

BTO 2018.045| Januari 2018

BTO rapport

Non-target LC-HRMS
screening – op weg naar
praktijkrichtlijnen

BTO 2018.045

Non-target LC-HRMS screening – op weg naar praktijkrichtlijnen

BTO | Januari 2018

Opdrachtnummer

400554-143

Projectmanager

Stefan Kools

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Nieuwe meetmethoden en sensing

Kwaliteitsborger(s)

Pim de Voogt

Auteur(s)

Ing. J.A. (Ton) van Leerdam, Dr. A.M (Andrea) Brunner, Ing. M.M.E. (Margo) van der Kooi en Ing. E (Erik) Emke

Verzonden aan

Nederlandse drinkwaterbedrijven, Nederlandse drinkwaterlaboratoria, Rijkswaterstaat en RIVM

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie

Ing. J.A. (Ton) van Leerdam
T 030-60 69 624
E ton.van.leerdam@kwrwater.nl

Keywords: LC-HRMS, screening, ring test

Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



BTO | Januari 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

BTO Managementsamenvatting

Eerste stappen gezet naar richtlijn en kwaliteitseisen voor non-target screening met LC-HRMS

Auteur(s) ing. Ton van Leerdam, dr. Andrea Brunner, ing. Margo van der Kooi, ing. Erik Emke

Onderzoek met de vier Nederlandse drinkwaterlaboratoria, Rijkswaterstaat en RIVM, aangevuld met Europees ringonderzoek, heeft geleid tot nieuwe informatie en bouwstenen voor een voorlopige richtlijn en kwaliteitseisen voor LC-HRMS. Deze screeningstechniek wordt al ruim tien jaar toegepast in het monitoren van stoffen. LC-HRMS onderscheidt zich vanwege de hoge gevoeligheid en detectie van meerdere stoffen tegelijk. Omdat het aantal en de hoeveelheid stoffen in het aquatisch milieu wereldwijd in sterke mate toenemen, groeit de behoefte aan een non-target screeningstechniek die in staat is een veelheid aan stoffen in beeld te brengen en aan breed gedeelde richtlijnen voor de uitvoering van deze monitoring.

Belang: non-target screeningstechniek nodig voor monitoring toenemend aantal stoffen

Wereldwijd neemt de productie van stoffen in hoeveelheden en aantallen steeds verder toe. Een deel van die stoffen (zowel bekende als onbekende) komt uiteindelijk in het milieu terecht. Monitoring van elke afzonderlijke stof en beoordeling van de bijbehorende risico's is niet mogelijk. LC-HRMS (de combinatie van vloeistofchromatografie en hoge-resolutie-massaspectrometrie) biedt hiervoor een oplossing die in toenemende mate wordt gebruikt. De gevoelige screeningstechniek brengt een breed palet aan stoffen tegelijk in beeld. Aan de hand van dat beeld kunnen vervolgens de bijbehorende risico's worden ingeschat. In dit onderzoek is gekeken of algemene richtlijnen of normen voor de toepassing van LC-HRMS kunnen worden geformuleerd.

Aanpak: richtlijn voor analysemethode en onderbouwing met Europees ringonderzoek.

Tijdens dit tweejarige project hebben de Nederlandse drinkwaterlaboratoria, Rijkswaterstaat, RIVM en KWR hun ervaringen met het gebruik van de LC-HRMS screeningstechniek binnen Nederland uitgewisseld. Op die basis zijn twee documenten opgesteld: (i) 'richtlijn screening met massaspectrometrie' en (ii) 'methode en kwaliteitseisen screenen met LC-HRMS'. Om deze documenten verder te kunnen onderbouwen, heeft KWR vervolgens een Europees ringonderzoek uitgevoerd. Hierin deden zeventien Europese

laboratoria mee aan het analyseren van in totaal acht verschillende watermonsters. Hiermee is de stand van zaken én kwaliteit van de LC-HRMS screening in beeld gebracht.

Resultaten: beeld verkregen van reikwijdte en prestaties van LC-HRMS screening

Een eerste beeld is verkregen van de gebruikte instrumenten, analysecondities en software bij zeventien Europese laboratoria in de toepassing van LC-HRMS screening. De resultaten van het ringonderzoek voor suspect en non-target screening kunnen worden gebruikt om de opgestelde richtlijn en kwaliteitseisen voor de screeningstechniek verder te onderbouwen.

