



Identificatie van mogelijke bijproducten na UV-oxidatie

November 2012
BTO 2012.016

Identificatie van mogelijke bijproduct(en) na UV-oxidatie

November 2012
BTO 2012.016

© 2012 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.

Colofon

Titel

Identificatie van mogelijke bijproduct(en) na UV-oxidatie.

Opdrachtnummer

B111713, B111756 en B111787

Onderzoeksprogramma('s)

Chemische Waterkwaliteit

Projectmanager

Merijn Schriks

Opdrachtgever

PBC-CW

Kwaliteitsborger(s)

Pim de Voogt

Auteur(s)

Ton van Leerdam, Minne Heringa, Erik Emke, Albert Brandt, Annemieke Kolkman en Dennis Vughs

Verzonden aan

Dit rapport is niet openbaar en slechts verstrekt aan de leden van de PBC CW.

Samenvatting

Binnen het project *Nevenproducten UV/UV-oxidatie* is nader onderzoek verricht naar het ontstaan van ongewenste nevenproducten bij de behandeling van water met UV-straling of een combinatie van UV en waterstofperoxide (H_2O_2). Bij eerder BTO-onderzoek is verhoogde respons in Ames fluctuatietesten aangetoond in water na middendruk (MD) UV/ H_2O_2 -behandeling, een indicatie voor ongewenste genotoxische activiteit.. Dit riep vragen op, waaronder de vraag welke stoffen verantwoordelijk zijn voor deze verhoogde respons. Met de identiteit van de verantwoordelijke stof(fen) kan beter het gezondheidsrisico voor de mens in kaart worden gebracht, kan beter uitgezocht worden hoe deze stoffen ontstaan en daarmee hoe de vorming kan worden voorkomen, en kan toekomstig onderzoek met chemische analyse worden uitgevoerd, waarmee preciezere informatie verkregen wordt.

Met verschillende analysemethoden is getracht de stof(fen) te identificeren die alleen in de waterextracten met een verhoogde Ames respons aanwezig waren (en niet in de extracten die geen Ames respons vertoonden). In totaal zijn zes extracten met een significant verhoogde Ames respons na UV(-oxidatie) onderzocht en zeven gerelateerde extracten zonder activiteit (voor UV-oxidatie of met een vorm van UV-oxidatie die niet leidde tot verhoging van de Ames respons).

Een groep van stoffen waarvan bekend is dat zij in lage concentratie een genotoxisch effect kunnen veroorzaken, zijn nitrosoamines. In de literatuur zijn er aanwijzingen dat UV-straling in water de vorming van nitrosamines zou kunnen veroorzaken. Daarom zijn alle dertien fracties onderzocht op de aanwezigheid van deze stoffen. In totaal is gezocht naar acht verschillende nitrosoamines in de dertien fracties. Er zijn geen nitrosoamines aangetoond, de aantoonbaarheidsgrens was 10-30 ng/l.

Met behulp van massaspectrometrie kan een breed scala aan organische stoffen worden gemeten. Daarom is onderzoek uitgevoerd met zowel gaschromatografie MS (GC-MS) als vloeistofchromatografie in combinatie met accurate massaspectrometrie (LC-MS). Met de GC-MS worden vooral apolaire en matig polaire stoffen gemeten, met LC-accurate MS matig polaire en polaire stoffen. De screening met GC-MS leverde geen resultaat op (geschatte aantoonbaarheidsgrens 0,1 $\mu\text{g/l}$). Bij visuele beoordeling van de meetgegevens konden geen verschillen tussen de extracten met en zonder een positieve Ames respons worden vastgesteld. Onderzoek met LC-accurate MS met de Orbitrap leverde wel een verschil op tussen de extracten. Bij de negatieve ionen meting werd één component aangetroffen, op een laag concentratieniveau (30 ng interne standaard equivalenten (bentazon-d6) /l), welke enkel aanwezig was in de extracten met een positieve Ames respons. De piekhoogtes van deze stof correspondeerden sterk met de gemeten Ames respons van de fracties. Met de positieve ionen meting werden geen verschillen gevonden.

Op basis van de gemeten accurate massa van deze stof (213.01531 amu in de $[\text{M-H}]^-$ vorm), de gemeten retentietijd en daarvan geschatte wateroplosbaarheid, het feit dat de component zure eigenschappen moest bevatten (bijvoorbeeld een hydroxy-, en of carbonzuurgroep) en geen signaal gaf bij de positieve ionen meting, waren er zeven molecuulstructuren mogelijk voor deze stof. Van geen van deze zeven stoffen waren data beschikbaar over de mogelijke genotoxiciteit. Analyse met de enige verkrijgbare stof van deze zeven, 5-methoxy-2,4-dinitrofenol gaf aan dat de stof waarschijnlijk een isomeer van deze stof was, waardoor er nog vijf mogelijk structuren overbleven. Uit een QSAR analyse kon met hoge zekerheid geconcludeerd worden dat alle vijf isomeren positief in de Ames test en carcinogeen kunnen zijn, maar kon geen onderscheid gemaakt worden welk isomeer een hogere waarschijnlijkheid had om de gezochte doelstof te zijn.

Vervolgens is 500 liter UV/ H_2O_2 -behandeld water geëxtraheerd, geconcentreerd en twee maal gefractioneerd voor NMR analyse. Met NMR analyse kan onderscheid gemaakt worden tussen verschillende isomeren. Het NMR-spectrum van de twee fracties met de doelstof bleek goed overeen te komen met de NMR-spectra van de referentiestof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol en het literatuurspectrum, zodat met grote zekerheid geconcludeerd kon worden dat dit de doelstof is. Deze conclusie is bevestigd met een LC-UV en een LC-accurate massa MS analyse, de spectra van de doelstof en de referentiestof 2-

methoxy-4,6-dinitrofenol kwamen geheel overeen. Op basis van de LC-UV analyse is de concentratie in het oorspronkelijke water geschat op 5-10 ng/l.

Resultaten van een Ames fluctuatietest met verschillende doseringen van 2-methoxy-4,6-dinitrofenol, verschillende doseringen van de gezuiverde fractie met de doelstof en een totaalextract van het oorspronkelijke water, lieten zien dat de concentratie van 2-methoxy-4,6-dinitrofenol in het water de totaal gemeten respons in de Ames fluctuatietest niet kon verklaren. Veel hogere concentraties van deze stof bleken wel een Ames respons te veroorzaken.

Omdat er wel een relatie tussen de hoeveelheid van deze stof en de gemeten Ames respons was gevonden, maar 2-methoxy-4,6-dinitrofenol niet (geheel) verantwoordelijk is voor de aangetroffen Ames respons in het water, is het mogelijk dat de totale Ames respons wordt veroorzaakt door meerdere stoffen. Mogelijk wordt onder invloed van UV-straling een breed scala aan stoffen met een aromatische nitro-groep gevormd, een groep waarvan bekend is dat die vaak mutageen is. Elke individuele stof kan misschien geen detecteerbare Ames respons veroorzaken, maar gezamenlijk als mengsel zou er wel een detecteerbare respons in de Ames fluctuatietest veroorzaken kunnen worden.

Met dit onderzoek is een werkwijze ontwikkeld om een doelstof (die in lage concentratie in het water aanwezig was!) te isoleren met behulp van een tweedimensionale zuivering. Voor de uiteindelijke identificatie van de stof bleek de combinatie van twee krachtige identificatietechnieken – accurate massaspectrometrie en NMR- noodzakelijk. De geïdentificeerde stof bleek niet de totale gemeten respons in de Ames fluctuatietest te kunnen verklaren, waardoor de hypothese is gesteld dat meerdere stoffen samen verantwoordelijk zijn.

Om deze hypothese verder te testen en meer licht op de oorzaak van de verhoogde Ames respons te werpen, wordt aanbevolen om verder onderzoek te richten op:

- Het nagaan welk type aromatische stoffen met nitro-groepen een respons laten zien in de Ames fluctuatietest.
- Het analyseren van de andere fracties uit de eerste zuiveringsstap op respons in de Ames fluctuatietest. Mogelijk vertonen andere fracties wel een detecteerbare respons in de Ames fluctuatietest waarin mogelijk potentere stoffen gevonden kunnen worden, of alle fracties blijven onder de detectiegrens, wat aangeeft dat er sprake is van mengseltoxiciteit.
- Het nagaan of de vorming van activiteit in de Ames fluctuatietest afhankelijk is van nitraat, van UV-licht en van een aromatische stof. De keuze van de aromatische stof hierin is kritisch: niet elke stof zal naar verwachting leiden tot de vorming van bijproducten die een Ames respons veroorzaken.

Inhoud

Samenvatting	1
Inhoud	3
1 Inleiding	5
2 Opsporen van stoffen die een response in de Ames fluctuatietest veroorzaken	7
2.1 Inleiding	7
2.2 Waterextracten	7
2.3 GC-MS analyse van nitrosoamines	8
2.4 Brede screening met GC-MS analyse	9
2.5 Brede screening met LC-MS	10
2.5.1 LC-Orbitrap MS screening	10
2.5.2 Identificatie gevonden piek	12
2.5.3 Vergelijking met één van de stoffen in pure vorm	15
2.5.4 Analyse van een nieuw extract	16
2.6 Voorlopige conclusie	17
3 Inschatting genotoxiciteit van kandidaatstoffen met QSARs	19
4 NMR analyse	23
4.1 Extractie van de stof uit water	23
4.1.1 Monstername	23
4.1.2 Groot volume opwerking	24
4.2 Eerste zuiveringsronde	25
4.3 NMR na eerste zuiveringsronde	26
4.4 Tweede zuiveringsronde	28
4.4.1 Ultrafiltratie van de fracties van het totaalextract	28
4.4.2 Fractionering	29
4.5 NMR-onderzoek na tweede zuiveringsronde	32
4.6 Identificatie doelstof	35
5 Bevestiging van de identiteit van de doelstof	37
5.1 Inleiding	37
5.2 Bevestiging met NMR	37
5.3 Bevestiging met LC-DAD	38
5.4 Bevestiging met LC-MS	39
6 Bevestiging van de Ames respons	41
7 Discussie	45

8	Conclusies en aanbevelingen	47
9	Literatuur	49
I	Resultaten van het onderzoek naar nitrosoamines	51
II	Relatie tussen theoretische logK_{ow} en KRetI	52
III	Chemische structuren voor stof met brutoformule C₇H₆N₂O₆	54
IV	Orbitrap resultaten van extra extract	62
V	Resultaten Ames fluctuatietest	65

1 Inleiding

Binnen het project *Nevenproducten UV/UV-oxidatie* is nader onderzoek verricht naar het ontstaan van ongewenste nevenproducten bij de behandeling van water met UV-straling of een combinatie van UV en waterstofperoxide. Bij eerder BTO-onderzoek is verhoogde respons in Ames fluctuatietesten aangetoond in water na middendruk (MD) UV/H₂O₂-behandeling (Heringa *et al.*, 2011; BTO 2011.046). Deze verhoogde respons is een indicatie voor de vorming van desinfectiebijproducten met ongewenste genotoxische activiteit. De verhoogde respons is niet gevonden in het eindproduct drinkwater, na behandeling met actief kool of via duininfiltratie. Een dergelijke *in vitro* test (met bacteriën) kan heel goed de aanwezigheid van onbekende toxische verbindingen detecteren in water, maar uit de testuitslag kan geen volledige beoordeling gemaakt worden van het gezondheidsrisico dat deze verbinding geeft. Daarvoor moet meer bekend zijn over, bijvoorbeeld, hoe een verantwoordelijke stof door de darmen wordt opgenomen, hoe de stof zich verdeelt over het lichaam, en hoe deze wordt omgezet door enzymen in een minder of meer schadelijke verbinding. Uiteindelijk zal het nodig zijn te weten wat de stof in een proefdier doet, als model voor de mens. Als dergelijke experimenten met de stof al zijn uitgevoerd, kan deze informatie in de beschikbare literatuur en databases opgezocht worden, en anders zullen de experimenten alsnog uitgevoerd moeten worden. In beide gevallen is het nodig om de identiteit (ofwel de chemische structuur) van de stof te kennen en in het laatste geval zal deze stof ook in pure vorm voorhanden moeten zijn.

Daarnaast kan met de identiteit van de stof(fen) soms een idee verkregen worden over hoe bijproduct(en) gevormd wordt/worden tijdens de UV/H₂O₂-behandeling en welke factoren hieraan bijdragen. Dit kan weer aanwijzingen geven hoe de vorming wellicht voorkomen kan worden. Ten slotte kan met de identiteit van de verantwoordelijke stof(fen) verder chemisch analytisch onderzoek uitgevoerd worden, waarmee exacte concentraties van de stof(fen) verkregen kunnen worden. Om deze redenen is in het project *Nevenproducten UV/UV-oxidatie* begonnen met de identificatie van de stof(fen) die verantwoordelijk zijn voor de gevonden verhoogde respons in de Ames fluctuatietesten. In dit rapport worden de experimenten beschreven die zijn uitgevoerd voor deze identificatie, waarbij tegelijkertijd een route beschreven wordt om een doelstof in lage concentraties (ng/l niveau) te identificeren.

2 Opsporen van stoffen die een response in de Ames fluctuatietest veroorzaken

2.1 Inleiding

Voor de identificatie van de verantwoordelijke stof(fen) is begonnen met verschillende massaspectrometrische analyses in restanten van de waterextracten waarin eerder een verhoogde respons in de Ames fluctuatietesten was aangetroffen (Heringa *et al.*, 2011; BTO 2011.046), zie 2.2.

Een groep van stoffen waarvan bekend is dat die in lage concentratie een genotoxisch effect kunnen geven, zijn nitrosoamines. In de literatuur is aangetoond dat bestraling van water met UV wellicht zou kunnen leiden tot vorming van nitrosamines (Helma *et al.*, 1994). Nitraat dat aanwezig is in het water kan door behandeling met UV en waterstofperoxide worden omgezet in nitriet. Nitriet kan vervolgens reageren met humuszuren, aminozuren of andere stoffen die aanwezig zijn in water waarbij mutagene stoffen worden gevormd, waaronder nitroverbindingen (Suzuki *et al.* 1992 en 1985, Ohta *et al.* 1982). Op basis van deze gegevens is het chemisch onderzoek naar de verantwoordelijke stof(fen) gestart met de analyse van acht verschillende nitrosoamines (zie 2.3).

Daarnaast is breed screenend onderzoek uitgevoerd met massaspectrometrie. Met GC-MS is gescreend op apolaire en matig polaire stoffen (zie 2.4) en met LC-accurate massaspectrometrie met de Orbitrap is op polaire stoffen gescreend (zie 2.5). Bij de screening is steeds gezocht naar chemische verschillen in fracties met verhoogde Ames respons en fracties zonder verhoogde Ames respons.

Op basis van de literatuur zijn, naast de nitrosoamines, nog eens vijf modelstoffen gekozen die mogelijk gevormd zouden kunnen worden door de UV-oxidatie (tabel 1). Deze modelstoffen zijn aan de extracten toegevoegd en er is onderzocht of ze met de verschillende toegepaste analysetechnieken meetbaar zijn. Andere relevante stoffen die zijn beschreven in de literatuur, zoals dinitrodihydroxybifenylnyl en dinitrodihydroxybenzodioxine, waren niet commercieel als zuivere stof verkrijgbaar en werden daarom niet gebruikt

Tabel 1. Modelstoffen die zijn toegevoegd aan de extracten voor het screeningsonderzoek

Stofnaam	brutoformule	CAS nummer
2-nitroaniline	$C_6H_6N_2O_2$	88-74-4
N,N-dimethylaniline	$C_8H_{11}N$	121-69-7
2-nitro-4-fenylfenol	$C_{12}H_9NO_3$	885-82-5
2-hydroxypyridine	C_5H_5NO	142-08-5
2-amino-3-hydroxypyridine	$C_5H_6N_2O$	16867-03-1

2.2 Waterextracten

In totaal zijn tien extracten van watermonsters na UV($/H_2O_2$)-behandeling met zowel lagedruk (LD) als middendruk (MD) UV-lampen onderzocht, en drie referentie extracten van voor de UV($/H_2O_2$)-behandeling. Vier extracten waren afkomstig van behandeld water van de Ohio rivier (Cincinnati, USA) en zes extracten waren afkomstig van behandeld Maaswater ((Heringa *et al.*, 2011; BTO 2011.046). In Tabel 2 zijn alle onderzochte extracten weergegeven samen met de gemeten activiteit in de Ames fluctuatietest.

Van deze watermonsters waren zowel extracten gemaakt voor de Ames fluctuatietest als voor de comet assay (waar geen respons in werd aangetroffen). Voor de massaspectrometrische analyses zijn restanten van de extracten voor de comet assays gebruikt, die 20.000x geconcentreerd waren in DMSO.

Tabel 2: Onderzochte extracten met bijbehorende referentie-extracten (onbehandeld water)

locatie	Datum fractie	Behandeling	Ames II TA98 -S9 respons ¹ (# gele wells)	LMC monstercode
Ohio rivier (Cincinnati)#	2-10-2008	Voor UV	2,7	C-08 3138
Idem	idem	Na LD-UV	3,3	C-08 3139
idem	idem	Na LD-UV/ H ₂ O ₂	3,0	C-08 3140
idem	idem	Na MD-UV	32,7	C-08 3142
idem	idem	Na MD-UV/ H ₂ O ₂	9,7	C-08 3143
Maaswater (Dunea)#	3-10-2007	Voor LD UV/ H ₂ O ₂	2,3	C-07 3393
idem	idem	Na LD UV/ H ₂ O ₂ (1.44 m3/h)	5,7	C-07 3397
idem	idem	Na LD UV/ H ₂ O ₂ (2.40 m3/h)	3,0	C-07 3400
idem	idem	Na LD UV/ H ₂ O ₂ (3.35 m3/h)	3,7	C-07 3401
Maaswater (Dunea)#	10-10-2007	Voor MD UV/ H ₂ O ₂	3,7	C-07 3506
idem	idem	Na MD UV/ H ₂ O ₂ (1,07 m3/h)	20,3	C-07 3511
idem	idem	Na MD UV/ H ₂ O ₂ (3.58 m3/h)	16,0	C-07 3513
idem	idem	Na MD UV/ H ₂ O ₂ (5.0 m3/h)	15,7	C-07 3514

¹. In TAMix werd geen respons gevonden, in TA98 -S9 werd de duidelijkste respons gevonden, daarom zijn alleen deze resultaten hier weergegeven. In vet staan de fracties weergegeven waar een significante verhoging na UV werd gevonden ten opzichte van het fractie voor UV.

= referentiefractione

LD= lagedruk (UV lamp), MD= middendruk (UV lamp)

2.3 GC-MS analyse van nitrosoamines

Voor de analyse van nitrosoamines is protocol LOA-535 gebruikt. De acht stoffen waarop hiermee gescreend kan worden zijn vermeld in tabel 3.

De normale uitvoering van deze methode is gebaseerd op een vaste fase extractie van het water fractie. Voorafgaand aan de extractie wordt de interne standaard NMDA-d6 toegevoegd als surrogaat standaard. Vervolgens wordt het verkregen dichloormethaan (DCM) extract 1000 x geconcentreerd. Aan het extract worden de interne standaarden NDEA-d10 en NDPA-d14 toegevoegd. Hierna wordt het extract met behulp van GC-MS geanalyseerd. Door aanwezigheid van ammoniakgas in de reactiekamer van de MS-bron worden de componenten tijdens de ionisatie chemisch geïoniseerd. Afhankelijk van de hoeveelheid gas ontstaan twee geladen molecuulionen, namelijk $[M + H]^+$ en $[M + NH_4]^+$. Vervolgens worden de ontstane ionen gedetecteerd met een massaspectrometer. Het gehalte aan de betreffende componenten wordt berekend aan de hand van een kalibratiecurve, waarbij wordt gecorrigeerd voor de interne standaard.

De beschikbare extracten die gebruikt zijn voor de Ames fluctuatietesten waren opgelost in DMSO in plaats van DCM. Deze extracten konden niet direct geanalyseerd worden met GC-MS in verband met storende effecten van DMSO tijdens de analyse. Een fractie van elk extract-restant werd daarom 200 x verdund met ethylacetaat, tot een concentratiefactor van 100. Omdat dit 10 maal lager is dan de

gebruikelijk concentratiefactor, werd de rapportagegrens werd hierdoor 10 maal verhoogd tot 10-30 ng/l (verschillend per stof).

Er zijn geen nitrosoamines aangetoond in de onderzochte extracten. In bijlage I zijn de complete analyseresultaten weergegeven. Het blijft mogelijk dat er wel nitrosamines aanwezig waren, maar in concentraties onder de detectiegrens. Het is echter twijfelachtig of concentraties onder de 10-30 ng/l de gemeten de respons in de Ames fluctuatietest zouden kunnen veroorzaken, omdat er al minstens 50 ng/L van de positieve controle (en zeer potente stof) 4-NQO nodig is om de laagst detecteerbare Ames fluctuatietest respons te veroorzaken.

Het is ook mogelijk dat er wel nitrosamines aanwezig waren in het oorspronkelijke water, maar dat deze niet zijn geëxtraheerd door het gebruikte materiaal Oasis™ HLB. Vooral van de polaire nitrosamines, zoals NDMA, is bekend dat deze niet goed vastgehouden worden door dit materiaal (Krauss en Hollender, 2008). Deze mogelijk niet-geëxtraheerde stoffen zijn dan echter ook niet meegenomen in de Ames fluctuatietesten en kunnen daardoor niet verantwoordelijk zijn voor de gemeten Ames respons.

Tabel 3: Onderzochte nitrosoamines.

component	afkorting	CAS nummer	Brutoformule
N-nitrosodimethylamine	NDMA	62-75-9	C ₂ H ₆ N ₂ O
N-nitrosomethylethylamine	NMEA	10595-95-6	C ₃ H ₈ N ₂ O
N-nitrosodiethylamine	NDEA	55-18-5	C ₄ H ₁₀ N ₂ O
N-nitrosopyrrolidine	NPYR	930-55-2	C ₄ H ₈ N ₂ O
N-nitrosomorpholine	NMOR	59-89-2	C ₄ H ₈ N ₂ O ₂
N-nitrosodi-n-propylamine	NDPA	621-64-7	C ₆ H ₁₄ N ₂ O
N-nitrosopiperidine	NPIP	100-75-4	C ₅ H ₁₀ N ₂ O
N-nitroso-n-dibutylamine	NDBA	924-16-3	C ₈ H ₁₈ N ₂ O

N-nitrosodimethyl-d6-amine	NDMA-d6	17829-05-9	C ₂ D ₆ N ₂ O
N-nitrosodiethyl-d10-amine	NDEA-d10	n/a	C ₄ D ₁₀ N ₂ O
N-nitrosodipropyl-d14-amine	NDPA-d14	93951-96-3	C ₆ D ₁₄ N ₂ O

2.4 Brede screening met GC-MS analyse

Voorafgaand aan de brede screening met GC-MS zijn andere fracties van de DMSO extracten (zoals beschreven in 2.2) 20 x verdund met ethylacetaat (5 µl extract + 95 µl ethylacetaat), tot een uiteindelijke concentratiefactor van 1000. De GC-MS screening is uitgevoerd volgens een KWR-protocol (huisvoorschrift LOA-411). Daarbij is gebruik gemaakt van een Trace GC-MS (Thermo Scientific), met Rtx-5 MS 60 m kolom en helium als draaggas.

Er werden *geen* verschillende gevonden tussen de UV-behandelde en onbehandelde extracten. De analysegrens was naar schatting 0,1 µg/l.

Van de vijf modelstoffen waren er drie te detecteren met deze GC MS analyse, namelijk 2-nitroaniline, N,N-dimethylaniline en 2-nitro-4-fenylfenol. De laatste stof had echter een relatief hoge aantoonbaarheidsgrens (> 1 µg/l). Deze drie met GC-MS te detecteren modelstoffen werden niet aangetroffen in de onderzochte extracten.

Het is mogelijk dat een stof die een positieve Ames respons veroorzaakte, wel met behulp van GC-MS gemeten had kunnen worden, maar dat de concentratie ervan te laag was om gedetecteerd te kunnen worden. Dit zou verbeterd kunnen worden door een extract te maken in een ander oplosmiddel (ethylacetaat) en met een hogere concentratiefactor. Ook zou de GC-MS analysemethode verder geoptimaliseerd kunnen worden, om ook in aanwezigheid van DMSO een betere gevoeligheid te

verkrijgen. Daarnaast zouden de verschillen tussen de behandelde en onbehandelde extracten geanalyseerd kunnen worden met dataverwerkingsoftware, waarvan op dit moment nog niet bekend is of het met GC-MS data werkt (wel LC-MS).

2.5 Brede screening met LC-MS

2.5.1 LC-Orbitrap MS screening

Voor de LC- Orbitrap MS analyse werd een fractie van elk van de extracten in DMSO (zoals beschreven in 2.2) 20 x verdund met water en acetonitril, tot een concentratiefactor van 1000 maal. Het uiteindelijke concentraat was een mengsel van de oplosmiddelen water/acetonitril/DMSO (50/45/5; v/v/v). De analyse werd uitgevoerd volgens het standaard screeningsprotocol (LOA-600) en zoals beschreven in Hogenboom *et al.* (2009). Een samenvatting van de belangrijkste analysecondities is opgenomen in tabel 4.

