00
Starttijd:	15.30	15.35	15.40
Datum einde extractie	6-10-00	6-10-00	6-10-00
Eindtijd:	16.00	16.00	16.00
Labtemperatuur (C):	20	20	20
Opmerkingen			

Code:	Crown 11-10-2000	Crown 11-10-2000	Crown 11-10-2000
serienummer #	1	2	3
Datum inzet monster:	17-10-00	17-10-00	17-10-00
Starttijd:	16.25	16.30	16.45
Datum einde extractie	18-10-00	18-10-00	18-10-00
Eindtijd:	16.50	16.55	17.00
Labtemperatuur (C):	20	20	20
Opmerkingen			Fiber tijdens analyse gebroken

Code:	Crown 19-10-2000	Crown 19-10-2000	Crown 19-10-2000
serienummer #	1	2	3
Datum inzet monster:	26-10-00	26-10-00	26-10-00
Starttijd:	13.00	13.00	13.15
Datum einde extractie	27-10-00	27-10-00	27-10-00
Eindtijd:	12.30	13.00	13.45
Labtemperatuur (C):	20	20	20
Opmerkingen			

Code:	Crown 23-10-2000	Crown 23-10-2000	Crown 23-10-2000
serienummer #	1	2	3
Datum inzet monster:	26-10-00	26-10-00	26-10-00
Starttijd:	10.00	10.30	11.15
Datum einde extractie	27-10-00	27-10-00	27-10-00
Eindtijd:	11.30	12.00	12.30
Labtemperatuur (C):	20	20	20
Opmerkingen			

Code:	IVAIR	IVAIR	IVAIR
serienummer #	1	2	3
Datum inzet monster:	5-10-00	18-10-00	18-10-00
Starttijd:	15.45	14.00	14.30
Datum einde extractie	6-10-00	19-10-00	19-10-00
Eindtijd:	16.00	14.30	14.35
Labtemperatuur (C):	20	20	20
Opmerkingen			

Code:	Eurometaal	Eurometaal	Eurometaal
serienummer #	1	2	3
Datum inzet monster:	5-10-00	5-10-00	5-10-00
Starttijd:	15.50	16.00	16.05
Datum einde extractie	6-10-00	6-10-00	6-10-00
Eindtijd:	16.00	16.00	16.00
Labtemperatuur (C):	20	20	20
Opmerkingen			

Code:	Witco	Witco	Witco
serienummer #	1	2	3
Datum inzet monster:	18-10-00	18-10-00	18-10-00
Starttijd:	13.00	13.30	14.00
Datum einde extractie	19-10-00	19-10-00	19-10-00
Eindtijd:	15.00	15.10	15.15
Labtemperatuur (C):	20	20	20
Opmerkingen			

Code:	Cargill	Cargill	Cargill
serienummer #	1	2	3
Datum inzet monster:	17-10-00	18-10-00	18-10-00
Starttijd:	16.15	15.00	15.45
Datum einde extractie	18-10-00	19-10-00	19-10-00
Eindtijd:	16.45	14.40	14.50
Labtemperatuur (C):	20	20	20
Opmerkingen			



Bijlage 2.

SPME-analyse resultaten van de afvalwatermonsters en Standaarden. Weergegeven zijn de molaire gehalten in de fiber ( $C_{fiber}$ ) uitgedrukt in mM, het gemiddelde (AVG), de standaard deviatie (SD) en de relatieve standaard deviatie (%). Daarnaast is de response van de 2,4,5-trichloortolueen externe standaard in drievoud voor en na de SPME-extractie weergegeven.

Molaire somgehalten (mM) de SPME-fiber ( $C_{fiber}$ ) in afvalwatermonsters in drievoud gemeten.

replica	Crown 2-10-00	Crown 11-10-00	Crown 19-10-00	Crown 23-10-00	IVAIR (Corus Staal)	Witco	Cargill Soja	Eurometaal
#1	24,1	18,1	14,3	19,3	3,2	149,1	5,9	>83
#2	41,2	12,5	41,2	11,1	6,6	107,7	7,1	>80
#3	25,0	*	13,7	8,7	6,5	75,6	10,3	>79
AVG	30	15	23	13	5,4	111	7,8	>80
SD	9,6	3,9	15,7	5,5	1,9	36,8	2,3	1,9
RSD %	32	26	68	43	36	33	30	2

\* fiber tijdens analyse gebroken,

Respons externe standaard (2,4,5-trichloortolueen) voor en na de SPME-analyses.

File naam	p.a. Stand voor	File naam	p.a. Stand. na
SPME2002	340620632	SPME2013	241537866
SPME2003	335772252	SPME2014	242378793
SPME2004	329327071	SPME2015	242053756
AVG	335239985		241990138
SD	5665564		424058
RSD	1.7		0.2
File naam	p.a. Stand voor	File naam	p.a. Stand. na
SPME2018	315811589	SPME2028	368933945
SPME2019	299567524	SPME2029	361980853
SPME2020	315140359	SPME2031	335745468
AVG	310173157		355553422
SD	9190878		17502933
RSD	3.0		4.9
File naam	p.a. Stand voor	File naam	p.a. Stand. na
SPME3016	219167915	SPME3026	207514117
SPME3017	216217100	SPME3027	214588869
SPME3018	217745857	SPME3028	207769972
AVG	217710291		209957653
SD	1475729		4012791
RSD	0.7		1.9
File naam	p.a. Stand voor	File naam	p.a. Stand. na
SPME3032	302544871	SPME3043	322679024
SPME3033	303109356	SPME3044	332050312
SPME3034	290183946	SPME3045	330968261
AVG	296646651		328565866
SD	9139645		5126781
RSD	3.1		1.6
File naam	p.a. Stand voor	File naam	p.a. Stand. na
SPME4002	260213124	SPME4008	227389149
SPME4003	275774632	SPME4009	209723059
SPME4004	254410433	SPME4010	211869678
AVG	263466063		216327295
SD	11047328		9639785
RSD	4.2		4.5