Implementatie: onderbouwing van een mogelijke richtlijn of norm

Veel ervaring is opgedaan en kennis uitgewisseld tussen Nederlandse drinkwaterlaboratoria, Rijkswaterstaat en RIVM door gedurende de twee jaar van het project samen op te trekken. Aangevuld met resultaten van het ringonderzoek kan in een vervolgtraject mogelijk een publieke richtlijn of wettelijke norm worden opgesteld die dankzij de medewerking van de bovengenoemde partijen ook breed gedragen wordt.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport 'Non-target LC-HRMS screening – op weg naar wettelijke verankering' BTO-xxx.

Samenvatting

Kader. Screening met LC-HRMS wordt al meer dan 10 jaar toegepast in de drinkwatersector. Op dit moment hebben de vier Nederlandse drinkwaterlaboratoria de beschikking over deze apparatuur, de mate van ervaring met deze methode is echter zeer verschillend. Een goede samenwerking om van elkaar te leren en ervaringen uit te wisselen is dan ook essentieel om samen op een hoger niveau te komen. Een van de doelen van het onderzoek is het opzetten van kwaliteitscriteria voor de Nederlandse drinkwaterlaboratoria waaraan de LC-HRMS screeningsmethode moet voldoen. Naast de Nederlandse situatie is het belangrijk om ook de Europese ontwikkelingen te volgen. Daarom is contact gelegd met diverse Duitse onderzoeksinstituten zoals Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) en IWW Zentrum Wasser (IWW) om van elkaar te leren en kennis en ervaringen uit te wisselen. Ook zijn de Europese ontwikkelingen binnen NORMAN-verband gevolgd en dit heeft uiteindelijk geresulteerd in een Europees opgezet ringonderzoek met in totaal 17 deelnemers waarvan 12 buiten Nederland. De bedoeling van dit ringonderzoek is om te inventariseren welke LC-HRMS analysemethoden er worden toegepast en in welke mate de resultaten bij analyse van dezelfde ringonderzoekmonsters vergelijkbaar zijn. Uit de meetgegevens zijn binnen de beschikbare middelen van dit onderzoek alleen de hoofdlijnen geïnventariseerd. De data blijven beschikbaar voor een aanvullende interpretatie.

Ringonderzoek. In totaal zijn acht watermonsters (grondwater, oppervlaktewater en drinkwater) met additie van 31 tot 39 verschillende doelstoffen en vier interne standaarden bereid door KWR. De analyse bij elke deelnemer is met de 'eigen' LC-HRMS analysemethode in triplo uitgevoerd in zowel de positieve als negatieve ionisatiemodus. Monsters 1 t/m 5 zijn bij de uitwerking behandeld als 'suspect screening' waarbij aan de hand van een suspectlijst met accurate massa's naar de specifieke stoffen is gezocht. Monsters 6 t/m 8 zijn behandeld als 'non-target screening' (monsters met onbekende samenstelling). Voor het registreren van de gebruikte apparatuur en analysecondities is tegelijk met de monsters een vragenlijst met vaste invulvelden verstuurd. Voor de rapportage van LC-MS resultaten is een spreadsheet gemaakt met een strikt formaat en vaste invulvelden om zo de uitwerking geautomatiseerd te kunnen uitvoeren.

Suspect screening. De massa-accuraatheid, één van de belangrijkste parameters bij hoge resolutie massaspectrometrie, blijkt voor alle deelnemers lager te zijn dan 5 ppm, dit komt overeen met de bovengrens van de specificatie van de meeste Orbitrap en Q-ToF hoge resolutie massaspectrometers. Om een indruk te krijgen tot welk concentratieniveau een breed palet aan stoffen kan worden gemeten zijn addities van totaal 43 stoffen inclusief de interne standaarden (logKow van -2,8 tot + 8,5) toegevoegd aan drinkwater met een concentratie van 0,025, 0,25 en 2,5 µg/L. Het overgrote deel (gemiddeld 85%) van deze stoffen wordt teruggevonden bij een concentratie van 0,025 µg/l. De meest hydrofiele stof iohexol (logKow -2,8) wordt niet teruggevonden, de overige stoffen met een logKow gebied van -1,3 tot +8,5 wel. In grondwater en oppervlaktewater wordt gemiddeld 82% van de stoffen teruggevonden bij een additie van 1,0 µg/L.