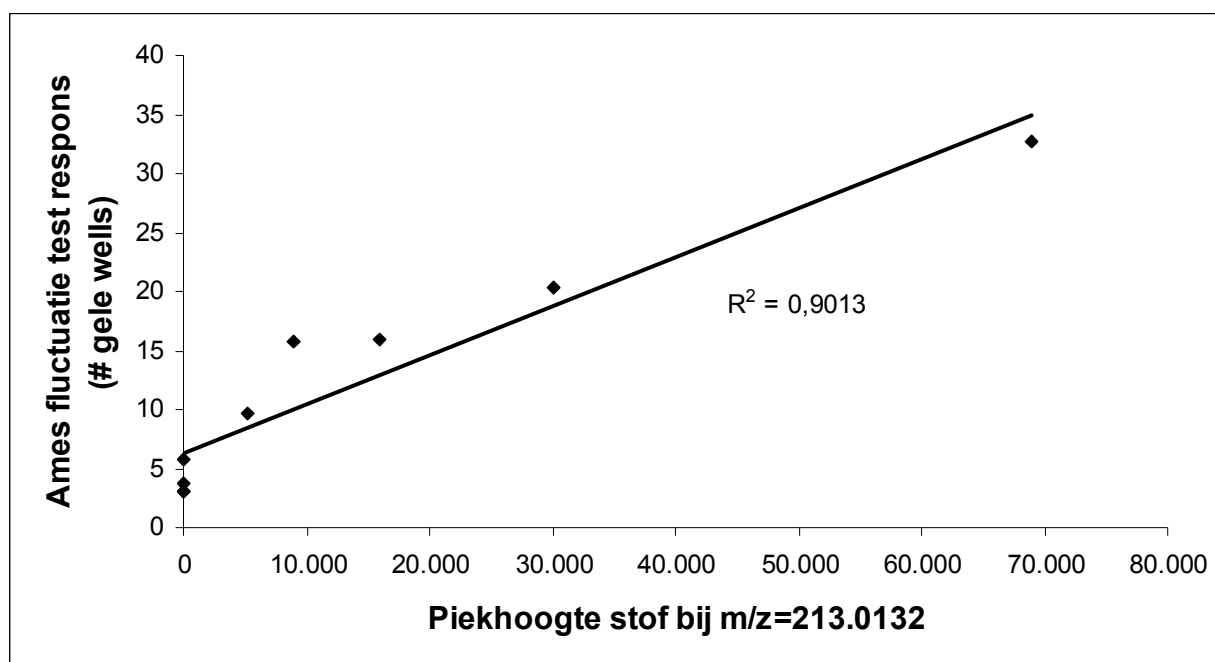
Tabel 4: Samenvatting van LC-Orbitrap MS analysecondities

Parameter	Instelling
Techniek	LTQ FT Orbitrap MS met positieve en negatieve ionisatie
Scan gebied	m/z 50-1300
Massa resolutie	100.000 (FWHM)
Scan type	MS accurate massa metingen van precursor ion en product ionen met linear ion trap (LTQ), data-dependent
LC kolom	100x2.1 mm C18 3-µm deeltjes
LC gradient (positieve ionisatie)	acetonitril (5-100%)/water met 0,05% mierenzuur in 40 min (lineair)
LC gradient (negatieve ionisatie)	acetonitril (5-100%)/water met 0,05% ammoniumformiaat in 40 min(lineair)
Temperatuur LC-kolom	21 °C
Interne standaarden	atrazin-d5 (positieve ionisatie) bentazon-d6 (negatieve ionisatie) fenuron en chlooroxuron voor bepalen Kreti

Er is gescreend op de aanwezigheid van componenten tot op een niveau van 4% van de bijbehorende interne standaard. Daarbij werd steeds gecorrigeerd voor het bijhorende referentie-extract (voor UV behandeling) als daarin een stof aanwezig is. Een component werd als aanwezig beschouwd als de intensiteit 10x zo hoog was als in het bijbehorende referentie-extract. De interne standaardstof voor de positieve ionen meting was atrazine-d5, en voor de negatieve ionen meting bentazon-d6. Deze interne standaarden werden aan het verdunde extract toegevoegd in een concentratie van 1,0 µg/L. De aantoonbaarheidsgrens was ongeveer 40 ng interne standaard equivalenten per liter. Op een niveau van 4% werden -voor zowel de meting in positieve ionisatie modus als de meting in negatieve ionenmodus- geen extra componenten waargenomen in de extracten met een Ames respons t.o.v. extracten zonder Ames respons.

Hierop werd besloten om te vergelijken op een niveau van 1% van de interne standaard voor het extract Na MP-UV van de Ohio rivier (KWR fractiecode C-08 3142), waarin de hoogste Ames respons gevonden was. Bij de analyse in positieve ionisatie modus werden wederom geen extra componenten gevonden, bij

analyse in negatieve ionisatie modus werd één extra component waargenomen op een zeer laag niveau. Daarop zijn ook de andere extracten op deze component gescreend en werden piekhoogtes gevonden die sterk gerelateerd bleken aan de gevonden Ames fluctuatietest respons (figuur 1 en tabel 5). Dit was een zeer sterke aanwijzing dat deze stof verantwoordelijk was voor Ames respons.



Figuur 1: Correlatie tussen gemeten Ames fluctuatietest respons in TA98 –S9 in de Ames fluctuatie test, en de piekhoogte van de stof met accurate massa 213.0132. Elk datapunt is afkomstig van een ander extract, van water na verschillende behandelingen.

Tabel 5: Piekhoogte van de stof met m/z 213.0153, en retentietijd van 11,51 min, in de geanalyseerde fracties gerelateerd aan de gevonden Ames respons.

monstercode	monsteromschrijving	Piekhoogte (counts) stof met mw= 213.01534	Ames II TA98 –S9 respons (# gele wells)
C-08 3142	Ohio rivier, Na MD-UV	69.000	32,7
C-07 3511	Maaswater, Na MD UV/ H ₂ O ₂ (1,07 m3/h)	30.000	20,3
C-07 3513	Maaswater, Na MD UV/ H ₂ O ₂ (3,58 m3/h)	16.000	16,0
C-07 3514	Maaswater, Na MD UV/ H ₂ O ₂ (5,0 m3/h)	9.000	15,7
C-08 3143	Ohio rivier, MD-UV/ H ₂ O ₂	5.211	9,7
C-08 3140	Ohio rivier, LD-UV/ H ₂ O ₂	n.a.	3,0
C-07 3397	Maaswater, Na LD UV/ H ₂ O ₂ (1,44 m3/h)	n.a.	5,7
C-07 3400	Maaswater, Na MD UV/ H ₂ O ₂ (2,40 m3/h)	n.a.	3,0
C-07 3401	Maaswater, Na MD UV/ H ₂ O ₂ (3,35 m3/h)	n.a.	3,7

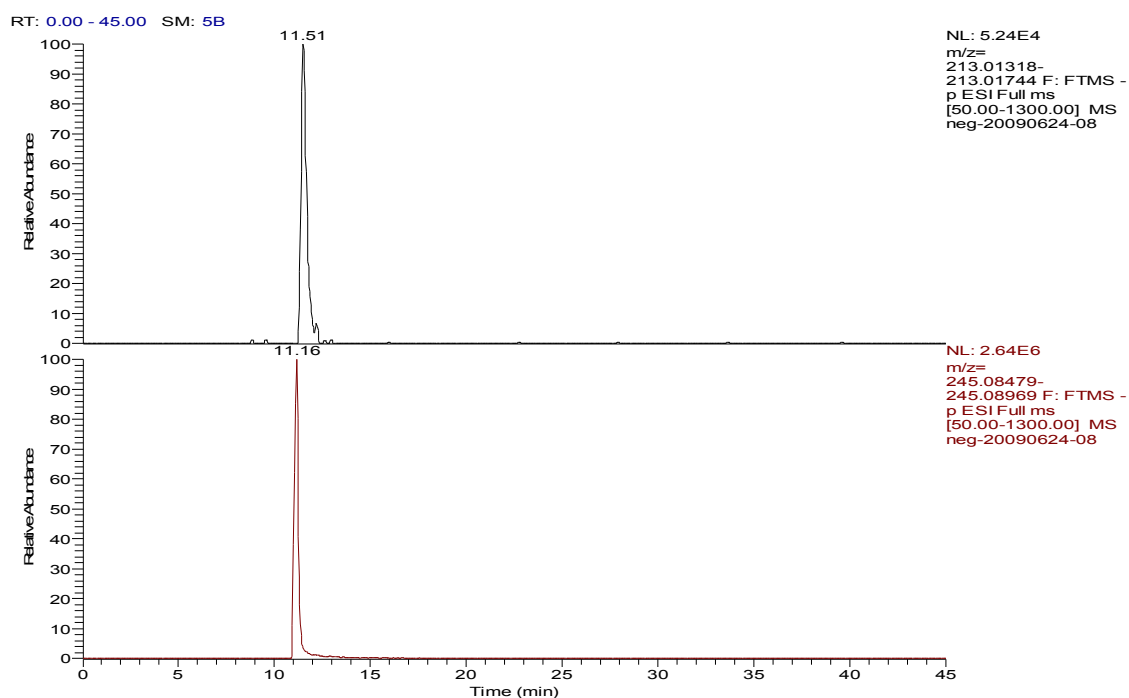
n.a. : stof niet aangetoond in fractie-extract. Gescreend tot 1% van de interne standaardstof bentazon-d6.

Het is echter niet uitgesloten dat er meerdere (vergelijkbare) componenten aanwezig waren in het extract maar dat deze niet gedetecteerd werden door een te geringe concentratie, slechte meetgevoeligheid of onvoldoende chromatografische scheiding. In eerste instantie is echter het verder onderzoek gericht op

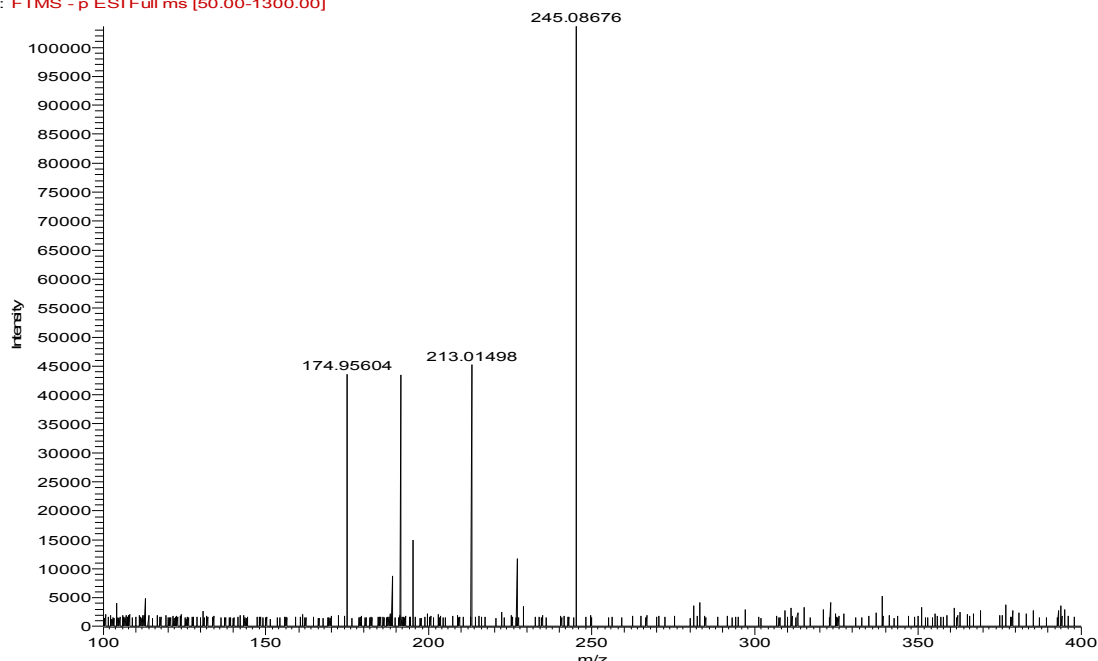
deze stof, en alleen als zou blijken dat deze stof niet alle activiteit verklaart, kon verder gezocht worden naar andere componenten.

2.5.2 Identificatie gevonden piek

De retentietijd van de stof, die enkel in de UV-behandelde extracten was gedetecteerd, was 11,51 min met een accurate massa van 213,01531 amu (zie figuur 2a). Het accurate massaspectrum van de doelstof is opgenomen in figuur 2b.



Figuur 2a: Extracted ion chromatogram van de stof die enkel in het UV behandelde fractie werd aangetroffen; $m/z=213,01531 \pm 5$ ppm (boven) en de interne standaardstof bentazon-d6; $m/z=245,08724 \pm 5$ ppm (onder).



Figuur 2b: Accurate masspectrum van de doelstof (m/z 213.01498). Het ion 245.08676 is afkomstig van de interne standaardstof bentazon-d6, die vrijwel gelijktijdig elueert. De ionen 175 en 192 zijn afkomstig van de achtergrond.

Voor het berekenen van de relatieve retentietijd (KRetI) zijn de retentietijden van de stoffen fenuron en chlooroxuron nodig. De KRetI wordt dan berekend met de volgende formule:

$$Kreti = Rt_{Fn} + \frac{(Rt_{Cx} - Rt_{Fn})}{(Rt'_{Cx} - Rt'_{Fn})} (Rtx_a - Rt'_{Fn})$$

Waarin:

Kreti = Gecorrigeerde retentietijd van component a ten opzichte van de interne standaarden Fenuron en Chlooroxuron

Rtx_a = Gemeten retentietijd van component a.

Rt_{Cx} en Rt_{Fn} = Vastgestelde retentietijden van de interne standaarden.

Rt'_{Cx} en Rt'_{Fn} = Gemeten retentietijden van de interne standaarden

De berekende Kreti was 19,7 min.

Op basis van deze Kreti is een schatting gemaakt van de logK_{ow} als maat voor de hydrofilititeit van de stof. Hiervoor is gebruikt gemaakt van een bestand met circa 90 verschillende stoffen die onder vergelijkbare condities zijn geanalyseerd, waarin de bekende log K_{ow} gerelateerd was aan de gemeten Kreti. Er blijkt een beperkt lineair verband te bestaan met formule logK_{ow}=0,0944 x Kreti - 0,6321 en een r² van 0,25. De verkregen figuur is opgenomen in bijlage IV. Door de geringe correlatie (r² van 0,25) moet voorzichtig worden omgegaan met deze relatie en hij is daarom alleen gebruikt om het aantal mogelijkheden voor de chemische structuur te beperken. Met de gevonden Kreti werd een logK_{ow} van 1,2 berekend voor de onbekende stof.

Het gemeten ion had een massa van 213,01531 amu. Waarschijnlijk betreft dit een gedeprotoniseerd molecuul ([M-H]⁻) zodat de molecuulmassa van deze stof 214 amu is. Er waren geen duidelijke productionen aanwezig in het MS2 spectrum, enkel een klein signaal voor een ion met m/z van 197,99193 amu (zie figuur 2b). Mogelijk komt dit door het geringe meetsignaal. Met dit gebrek aan productionen werd verdere informatie over de mogelijke structuur van de stof gemist.

Op basis van de accurate massa is met behulp van het software programma Xcalibur gezocht naar mogelijke brutoformules, uitgaande van de elementen C, H, N, O, P en S. In tabel 6 zijn alle theoretische mogelijkheden voor de brutoformule binnen een bandbreedte van 5 ppm opgenomen.

Tabel 6: Mogelijke brutoformules voor m/z waarde 213.01531 binnen een bandbreedte van 5 ppm.

Hit nummer	Bruto formule [M-H] ⁻	DBE	Delta ppm
1	C ₇ H ₅ O ₆ N ₂	6,5	0,004
2	C ₂ H ₁₀ N ₆ PS ₂	1,5	0,772
3	C ₂ H ₂ ON ₁₀ P	7,5	-1,430
4	C ₃ H ₈ O ₆ N ₃ P	2,0	-1,454
5	C ₉ H ₁₂ P ₃	5,5	-1,987
6	C ₆ H ₇ N ₅ S ₂	6,0	2,230
7	C ₅ H ₁₃ O ₂ NP ₂ S	1,0	2,532
8	H ₅ O ₄ N ₈ S	2,5	-3,214
9	C ₅ H ₁₅ NP ₄	1,0	-3,445
10	C ₉ H ₁₀ O ₂ PS	5,5	3,990

DBE: double bond equivalents (dubbele band eenheden als maat voor de aromaticiteit)

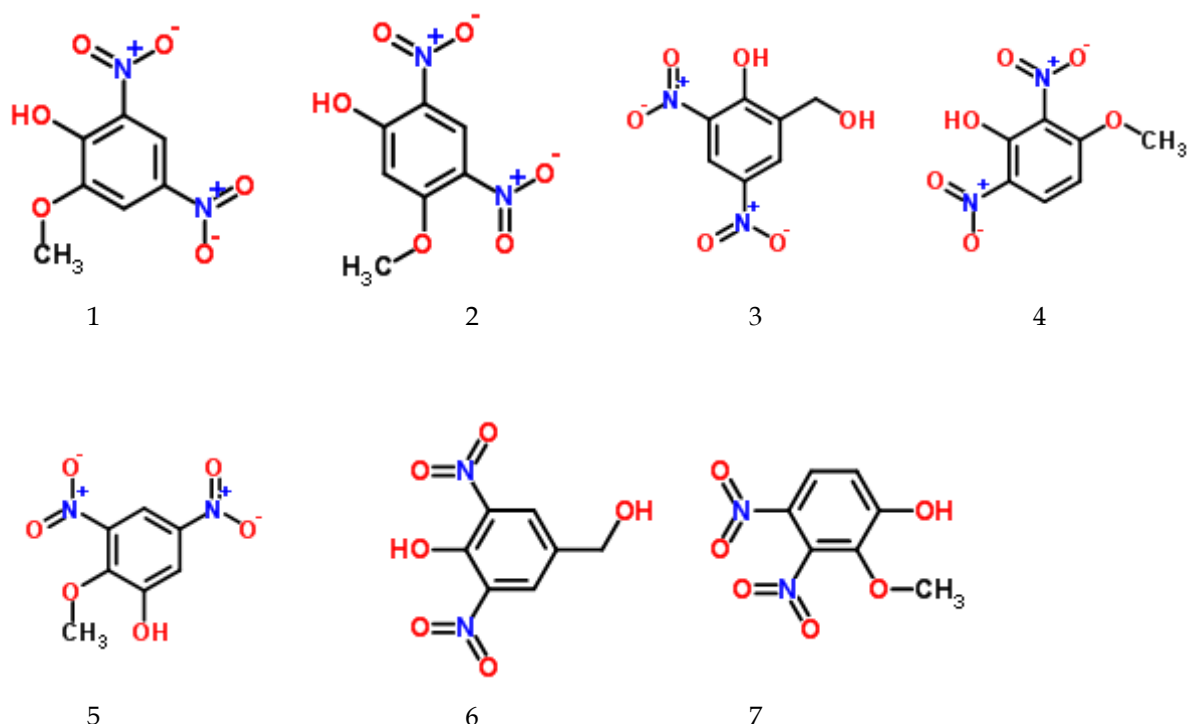
De meest waarschijnlijke bruto formule (hit no. 1) voor het [M-H]⁻ ion is C₇H₅O₆N₂. De massa afwijking tussen de gemeten en theoretisch massa bedraagt slechts 0,004 ppm. Dit is ook de enige brutoformule zonder de elementen P en/of S. De aanwezigheid van S in de verbinding is gezien het isotopenpatroon niet waarschijnlijk.

Op basis van de brutoformule C₇H₆O₆N₂ is gezocht in de grootste bibliotheek met chemische structuren die op dit moment beschikbaar is: Chemspider (www.chemspider.com). Hieruit bleek dat 23 stoffen aan de brutoformule C₇H₆O₆N₂ voldoen. In bijlage III zijn deze chemische structuren opgenomen.

Omdat sommige van deze 23 stoffen zowel een respons bij negatieve als bij positieve ionisatie geven, zijn alle fracties ook gescreend op het geprotoneerde ion met behulp van een positieve ionen meting (ion met m/z 215,02986). Dit ion was echter niet aantoonbaar in de negen onderzochte fracties. Dit betekent waarschijnlijk dat de stof slecht of niet ioniseert onder de condities voor positieve ionen. Een stof met een basisch karakter is hierdoor zeer onwaarschijnlijk. Wel waarschijnlijk is een stof met hydroxy- en/of carbonzuurgroepen, deze kunnen namelijk makkelijk een proton afstaan.

Om het aantal mogelijkheden voor de chemische structuur verder te beperken is de berekende logK_{ow} meegenomen in de beoordeling van structuren, evenals het feit dat de doelstof een zuur karakter heeft. Als alleen stoffen met een logK_{ow} van $1,2 \pm 1$ in aanmerking worden genomen blijven er in totaal 7 structuren over van de oorspronkelijke 23 stuks uit Chemspider (figuur 3). Vijf van deze stoffen (no. 1, 2, 4, 5 en 7) zijn structurele isomeren van dinitromethoxyfenol, de andere twee stoffen zijn structurele isomeren van dinitro(hydroxymethyl)fenol (no. 3 en 6).

In de beschikbare Ames test databases (CCRIS en EMIC) werden geen van deze 7 structuren teruggevonden, er waren daarom geen mutageniteitsdata van deze stoffen bekend, om verder onderscheid te kunnen maken tussen de structuren.



Figuur 3: Mogelijke chemische structuren voor brutoformule $C_7H_5O_6N_2$, rekening houdend met de mogelijk $\log K_{ow}$ en het zure karakter van de stof.

2.5.3 Vergelijking met één van de stoffen in pure vorm

Om vast te stellen of één van bovenstaande stoffen de gezochte stof was, is nagegaan welke stoffen in zuivere vorm te koop zijn. Met behulp van de zuivere stof kan dan de retentietijd en het massaspectrum worden bevestigd. Van deze zeven stoffen bleek er destijds één verkrijgbaar als zuivere stof, namelijk stof no. 2 (stofnaam 5-methoxy-2,4-dinitrofenol, $\log K_{ow}=1,80$). Van deze stof is een stockoplossing gemaakt waaruit een verdunde oplossing met een concentratie van 1 mg/L is gemaakt. Hiervan is 5 μ l geïnjecteerd op de LC Orbitrap-MS onder dezelfde condities als de extracten met de doelstof eerder.

De retentietijd van 5-methoxy-2,4-dinitrofenol bleek afwijkend te zijn ten opzichte van die van de doelstof. De retentietijd verschilde circa 1 minuut op een totale analysetijd van 40 minuten. Ook bleek dat de retentietijd van de doelstof minder verschoof onder invloed van de zuurgraad van het LC-eluent dan 5-methoxy-2,4-dinitrofenol. Met deze toch zeer gelijkende stof kon wel beter een indicatie verkegen worden van de concentratie van de doelstof. De concentratie van de doelstof in het oorspronkelijk water van de fractie met de hoogste Ames respons (Ohio rivier, na MD-UV), berekend ten opzichte van 5-methoxy-2,4-dinitrofenol werd bepaald op ca. 64 ng/l.

Voor het bepalen van de productionen van de stof 5-methoxy-2,4-dinitrofenol werd een oplossing van 5 mg/L in methanol geanalyseerd door middel van directe infusie met een flow van 5 μ l/min in de LC-Orbitrap. Hierbij werd stapsgewijs de accurate productionen bepaald en gemeten (zie tabel 7).

Tabel 7: Gemeten accurate productionen van de referentiestof 5-methoxy-2,4-dinitrofenol.

Type experiment	Gemeten accurate massa (Da)	Relatieve intensiteit (%)	Bruto formule	Massaafwijking (ppm)	Ion type
Full scan (resolutie 30.000)	213.01494	100	C ₇ H ₅ O ₆ N ₂	-1,74	[M-H] ⁻
ms2 van m/z=213 (resolutie 7.500)	197,99193	100	C ₆ H ₂ O ₆ N ₂	0,47	[M-H-CH ₃] ⁻
ms3 van 213→198 (resolutie 7.500)	169.99687	100	C ₅ H ₂ O ₅ N ₂	-0,28	[M-H-CH ₃ -CO] ⁻
ms3 van 213→198 (resolutie 7.500)	139.99895	5	C ₅ H ₄ O ₂ N	0,11	[M-H-CH ₃ -CO-NO] ⁻
ms4 van 213→198→139 (resolutie 7.500)	n.a	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.

Opmerking: Normalized Collision Energy (NCE): 40, activation time: 0,25 ms.

n.a.: niet aangetoond

Bij de referentiestof werd dus één production gemeten dat gelijk was aan het production dat gevonden was voor de doelstof, namelijk ion 198.

Om een indruk te verkrijgen van de concentratie in water is de piekrespons van de doelstof vergeleken met een interne standaardstof (chlooroxuron) die in een concentratie van 1,0 µg/l aan het water was toegevoegd. De geschatte concentratie van de doelstof is bepaald op ongeveer 50-100 ng interne standaard equivalenten (chlooroxuron)/l

Samengevat, kan uit bovenstaande experimenten, uitgevoerd met de zuivere stof 5-methoxy-2,4-dinitrofenol, worden geconcludeerd dat de doelstof niet 5-methoxy-2,4-dinitrofenol is.

2.5.4 Analyse van een nieuw extract

Om meer informatie over de productionen van de doelstof te verkrijgen en zo tot verdere structuuropheldering te komen, werd een apart extract opgewerkt van Maaswater van na MD-UV/ H₂O₂ -behandeling in een pilotinstallatie van Dunea (KWR code C-09 3592). Eén liter van het water werd na aanzuring (pH 2,3) geëxtraheerd met 200 mg Oasis®-HLB in een glazen kolom en deze werd vervolgens geëluëerd met 7,5 mL acetonitril:methanol 80:20. Dit eluaat werd niet ingedampt en omgezet in een DMSO-extract, zoals bij de vorige monsters, maar werd bewaard bij -20°C tot de parallelle extracten (wel in DMSO) waren getest in de Ames II test. In een parallel extract van dit water was ook een verhoogde respons in de Ames fluctuatietest gemeten.

Vervolgens werd het eluaat, dat bewaard was voor chemische analyse, ingedampt en overgebracht naar een oplossing van 90% water en 10% methanol (concentratiefactor 2000). Hiervan werd 20 µl (overeenkomend met 40 mL water) geïnjecteerd. Door afwezigheid van DMSO en de beschikbaarheid van meer extract dan in de eerste analyses, kon een grotere hoeveelheid worden geïnjecteerd, waardoor productionen beter zichtbaar zouden zijn. Dezelfde meetcondities werden aangehouden als bij de eerste analysesreeks (tabel 4), met één verschil. Om een betere negatieve ionisatie te verkrijgen en daarmee een hogere meetgevoeligheid, werd er post-kolom een base toegevoegd aan het eluens (100 µl/min van een 3% van ammoniumhydroxide in methanol/water; 50/50 volumepercenten). Het LC-chromatogram is opgenomen in bijlage IV. Vervolgens werden stapsgewijs de accurate productionen bepaald en gemeten (zie tabel 8).