Non-target screening. De deelnemers waren niet op de hoogte welke stoffen aan de 3 monsters zijn toegevoegd. Bij 3 van de 17 deelnemers waren de resultaten onvoldoende voor de automatische verwerking door ontbreken van stofnamen en zijn de resultaten daarom niet meegenomen bij de data-analyse. Door de overige 14 deelnemers werd tussen

de 32 en 84% van de geaddeerde stoffen teruggevonden. De grote verschillen per deelnemer zijn mogelijk afhankelijk van type massaspectrometer, analysecondities en de ervaring van de onderzoeker, maar dit is niet verder onderzocht. Gemiddeld worden 63% van de toegevoegde stoffen teruggevonden. Bij de non-target screening worden minder stoffen aangetoond dan bij de suspect screening van hetzelfde monster (81 resp. 85%). Opmerkelijk is het grote verschil in aangetoonde stoffen per deelnemer. Zowel bij de suspect screening als de non-target screening ligt dit tussen de 0 en 95%. Om de non-target screening resultaten van de deelnemers naast de toegevoegde stoffen te vergelijken zijn de top-5 gerapporteerde stoffen van elke deelnemer bepaald. Deze top-5 blijken niet voor elke deelnemer gelijk te zijn. Dit komt o.a. door een instrumentafhankelijke meetgevoeligheid voor de verschillende toegevoegde. In totaal zijn bij de verschillende deelnemers in de 3 monsters tussen de 24 en 42 top-5 stoffen aangetoond bij de positieve ionen meting en tussen de 32 en 42 stoffen bij de negatieve ionen meting. Ruim de helft van de stoffen was niet toegevoegd.

Toepassing Retentie Tijd Index. Voor het onderling vergelijken en uitwisselen van onbekende stoffen (alleen accurate massa en retentietijd beschikbaar) en ter identificatie/bevestiging van suspects is de Retentie Tijd Index (RTI) een handig hulpmiddel. Met deze RTI wordt een gemeten retentietijd omgerekend naar een relatieve retentietijd met behulp van referentiestoffen. Hiervoor kunnen diverse methoden worden gebruikt zoals de Kreti, de 'Letzel' index van de Universiteit van München of de index die ontwikkeld is door de Universiteit van Athene (UoA), zie voor meer informatie bijlage I. De Kreti heeft als voordeel dat deze al jaren wordt gebruikt voor LC-UV screening en dat onbekende stoffen gemeten met LC-HRMS gelinkt kunnen worden met onbekende stoffen gemeten met LC-UV. De verwachting is dat de methode van UoA binnen het NORMAN-netwerk de standaard gaat worden.

Toekomst. De resultaten van het ringonderzoek geven een goed beeld van de status quo van de LC-HRMS screening en geven input aan een mogelijke normdocument. Geconcludeerd kan worden dat de LC-HRMS screening zodanig volgroeid is dat een norm kan worden opgesteld. Voor het opzetten van een dergelijke norm is het waardevol om in vervolgonderzoek een extra verdiepingsslag van het uitgevoerde ringonderzoek uit te voeren waarbij de invloed van de gebruikte analysecondities op het eindresultaat verder in beeld wordt gebracht.

Aanbevolen wordt om een minder uitgebreid ringonderzoek in de toekomst te herhalen, zodat de laboratoria de kwaliteit van hun eigen methode kunnen vergelijken met anderen. Ook kan de ontwikkeling van de methode over meerdere jaren hiermee in beeld worden gebracht. De ontwikkelde automatische tools voor verwerking van de meetgegevens en de opgedane ervaring met het rapportageformulier zorgen dan voor een snelle en efficiënte uitwerking van de meetgegevens.

Inhoud

1	Inleiding en leeswijzer	5
2	Methodebeschrijving en onderzoek retentie-index	7
2.1	Methodebeschrijving en kwaliteitseisen	7
2.2	RTI ringonderzoek	8
3	Opzet Europees ringonderzoek	11
3.1	Inleiding	11
3.2	Monsters	11
3.3	Deelnemers	12
3.4	Dataverwerking	13
4	Resultaten Europees ringonderzoek	15
4.1	Analysecondities	15
4.2	Suspect screening	16
4.3	Non-target screening	27
4.4	Retentie tijd indices	39
4.5	Conclusies	41
5	Discussie en vooruitblik	42
6	Referenties	43
Bijlage I	Achtergrondinformatie Kreti en Letzel index	
Bijlage II	Resultaten RTI onderzoek	
Bijlage III	Overzicht van de toegevoegde stoffen bij Europees ringonderzoek suspects screening (monsters 1 t/m 5)	
Bijlage IV	Overzicht van de interne standaarden en RTI stoffen bij Europese ringonderzoek	
Bijlage V	Overzicht van de toegevoegde stoffen bij Europees ringonderzoek non-target screening (monsters 6 t/m 8)	
Bijlage VI	Google vragenlijst bij Europees ringonderzoek	
Bijlage VII	Overzicht van toegepaste analysecondities bij Europees ringonderzoek	
Bijlage VIII	massa-afwijking met spreiding van doelstoffen bij een additie van 0,025 en 2,5 µg/L aan drinkwater	

Bijlage IX	Non-target screening: overzicht top-5 aangetoonde stoffen
Bijlage X	Richtlijn screening met massaspectrometrie
Bijlage XI	Methode en kwaliteitseisen screenen met LC-HRMS
Bijlage XII	Ingediend voorstel bij NORMAN voor een verdere verdieping van het ringonderzoek
Bijlage XIII	Memo aan Adviesgroep Waterkwaliteit

1 Inleiding en leeswijzer

Wereldwijd worden chemische stoffen in steeds grotere hoeveelheden en aantallen geproduceerd. Een deel van die stoffen komt uiteindelijk in het milieu terecht. Het aantal is te groot om elke stof met traditionele chemische analysemethoden te monitoren en risico's te beoordelen. Daarom bestaat de collectieve wens om één methode te hebben die relatief eenvoudig een zo breed mogelijk beeld geeft van de aanwezigheid van bekende en onbekende (antropogene) stoffen. Verder kan een dergelijke methode worden ingezet bij het in beeld brengen van stoffen die verantwoordelijk zijn voor positieve testresultaten in een bio-assay en daarmee een mogelijk risico vormen voor de drinkwaterkwaliteit, en heeft deze een meerwaarde bij het aantonen van (nog onbekende) bedreigingen voor drinkwaterwinningen.

In 2013 is als eerste stap gezamenlijk binnen Speerpuntonderzoek door Vitens, WLN en KWR een zogenaamde non-target screeningsmethode gebaseerd op LC-HRMS onderzocht om van elkaar te leren en om de analysemethoden te harmoniseren, af te stemmen en op een hoger plan te tillen. Het uitgangspunt hierbij is geweest dat de uiteindelijke screeningsmethode toepasbaar moet zijn in elk drinkwaterlaboratorium en op termijn invulling kan geven aan de wettelijke eisen voor risico gestuurd monitoren [1-4]. In 2015 is ook bij Aqualab Zuid en Het Waterlaboratorium een hoge resolutie massaspectrometer geïnstalleerd om deze LC-HRMS screening uit te kunnen voeren. Met de huidige non-target LC-HRMS screening die in gebruik is bij de drinkwaterlaboratoria en KWR wordt op laag niveau (ng/L range) naar een breed palet van stoffen gescreend. In 2016 is het twee jaar durende BTO-project 'Kwaliteitsborging brede screening – op weg naar wettelijke verankering' gestart met deelname van alle vier de drinkwaterlaboratoria, Rijkswaterstaat en KWR.