Tabel 8: Gemeten accurate productionen van de doelstof in een geconcentreerd extract van behandeld Maaswater en geoptimaliseerde MS-condities

Type experiment	Gemeten accurate massa (Da)	Relatieve intensiteit (%)	Bruto formule	Massaafwijking (ppm)	Ion type
Full scan (resolutie 30.000)	213.01465	100	C ₇ H ₅ O ₆ N ₂	-3,10	[M-H] ⁻
ms2 van m/z=213 (resolutie 7.500)	197,99134	100	C ₆ H ₂ O ₆ N ₂	-2.48	[M-H-CH ₃] ⁻
ms3 van 213→198 (resolutie 7.500)	154.00153	100	C ₅ H ₂ O ₄ N ₂	-3.05	[M-H-CH ₃ -CO ₂] ⁻
ms4 van 213→198→154 (resolutie 7.500)	n.a	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.

Opmerking: Normalized Collision Energy (NCE): 40, activation time: 0,25 ms.

n.a.: niet aangetoond

De accurate massa's van de gevormde productionen waren 197.99134 (MS2) en 154,00153 (MS3). De meest waarschijnlijke brutoformules voor deze productionen zijn C₆H₂O₆N₂ (een verlies van CH₃, bijvoorbeeld vanaf een methoxygroep) en C₅H₂O₄N₂ (een verlies van CO₂). Omdat de productionen van de doelstof voor een deel gelijk bleken aan die van 5-methoxy-2,4-dinitrofenol en de retentietijd in de buurt lag, leek een isomeer van methoxydinitrofenol waarschijnlijk voor de structuur van de doelstof.

Omdat de doelstof eerder elueerde dan 5-methoxy-2,4-dinitrofenol is de hydrofilititeit van de doelstof waarschijnlijk groter en wordt een kleinere logK_{ow} verwacht. Van de 5 isomeren heeft 5-methoxy-2,4-dinitrofenol echter de laagste logK_{ow} (tabel 9). De logD (distributiecoëfficiënt) waarden waren niet te voor alle isomeren te vinden. De stof met de logK_{ow} die het dichtst in de buurt komt van 5-methoxy-2,4-dinitrofenol is 3-methoxy-2,6-dinitrofenol (logK_{ow}=1,94). De logK_{ow} van de andere drie isomeren is groter dan 2,0. Op basis van deze gegevens zou 3-methoxy-2,6-dinitrofenol de meest waarschijnlijke structuur zijn.

Tabel 9: LogKow en logD van de vijf isomeren van methoxydinitrofenol(bron: www.chemspider.com)

Structuur no	Stofnaam	ACD/logKow	ACD/logD (pH 5,5)	ACD/logD (pH 7,4)
1	2-methoxy-4,6-dinitrofenol	2,05	0,58	-0,89
2	5-methoxy-2,4-dinitrofenol	1,80	-	-
3	2-methoxy-4,5-dinitrofenol	2,35	1,64	-0,07
4	3-methoxy-2,6-dinitrofenol	1,94	-	-
5	4-methoxy-2,6-dinitrofenol	2,31	0,87	-0,62

- = niet bekend; logP = partitie coëfficiënt; logD = distributie coëfficiënt

2.6 Voorlopige conclusie

Op basis van deze gegevens uit de massaspectrometrie is de exacte structuur van de doelstof niet vast te stellen. Zeer waarschijnlijk betreft het een isomeer van methoxydinitrofenol. De precieze positie van de diverse functionele groepen is echter niet eenduidig vast te stellen. Daarvoor is aanvullend onderzoek met een andere identificatie techniek (NMR) nodig.

De geschatte concentratie van de doelstof is bepaald op ongeveer 50-100 ng interne standaard equivalenten (chlooroxuron)/L

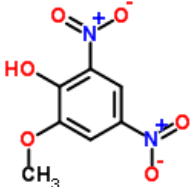
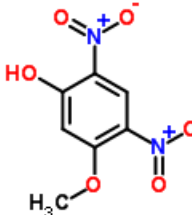
3 Inschatting genotoxiciteit van kandidaatstoffen met QSARs

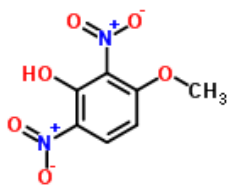
Vijf isomeren van methoxydinitrofenol (zie tabel 9), zijn getest op aanwezigheid van genotoxische groepen met behulp van QSARs. QSARs zijn "Quantitative Structure-Activity Relationships": relaties tussen de structuur van een stof en in dit geval zijn toxische eigenschappen. Deze relaties zijn gebaseerd op de gemeten toxiciteit van bekende structuren en zijn beschikbaar via diverse software programma's, die elk op een andere manier deze relaties hebben vastgesteld (zie ook BTO 2005.021).

De vijf structuren bevatten allemaal twee aromatische nitro-groepen waarvan bekend is dat deze een hoge potentie voor mutageniteit en carcinogeniteit hebben (Ashby et al., 1989). Het is daarom al "op het oog" te verwachten dat deze structuren positief zijn in de Ames test, wat de waarschijnlijkheid versterkt dat één of meerdere van deze structuren verantwoordelijk is voor de gemeten Ames respons na UV-oxidatie.

Andere groepen op een molecuul kunnen deze potentie echter beïnvloeden, bijvoorbeeld door sterische hindering. Veel QSAR programma's bevatten ook de effecten van dergelijke modulerende groepen. Daarom zijn de vijf structuren getest op Ames test mutageniteit (ter vergelijking met de gevonden respons in de Ames fluctuatie test) en carcinogeniteit (om alvast een idee te hebben of de stof naast mutageen ook carcinogeen kan zijn) met de QSAR programma's HazardExpert, Toxtree en Lazar. De voorspellingen zijn weergegeven in tabel 10 en 11.

Tabel 10: Voorspelling van de mutageniteit van de vijf meest waarschijnlijke structuren van de doelstof

Stofnaam	Structuur	Voorspelling mutageniteit door HazardExpert	Voorspelling mutageniteit door Toxtree	Voorspelling mutageniteit door Lazar ¹⁾
2-methoxy-4,6-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Genotoxisch (aromatische nitro groep)	Mutageen (0,0772 en 0,16)
5-methoxy-2,4-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Genotoxisch (aromatische nitro groep)	Mutageen (0,239 en 0,16)
2-methoxy-4,5-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Genotoxisch (aromatische nitro groep)	Niet mutageen (0,0274 en 0,0742)

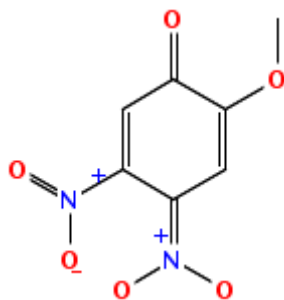
3-methoxy-2,6-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Genotoxisch (aromatische nitro groep)	Mutageen (0,0641 en 0,239)
4-methoxy-2,6-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Genotoxisch (aromatische nitro groep)	Mutageen (0,16 en 0,116)

¹⁾ Beide databases (Kazius-Bursi en DSSTox) zijn meegenomen en bij tegenstrijdige voorspellingen is dit vermeld. Tussen haakjes staat de betrouwbaarheidsindex van beide voorspellingen, een betrouwbaarheidsindex boven 0,025 geldt bij Lazar als betrouwbaar en verder is het hoe hoger het getal, hoe hoger de betrouwbaarheid.

Op basis van de aromatische nitro-groep geeft HazardExpert een voorspelling dat de structuren zeer waarschijnlijk mutageen zijn. Uit de database met de beschrijving van het toxische fragment en de modulerende groepen bleek dat de verschillen tussen deze vijf isomeren niet uitmaken voor de voorspelling van de mutageniteit.

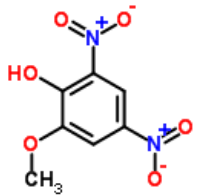
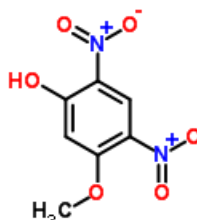
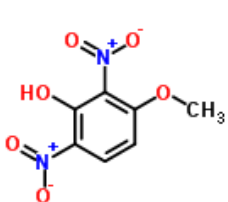
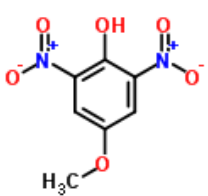
Bij Toxtree bleek het cruciaal om ook de ladingen op de atomen in de structuur aan te brengen. Volgens de regels van Toxtree (de Benigni/Bossa Rulebase) voor de "alert" van een aromatische nitro groep is de voorspelling voor genotoxiciteit en carcinogeniteit niet geldig als beide posities ortho ten opzichte van de nitro groep bezet zijn, ook niet als er op een ortho positie een carboxylgroep aanwezig is en niet als er een sulfonzuur aanwezig is op dezelfde ring als de nitro groep. Van deze modulerende groepen is bij deze isomeren wel sprake (ortho-disubstitutie bij 3-methoxy-2,6-dinitrofenol), maar er is dan nog een tweede aromatische nitro-groep die wel aan één kant vrij is. Er zijn daarom ook volgens Toxtree geen verschillen te verwachten in de genotoxische en carcinogene eigenschappen van de vijf isomeren.

Lazar werkt met het analyseren van de gelijkenis op stoffen in databases, en daarbij worden voor de verschillende isomeren wel verschillende maten van gelijkenis gevonden met de stoffen in de databases. Hierdoor kan de betrouwbaarheidsindex verschillen. Echter, omdat de structurele verschillen tussen de isomeren klein zijn in vergelijking met de verschillen met de stoffen in de databases, komen ook hier geen verschillen in de uiteindelijke voorspelling uit. Bij 2-methoxy-4,5-dinitrofenol gebeurt er echter iets bijzonders: de ingevoerde structuur wordt herschikt naar de structuur in figuur 4, waarvoor veel minder gelijkende stoffen in de database worden gevonden en waar ook een afwijkende voorspelling voor wordt verkregen. Mogelijk is deze structuur chemisch stabielere dan het ingevoerde isomeer, en zal het dus eerder in deze vorm voorkomen.



Figuur 4. De chemische structuur waarin 2-methoxy-4,5-dinitrofenol wordt omgezet door Lazar.

Tabel 11 Voorspelling van de carcinogeniteit van de vijf meest waarschijnlijke structuren van de doelstof

Stofnaam	Structuur	Voorspelling carcinogeniteit door HazardExpert	Voorspelling carcinogeniteit door Toxtree	Voorspelling carcinogeniteit door Lazar ¹
2-methoxy-4,6-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Carcinogeen (aromatische nitro groep)	Tegenstrijdige voorspellingen
5-methoxy-2,4-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Carcinogeen (aromatische nitro groep)	Tegenstrijdige voorspellingen
2-methoxy-4,5-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Carcinogeen (aromatische nitro groep)	Tegenstrijdige voorspellingen
3-methoxy-2,6-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Carcinogeen (aromatische nitro groep)	Tegenstrijdige voorspellingen
4-methoxy-2,6-dinitrofenol		Zeer waarschijnlijk (aromatische nitro groep)	Carcinogeen (aromatische nitro groep)	Tegenstrijdige voorspellingen

¹ Alle zes de databases (DSSTox muis, rat, hamster, single cell call, Multi cell call en ISSCAN v3a) zijn meegenomen. De eindconclusie is gebaseerd op deskundige analyse van de zes verschillende voorspellingen, bij tegenstrijdige voorspellingen is dit vermeld. Tussen haakjes staat de betrouwbaarheidsindex van beide voorspellingen, een betrouwbaarheidsindex boven 0,025 geldt bij Lazar als betrouwbaar en verder geldt "hoe hoger het getal, hoe hoger de betrouwbaarheid".

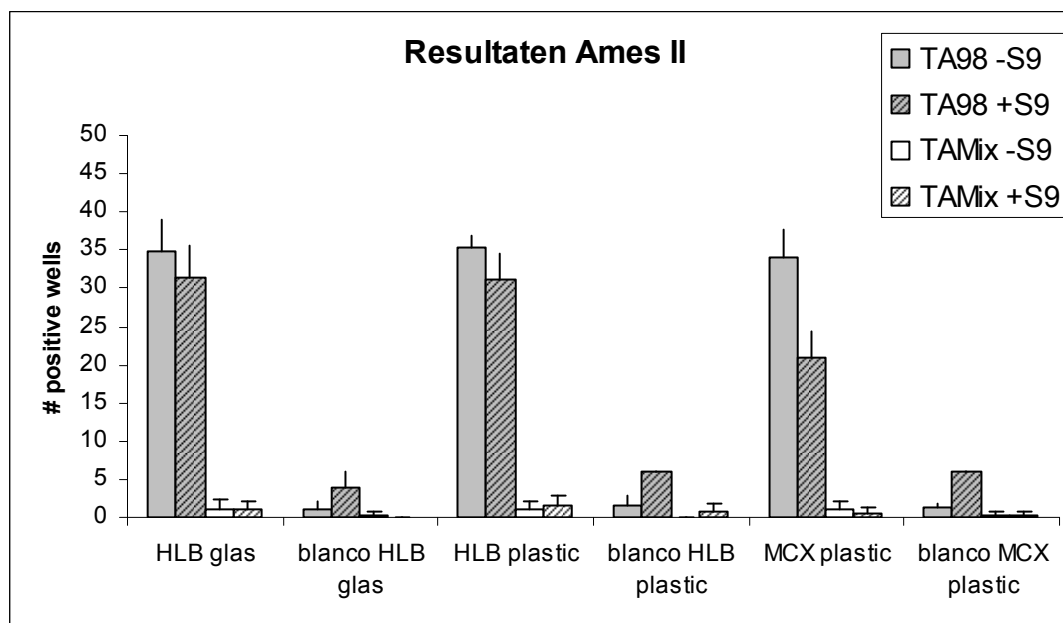
Uit de QSAR analyse kan met hoge zekerheid geconcludeerd worden dat alle vijf de isomeren positief in de Ames test en carcinogeen kunnen zijn. Op basis van de QSAR analyse kan geen onderscheid gemaakt worden welke isomeer een hogere waarschijnlijkheid heeft om de gezochte doelstof te zijn.

4 NMR analyse

4.1 Extractie van de stof uit water

Om te kunnen bepalen welke van de vijf mogelijk structuren de juiste was voor de doelstof, werd een NMR analyse uitgevoerd. Voor de identificatie door middel van NMR is doorgaans circa 25-100 µg aan absolute hoeveelheid stof nodig om betrouwbare metingen uit te kunnen voeren. Omdat bij een waterfractie de matrix relatief gering is in vergelijking met bijvoorbeeld planten extracten kan naar verwachting met 25 µg aan absolute hoeveelheid stof worden volstaan. De concentratie van de doelstof was bepaald op ongeveer 50-100 ng interne standaard equivalenten (chlooroxuron)/L. Om minimaal 25 µg van de doelstof te isoleren voor NMR analyse was daarom ongeveer 500 liter water nodig.

Er waren verschillende opties om een dergelijk groot volume te extraheren. Omdat er aanwijzingen waren uit resultaten van anderen (Penders *et al.*, 2009), dat XAD-4 de stof mogelijk niet extraheerde, en op het moment van keuze hier nog geen eigen resultaten over waren, is ervoor gekozen de extractie niet met XAD-4 uit te voeren. Met Oasis® HLB was de stof wel geëxtraheerd, en iets beter dan met Oasis® MCX (figuur 5). In deze figuur is ook te zien dat er geen verschil is tussen het gebruik van 200 mg Oasis® HLB kolommen van glas en 500 mg Oasis® HLB kolommen van plastic. Er waren geen kolommen commercieel beschikbaar met meer dan de 500 mg Oasis® HLB die al getest was, wel disks met 1 g Oasis® HLB. Daar was echter geen ervaring mee. Daarom werd besloten om de 500 liter water te extraheren met 500 mg Oasis® HLB.



Figuur 5: Ames II respons van water behandeld met MD UV-oxidatie na extractie met verschillende Oasis® materialen en kolomsoorten.

4.1.1 Monstername

Een totaal van 500 L water werd bemonsterd van het effluent van de MD UV-oxidatiestap in de pilotinstallatie van Dunea bij Bergambacht. De monstername werd uitgevoerd in de maanden november en december 2010. Gedurende vier weken werd elke maandag een hoeveelheid van circa 160 liter water bemonsterd in schoongemaakte flessen van borosilicaat waaraan vooraf 0,3 gram/L natriumsulfiet was toegevoegd om het restant H₂O₂ te neutraliseren. Bij elke monstername werd er voor zorg gedragen dat de UV lampen (twee keer 2,2 kW) minimaal een half uur waren opgewarmd, het systeem ontlucht was

en voldoende was doorgestroomd. Tijdens elke monsternamen werden de waterkwaliteitsparameters vastgelegd (tabel 12).

Tabel 12. Waterkwaliteitsparameters op de monsternamedata.

	11/22/2010	11/29/2010	12/6/2010	12/13/2010
flow proefinstallatie m ³ /h	5	5	5	5
H ₂ O ₂ PPM	10	10	10	10
Temp °C	8.1	5.7	2.3	2.71
UV ballast	100%	100%	100%	100
UVTransmissie %	72.4	73.4	72.6	71.8
UV intensiteit laatste sensor %	48	38	26	18
Influent (Snelfiltraat) FTU	0.171	0.130	0.161	0.199

Opmerkelijk was dat de onderzochte waterfractie relatief veel uitgeslagen polderwater bevatte (deze matrix bestaat voornamelijk uit humusachtige verbindingen). Door het uitgeslagen polderwater was de kleur van het monster geel en werd deze elke week steeds donkerder. Dit kan ook de toegenomen troebelheid (FTU) en de afname van de gemeten UV intensiteit van de laatste sensor verklaren. Na monsternamen werden de monsters direct in batches van 40 liter klaargemaakt voor extractie en opgeslagen bij een temperatuur 4°C.

4.1.2 Groot volume opwerking

Voorafgaand aan de extractie werden de waterfracties aangezuurd met behulp van een zoutzuur (Merck suprapur 30%) oplossing tot pH 2,3. Hierna werden de automatische extractie en elutie bewerkstelligd met een Gilson (Middleton, WI, U.S.A.) Trilution LH automatische extractie apparaat, gebruikmakend van 500-mg Oasis® HLB cartridges (Waters Corporation, Milford, USA). De parameters van deze extractie staan in tabel 13.

In dit extractie apparaat is het niet mogelijk een zandfilter bovenop de extractiekolommen te monteren. De fracties zijn daarom bij deze extractie niet vooraf gefiltreerd, zoals eerder wel gebeurde. Omdat de waterfracties relatief schoon waren, was dit echter geen probleem.

Elke volgende dag werden de eluaten overgebracht in puntbuizen en werd direct een nieuwe batch van 40 liter klaargemaakt en opgestart. Op deze manier werd 160 liter per week, en in totaal 500 liter water geëxtraheerd.

Tabel 13: Parameters van de extractie van 500 liter water

Handeling	Parameter
Aanzuren	pH 2,3 met HCL (Merck suprapur 30%)
Conditionering	8 ml acetonitril
	8 ml methanol
	8 ml Evian pH2,3 (HCl)
Isolatie	2000 ml water/cartridge, 10 ml/min
Clean-up	8 ml Evian pH 2,3 (HCl)
Drogen	Nitrogen 60 min
Elutie	10 ml methanol
Droogblazen	250 µl

In de eerste week werd gebruik gemaakt van een elutie met 20% methanol in acetonitril, maar concentratie van deze fracties tot 250 µl zorgde voor een gelige neerslag. Doordat er al bij 1/250 deel van het totale eindextract een neerslag ontstond werd besloten om geen gebruik meer te maken van elutie met een mengsel van acetonitril en methanol, maar uitsluitend gebruik te maken van methanol. Een kleine ad hoc studie wees uit dat het neerslag goed oplosbaar was in methanol en de te onderzoeken stof hiermee ook net zo goed geëluëerd werd.

Van elke 2 liter watermonster werd een SPE-extract van 10 mL gemaakt. Alle 250 extracten werden ingedampt onder stikstof en samengevoegd tot uiteindelijk één eindextract van circa 8 ml met een concentratiefactor van circa 62500. Deze oplossing was helder en donkerbruin gekleurd.

4.2 Eerste zuiveringsronde

Direct identificeren van een stof met behulp van NMR is vaak niet mogelijk omdat een extract te veel storende stoffen bevat. Hierdoor wordt het NMR-spectrum dusdanig beïnvloed dat een betrouwbare identificatie niet mogelijk is. Om die reden was het nodig om het extract in fracties te scheiden zodat de doelstof en de storende stoffen zoveel mogelijk gescheiden werden.

Voor de fractionering is gebruikt gemaakt van preparatieve LC, gekoppeld met Photodiode Array-Detector (PAD) en accurate MS.

Na een korte inventarisatie van diverse LC-preparatieve kolommen werd besloten om de fractionering uit te voeren met behulp van een C18-kolom van Waters die een hoge belaadbaarheid heeft.

De opstelling voor de eerste fractioneringsronde bestond uit de volgende onderdelen:

- Fractiewisselaar: Gilson Aspec XLi 735/402 (Gilson International B.V., Den Haag), voorzien van een 500 µl fractielus.
- HPLC-pomp: Waters 600 C (Waters Chromatography, Etten-Leur).
- Preparatieve kolom: De preparatieve kolom is 250 x 10 mm (i.d.) Xselect C18, 5 µm (Waters USA). De "guard"-kolom is 10 x 10 mm (i.d.) Xselect C18, 5 µm (Waters USA).
- Kolomthermostaat: De preparatieve kolom en de guard-kolom bevonden zich in een kolomthermostaat (Jetstream, Aurora Borealis Control, Nederland). Voor de eerste fractioneringsronde van het totaalextract is de temperatuur op 20 °C ingesteld. Tijdens de tweede fractioneringsronde is de temperatuur op 30 °C gehandhaaft.
- Photodiode Array-Detector (PAD): Waters 2996 (Waters Chromatography, Etten-Leur) met een ingesteld golflengte bereik tussen de 200 en 350 nm.
- Massaspectrometer: LTQ FT Orbitrap MS
- Fractieverzamelaar: Model 202 (Gilson International B.V., Den Haag).
- De voor de HPLC gebruikt eluentia en gradiëntprogramma's staan in Tabel 12 en 13.
- Indampcentrifuge: Genevac EZ-2Plus Series Personal Evaporator (Genevac Limited, UK).

Na optimalisatie van de gradiënt, de temperatuur en de samenstelling van de injectieoplossing, aan de hand van 11 standaard stoffen, is de fractionering uitgevoerd. Het eindextract (nagenoeg 100% methanol) werd verdund tot 70% methanol met ultra-zuiver water voordat het geïnjecteerd werd. Van deze oplossing werd telkens 500 µl geïnjecteerd om te fractioneren. In het totaal werd de fractionering 14 keer herhaald ten einde het totale extract te kunnen scheiden in verzamelfracties. Per injectie werden 56 fracties van 1 minuut opgevangen en het opvangen startte telkens na 15 minuten. Uiteindelijk werden van alle injecties de corresponderende fracties samengevoegd.

Tabel 14: HPLC gradiëntprogramma voor de eerste fractioneringsronde

Tijd totaal (min)	Tijd per stap (min)	eluens A %	eluens B %	debiet ml/min	gradiënt
0	0	90	10	1	isocrat.
52	52	0	100	1	lineair
71	19	0	100	1	isocrat.
72	1	90	10	2	lineair
104	32	90	10	2	isocrat.
105	1	90	10	1	isocrat.

Eluens A = 0,05 (vol) % mierenzuur oplossing in water (ultra puur water) (Milli-Q)

Eluens B = 0,05 (vol) % mierenzuur in methanol (Baker, ultra resi-analyzed) (MeOH)

De controle op de aanwezigheid van de doelstof in de verschillende fracties werd uitgevoerd met de Orbitrap-massaspectrometer (m/z 213,01531). Fractie 42 bleek verreweg het meest van de doelstof te bevatten, de fractie ervoor veel minder en de fractie daarna bevatte de doelstof niet. Fractie 41, 42 en 43 werden ingedampt tot circa 2 ml. Vervolgens is door middel van vacuümcentrifugeren het extract geheel drooggedampt tot een poeder. Deze droge extracten werden opgeslagen in een glazen fractiebuisje tot analyse met NMR.