In hoofdstuk 2 worden kort de ontwikkelingen beschreven die bij het begin van het project zijn uitgevoerd. Er is een kleinschalig ringonderzoek uitgevoerd met de 4 drinkwaterlaboratoria, RWS en KWR, gericht op het meten van bekende stoffen die gebruikt worden als retentietijd index. Hierbij zijn ook de verschillende analysecondities per laboratorium globaal in beeld gebracht en zijn onderlinge kennis en ervaringen uitgewisseld. De methodebeschrijving en kwaliteitseisen die door een iteratief proces van de 7 deelnemers (4 drinkwaterlaboratoria, RWS, RIVM en KWR) tot stand zijn gekomen zijn als bijlage bij dit rapport opgenomen.

De focus van dit rapport ligt op het beschrijven van de resultaten van het Europese ringonderzoek omdat daarmee een beeld is verkregen van de huidige stand van zaken met betrekking tot screening met LC-HRMS. In hoofdstuk 3 wordt de opzet van dit ringonderzoek beschreven, in hoofdstuk 4 de resultaten. De resultaten zijn binnen het kader van dit onderzoek zo goed mogelijk grafisch in beeld gebracht en alleen op hoofdlijnen geïnterpreteerd. De verwerking van de gegevens met betrekking tot de RTI van de Universiteit van Athene (UoA, NORMAN-mix) is ook door deze universiteit uitgevoerd. In een mogelijk vervolg kan een verdiepingsslag worden uitgevoerd waarbij bijvoorbeeld de invloed van het type massaspectrometer en analysecondities zoals het LC-eluens op de resultaten verder in beeld worden gebracht. Gegevens uit dit ringonderzoek kunnen dienen als verdere onderbouwing voor en het aanscherpen van kwaliteitseisen voor een screening met LC-HRMS.

Binnen de kaders en mogelijkheden van dit project konden alleen de belangrijkste resultaten van het ringonderzoek worden bekeken. Deze resultaten zijn gedeeld met alle deelnemers.

2 Methodebeschrijving en onderzoek retentie-index

2.1 Methodebeschrijving en kwaliteitseisen

Eén van de doelen van het onderzoek was het beschrijven van de methode voor LC-HRMS screening en het opzetten van criteria voor de Nederlandse drinkwaterlaboratoria waaraan de screeningsmethode moet voldoen. Binnen de Nederlandse drinkwaterlaboratoria is de mate van ervaring met deze methode echter zeer verschillend. Zo hebben KWR, Vitens en WLN ruime ervaring, terwijl Aqualab Zuid en Het Waterlaboratorium recent gestart zijn met het opzetten en toepassen van de methode.

2.1.1 Normalisatie in Nederland

Halverwege het project is een medewerker van NEN bij een projectoverleg uitgenodigd om een toelichting te geven op de mogelijkheden van normalisatie. Hierbij werd aangegeven dat normen openbaar zijn, vrijwillig gebruikt worden en niet direct aan wetgeving gekoppeld zijn. Daarbij wordt niet altijd de methode met de hoogste kwaliteit geselecteerd omdat het een compromis is van de verschillende partijen die aan de ontwikkeling van de norm meewerken. De mogelijkheden voor een nationale norm zijn o.a.

- een Nederlandse Praktijk Richtlijn (NPR): een richtinggevend document
- een Nederlandse Voor Norm (NVN): als basis voor verdere ontwikkeling, deze wordt niet meer zoveel gemaakt en
- een Nederlands Technische Afspraak (NTA): voor een beperkte groep.

De voorkeur van NEN ligt bij een NTA omdat de doorlooptijd relatief kort is (circa 1 jaar, afhankelijk van startdocument en organisatie).

Op basis van de ervaringen en het gebruik binnen Nederland zijn in dit project 2 documenten opgesteld, (i) 'richtlijn screening met massaspectrometrie' en (ii) 'methode en kwaliteitseisen screenen met LC-HRMS'. De richtlijn is bedoeld als 'kapstok' voor chemische screening als invulling voor risico gestuurd monitoren, document (ii) is een nadere invulling van de specifieke screening met LC-HRMS. Beide documenten zijn opgenomen in resp. bijlage X en XI. Beide documenten zijn iteratief met de projectgroep tot stand gekomen, waarbij meerdere commentaarronden zijn doorlopen.