4.3 NMR na eerste zuiveringsronde

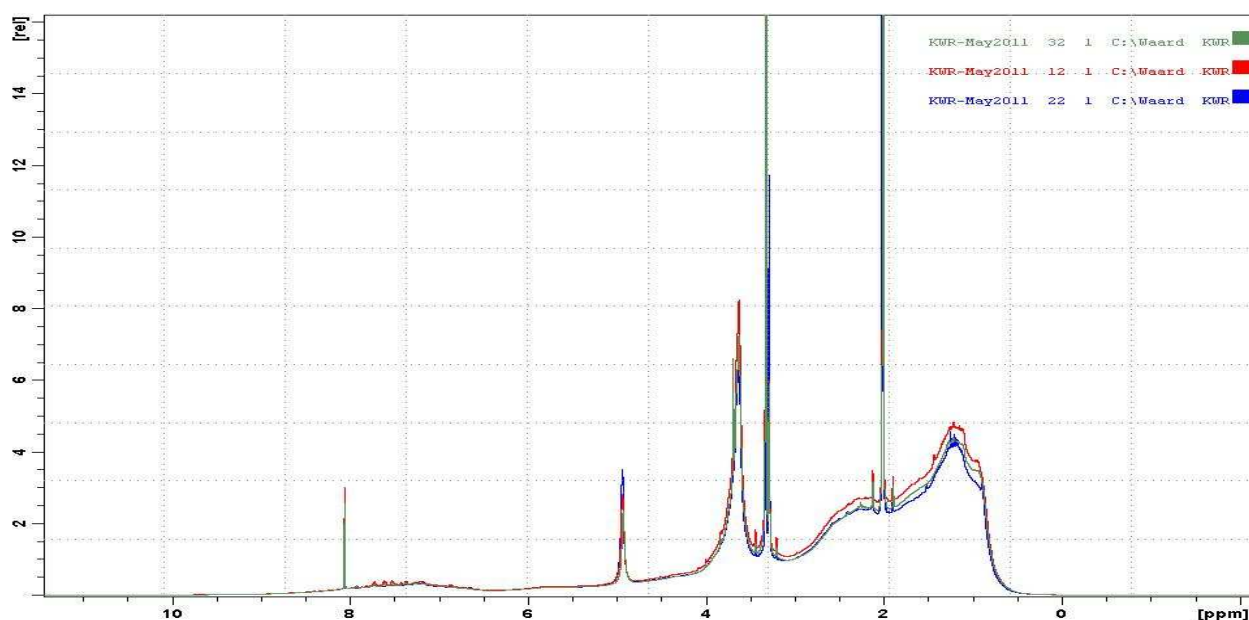
Om de drie droge fracties geschikt te maken voor NMR-analyse werd per fractie 250 microliter methanol-D₄ (Cambridge Isotope Laboratories, VS) toegevoegd. Door de buizen langzaam te schudden, werd alle poeder opgelost en werd een oranje gekleurde oplossing verkregen. Van ieder van de drie fracties werd 200 microliter in 3-mm NMR-buizen (Bruker Match-systeem) gepipetteerd en vervolgens werden NMR-spectra gemeten bij 300 K met behulp van een Avance III 600 MHz NMR-systeem met een 5 mm cryoprobe.

Er zijn drie verschillende soorten metingen uitgevoerd:

1. 1D proton NOESY
2. 1D proton CPMG
3. 2D proton JRES met 1D-projectie.

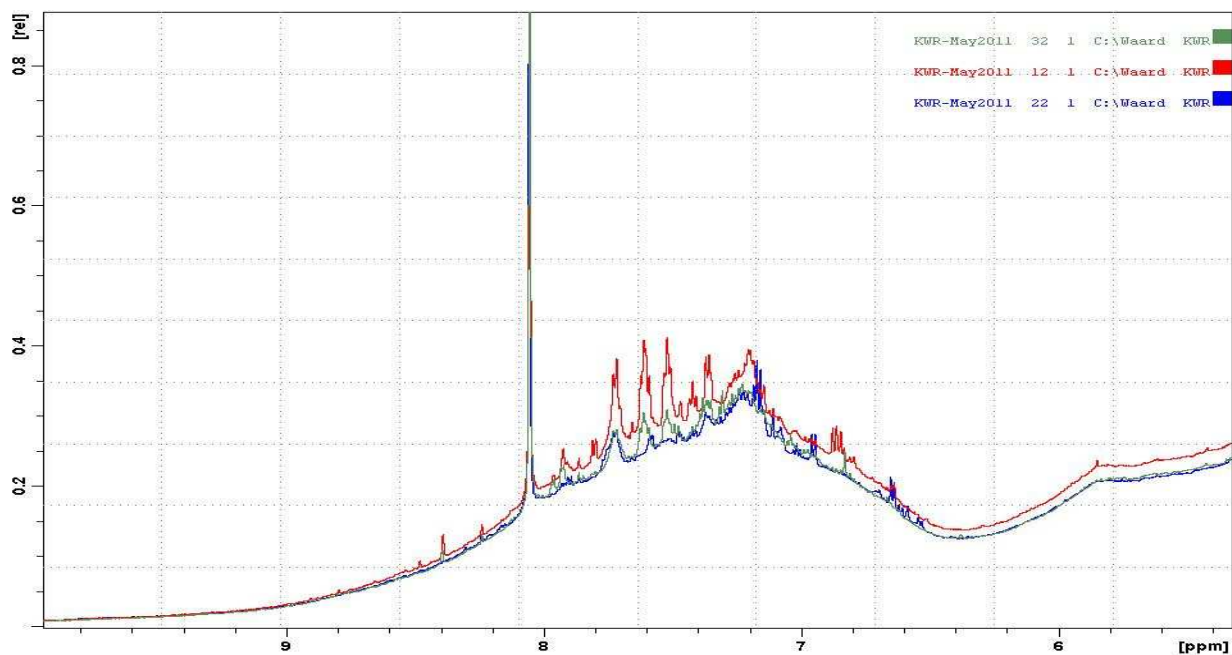
Deze drie verschillende soorten NMR-metingen leveren kwantitatieve gegevens op. De 1D proton CPMG en de 2D proton JRES met 1D-projectie maken het mogelijk om brede resonanties uit te filteren. Brede resonanties ontstaan bij grote moleculen.

De 1D NOESY-spectra van de drie fracties zijn hieronder weergegeven in figuur 6.



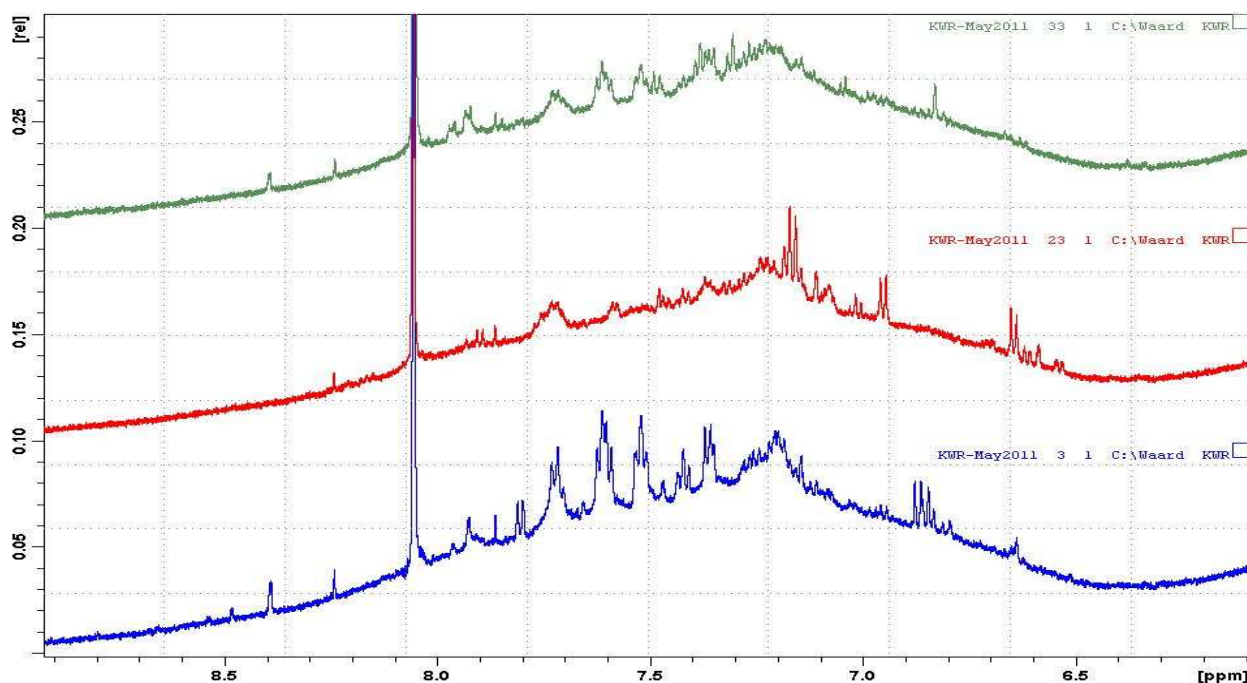
Figuur 6: 1D proton NOESY-spectra van de drie fracties (fractie 41 (blauw), fractie 42 (rood) fractie 43 (groen)).

Figuur 7 geeft het aromatische gebied van de 1D proton NOESY-spectra weer.



Figuur 7: Aromatisch gebied van de 1D proton NOESY-spectra van fracties 41 (blauw), fractie 42 (rood), fractie 43 (groen).

Figuur 6 en 7 tonen duidelijk aan dat er resonanties van belang aanwezig zijn in het aromatische gebied (het gebied tussen 6 en 10 ppm in het ^1H NMR-spectrum). Deze resonanties stijgen boven een groot achtergrondsignaal uit. Het achtergrondsignaal is breed zonder duidelijke proton NMR-kenmerken, wat duidt op de aanwezigheid van grote moleculen. Om te testen of inderdaad grote moleculen aanwezig zijn, werd een CPMG-spectrum opgenomen. In een CPMG-onderzoek worden grote en langzaam draaiende moleculen niet waargenomen. Het CPMG-spectrum van het aromatische gebied (zoals hierboven aangegeven in Figuur 7) is weergegeven in Figuur 8.

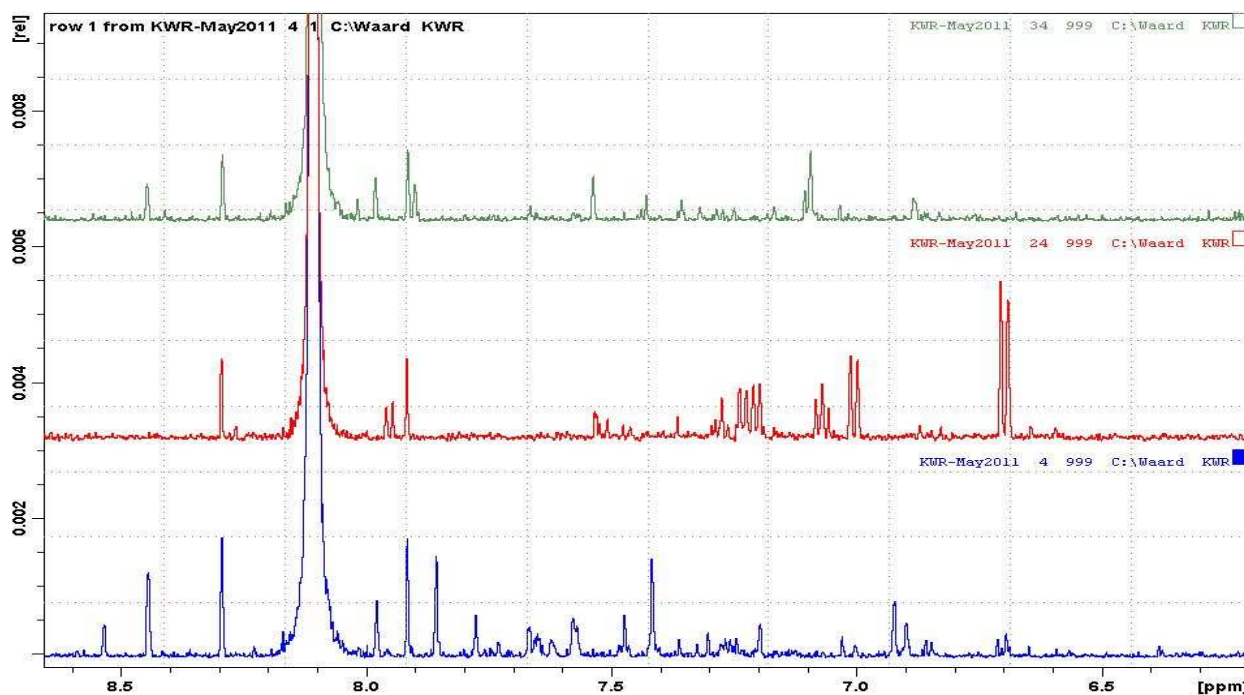


Figuur 8: 1D proton CPMG-spectrum van de drie fracties (fractie 43 (groen), fractie 41 (rood) fractie 42 (blauw)).

Bij vergelijking van Figuur 7 en Figuur 8 wordt duidelijk dat de intensiteit van het achtergrondsignaal lager is in het CPMG-spectrum (Figuur 8) dan in het NOESY-spectrum (Figuur 7). De reductie in het

achtergrondsignaal in de CPMG-spectra is een sterke indicatie dat inderdaad grote moleculen in de fractie aanwezig zijn. In de CPMG-spectra is echter nog steeds een groot achtergrondsignaal aanwezig, wat erop duidt dat ook moleculen van gemiddelde grootte aanwezig zijn (molecuulmassa's tussen de 2.000 en 20.000 Da.). Door middel van een nieuwe methode, ontwikkeld door Biqualy (Wageningen), kunnen deze in de CPMG aanwezige brede achtergrondsignalen eruit gehaald worden. Deze methode wordt JRES genoemd.

Een JRES-spectrum toont alleen resonanties aan die een duidelijke H-H-verbinding hebben. Bij projectie van de waargenomen patronen op de ^1H -as, wordt een 1D ^1H NMR-spectrum zichtbaar dat kan worden gebruikt voor gedetailleerde analyse van de samenstelling van de fracties.



Figuur 9: 2D proton JRES-spectrum van fractie 43 (groen), fractie 41 (rood), fractie 42 (blauw)

Figuur 9 laat zien dat het brede achtergrondsignaal niet langer aanwezig is en dat er een aantal scherpe pieken wordt waargenomen. Deze scherpe pieken worden veroorzaakt door aromatische protonen. De grote piek bij 8,1 ppm is afkomstig van mierenzuur, de enige niet-aromatische protonresonantie in het spectrum. Bij het vergelijken van de drie spectra blijkt dat alle drie fracties duidelijke resonanties hebben, wat duidt op de aanwezigheid van verschillende kleine moleculen in deze drie fracties. Bovendien geeft het grote aantal aromatische pieken aan dat alle drie fracties verschillende moleculen bevatten, dus alle drie fracties zijn nog steeds mengsels.

Geconcludeerd werd dat de drie fracties mengsels waren met een aanzienlijke hoeveelheid achtergrondsignaal. Verdere zuivering werd nodig bevonden voordat de structuur van de gezochte verbinding kon worden achterhaald.

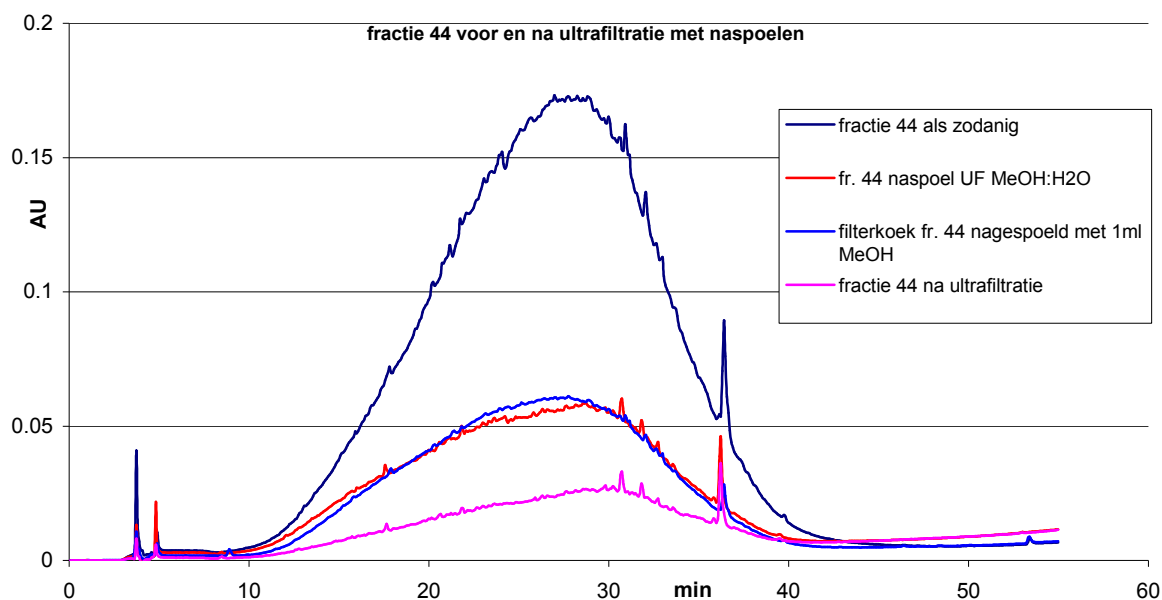
4.4 Tweede zuiveringsronde

4.4.1 Ultrafiltratie van de fracties van het totaalextract

Omdat de drie fracties nog niet zuiver genoeg waren, is geprobeerd het natuurlijk organisch materiaal (NOM) in de fracties van het totaalextract te verwijderen doormiddel van ultrafiltratie (UF).

De voor dit doel gebruikte filters waren geregenereerde cellulose filters met een Molecular Weight Cut-Off (MWCO) van 1000 Dalton (1 kD). Bij wijze van experiment werden fracties zonder de doestof, namelijk de fracties voor en na de drie doelfracties, met deze filters gefiltreerd. Het filtraat bleek minder

dan 20 % van de oorspronkelijke hoeveelheid NOM te bevatten. Echter, bij het naspoelen van de filterkoek met een oplossing van 50 (vol) % methanol in ultra-zuiver water (Milli-Q) of 100 % methanol bleek er twee maal zoveel NOM in het filtraat terecht te komen als in het eerste filtraat. Dit is mogelijk te verklaren door de aanwezigheid van methanol. Waarschijnlijk kan ultrafiltratie alleen in een (meer verdunde) volledig waterige oplossing op de juiste manier worden uitgevoerd. Ook bleken met het naspoelen nog afzonderlijke stoffen uit de filterkoek gewassen te worden. Dit was een aanwijzing dat óók de doelstof nog gedeeltelijk in de filterkoek zou kunnen achterblijven. Door bovengenoemde onzekerheden is afgezien van opwerking van de doelfractie (fractie nummer 42) doormiddel van deze techniek.



Figuur 10. Chromatogrammen van fractie 44 (hoogste respons), het ultrafiltraat (laagste respons), het naspoelen met methanol-water en het naspoelen met methanol (de middelste responsies).

4.4.2 Fractionering

De fractionering werd herhaald met dezelfde preparatieve kolom en instrumentarium als bij de eerste fractioneringsronde (zie par. 4.2) maar met een aangepaste gradiënt, temperatuur en injectievolume. Deze wijzigingen waren bedoeld om de doelstof en de storende stoffen in de betreffende fractie op een andere manier te scheiden dan bij de eerste fractioneringsronde.

Voor de tweede fractioneringsronde werd het concentraat (afkomstig van de NMR-analyse en opgelost in gedeutereerde methanol) tot 2 ml verdund in een mengsel van methanol en water (verhouding ca. 70/30). Deze oplossing was helder en donkerbruin gekleurd. De aanwezigheid van de doelstof in deze oplossingen werd bevestigd met de LC-Orbitrap MS. Van deze oplossing werd telkens 250 µl op de preparatieve kolom geïnjecteerd om te fractioneren. De fractionering startte na 10 minuten en stopte na 90 minuten, per injectie werden 70 fracties van 1 minuut opgevangen.

Tabel 15: HPLC gradiëntprogramma voor de tweede fractioneringsronde.

Tijd totaal (min)	Tijd per stap (min)	eluens A %	eluens B %	debiet (ml/min)	gradiënt
0	0	60	40	1	isocrat.
80	80	0	100	1	lineair
84	4	0	100	1	isocrat.
99	15	0	100	2	isocrat.
100	1	60	40	2	lineair
134	34	60	40	1	isocrat.
135	1	60	40	1	isocrat.

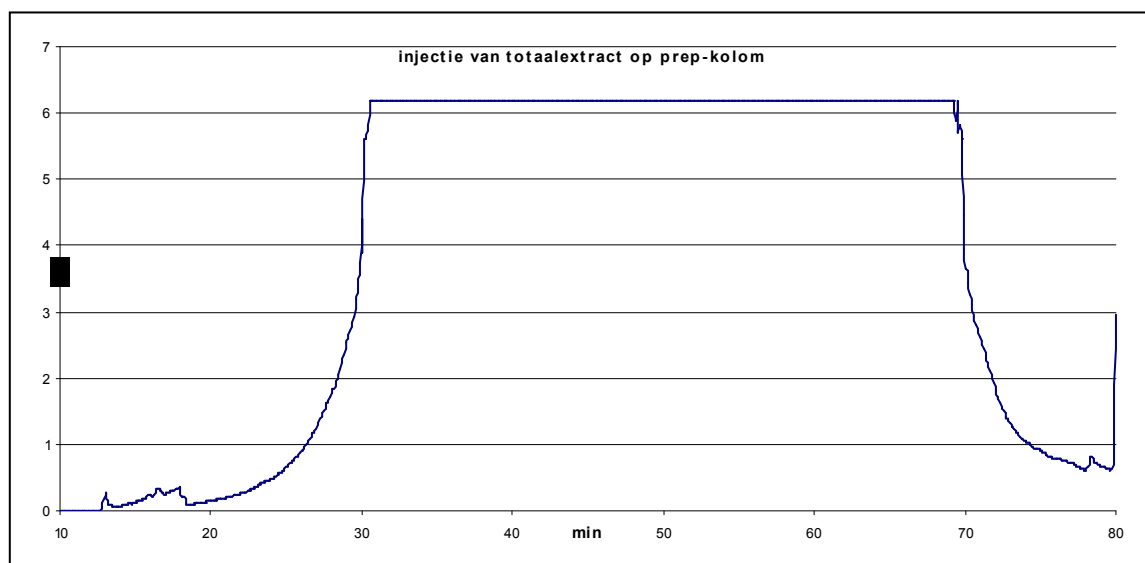
Eluens A = 0,05 (vol) % mierenzuur oplossing in ultra-puur water (Milli-Q)

Eluens B = 0,05 (vol) % mierenzuur in methanol (Baker, ultra resi-analyzed)

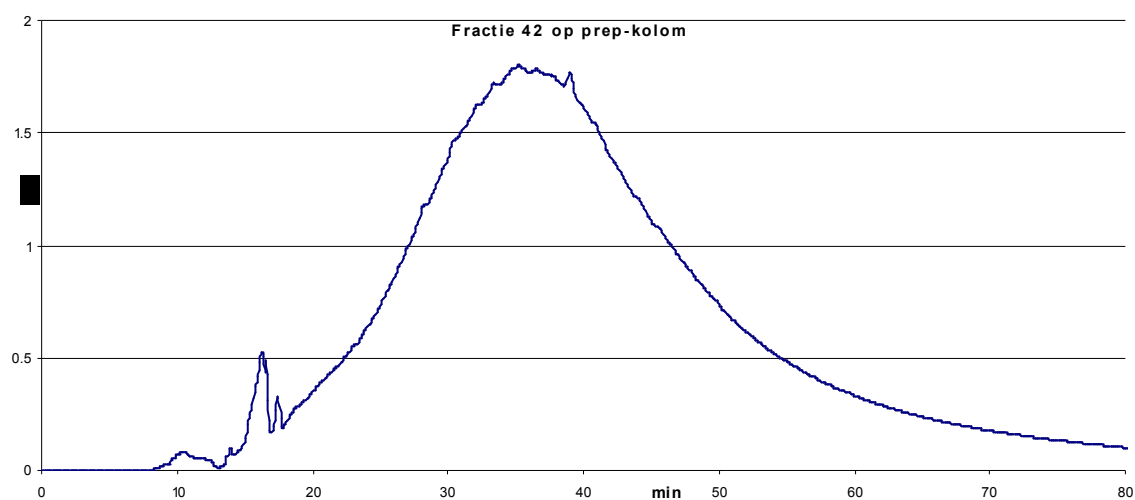
In totaal werd de fractionering 8 keer herhaald ten einde de hele oplossing te kunnen scheiden in verzamelfracties... De controle op de aanwezigheid van de doelstof (m/z 213,01531) in de verschillende fracties werd uitgevoerd met de LC- Orbitrap-MS na de eerste injectie. Fractie 29 bleek het meest van de doelstof te bevatten, in fractie 28 werd geen doelstof gemeten en fractie 30 bevatte ook minder van de doelstof. Fractie 31 bevatte nog een spoortje van de doelstof.

De verzamelfracties 27, 28, 29, 30 en 31 werden met stikstof ingedampt tot circa 1 ml. Deze voornamelijk waterige fracties werden met behulp van een vacuümcentrifuge bij de WUR in Wageningen drooggedampt en vervolgens met NMR geanalyseerd (zie paragraaf 4.5).

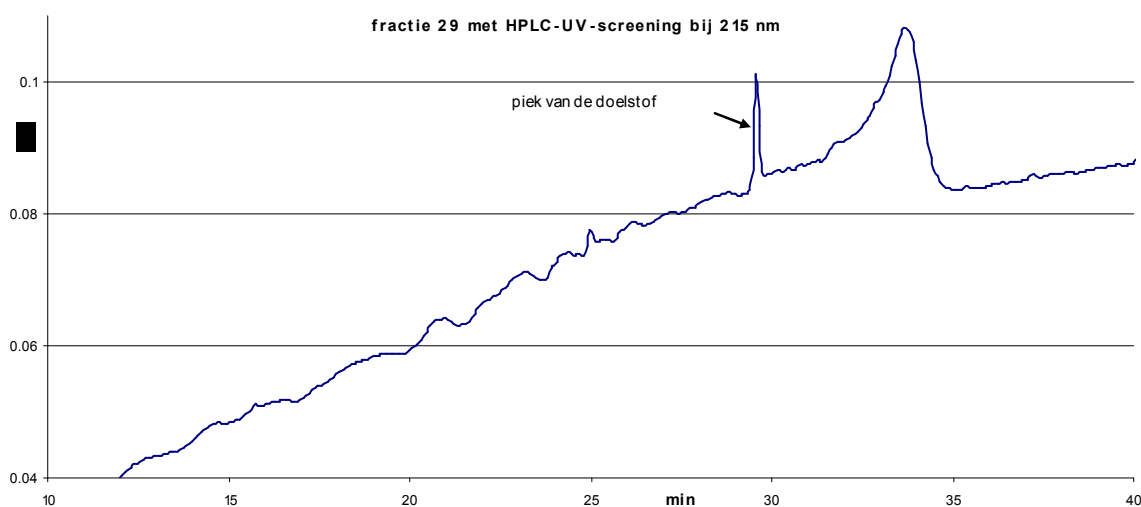
In figuren 11-13 zijn de LC-UV chromatogrammen te zien van het totaalextract, van fractie 42 na de eerste zuiveringsronde en van fractie 29 na de tweede fractioneringsronde. Er is duidelijk te zien dat het signaal in het totaalextract (figuur 11) ver buiten het meetbereik valt omdat de UV-detector werd verzadigd door de grote hoeveelheid NOM dat daarin aanwezig was. Na de eerste fractioneringsronde (figuur 12) is de hoeveelheid UV-absorberend materiaal (zoals NOM) duidelijk verminderd en is de piek van de doelstof op een grote bult van het NOM zichtbaar. De tweede fractioneringsronde leverde een nog schonere fractie met de doelstof op (figuur 13). Hierin is nog steeds absorptie door de matrix, maar de piek van de doelstof is goed gescheiden van storend materiaal.