2.1.2 Europese normalisatie ontwikkelingen

Er is contact gelegd met diverse Duitse onderzoeksinstituten zoals Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) en IWW Zentrum Wasser (IWW). In januari 2017 is op een bijeenkomst in Düsseldorf de afspraak gemaakt om elkaar op de hoogte te houden m.b.t. normalisatie van de methode. Hierbij zijn ook de voorlopige resultaten van 2 in Duitsland uitgevoerde ringonderzoeken gepresenteerd waarbij tussen de 18 en 21 deelnemers waren betrokken. De verwachting is dat begin 2018 een eerste Duits concept van een normalisatiedocument beschikbaar komt. Ook zijn de Europese ontwikkelingen binnen NORMAN-verband gevolgd (zie kader bij paragraaf 3.1 voor doelstelling van NORMAN-netwerk). Zo heeft het Zwitserse onderzoeksinstituut EAWAG voor 2018 een voorstel ingediend voor een workshop met Europese regelgevers zoals European Chemicals Agency (ECHA) en Directorate-General (DG) environment. Bij Waterlink in België is

sinds kort een normalisatiedocument voor screening met LC-HRMS beschikbaar. Het ontwikkelen van een Europese norm ligt echter niet voor de hand omdat voor de opstart de steun nodig is van minimaal 5 landen en de doorlooptijd gemiddeld 3 jaar is.

2.2 RTI ringonderzoek

Als eerste stap in de samenwerking is een vergelijkend onderzoek uitgevoerd voor het testen van 2 verschillende Retentie Tijd Indices (RTI), namelijk de Kreti en de Letzel. Voor achtergrondinformatie over beide indices, zie bijlage I. Met het programma FOR-Ident (<https://water.for-ident.org/login>) is het mogelijk om een retentietijd in te geven, als de log D bekend is, zal het programma de Letzel index berekenen. De berekende index kan vervolgens worden betrokken bij het identificatieproces van onbekende stoffen. Voor het testen zijn in totaal 17 stoffen gebruikt: 3 'Kreti' stoffen, namelijk fenuron, neburon en chlooroxuron, 10 'Letzel' stoffen, en 4 'kwantificerings' stoffen standaard (zie tabel 2-1 voor het overzicht van de stoffen). Hiervoor zijn de stoffen door KWR verzonden en door de deelnemers toegevoegd aan drinkwater met een concentratie van 2,0 µg/L.

TABEL 2-1: OVERZICHT VAN GETESTE STOFFEN BIJ RTI ONDERZOEK. DE CONCENTRATIE IS 2 UG/L IN DRINKWATER.

Stofnaam	Brutoformule
<i>Kreti stoffen</i>	
Fenuron	C ₉ H ₁₂ N ₂ O
Neburon	C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O
Chlooroxuron	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₂
<i>Letzel stoffen</i>	
Metformin	C ₄ H ₁₁ N ₅
Chloridazon	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O
Carbetamide	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃
Monuron	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O
Metobromuron	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂
Chlorbromuron	C ₉ H ₁₀ BrClN ₂ O ₂
Metconazole	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O
Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
Quinoxifen	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO
Fenofibrate	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄
<i>Kwantificeringsstoffen</i>	
Atrazin-D5	C ₈ H ₉ D ₅ ClN ₅
Bentazon-D6	C ₁₀ H ₆ D ₆ N ₂ O ₃ S
Diclofenac-D4	C ₁₄ H ₇ D ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂
Hydrochloorthiazide-C13-D2	C ₇ H ₆ D ₂ ClN ₃ O ₄ S ₂

De watermonsters zijn geanalyseerd door 6 laboratoria: Aqualab Zuid, Het Waterlaboratorium, KWR, RWS, Vitens en WLN met de eigen 'analysecondities'. In tabel 2-2 zijn de belangrijkste analysecondities weergegeven.