Figuur 11: LC-UV chromatogram van totaalextract. De doelstof is niet zichtbaar door het hoge achtergrondsignaal



Figuur 12. LC-UV chromatogram van fractie 42 (eerste fractioneringsronde). De doelstof is aanwezig op een retentietijd van circa 39 minuten.



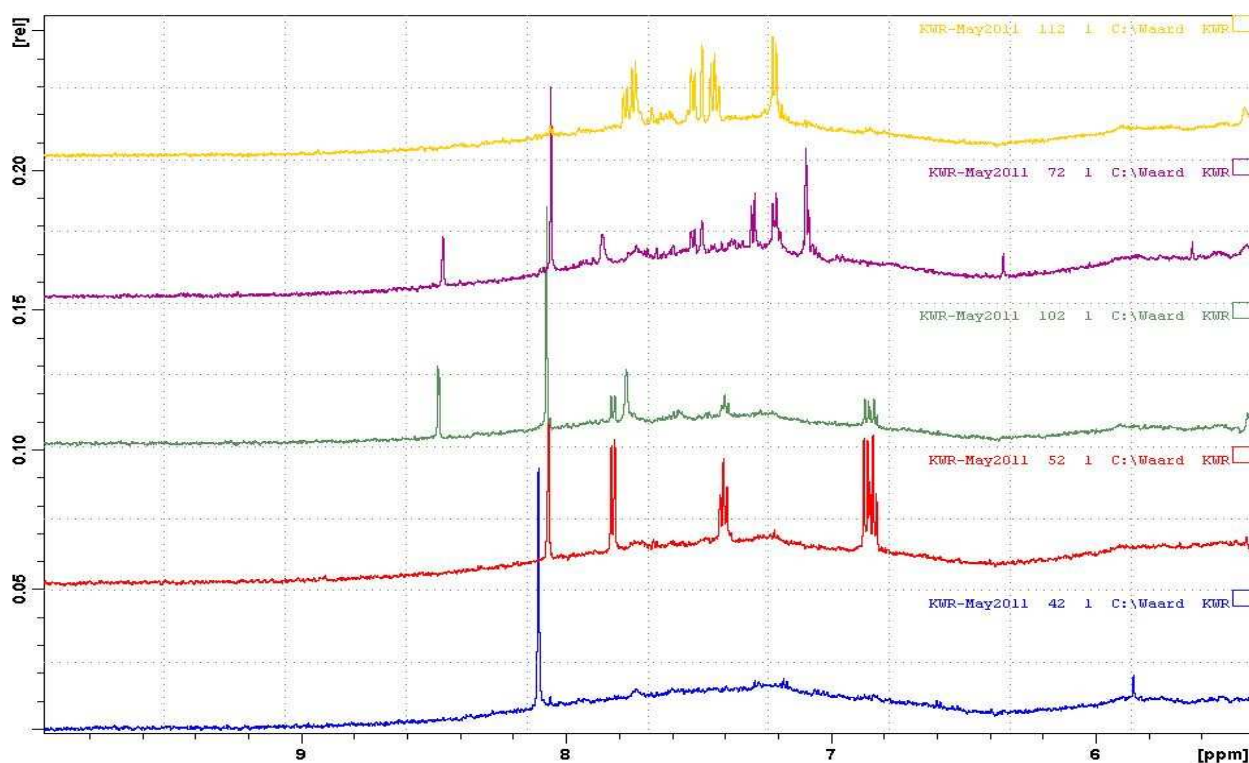
Figuur 13. LC-UV chromatogram van fractie 29 (tweede fractioneringsronde). De doelstof is aanwezig op een retentietijd van circa 30 minuten.

4.5 NMR-onderzoek na tweede zuiveringsronde

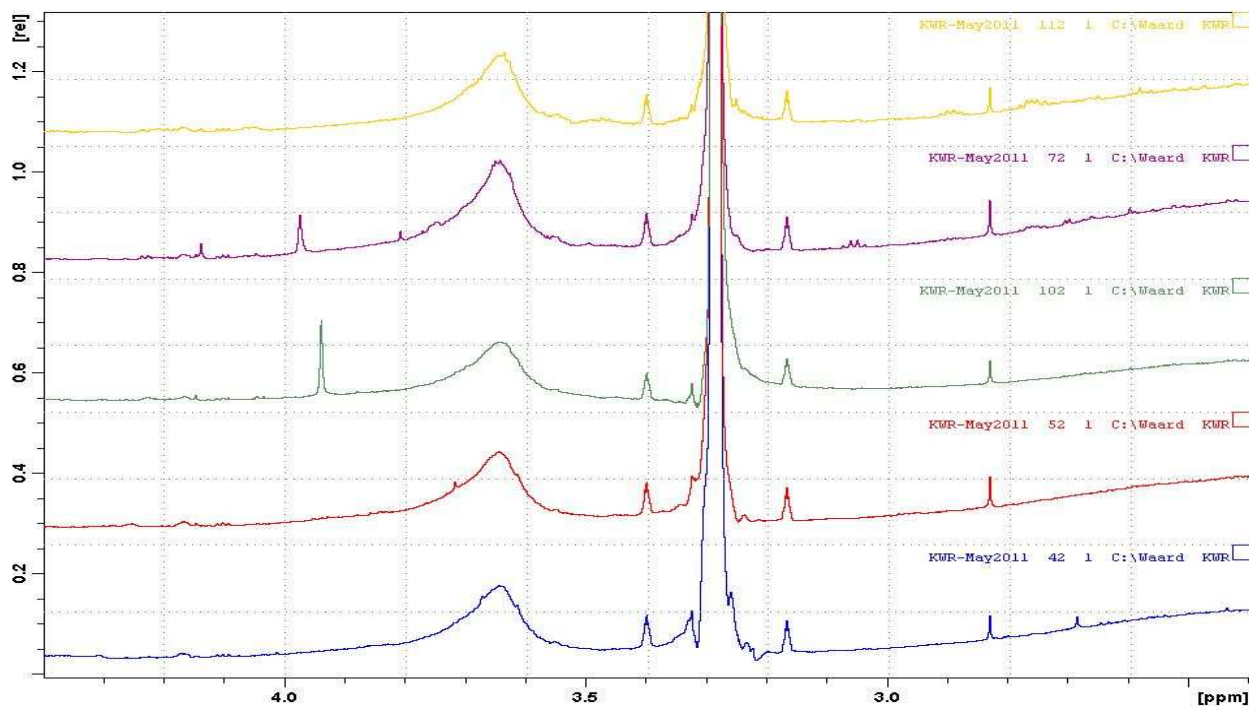
De verzamel fracties 27, 28, 29, 30 en 31 (gedroogd, in glazen buis) afkomstig van fractie 42 van de eerste fractionering werden onderworpen aan een NMR analyse.

Iedere fractie werd opgelost in 200 microliter methanol-D₄ (Cambridge Isotope Laboratories, VS) en gemeten in een 3 mm NMR-buis (Bruker Match-systeem). Een iets kleinere hoeveelheid methanol-D₄ werd gebruikt dan eerder, omdat de hoeveelheid droge poeder van ieder van de 5 fracties minder was dan bij het onderzoek na de eerste zuiveringsronde. Eéndimensionale proton NOESY-spectra werden gemeten (32-128 scans, 4 dummy scans, ontvangsttoename 128, tijddomein 97352, grootte 64 K, spectrale breedte = 30 ppm, vertraging 4 seconden).

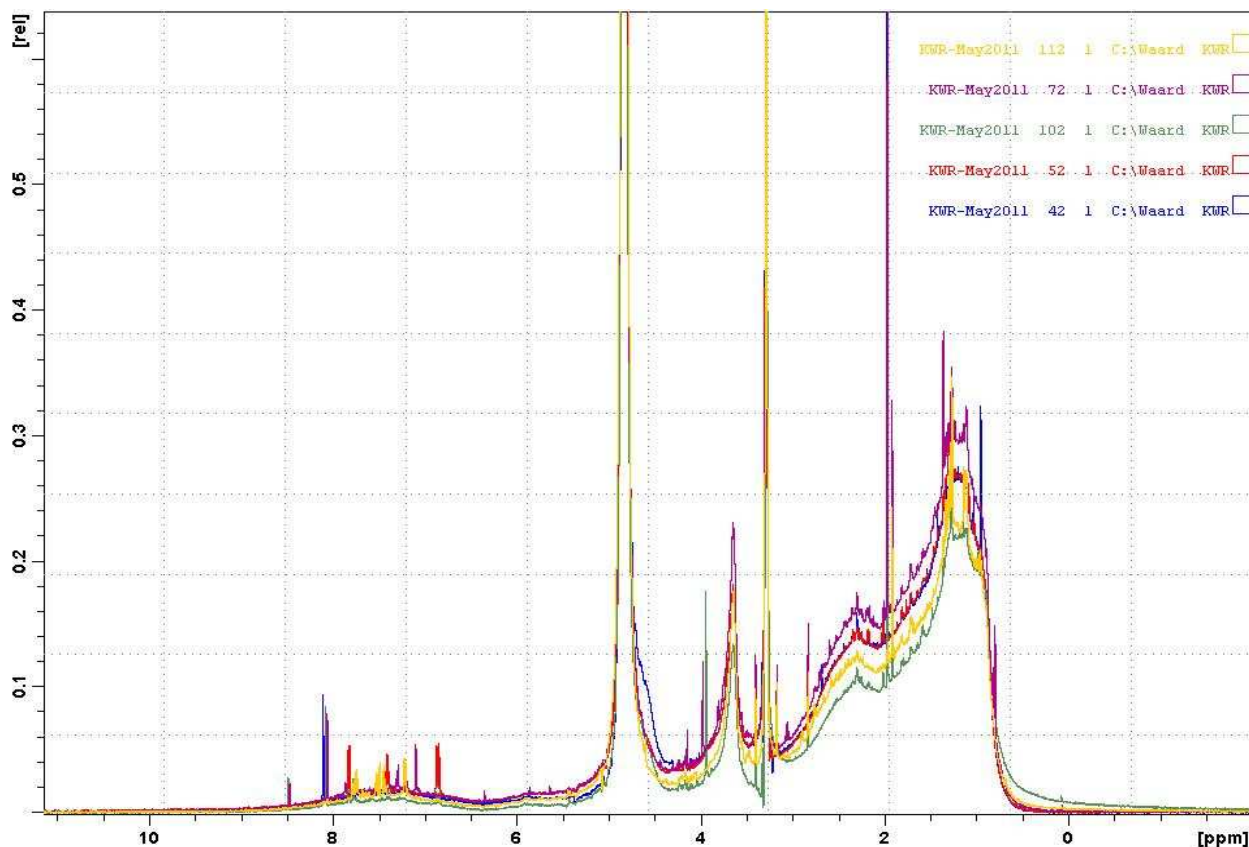
De verkregen spectra worden hieronder in figuur 14 (aromatisch gebied), figuur 15 (alifatisch gebied) en figuur 16 (het complete spectrum, zowel het aromatische als het alifatische gebied) weergegeven.



Figuur 14: 1D proton NOESY NMR-spectra van de vijf fracties (aromatisch gebied).
Fractie 27 (blauw), fractie 28 (rood) fractie 29 (groen), fractie 30 (paars), fractie 31 (geel).



Figuur 15: 1D proton NOESY NMR-spectra van de vijf fracties (gebied met resonanties van een methoxygroep). Fractie 27 (blauw), fractie 28 (rood), fractie 29 (groen), fractie 30 (paars), fractie 31 (geel)



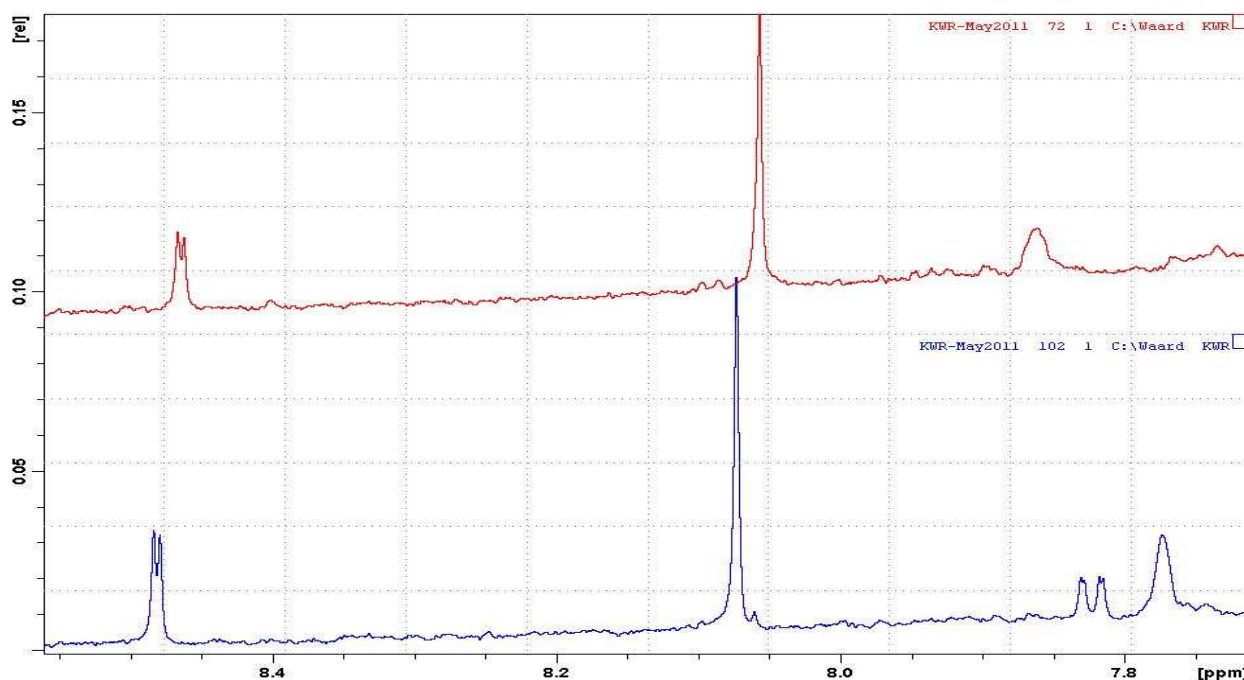
Figuur 16: 1D proton NOESY NMR-spectra van de 5 fracties (volledig spectrum). Fractie 27 (blauw), fractie 28 (rood), fractie 29 (groen), fractie 30 (paars), fractie 31 (geel).

Uit analyse van de spectra blijkt dat deze fracties veel schoner zijn dan de fracties na de eerste fractionering. Dit is het eenvoudigst te zien in figuur 14. Bij vergelijking van figuur 14 met figuur 7 (na eerste fractioneringsronde) is te zien dat de intensiteit van de betreffende resonanties (de scherpe pieken die boven het achtergrondsignaal uitsteken) veel duidelijker zichtbaar is in de verder gezuiverde fracties (figuur 14) dan in de fracties na de eerste fractionering (figuur 7). Het achtergrondsignaal is minder intensief, maar nog steeds als achtergrondsignaal aanwezig. Dit is het duidelijkst te zien aan de grote en brede pieken tussen 3 en 0 ppm (figuur 16). Het achtergrondsignaal is mogelijk afkomstig van afgifte van stoffen uit de gebruikte LC-kolom, zoals vaker is waargenomen bij zuiveringssystemen op basis van vloeistofchromatografie (LC). Toch geeft het feit dat ook in het aromatische gebied achtergrondsignaal aanwezig is aan dat niet alleen leaching vanuit de LC-kolom dit achtergrondsignaal veroorzaakt.

Figuur 14 toont aan dat het aromatische gebied van de fractie waarin de hoogste concentratie van de doelstof wordt verwacht (fractie 29), niet de meeste aromatische protonsignaalintensiteit heeft. In feite heeft fractie 28 de meeste aromatische signaalintensiteit. Fractie 27 heeft een zeer beperkte aromatische signaalintensiteit. Signalen in ^1H NMR-spectra van protonen in aromatische ringsystemen worden waargenomen in het gebied tussen 6 en 9 ppm.

Om de structuur van het gezochte molecuul tweedimensionaal vast te stellen, werden ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) en ^1H - ^{13}C NMR (HSQC, HMBC) spectra opgenomen. Uit de analyse van deze 2D alsook van de 1D NMR-spectra bleek dat zowel fractie 29 als fractie 30 een molecuul met een aromatisch ringsysteem bevat met twee aromatische H-atomen in een meta-configuratie. De meta-configuratie is gebaseerd op de waarneming dat twee protonen aan elkaar worden gebonden met een koppelingsconstante van ongeveer 2 Hz. Deze koppelingsconstante is een normale waarde voor het splitsingspatroon van twee protonen in een meta-configuratie aan een aromatisch ringsysteem. Bovendien wordt één van de aromatische protonen aan een OCH_3 -groep gebonden in een ortho-configuratie. Dit is te zien in de 2D NMR-gegevenssets (COSY en TOCSY) waar één van de aromatische protonen een zwakke verbinding met de resonantie van een OCH_3 -groep toont.

Concluderend kan gesteld worden dat zowel fractie 29 als fractie 30 allebei twee aromatische protonen in een meta-configuratie én een methoxygroep (OCH_3) in de ortho positie t.o.v. één van de aromatische waterstofelementen. Echter, de ^1H NMR-resonanties van deze twee fracties zijn niet volledig identiek (zie figuur 17). Daarnaast bevat fractie 31 mogelijk een stof met een nitrofenolgroep.



Figuur 17: 1D NOESY NMR-spectra van het aromatische gebied van fractie 29 (blauw) en 30 (rood). De grote piek bij 8,1 ppm wordt veroorzaakt door mierenzuur.

De resonanties die de verbinding tussen de twee aromatische protonen tonen, zijn bij 8,5 ppm (de twee pieken aan de linkerzijde van het spectrum) en bij 7,8 ppm (fractie 29, blauwe spectrum) en 7,85 ppm (fractie 30, rode spectrum). De resonantie bij 7,8 ppm (blauwe spectrum, fractie 29) en de resonantie bij 7,85 ppm (rood spectrum, fractie 30) tonen beide een verbinding met een ortho-OCH₃-groep.

De kleine verschillen in chemische verschuivingen tussen fractie 29 en fractie 30 zijn waarschijnlijk toe te schrijven aan het verschil in zuurtegraad, aangezien beide fracties een aanzienlijke hoeveelheid mierenzuur bevatten. De resonanties komen zo goed overeen dat het gaat om dezelfde stof.

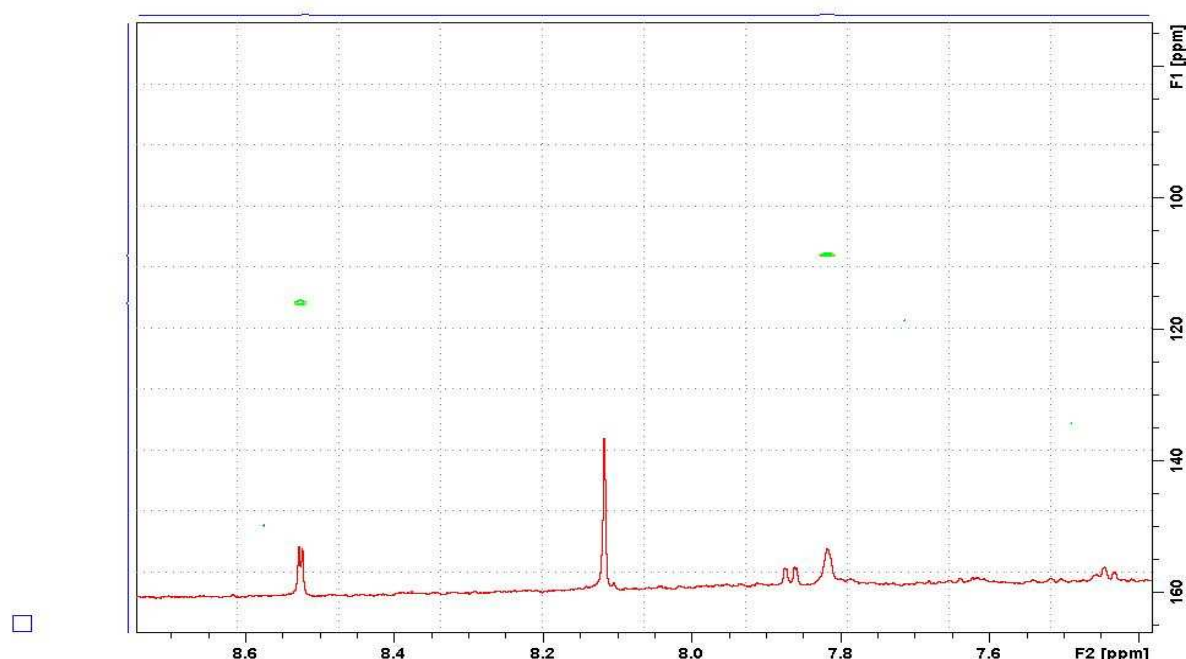
4.6 Identificatie doelstof

Voor de identificatie van de doelstof is fractie 29 gebruikt omdat in deze fractie de hoogste concentratie is gemeten.

Uit de accurate massaspectra blijkt de brutoformule C₇H₆O₆N₂ (molecuulgewicht 214 Da.). Zoals beschreven in paragraaf 3.4.2 bevat de stof waarschijnlijk nitro-groepen en ook een methoxygroep (OCH₃).

De 1H-13C NMR-gegevens (zie figuur 18) tonen resonanties voor de 13C-atomen die direct aan de aromatische H-atomen bij 116,5 en 109,3 ppm zijn gebonden. Dit bevestigt dat de stof twee aromatische protonen bevat, zoals te zien in de proton-spectra. Nitro-groepen zijn niet zichtbaar in de 1H NMR-spectra, maar kunnen worden afgeleid van de moleculaire massa. Met één methoxygroep, twee aromatische protonen en één C6 aromatisch ringsysteem zijn ook één hydroxyl-groep en twee nitro-groepen aanwezig op basis van de brutoformule.

□



Figuur 18: 1H-13C NMR-spectrum (2D HSQC) van fractie 29 in methanol-D4

Weergegeven zijn de 1H-13C correlatielijnen van de twee aromatische H-resonanties bij 8,5 ppm en bij 7,8 ppm.

Uit nader literatuuronderzoek bleek dat de chemische verschuivingen bij 1H en 13C NMR zeer veel gelijkenis vertonen met de resonanties voor de stof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol (Rousseau *et al.*, 1998). Deze stof bleek in zuivere vorm te koop en is daarom vervolgens aangeschaft.

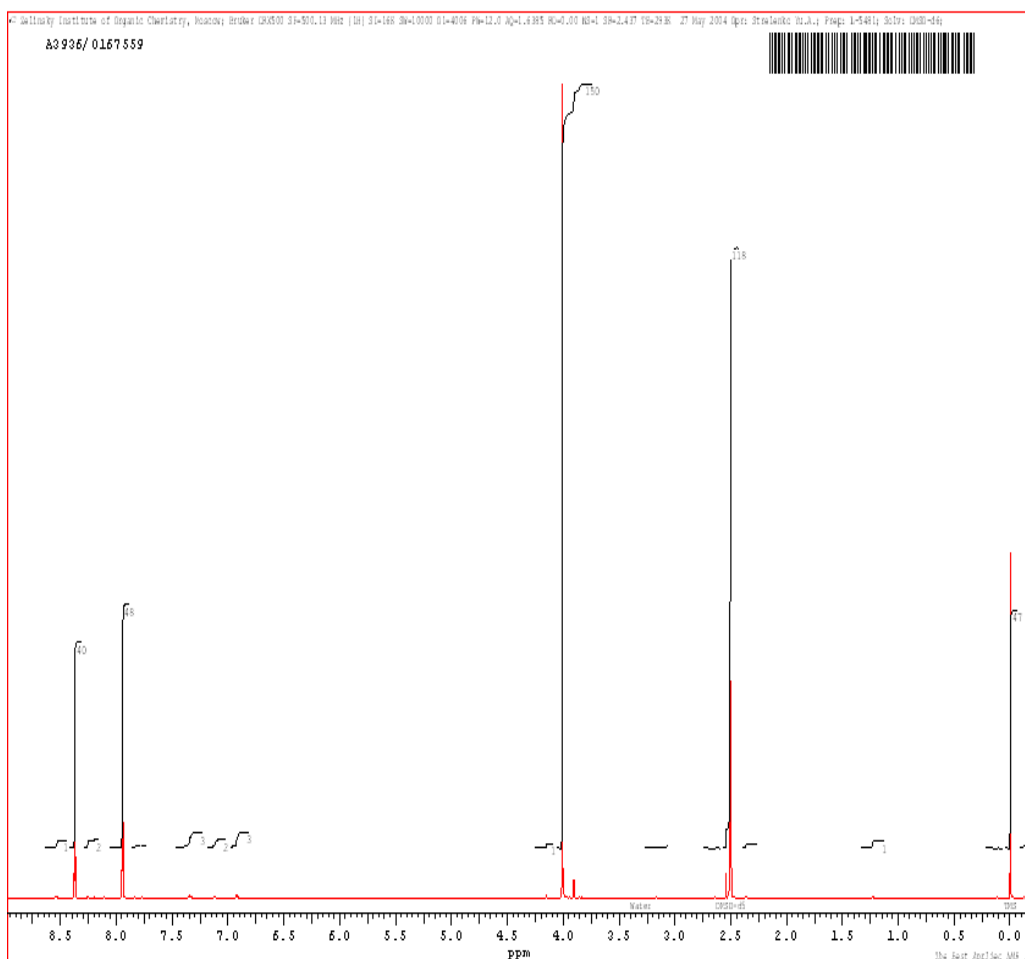
5 Bevestiging van de identiteit van de doelstof

5.1 Inleiding

Om de identiteit van de doelstof te bevestigen is de zuivere stof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol aangeschaft (Vitas-M Laboratory, Ltd, id. nummer: STK687215). Vervolgens is het extract met de hoogste concentratie doelstof vergeleken met deze referentiestof. Hiervoor zijn drie analysetechnieken gebruikt, nl. NMR, LC-DAD en LC-accurate MS.

5.2 Bevestiging met NMR

Bij de leverancier van de zuivere stof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol was een ^1H -NMR-referentiespectrum aanwezig. Dit NMR-spectrum is weergegeven in figuur 19.



Figuur 19: ^1H NMR-spectrum van de referentiestof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol in DMSO.

Dit spectrum toont het volledige NMR-spectrum, de aromatische resonanties zijn aan de linkerkant van het spectrum weergegeven. De resonanties bij 8,4 en 7,9 ppm zijn van de aromatische protonen, de resonantie bij 4 ppm is van de methoxygroep, de resonantie bij 2,5 ppm is van het DMSO-oplosmiddel en de resonantie bij 0 ppm is het referentiesignaal.

Het spectrum van de doelstof werd opgenomen in methanol- D_4 , het spectrum uit de literatuur

(Rousseau *et. al*) in gedeutereerde chloroform. Van oplosmiddelen is bekend dat zij kleine verschuivingen veroorzaken in ^1H NMR-spectra als gevolg van zwakke interacties (waterstofverbindingen, solvatatie) met het betreffende molecuul.

Om onzekerheid door de kleine verschillen in de NMR-spectra te elimineren, werd de referentiestof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol opgelost in gedeutereerde methanol (zoals ook met fractie 29 was gebeurd) en vervolgens zijn NMR-analyses uitgevoerd met 1D ^1H , 2D ^1H - ^1H (COSY, TOCSY), 2D ^1H - ^{13}C HSQC en HMBC-gegevenssets. De ^1H - en ^{13}C -resonanties van de referentiestof lagen zeer dicht in de buurt van de bij fractie 29 waargenomen ^1H - en ^{13}C -resonanties.

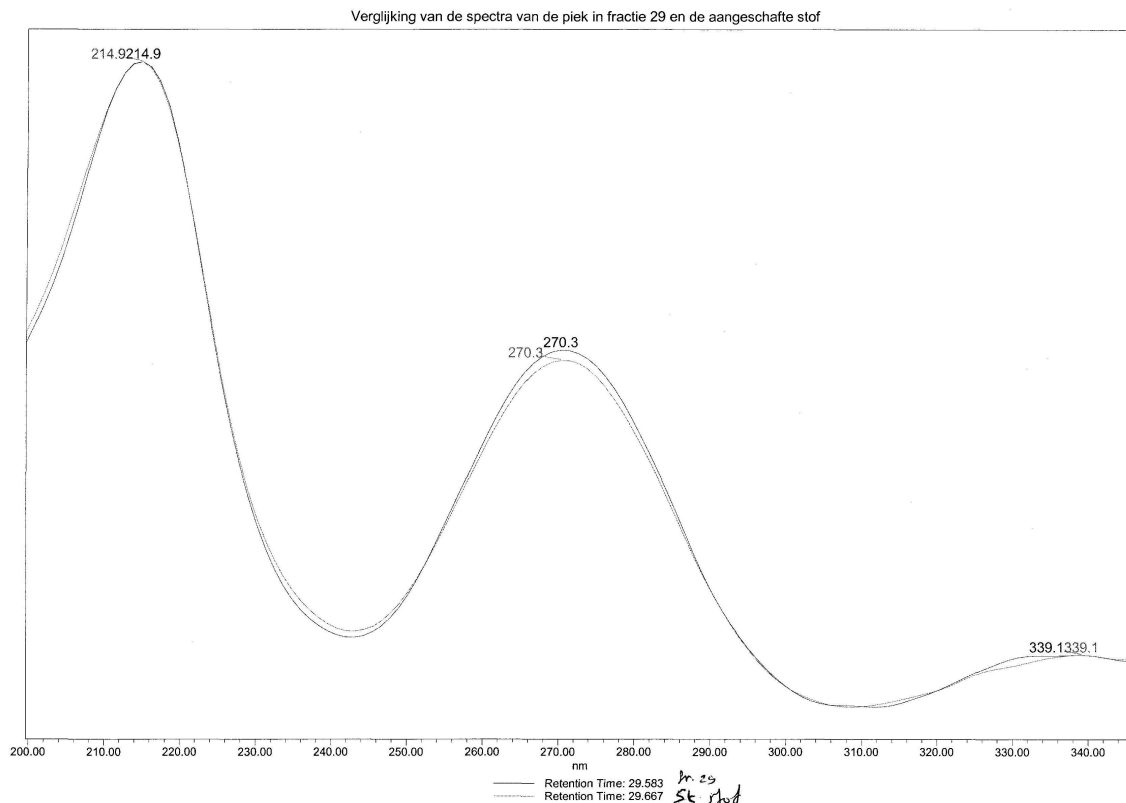
Ook is onderzocht of andere methoxy-dinitrofenol isomeren (met een meta-configuratie voor de twee aromatische protonen en een ortho-configuratie van de methoxy-groep) betreffende één van de aromatische protonen mogelijk kon zijn. Zowel de ^1H - als de ^{13}C -resonanties pasten niet in deze twee mogelijke andere configuraties, zodat alleen 2-methoxy-4,6-dinitrofenol als de gezochte stof overbleef.

Samenvattend kan gesteld worden dat de NMR-spectra van de doelstof in fractie 29 en fractie 30 zó goed overeen komen met de NMR-spectra van de referentiestof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol dat met grote zekerheid geconcludeerd kan worden dat de doelstof gelijk is aan 2-methoxy-4,6-dinitrofenol.

5.3 Bevestiging met LC-DAD

Een oplossing van de referentiestof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol in methanol werd samen met fractie 29 geanalyseerd met behulp van LC-DAD onder gelijke analysecondities. (De samenstelling van het eluens is beschreven in paragraaf 4.4.2). De referentiestof had een retentietijd van 29,67 min, de doelstof 29,58 min. De UV-spectra van de twee stoffen zijn weergegeven in figuur 20 en komen volledig met elkaar overeen. Op basis van deze analyse is verder bevestigd dat de doelstof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol (CAS 4097-63-6) is.

Aan de hand van de concentratie van de referentiestof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol is de concentratie van de doelstof geschat tussen de 5 en 10 ng/l.

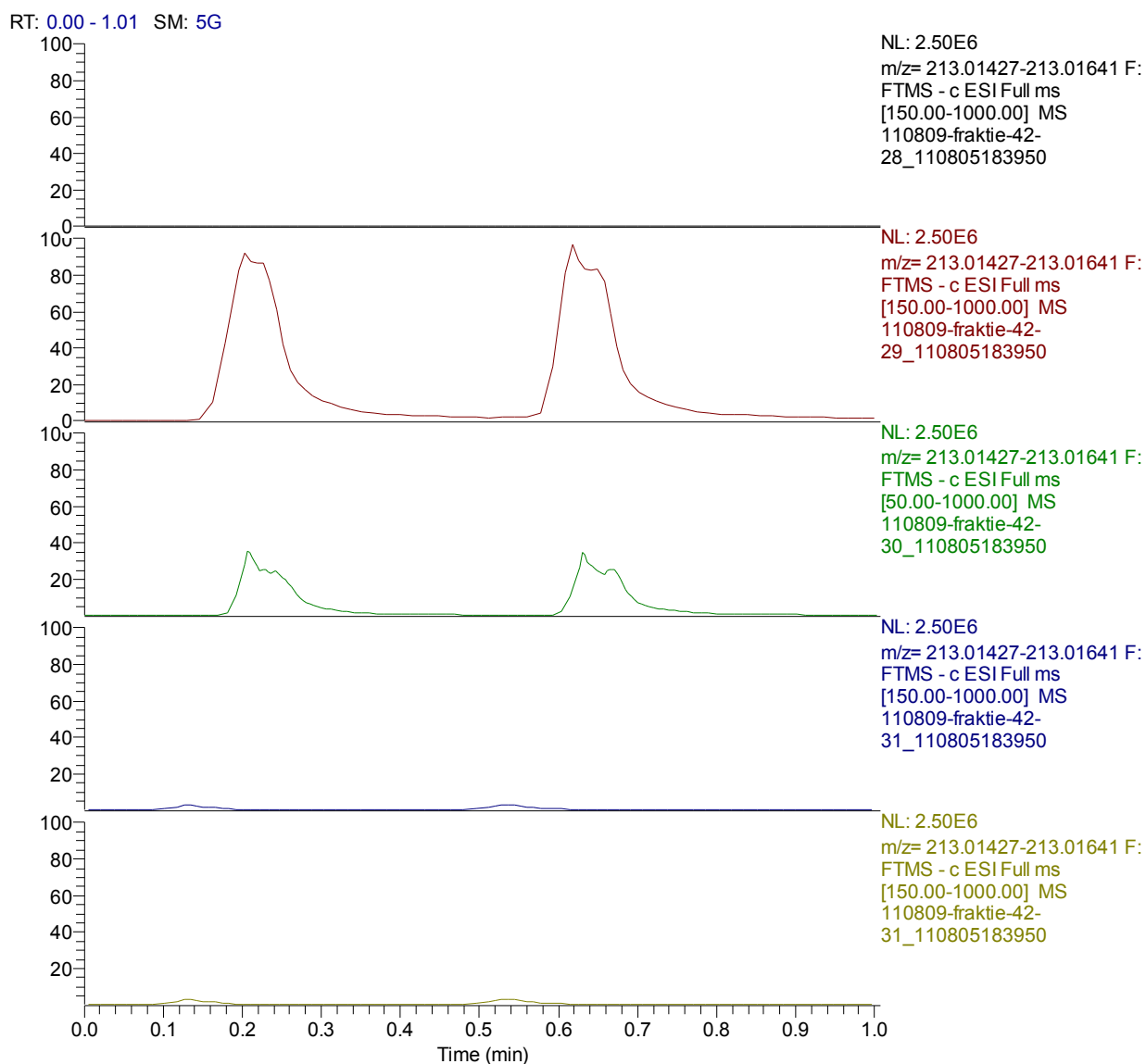


Figuur 20: UV-spectra van de doelstof (fractie 29) en de zuivere referentiestof. 2-methoxy-4,6-dinitrofenol.

5.4 Bevestiging met LC-MS

Direct na fractionering zijn de verzamel fracties 27, 28, 29, 30 geanalyseerd met behulp van accurate MS. De analyse werd uitgevoerd zonder LC: de fracties werden rechtstreeks ingelaten in de massaspectrometer. De metingen werden in duplo uitgevoerd.

In figuur 21 is het signaal van het specifieke ion 213,01531 (+/- 5 ppm) weergegeven van de vijf verschillende fracties. Duidelijk is te zien dat bij fractie 29 het hoogste signaal wordt verkregen. Bij fractie 30 wordt nog ongeveer 40% van het signaal verkregen en bij de andere drie fracties wordt nauwelijks of geen signaal verkregen. Hieruit blijkt dat in fractie 29 de hoogste concentratie van de doelstof aanwezig is.



Figuur 21: signaal van specifiek ion van 213,01531 in de vijf onderzochte fracties. Van boven naar beneden: fractie 27, 28, 29, 30 en 31.

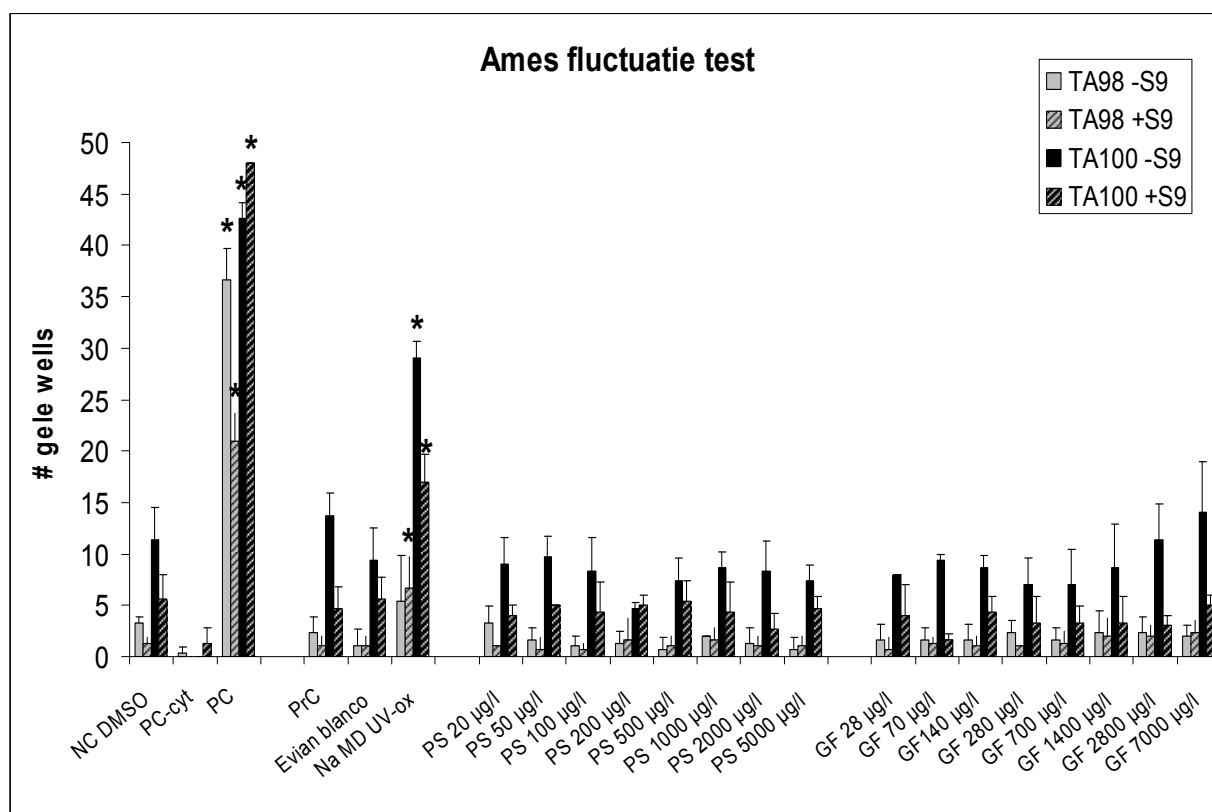
Een oplossing van de referentiestof 2-methoxy-4,6-dinitrofenol in methanol is samen met fractie 29 geanalyseerd met behulp van LC-accurate MS waarbij ook de productionen accuraat zijn gemeten Voor de analysecondities zie paragraaf 3.4.1.

De productionen 197.99134 en 154,00153 blijken bij beide stoffen aanwezig met dezelfde intensiteit (zie tabel 8 voor het iontype van deze ionen). Hieruit kan met grote zekerheid geconcludeerd kan worden dat de doelstof gelijk is aan de referentiestof.

6 Bevestiging van de Ames respons

Na de chemische bevestigingen dat de identiteit van de doelstof inderdaad 2-methoxy-4,6-dinitrofenol moest zijn en de bepaling dat de concentratie hiervan in het water tussen de 5 en 10 ng/l moet zijn geweest, is getest of deze concentratie van deze stof de positieve respons in de Ames fluctuatietest in het totaalextract zou kunnen verklaren. Daarvoor werd één van de achtergehouden SPE-extracten van 2 liter water (paragraaf 4.1.2, samen met een procedure controle (extractie zonder water) en een Evian mineraalwater blanco, ingedampt tot exact 500 µl, waarvan 100 µl apart werd gehouden voor LC-MS analyse. De overige 400 µl werd verder ingedampt en opgelost in 150 µl DMSO zoals is beschreven in paragraaf 2.2.

In dit totaalextract (10.000x geconcentreerd) zou de concentratie minimaal 70 µg/l moeten zijn geweest volgens de MS analyse (zie paragraaf 3.4.2). Daarom werd een concentratiereeks gemaakt van 20 – 5000 µg/l van de aangeschafte pure stof. Ook werd fractie 29 (waar het meeste van de gezuiverde stof in was gevangen), die opgelost in gedeutereerd methanol terug ontvangen was na de NMR analyse, drooggedampt en heropgelost in 500 µl DMSO. Exact 250 µl hiervan werd gebruikt om een verdunningsreeks te maken van onverdund tot 250x verdund. Dit zou naar verwachting een concentratiereeks opleveren van 28 – 7000 µg/l van 2-methoxy-4,6-dinitrophenol. Samen met het totaalextract zijn deze twee concentratiereksen vervolgens geanalyseerd op TA98 en TA100, beiden +/- S9, in de Ames fluctuatietest. In TAMix + en - S9 zijn het totaalextract, één concentratie van de pure stof en één verdunning van de gezuiverde fractie getest, omdat hier geen respons verwacht werd. Hierbij is het standaard protocol gevolgd zoals beschreven in Heringa *et al.* (2011) en in BTO 2011.046. De resultaten zijn weergegeven in figuur 22 en in bijlage V.

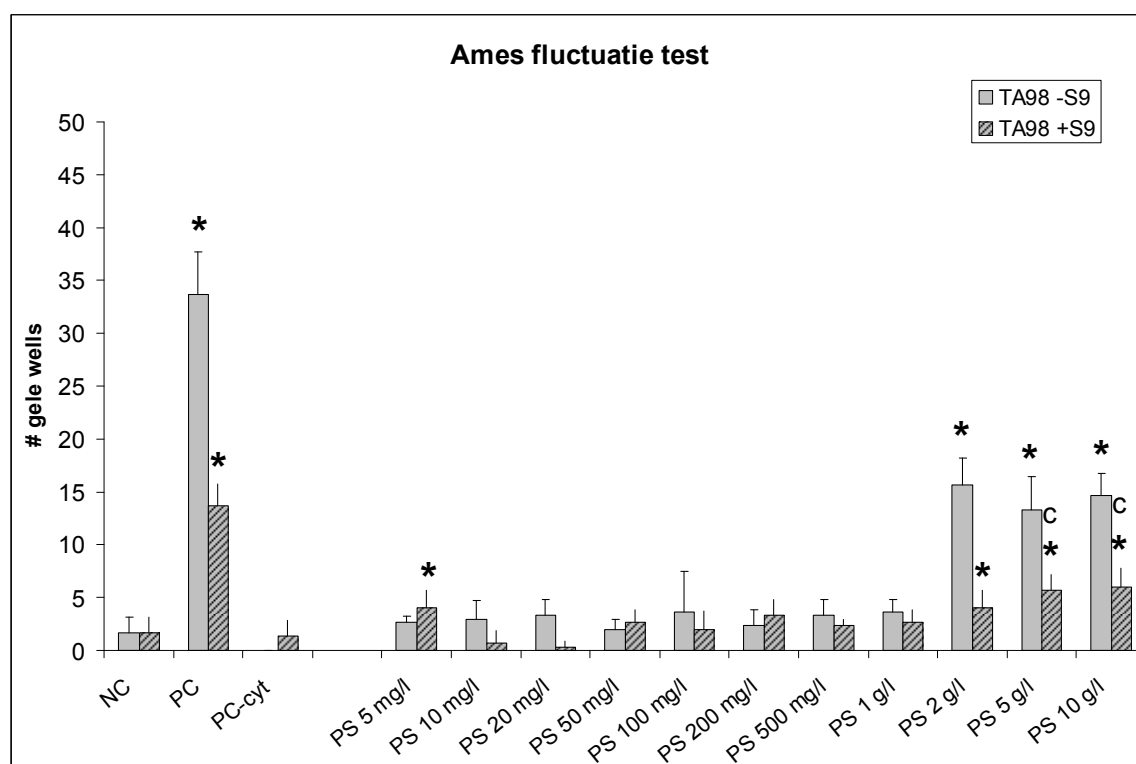


Figuur 22. Resultaten van de Ames fluctuatie test (n=3) met het totaalextract van water na MD UV-oxidatie, de pure stof (PS) in verschillende concentraties en verschillende verdunningen van de gezuiverde fractie (GF) van het extract van het water na MD UV-oxidatie. NC= negatieve controle, PC-cyt = de positieve controle voor cytotoxiciteit, PC = de positieve controle voor genotoxiciteit, PrC = de

procedure controle van de extractie. Sterretjes geven aan welke fracties een statistisch significante hogere respons hadden dan de NC.

Figuur 22 laat zien dat de controles goed waren (NC TA100 -S9 wel wat aan hoge kant en PC TA98+S9 wat aan lage kant). De resultaten van TAMix zijn uit de figuur gelaten ten behoeve van de helderheid, TAMix liet in geen van de fracties een respons zien, zoals verwacht op basis van de eerdere resultaten. Het totaalextract ("Na MD UV-ox") laat een Ames respons zien, die echter wel lager was dan in eerdere experimenten. In TA98 -S9 was de respons zelfs niet significant hoger dan de NC. Het kan zijn dat onder de omstandigheden in de vier weken waarin dit water gefractioneerd werd, een verminderde vorming van het bijproduct plaatsvond. De bepaalde concentratie van 2-methoxy-4,6-dinitrofenol in dit water (5-10 ng/l) was ook lager dan geschat met behulp van het isomeer van de stof in het water.

Geen van de doseringen van de pure stof en de gezuiverde fractie laten een respons in de Ames fluctuatietest zien. Dit toont aan dat deze stof niet (geheel) verantwoordelijk is voor de Ames respons in het water. Er was echter wel een relatie tussen de hoeveelheid van deze stof en de gemeten Ames respons gevonden. Het zou goed mogelijk zijn dat dit maar één stof is in een groep van stoffen die gevormd wordt tijdens UV-oxidatie, zoals er bij chloring ook een veelheid aan verschillende bijproducten wordt gevormd. Bij een grote groep van verschillende bijproducten is het mogelijk dat zij ieder afzonderlijk maar een klein, niet detecteerbaar deel van de totale Ames respons veroorzaken. In dat geval zouden de concentraties van deze ene geïdentificeerde stof nog te laag kunnen zijn geweest om een Ames respons te veroorzaken. Om deze reden is de pure stof in nog hogere doseringen (5 mg/l - 1 g/l) getest in de Ames fluctuatietest, in TA98 -/+ S9, wederom als in Heringa *et al.* (2011) en in BTO 2010.056. De resultaten zijn weergegeven in figuur 23 en in bijlage V.



Figuur 23. Resultaten van de Ames fluctuatietest (n=3) met de pure stof (PS) in verschillende concentraties.

NC= negatieve controle, PC-cyt = de positieve controle voor cytotoxiciteit, PC = de positieve controle voor genotoxiciteit. Sterretjes geven aan welke fracties een statistisch significante hogere respons hadden dan de NC, een "c" geeft aan welke fracties cytotoxisch waren.

Figuur 23 laat zien dat 2-methoxy-4,6-dinitrofenol pas bij zeer hoge doses (vanaf 2 g/L, concentratie in de gedoseerde DMSO-oplossing) en respons vertoont in de Ames fluctuatietest. Omgerekend naar een

waterconcentratie zou dit 20 kg/L zijn, een zeer onrealistische concentratie. De geschatte oplosbaarheid van deze stof op basis van structuurkenmerken is namelijk ongeveer 0,5 g/L (www.chemspider.com). De positieve controle bij TA98+S9 is hier te laag uitgevallen, de resultaten van TA98 + S9 zijn daarom niet acceptabel (de activiteiten kunnen te laag zijn). Een test met wel een goede positieve controle zou echter weinig toevoegen, omdat de TA98+S9 steeds lagere respons heeft laten zien dan TA98-S9 in water na UV-oxidatie, en hier al cytotoxiciteit laat zien bij de responsieve concentraties. Daarom is deze test niet herhaald om alsnog een test met een goede positieve controle te krijgen.

De stof laat dus een verhoogde respons in de Ames fluctuatietesten zien. Dit is een indicatie voor genotoxische activiteit. Ondanks dat de stof twee aromatische nitrogroepen bevat, heeft het maar een erg lage potentie. De gemeten Ames respons moet daarom ofwel van heel veel (20 kg/L gedeeld door 7 ng/L = ca. 3×10^{12}) stoffen met eenzelfde lage potentie afkomstig zijn, wat niet waarschijnlijk lijkt, of van minder stoffen met een veel hogere potentie.

7 Discussie

Er is maar één uniek gevormde stof gevonden op het detecteerbare niveau van boven de ca. 10 ng/L interne standaard equivalenten in de brede LC-MS screening, 10-30 ng/L in de nitrosamine analyse en 100 ng/L in de brede GC-MS screening. Deze stof, waarvan de LC-MS piek sterk correleerde met de mate van Ames respons, is geïdentificeerd als 2-methoxy-4,6-dinitrophenol, maar deze stof blijkt de gemeten respons in de Ames fluctuatietesten niet te verklaren. De gemeten Ames respons kan dan veroorzaakt worden door ofwel een stof/enkele stoffen die niet met LC-MS te detecteren zijn, doordat ze bijvoorbeeld niet ioniseerbaar zijn, ofwel door stoffen die in niet-detecteerbare niveau's aanwezig zijn (< ca. 10 ng/L). Omdat zelfs hele potente stoffen geen detecteerbare respons in de Ames fluctuatietest geven bij concentraties lager dan 10 ng/L in water, zal er in het laatste geval sprake moeten zijn van een veelvoud van stoffen, die als mengsel opgeteld wel de hoge gemeten respons kunnen geven. Dit identificatiewerk heeft daarom als resultaat dat er niet meer met LC-MS of GC-MS naar één of enkele stoffen gezocht hoeft te worden.

Daarnaast levert dit identificatiewerk veel informatie over wat er waarschijnlijk gebeurt tijdens UV-oxidatie. De structuur van de stof, met twee aromatische nitro-groepen, waarvan bekend is dat deze een genotoxische eigenschap hebben, heeft onze blik geleid naar het nitraat in het water. Het is bekend dat nitraat door UV-licht met een golflengte >280 nm omgezet wordt in nitriet. Dit proces vindt daarom vooral in het brede licht-spectrum bij middendruk lampen plaats en nauwelijks bij lagedruk lampen, omdat deze een smalle emissieband bij 253,7 nm hebben en dus nauwelijks licht van >280 nm uitzenden. Dit correspondeert met de gevonden verschillen in Ames respons tussen middendruk en lagedruk lampen: geen/nauwelijks een Ames respons bij lagedruk lampen en een Ames respons bij middendruk lampen. Ondertussen is ook al bevestigd dat UV-bestraling van een oplossing van synthetische NOM (natuurlijk organisch materiaal) met nitraat leidt tot een respons in de Ames fluctuatietest, waar bestraling van NOM of nitraat alleen geen positieve respons in de Ames fluctuatietest gaf (Martijn en Kruithof, 2012).

De omzetting van nitraat is geen rechtstreekse reactie, maar een ingewikkeld proces waarbij zeker 25 verschillende reacties een rol spelen. Het is niet ondenkbaar dat tijdens dit proces een NO₂-groep aan een aromatische ring wordt geplakt, zodat een stof met een aromatische nitro-groep ontstaat. Uit de literatuur (Challis et al, 1971; Virk et al, 1985; Coombes et al, 1994; Metivier et al, 1996; Fernández-Liencres et al, 1997; González-Mancebo et al, 1999) is veel bekend over de vorming van nitrofenolgroepen, en hun carcinogene en mutagene eigenschappen (Mende, et al., 1994). Er is zelfs al gerapporteerd dat dergelijke processen lijken plaats te vinden in het milieu, waar water met natuurlijk organisch materiaal en nitraat onder invloed staat van UV uit zonlicht (bijvoorbeeld Vione *et al.*, 2004 en 2005). In dat geval is het niet onlogisch dat er een breed scala aan stoffen met een aromatische nitro-groep wordt gevormd onder invloed van UV-straling, die elk individueel misschien maar weinig respons en een Ames fluctuatietest veroorzaken, maar gezamenlijk als mengsel wel.

8 Conclusies en aanbevelingen

Er zijn geen nitrosoamines aangetoond in de extracten, de aantoonbaarheidsgrens was 20-30 ng/l. De screening met GC-MS leverde ook geen resultaat op (visuele beoordeling, geschatte aantoonbaarheidsgrens 0,1 µg/l). Met LC-accurate massaspectrometrie met de Orbitrap werd in de zes fracties, die een verhoogde respons in de Ames fluctuatietesten lieten zien, met de negatieve ionen meting een extra piek ten opzichte van de 'blanco's' waargenomen op een laag niveau concentratieniveau. Met behulp van NMR kon deze piek uiteindelijk worden geïdentificeerd als 2-methoxy-4,6-dinitrophenol (CAS 4097-63-6). Deze identificatie is ook bevestigd met LC-UV en LC-accurate MS.

Met dit onderzoek is een werkwijze ontwikkeld om een doelstof (die in lage concentratie in het water aanwezig was!) te isoleren met behulp van een tweedimensionale zuivering. Voor de uiteindelijke identificatie van de stof bleek de combinatie van twee krachtige identificatietechnieken – accurate massaspectrometrie en NMR- noodzakelijk.

Deze stof bleek echter de gemeten respons in de Ames fluctuatietesten niet (geheel) te kunnen verklaren. Waarschijnlijk zijn meerdere stoffen verantwoordelijk voor de gemeten respons. De verantwoordelijke stoffen waren niet detecteerbaar met chemische analyse door een te laag concentratieniveau en/of door onvoldoende chromatografische scheiding. De structuur van de gevonden stof doet vermoeden dat bij de omzetting van nitraat naar nitriet bij MD UV nitro-groepen aan aromatische ringstructuren worden geplakt, waardoor vele soorten mutagene aromatische nitro verbindingen zouden kunnen ontstaan.

Om deze hypothese verder te testen en meer licht op de oorzaak van de verhoogde Ames respons te werpen, wordt aanbevolen om verder onderzoek te richten op:

- het nagaan welk type aromatische nitro-groepen een respons in de Ames fluctuatietest laten zien.
- het analyseren van de andere fracties uit de eerste zuiveringsstap met de Ames fluctuatietest. Mogelijk vertonen andere fracties wel een detecteerbare Ames respons. In deze fracties kunnen dan mogelijk potentere stoffen gevonden kunnen worden, of alle fracties blijven onder de detectiegrens, wat aangeeft dat er sprake is van mengseltoxiciteit.
- het nagaan of de vorming van een Ames respons afhankelijk is van nitraat, van UV-licht en van een aromatische stof. De keuze van de aromatische stof hierin is kritisch: niet elke stof zal naar verwachting leiden tot bijproducten die een respons kunnen veroorzaken in de Ames fluctuatietest.

9 Literatuur

Ashby, J., Tennant, R.W., Zeiger, E., Stasiewicz, S. (1989) Classification according to chemical structure, mutagenicity to Salmonella and level of carcinogenicity of a further 42 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutation Research* 223, 73-103.

BTO 2011.046. (2011) New concepts of UV/H₂O₂ oxidation. Hofman-Caris, C.H.M. and Beerendonk, E.F. (eds), KWR, Nieuwegein (the Netherlands).

Challis, B.C., Lawson, A.J. (1997); The chemistry of nitroso-compounds. Part II. The nitrosation of phenol and anisole; *J. Chem. Soc. (B)*, 770-775

Coombes, R.G., Diggle, A.W. (1994); The mechanism of nitration of phenol and 4-methylphenol by nitrogen dioxide in solution; *Tetrahedr. Letters*, 35 (34), 6373-6376

Fernandez-Linecres, M.P., Calle, E., González-Mancebo, S., Casado, J. (1997); Nitrosation kinetics of phenolic components of Foods and beverages; *Int. J. Chem. Kin.*, 29 (2), 119-125

González-Mancebo, García-Santos, M.P., Hernández-Benito, J., Calle, E., Casado, J. (1999); Nitrosation of phenolic compounds: inhibition and enhancement; *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2235-2240

Helma, C., Sommer, R., Schulte-Hermann, R. and Knasmüller, S. (1994) Enhanced clastogenicity of contaminated groundwater following UV irradiation detected by the Tradescantia micronucleus assay. *Mutation Research* 323(3), 93-98.

Heringa, M.B., Harmsen, D.J.H., Beerendonk, E.F., Reus, A.A., Krul, C.A.M., Metz, D.H. and Ijpelaar, G.F. (2011) Formation and removal of genotoxic activity during UV/H₂O₂-GAC treatment of drinking water. *Water Research* 45(1), 366-374.

Hogenboom, A.C. , van Leerdam, J.A. , de Voogt, P. (2009) Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216 ,510-519

Krauss, M., Hollender, J. (2008) Analysis of Nitrosamines in Wastewater: Exploring the Trace Level Quantification Capabilities of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* 80, 834-842.

Martijn, A.J., Kruithof, J.C., 2012. UV and UV/H₂O₂ Treatment: The Silver Bullet for By-product and Genotoxicity Formation in Water Production. *Ozone: Science and Engineering* 34, 92-100.

Mende, P., Siddiqi, M., Preussmann, R., Spiegelhalder, B.(1994); Identification of nitrophenols as nitrosation products from capsaicin and red chillies; *Cancer letters*, 83, 277-282

Metivier, P., Schlama, T. (1996); The mechanisms of nitration of phenol; *Indus. Chem. Libr.*, 8©, 368-379

Ohta, T., Suzuki, J., Iwano, Y. and Suzuki, S. (1982) Photochemical nitrosation of dimethylamine in aqueous solution containing nitrite. *Chemosphere* 11(6), 797-801.

Rousseau and Rosazza, *JAFC*, deel 46, 3314-3317, 1998

Suzuki, J., Okazaki, H., Sato, T. and Suzuki, S. (1982) Formation of mutagens by photochemical reaction of biphenyl in nitrate aqueous solution. *Chemosphere* 11(4), 437-444.

Suzuki, J., Ueki, T., Shimizu, S., Uesugi, K. and Suzuki, S. (1985) Formation of mutagens by photolysis of amino acids in neutral aqueous solution containing nitrite or nitrate ion. *Chemosphere* 14(5), 493-500.

Vione, D., Maurino, V., Minero, C., Pelizzetti, E., 2005. Aqueous atmospheric chemistry: Formation of 2,4-dinitrophenol upon nitration of 2-nitrophenol and 4-nitrophenol in solution. *Environmental Science and Technology* 39, 7921-7931.

Vione, D., Belmondo, S., Carnino, L. (2004); A kinetic study of phenol nitration and nitrosation with nitrous acid in the dark; *Environ.Chem.Lett.*, 2, 135-139

Virk, M.S., Issenberg, Ph. (1985); Nitrosation of phenol and 2,6-dimethoxyphenol and its effect on nitrosamine formation; *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1082-1085

I Resultaten van het onderzoek naar nitrosoamines

Analyse uitgevoerd volgens protocol LOA-535.

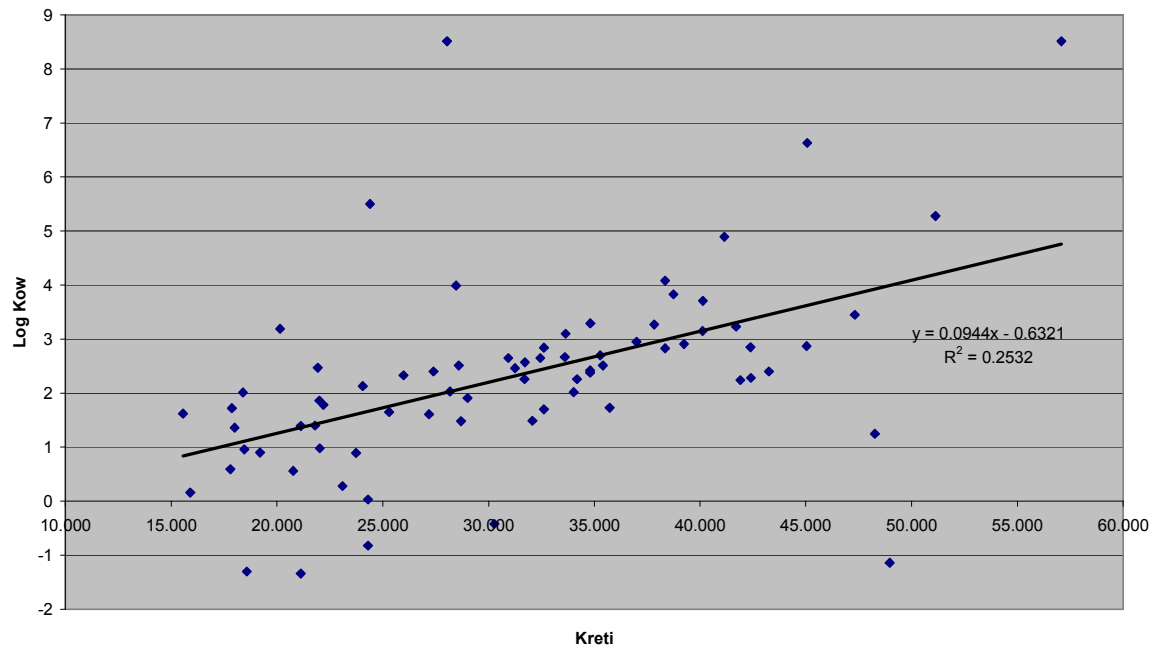
Component	C-07 3393 referentiefraction	C-07 3397	C-07 3400	C-07 3401
NDMA	< 10 ng/l	< 10 ng/l	< 10 ng/l	< 10 ng/l
NMEA	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NDEA	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NDPA	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NMOR	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NPYR	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NPIP	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NDBA	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l

Component	C-07 3506 referentiefraction	C-07 3511	C-07 3513	C-07 3514
NDMA	< 10 ng/l	< 10 ng/l	< 10 ng/l	< 10 ng/l
NMEA	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NDEA	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NDPA	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NMOR	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NPYR	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NPIP	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NDBA	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l

Component	C-08 3138 referentiefraction	C-08 3139 referentiefraction	C-08 3140	C-08 3142
NDMA	< 10 ng/l	< 10 ng/l	< 10 ng/l	< 10 ng/l
NMEA	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NDEA	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NDPA	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NMOR	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l	< 30 ng/l
NPYR	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NPIP	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l
NDBA	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l	< 20 ng/l

Component	C-08 3143
NDMA	< 10 ng/l
NMEA	< 20 ng/l
NDEA	< 30 ng/l
NDPA	< 30 ng/l
NMOR	< 30 ng/l
NPYR	< 20 ng/l
NPIP	< 20 ng/l
NDBA	< 20 ng/l

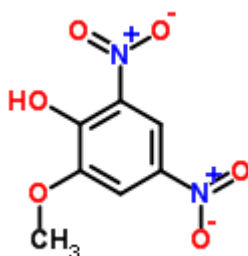
II Relatie tussen theoretische logK_{ow} en KRetI



III Chemische structuren voor stof met brutoformule C₇H₆N₂O₆

Chemspider ID

144810



Data Sources:

ABI Chemicals, GmbH, ChemBlock, ChemDB, ChemIDplus, DiscoveryGate, eMolecules, LeadScope, Molport, NIST, PubChem, Synonyms, Thomson Pharma, Timtec, Vitas-M, ZINC

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

2-methoxy-4,6-dinitrophenol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

2.05

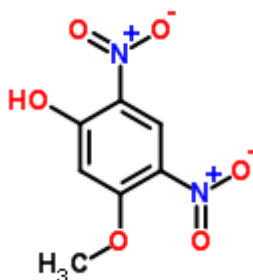
ACD/LogD (pH 5.5):

0.58

ACD/LogD (pH 7.4):

-0.89

234489



Data Sources:

ABI Chemicals, GmbH, Apollo Scientific Limited, ChemDB, DiscoveryGate, DTP/NCI, eMolecules, Finetech Industry, Molport, PubChem, Ryan Scientific, Thomson Pharma, Timtec, Tractus, ZINC

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

5-methoxy-2,4-dinitrophenol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

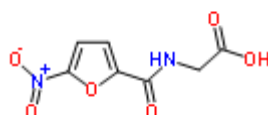
ACD/LogP:

1.80

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

1558321



Data Sources:

AKos, ChemDB, DiscoveryGate, eMolecules, Enamine, Molport, PubChem, Ryan Scientific, Synonyms, UkrOrgSynthesis, ZINC

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

N-[(5-nitrofuran-2-yl)carbonyl]glycine

Molecular Weight:

214.1323

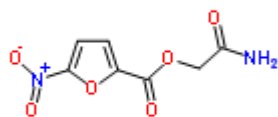
Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

1783487



Monoisotopic Mass: 214.022586 Da
 ACD/LogP: -0.85
 ACD/LogD (pH 5.5): -2.8
 ACD/LogD (pH 7.4): -4.35

Data Sources: ChemDB, DiscoveryGate, eMolecules, Enamine, Molport, PubChem, Ryan Scientific, ZINC

Empirical Formula: C7H6N2O6
 Systematic Name: 2-amino-2-oxoethyl 5-nitrofuran-2-carboxylate

Molecular Weight: 214.1323
 Nominal Mass: 214 Da
 Average Mass: 214.1323 Da
 Monoisotopic Mass: 214.022586 Da
 ACD/LogP: -1.23
 ACD/LogD (pH 5.5):
 ACD/LogD (pH 7.4):

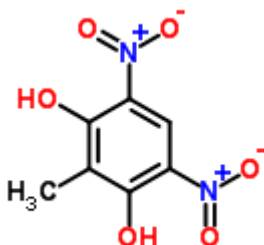
531864



Data Sources: DiscoveryGate, Molport, NIST, Princeton Biomolecular, PubChem, PubMed, Synonyms

Empirical Formula: C7H6N2O6
 Systematic Name: 2-(hydroxymethyl)-4,6-dinitrophenol
 Molecular Weight: 214.1323
 Nominal Mass: 214 Da
 Average Mass: 214.1323 Da
 Monoisotopic Mass: 214.022586 Da
 ACD/LogP: 0.55
 ACD/LogD (pH 5.5): -0.97
 ACD/LogD (pH 7.4): -2.41

3483230



Data Sources: ChemDB, DiscoveryGate, eMolecules, Molport, PubChem

Empirical Formula: C7H6N2O6
 Systematic Name: 2-methyl-4,6-dinitrobenzene-1,3-diol
 Molecular Weight: 214.1323
 Nominal Mass: 214 Da
 Average Mass: 214.1323 Da
 Monoisotopic Mass: 214.022586 Da
 ACD/LogP: 2.33
 ACD/LogD (pH 5.5):
 ACD/LogD (pH 7.4):

160498



Data Sources:

ABI Chemicals, GmbH, ChemIDplus,
DiscoveryGate, PubChem

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

2-methoxy-4,5-dinitrophenol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

2.35

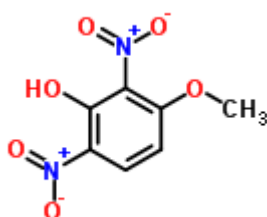
ACD/LogD (pH 5.5):

1.64

ACD/LogD (pH 7.4):

-0.07

2681265



Data Sources:

ChemDB, DiscoveryGate, PubChem

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

3-methoxy-2,6-dinitrophenol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

1.94

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

9302738



Data Sources:

PubChem, PubMed, Thomson Pharma

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

4-methoxy-2,6-dinitrophenol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

2.31

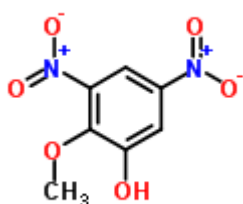
ACD/LogD (pH 5.5):

0.87

ACD/LogD (pH 7.4):

-0.62

21427965



Data Sources:

eMolecules, MP Biomedicals

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

2-methoxy-3,5-dinitrophenol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

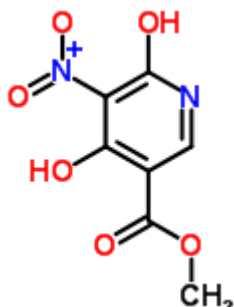
Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

2.05

25073194



ACD/LogD (pH 5.5):

2.02

ACD/LogD (pH 7.4):

1.26

Data Sources:

AOKChem, BePharm

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

methyl 4,6-dihydroxy-5-nitro-pyridine-3-carboxylate

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.132 Da

Monoisotopic Mass:

214.023 Da

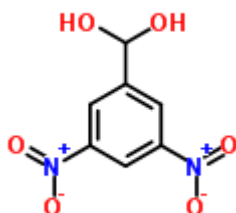
ACD/LogP:

1.96

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

4414689



Data Sources:

ChemRefer, PubChem

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

(3,5-dinitrophenyl)methanediol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

-0.60

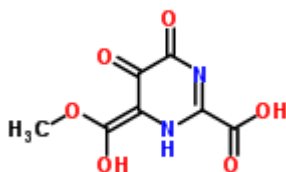
ACD/LogD (pH 5.5):

-0.6

ACD/LogD (pH 7.4):

-0.6

17348964



Data Sources:

PubChem

Empirical Formula:

C₇H₆N₂O₆

Systematic Name:

(6E)-6-[hydroxy(methoxy)methylidene]-4,5-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-2-carboxylic acid

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

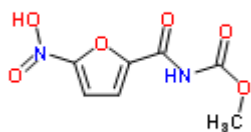
214.022586 Da

ACD/LogP:

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

24657163



Data Sources:

ChEMBL

Empirical Formula:

C7H6N2O6

Systematic Name:

methyl N-(5-nitrofuran-2-carbonyl)carbamate

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.132 Da

Monoisotopic Mass:

214.023 Da

ACD/LogP:

0.51

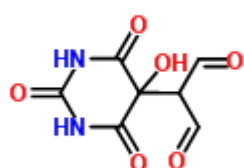
ACD/LogD (pH 5.5):

0.505

ACD/LogD (pH 7.4):

0.468

10528313



Data Sources:

Journal of Heterocyclic Chemistry

Empirical Formula:

C7H6N2O6

Systematic Name:

(5-hydroxy-2,4,6-trioxohexahydropyrimidin-5-yl)propanedial

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

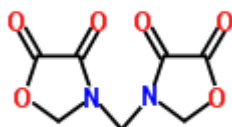
214.022586 Da

ACD/LogP:

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

10564452



Data Sources:

Journal of Heterocyclic Chemistry

Empirical Formula:

C7H6N2O6

Systematic Name:

3,3'-methanediylbis(1,3-oxazolidine-4,5-dione)

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

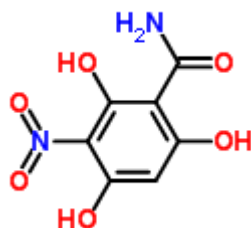
214.022586 Da

ACD/LogP:

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

10629272



Data Sources:

PubMed

Empirical Formula:

C7H6N2O6

Systematic Name:

2,4,6-trihydroxy-3-nitrobenzamide

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

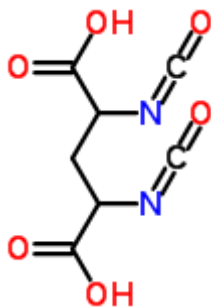
Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

2.93

15196464



ACD/LogD (pH 5.5):

0.34

ACD/LogD (pH 7.4):

Data Sources:

<http://www.chemspider.com/Substance-Suppliers/15196464.html>

Empirical Formula:

C7H6N2O6

Systematic Name:

4-isocyanato-N-(oxomethylidene)glutamic acid

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

1.69

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

15398926



Data Sources:

<http://www.chemspider.com/Substance-Suppliers/15398926.html>

Empirical Formula:

C7H6N2O6

Systematic Name:

4,6-dihydroxy-2-methyl-5-nitropyridine-3-carboxylic acid

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

16445101



Data Sources:

<http://www.chemspider.com/Substance-Suppliers/16445101.html>

Empirical Formula:

C7H6N2O6

Systematic Name:

4,5-dihydroxy-6-(methoxycarbonyl)pyrimidine-2-carboxylic acid

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

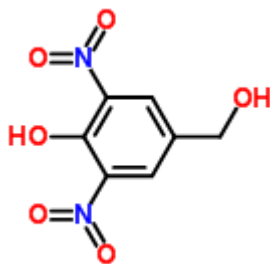
214.022586 Da

ACD/LogP:

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

14842499



Data Sources:

<http://www.chemspider.com/Substance-Suppliers/14842499.html>

Empirical Formula:

$C_7H_6N_2O_6$

Systematic Name:

4-(hydroxymethyl)-2,6-dinitrophenol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

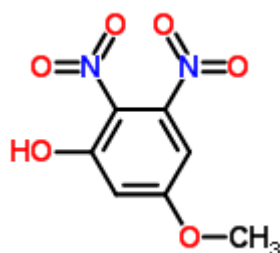
ACD/LogP:

0.69

ACD/LogD (pH 5.5):

ACD/LogD (pH 7.4):

15085832



Data Sources:

<http://www.chemspider.com/Substance-Suppliers/15085832.html>

Empirical Formula:

$C_7H_6N_2O_6$

Systematic Name:

5-methoxy-2,3-dinitrophenol

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

2.82

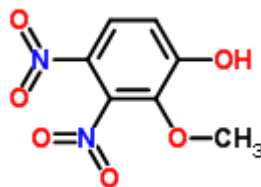
ACD/LogD (pH 5.5):

1.9

ACD/LogD (pH 7.4):

0.2

15128531



Data Sources:

<http://www.chemspider.com/Substance-Suppliers/15128531.html>

Empirical Formula:

$C_7H_6N_2O_6$

Systematic Name:

2-methoxy-3,4-dinitrophenol

SMILES:

Oc1ccc(c(N(=O)=O)c1OC)N(=O)=O

Molecular Weight:

214.1323

Nominal Mass:

214 Da

Average Mass:

214.1323 Da

Monoisotopic Mass:

214.022586 Da

ACD/LogP:

2.05

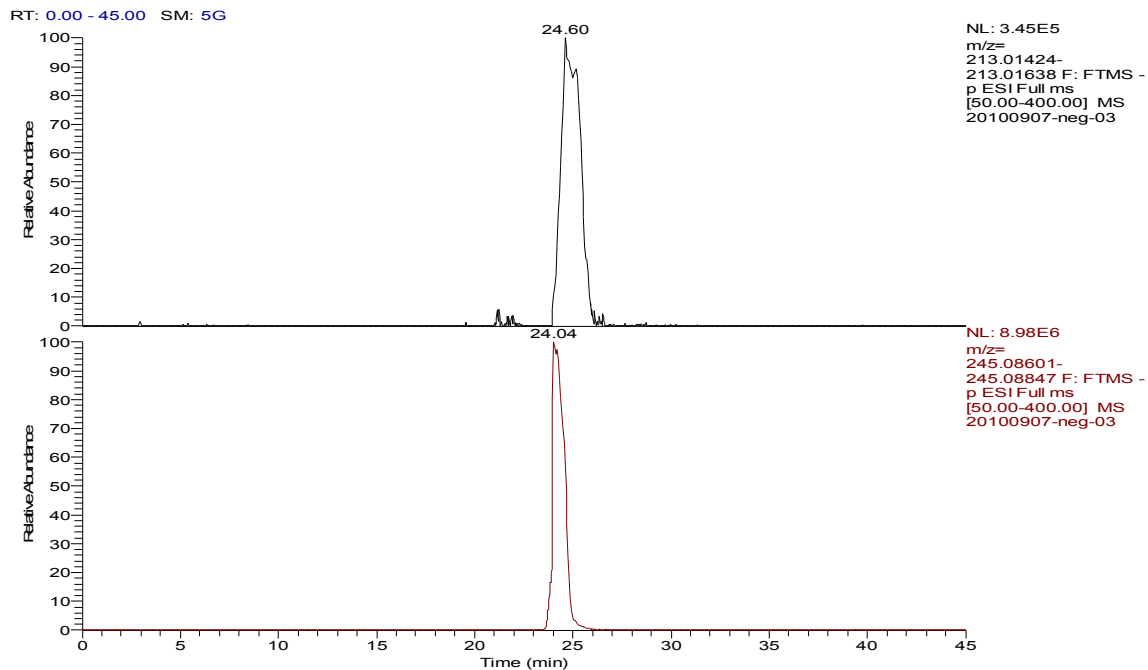
ACD/LogD (pH 5.5):

1.67

ACD/LogD (pH 7.4):

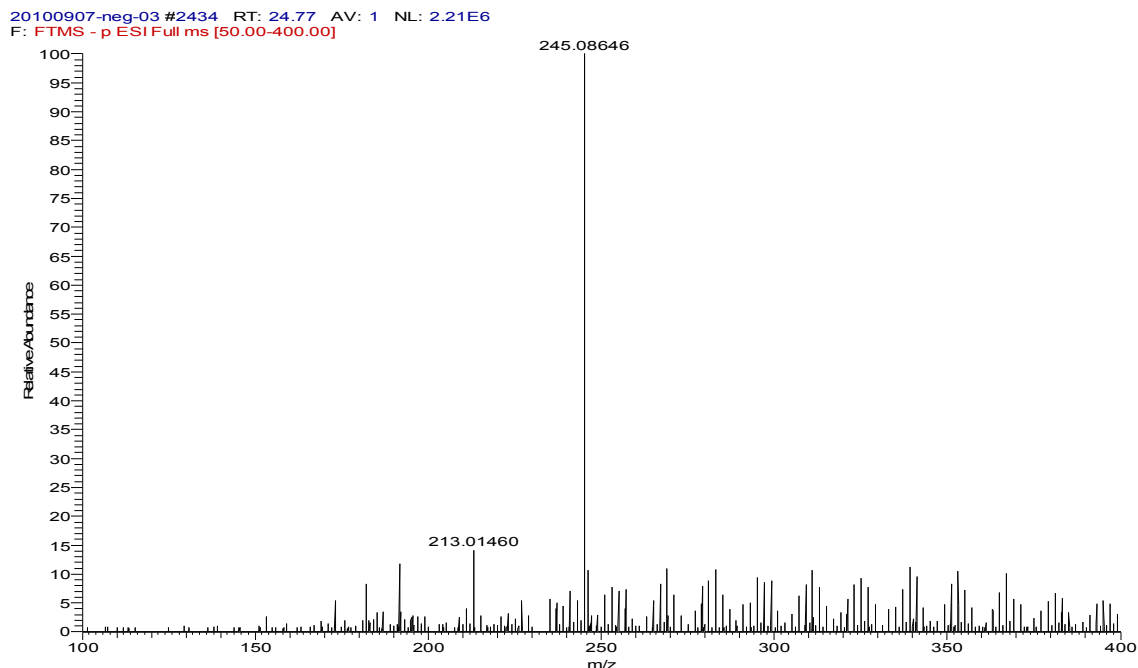
0.04

IV Orbitrap resultaten van extra extract



Extracted ion chromatogram van de stof die enkel in het UV behandelde extract werd aangetroffen; $m/z=213,01531 \pm 5$ ppm (boven) en de interne standaardstof bentazon-d6; $m/z=245,08724 \pm 5$ ppm (onder).

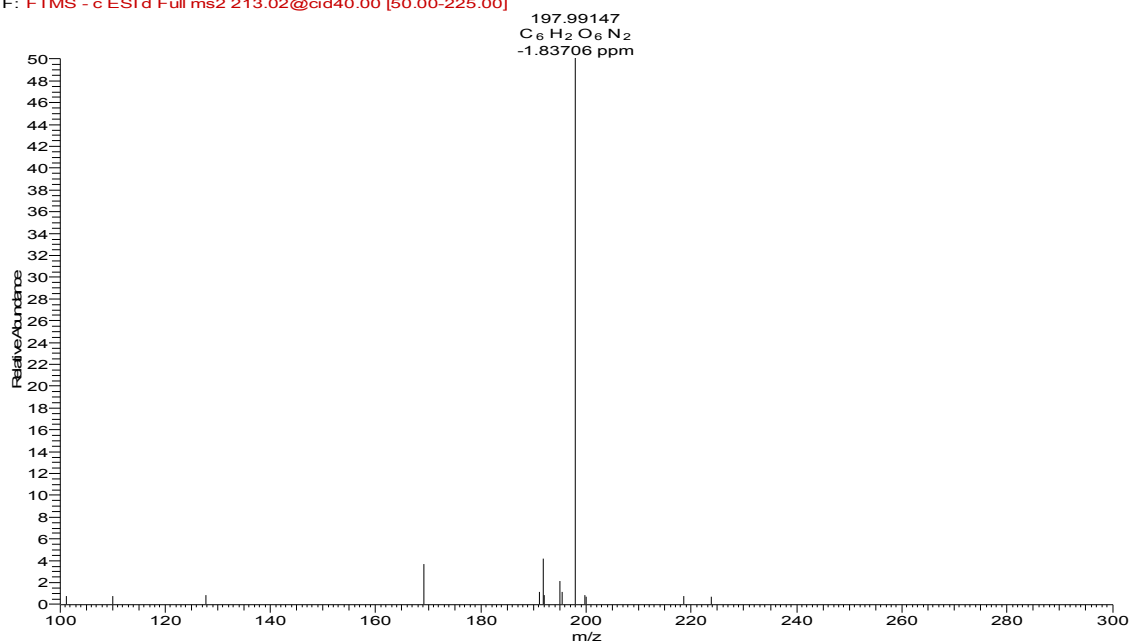
Door een andere zuurgraad van het LC-eluens is de retentietijd verschoven.



Accurate mass spectrum van de doelstof ($m/z=213$).

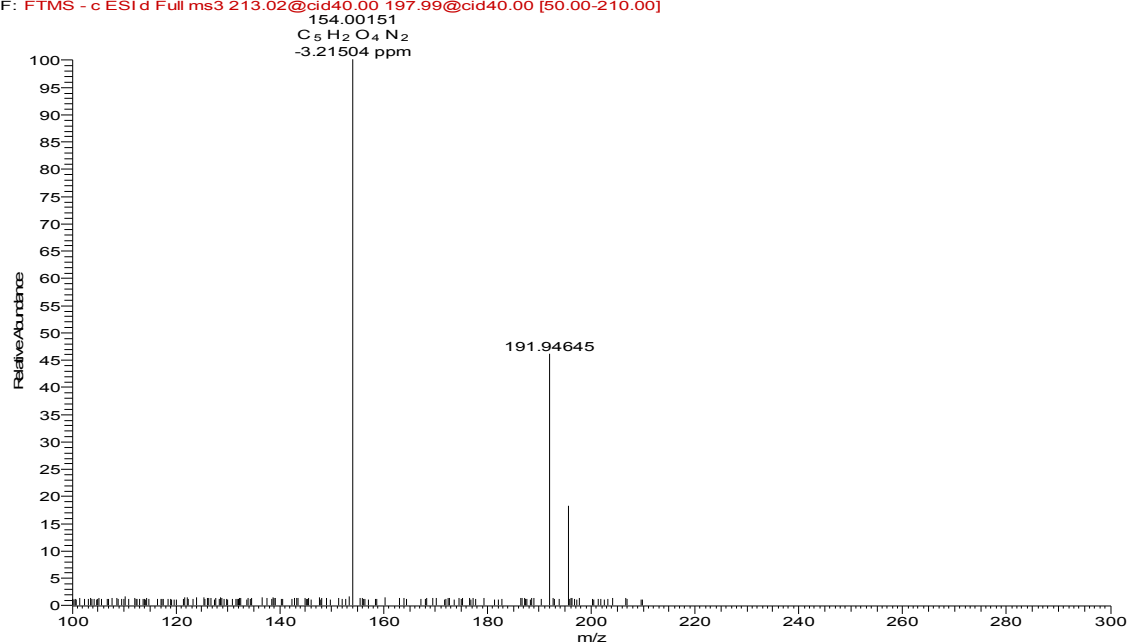
Het ion 245.08676 is afkomstig van de interne standaardstof bentazon-d6 die vrijwel gelijktijdig elueert.

20100907-neg-03 #2441 RT: 24.89 AV: 1 NL: 8.43E4
 F: FTMS - c ESI d Full ms2 213.02@cid40.00 [50.00-225.00]



MS2-spectrum van ion 213.

20100907-neg-03 #2398-2469 RT: 24.13-25.43 AV: 24 NL: 5.32E2
 F: FTMS - c ESI d Full ms3 213.02@cid40.00 197.99@cid40.00 [50.00-210.00]



MS3-spectrum van ion 213→198.

V Resultaten Ames fluctuatietest

Bevestigingsproef

Cytotoxiciteitsdata

TA98 -S9	cytotoxiciteit respons (triplo)					statistiek cytotoxiciteit				
	OD bij 595 nm			gemiddelde	stdev	NC < 0,100	NC>0,100	x < DL?	% cytotoxisch	cytotoxisch?
monster naam	1	2	3			DL	DL			
NC (DMSO)	0,088	0,079	0,082	0,0830	0,0046	0,0792	0,0615		100%	
PC-cyt	0,039	0,039	0,04	0,0393	0,0006	0,0792	0,0615	Ja	47%	Ja
PC	0,075	0,072	0,069	0,0720	0,0030	0,0792	0,0615	Ja	87%	Ja
PrC	0,092	0,08	0,081	0,0843	0,0067	0,0792	0,0615		102%	
Evian blanco	0,085	0,082	0,08	0,0823	0,0025	0,0792	0,0615		99%	
Na MD UV-ox	0,107	0,104	0,101	0,1040	0,0030	0,0792	0,0615		125%	
PS 20 µg/l	0,084	0,079	0,079	0,0807	0,0029	0,0792	0,0615		97%	
PS 50 µg/l	0,076	0,079	0,073	0,0760	0,0030	0,0792	0,0615	Ja	92%	
PS 100 µg/l	0,073	0,072	0,074	0,0730	0,0010	0,0792	0,0615	Ja	88%	Ja
PS 200 µg/l	0,077	0,074	0,075	0,0753	0,0015	0,0792	0,0615	Ja	91%	
PS 500 µg/l	0,087	0,075	0,077	0,0797	0,0064	0,0792	0,0615		96%	
PS 1000 µg/l	0,082	0,079	0,079	0,0800	0,0017	0,0792	0,0615		96%	
PS 2000 µg/l	0,077	0,082	0,073	0,0773	0,0045	0,0792	0,0615	Ja	93%	
PS 5000 µg/l	0,073	0,071	0,076	0,0733	0,0025	0,0792	0,0615	Ja	88%	Ja
GF 28 µg/l	0,083	0,079	0,082	0,0813	0,0021	0,0792	0,0615		98%	
GF 70 µg/l	0,08	0,072	0,078	0,0767	0,0042	0,0792	0,0615	Ja	92%	
GF140 µg/l	0,076	0,071	0,076	0,0743	0,0029	0,0792	0,0615	Ja	90%	
GF 280 µg/l	0,074	0,075	0,07	0,0730	0,0026	0,0792	0,0615	Ja	88%	Ja
GF 700 µg/l	0,072	0,072	0,072	0,0720	0,0000	0,0792	0,0615	Ja	87%	Ja
GF 1400 µg/l	0,082	0,077	0,075	0,0780	0,0036	0,0792	0,0615	Ja	94%	
GF 2800 µg/l	0,08	0,077	0,079	0,0787	0,0015	0,0792	0,0615	Ja	95%	
GF 7000 µg/l	0,08	0,075	0,083	0,0793	0,0040	0,0792	0,0615		96%	

TA98 +S9	cytotoxiciteit respons (triplo)					statistiek cytotoxiciteit				
	OD bij 595 nm			gemiddelde	stdev	NC < 0,100	NC>0,100	x < DL?	% cytotoxisch	cytotoxisch?
monster naam	1	2	3			DL	DL			
NC (DMSO)	0,072	0,077	0,08	0,0763	0,0040	0,0698			100%	
PC-cyt	0,052	0,059	0,059	0,0567	0,0040	0,0698		Ja	74%	Ja
PC	0,071	0,071	0,079	0,0737	0,0046	0,0698			97%	
PrC	0,072	0,075	0,079	0,0753	0,0035	0,0698			99%	
Evian blanco	0,072	0,076	0,075	0,0743	0,0021	0,0698			97%	
Na MD UV-ox	0,09	0,1	0,092	0,0940	0,0053	0,0698			123%	
PS 20 µg/l	0,071	0,075	0,076	0,0740	0,0026	0,0698			97%	
PS 50 µg/l	0,077	0,071	0,07	0,0727	0,0038	0,0698			95%	
PS 100 µg/l	0,071	0,071	0,069	0,0703	0,0012	0,0698			92%	
PS 200 µg/l	0,069	0,067	0,073	0,0697	0,0031	0,0698		Ja	91%	
PS 500 µg/l	0,074	0,067	0,072	0,0710	0,0036	0,0698			93%	
PS 1000 µg/l	0,072	0,066	0,069	0,0690	0,0030	0,0698		Ja	90%	
PS 2000 µg/l	0,081	0,08	0,081	0,0807	0,0006	0,0698			106%	
PS 5000 µg/l	0,079	0,081	0,078	0,0793	0,0015	0,0698			104%	
GF 28 µg/l	0,08	0,07	0,075	0,0750	0,0050	0,0698			98%	
GF 70 µg/l	0,073	0,077	0,078	0,0760	0,0026	0,0698			100%	
GF140 µg/l	0,072	0,075	0,082	0,0763	0,0051	0,0698			100%	
GF 280 µg/l	0,071	0,072	0,076	0,0730	0,0026	0,0698			96%	
GF 700 µg/l	0,071	0,079	0,072	0,0740	0,0044	0,0698			97%	
GF 1400 µg/l	0,074	0,075	0,07	0,0730	0,0026	0,0698			96%	
GF 2800 µg/l	0,075	0,086	0,081	0,0807	0,0055	0,0698			106%	
GF 7000 µg/l	0,077	0,082	0,095	0,0847	0,0093	0,0698			111%	

TA100 -S9	cytotoxiciteit respons (triplo)					statistiek cytotoxiciteit				
	OD bij 595 nm			gemiddelde	stdev	NC < 0,100 DL	NC>0,100 DL	x < DL?	% cytotoxisch	cytotoxisch?
	1	2	3							
NC (DMSO)	0,095	0,09	0,093	0,0927	0,0025	0,0889	0,0712		100%	
PC-cyt	0,036	0,037	0,037	0,0367	0,0006	0,0889	0,0712	Ja	40%	Ja
PC	0,085	0,092	0,094	0,0903	0,0047	0,0889	0,0712		97%	
PrC	0,093	0,097	0,105	0,0983	0,0061	0,0889	0,0712		106%	
Evian blanco	0,095	0,097	0,097	0,0963	0,0012	0,0889	0,0712		104%	
Na MD UV-ox	0,132	0,136	0,131	0,1330	0,0026	0,0889	0,0712		144%	
PS 20 µg/l	0,08	0,079	0,08	0,0797	0,0006	0,0889	0,0712	Ja	86%	Ja
PS 50 µg/l	0,093	0,081	0,085	0,0863	0,0061	0,0889	0,0712	Ja	93%	
PS 100 µg/l	0,089	0,087	0,084	0,0867	0,0025	0,0889	0,0712	Ja	94%	
PS 200 µg/l	0,085	0,084	0,091	0,0867	0,0038	0,0889	0,0712	Ja	94%	
PS 500 µg/l	0,094	0,09	0,089	0,0910	0,0026	0,0889	0,0712		98%	
PS 1000 µg/l	0,098	0,09	0,09	0,0927	0,0046	0,0889	0,0712		100%	
PS 2000 µg/l	0,078	0,091	0,085	0,0847	0,0065	0,0889	0,0712	Ja	91%	
PS 5000 µg/l	0,104	0,091	0,083	0,0927	0,0106	0,0889	0,0712		100%	
GF 28 µg/l	0,087	0,084	0,076	0,0823	0,0057	0,0889	0,0712	Ja	89%	Ja
GF 70 µg/l	0,092	0,09	0,08	0,0873	0,0064	0,0889	0,0712	Ja	94%	
GF 140 µg/l	0,086	0,082	0,081	0,0830	0,0026	0,0889	0,0712	Ja	90%	
GF 280 µg/l	0,088	0,083	0,08	0,0837	0,0040	0,0889	0,0712	Ja	90%	
GF 700 µg/l	0,098	0,078	0,082	0,0860	0,0106	0,0889	0,0712	Ja	93%	
GF 1400 µg/l	0,093	0,102	0,086	0,0937	0,0080	0,0889	0,0712		101%	
GF 2800 µg/l	0,089	0,092	0,083	0,0880	0,0046	0,0889	0,0712	Ja	95%	
GF 7000 µg/l	0,1	0,085	0,084	0,0897	0,0090	0,0889	0,0712		97%	

formule van TA98 -S9 gebruikt bij gebrek aan voldoende historische data TA100

TA100 +S9	cytotoxiciteit respons (triplo)					statistiek cytotoxiciteit				
	OD bij 595 nm			gemiddelde	stdev	NC < 0,100 DL	NC>0,100 DL	x < DL?	% cytotoxisch	cytotoxisch?
	1	2	3							
NC (DMSO)	0,064	0,06	0,066	0,0633	0,0031	0,0568			100%	
PC-cyt	0,046	0,045	0,047	0,0460	0,0010	0,0568		Ja	73%	Ja
PC	0,063	0,059	0,057	0,0597	0,0031	0,0568			94%	
PrC	0,067	0,068	0,067	0,0673	0,0006	0,0568			106%	
Evian blanco	0,064	0,075	0,062	0,0670	0,0070	0,0568			106%	
Na MD UV-ox	0,074	0,095	0,077	0,0820	0,0114	0,0568			129%	
PS 20 µg/l	0,071	0,078	0,076	0,0750	0,0036	0,0568			118%	
PS 50 µg/l	0,069	0,066	0,065	0,0667	0,0021	0,0568			105%	
PS 100 µg/l	0,07	0,063	0,058	0,0637	0,0060	0,0568			101%	
PS 200 µg/l	0,067	0,063	0,06	0,0633	0,0035	0,0568			100%	
PS 500 µg/l	0,06	0,064	0,057	0,0603	0,0035	0,0568			95%	
PS 1000 µg/l	0,058	0,062	0,056	0,0587	0,0031	0,0568			93%	
PS 2000 µg/l	0,065	0,066	0,075	0,0687	0,0055	0,0568			108%	
PS 5000 µg/l	0,07	0,063	0,063	0,0653	0,0040	0,0568			103%	
GF 28 µg/l	0,074	0,077	0,064	0,0717	0,0068	0,0568			113%	
GF 70 µg/l	0,057	0,086	0,063	0,0687	0,0153	0,0568			108%	
GF 140 µg/l	0,056	0,059	0,063	0,0593	0,0035	0,0568			94%	
GF 280 µg/l	0,063	0,058	0,058	0,0597	0,0029	0,0568			94%	
GF 700 µg/l	0,058	0,053	0,053	0,0547	0,0029	0,0568		Ja	86%	Ja
GF 1400 µg/l	0,058	0,063	0,061	0,0607	0,0025	0,0568			96%	
GF 2800 µg/l	0,062	0,058	0,061	0,0603	0,0021	0,0568			95%	
GF 7000 µg/l	0,06	0,061	0,061	0,0607	0,0006	0,0568			96%	

formule van TA98 -S9 gebruikt bij gebrek aan voldoende historische data TA100

TAMix -S9	cytotoxiciteit respons (triplo)					statistiek cytotoxiciteit				
	OD bij 595 nm			gemiddelde	stdev	NC < 0,100 DL	NC>0,100 DL	x < DL?	% cytotoxisch	cytotoxisch?
	1	2	3							
NC (DMSO)	0,057	0,056	0,056	0,0563	0,0006	0,0530	0,0494		100%	
PC-cyt	0,040	0,040	0,040	0,0400	0,0000	0,0530	0,0494	Ja	71%	Ja
PC	0,055	0,055	0,055	0,0550	0,0000	0,0530	0,0494		98%	
PrC	0,060	0,061	0,062	0,0610	0,0010	0,0530	0,0494		108%	
Evian blanco	0,062	0,062	0,062	0,0620	0,0000	0,0530	0,0494		110%	
Na MD UV-ox	0,078	0,076	0,070	0,0747	0,0042	0,0530	0,0494		133%	
PS 1000 µg/l	0,054	0,057	0,058	0,0563	0,0021	0,0530	0,0494		100%	
GF 700 µg/l	0,054	0,056	0,059	0,0563	0,0025	0,0530	0,0494		100%	

TAMix +S9	cytotoxiciteit respons (triplo)					statistiek cytotoxiciteit				
	OD bij 595 nm			gemiddelde	stdev	NC < 0,100 DL	NC>0,100 DL	x < DL?	% cytotoxisch	cytotoxisch?
	1	2	3							
NC (DMSO)	0,100	0,102	0,103	0,1017	0,0015	0,0972	0,0902		100%	
PC-cyt	0,063	0,072	0,071	0,0687	0,0049	0,0972	0,0902	Ja	68%	Ja
PC	0,092	0,098	0,115	0,1017	0,0119	0,0972	0,0902		100%	
PrC	0,096	0,096	0,089	0,0937	0,0040	0,0972	0,0902		92%	
Evian blanco	0,109	0,075	0,094	0,0927	0,0170	0,0972	0,0902		91%	
Na MD UV-ox	0,107	0,111	0,101	0,1063	0,0050	0,0972	0,0902		105%	
PS 1000 µg/l	0,082	0,078	0,098	0,0860	0,0106	0,0972	0,0902	Ja	85%	Ja
GF 700 µg/l	0,096	0,090	0,075	0,0870	0,0108	0,0972	0,0902	Ja	86%	Ja

Identificatie van mogelijke bijproduct(en) na UV-oxidatie

Ames fluctuatietest data

Hoge dosering

Cytotoxiciteitsdata

TA98-S9 monster naam	cytotoxiciteit respons (triplo) OD bij 595 nm					statistiek cytotoxiciteit			
	1	2	3	gemiddelde	stdev	NC < 0,100 DL	NC>0,100 DL	x < DL?	% cytotoxisch cytotoxisch?
NC	0,074	0,068	0,067	0,0697	0,0038	0,0659	0,0482		100%
PC	0,076	0,075	0,072	0,0743	0,0021	0,0659	0,0482		107%
PC-cyt	0,066	0,072	0,074	0,0707	0,0042	0,0659	0,0482		101%
PS 5 mg/l	0,064	0,068	0,074	0,0687	0,0050	0,0659	0,0482		99%
PS 10 mg/l	0,071	0,067	0,073	0,0703	0,0031	0,0659	0,0482		101%
PS 20 mg/l	0,064	0,062	0,065	0,0637	0,0015	0,0659	0,0482	Ja	91%
PS 50 mg/l	0,079	0,081	0,087	0,0823	0,0042	0,0659	0,0482		118%
PS 100 mg/l	0,072	0,074	0,069	0,0717	0,0025	0,0659	0,0482		103%
PS 200 mg/l	0,04	0,041	0,041	0,0407	0,0006	0,0659	0,0482	Ja	58% Ja
PS 500 mg/l	0,092	0,086	0,078	0,0853	0,0070	0,0659	0,0482		122%
PS 1 g/l	0,087	0,084	0,085	0,0853	0,0015	0,0659	0,0482		122%
PS 2 g/l	0,076	0,075	0,138	0,0963	0,0361	0,0659	0,0482		138%
PS 5 g/l	0,081	0,083	0,08	0,0813	0,0015	0,0659	0,0482		117%
PS 10 g/l	0,077	0,082	0,081	0,0800	0,0026	0,0659	0,0482		115%

te hoog, niet acceptabel

TA98+S9 monster naam	cytotoxiciteit respons (triplo) OD bij 595 nm					statistiek cytotoxiciteit			
	1	2	3	gemiddelde	stdev	NC < 0,100 DL	NC>0,100 DL	x < DL?	% cytotoxisch cytotoxisch?
NC	0,059	0,061	0,066	0,0620	0,0036	0,0554			100%
PC	0,062	0,06	0,065	0,0623	0,0025	0,0554			101%
PC-cyt	0,05	0,051	0,052	0,0510	0,0010	0,0554		Ja	82% Ja
PS 5 mg/l	0,063	0,063	0,06	0,0620	0,0017	0,0554			100%
PS 10 mg/l	0,062	0,06	0,062	0,0613	0,0012	0,0554			99%
PS 20 mg/l	0,058	0,06	0,062	0,0600	0,0020	0,0554			97%
PS 50 mg/l	0,066	0,064	0,064	0,0647	0,0012	0,0554			104%
PS 100 mg/l	0,066	0,067	0,065	0,0660	0,0010	0,0554			106%
PS 200 mg/l	0,066	0,063	0,067	0,0653	0,0021	0,0554			105%
PS 500 mg/l	0,064	0,065	0,068	0,0657	0,0021	0,0554			106%
PS 1 g/l	0,065	0,061	0,062	0,0627	0,0021	0,0554			101%
PS 2 g/l	0,055	0,057	0,056	0,0560	0,0010	0,0554			90%
PS 5 g/l	0,055	0,054	0,054	0,0545	0,0007	0,0554		Ja	88% Ja
PS 10 g/l	0,053	0,052	0,049	0,0513	0,0021	0,0554		Ja	83% Ja

aan hoge kant

Ames fluctuatietest data