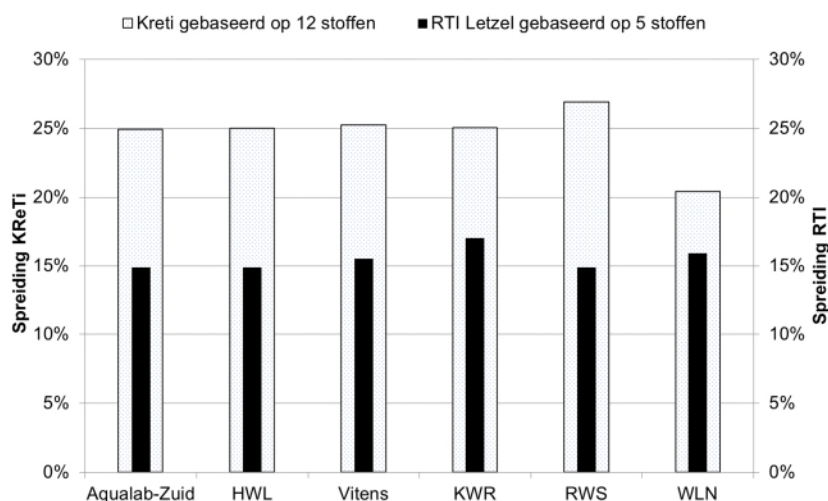
TABEL 2-2: OVERZICHT VAN DE BELANGRIJKSTE ANALYSECONDITIES BIJ HET RTI ONDERZOEK

Parameter	Aqualab Zuid	Het Waterlaboratorium	Vitens
LC			
LC-kolom	C ₁₈ Analytical Acclaim RSLC 120 (Dionex)	C ₁₈ Analytical Acclaim RSLC 120 (Dionex)	C ₁₈ , HSS-T3 (Waters)
dimensies LC-kolom (mm)	2.1 x 100	2.1 x 100	4.6 x 150
deeltjesgrootte (µm)	2,2	2,2	3,5
LC-eluens positieve ionen meting	water + methanol + 5 mM ammonium formaat + 0.01% mierzuur	water + methanol + 5 mM ammonium formaat	water + acetonitril + 0,1% mierzuur
LC-eluens negatieve ionen meting	water + methanol + 5 mM ammonium acetaat	gelijk aan eluens voor positieve ionen meting	gelijk aan eluens voor positieve ionen meting
MS			
massaspectrometer	Q-ToF (Bruker)	Q-ToF (Bruker)	Q-ToF (ABSciex)
MS-resolutie	50.000	50.000	22.000 (bij massa 128)

Parameter	KWR	RWS	WLN
LC			
LC-kolom	Xbridge C ₁₈ (Waters) 2.1 x 150	Xbridge C ₁₈ (Waters) 2.1 x 150	C ₁₈ Hypersil Gold aQ (Thermo) 2.1 x 100
dimensies LC-kolom (mm)	3,5	3,5	1,9
deeltjesgrootte (µm)	water + acetonitril + 0,05 % mierzuur	water + acetonitril + 0,05 % mierzuur	water + methanol + 0.1 mM/L ammonium formaat + 0,01% mierzuur
LC-eluens positieve ionen meting			
LC-eluens negatieve ionen meting	gelijk aan eluens voor positieve ionen meting	gelijk aan eluens voor positieve ionen meting	gelijk aan eluens voor positieve ionen meting
MS			
massaspectrometer	Orbitrap (Thermo)	Orbitrap (Thermo)	Orbitrap (Thermo)
MS-resolutie	30.000	30.000	50.000

Er blijkt een geringe diversiteit aan C₁₈ Reversed Phase LC-kolommen gebruikt te worden, als LC-eluens wordt zowel methanol als acetonitril gebruikt. Voor wat betreft de massaspectrometers zijn deze in te delen in 2 typen: Q-ToF en Orbitrap. De resolutie wordt ingesteld tussen de 22.000 en 50.000. De concentratie van de teststoffen was 2 µg/L in drinkwater. De metingen zijn in triplo uitgevoerd, de metingen zijn verspreid over drie verschillende dagen.

In figuur 2-1 is de spreiding van de beide indices, over alle stoffen gemeten in drievoud, per laboratorium weergegeven.



FIGUUR 2-1: SPREIDING VAN DE KRETI EN LETZEL INDEX BIJ DE 6 DEELNEMENDE LABORATORIA (N=3)

Uit de figuur blijkt dat de spreiding van de Letzel index over de 17 geanalyseerde stoffen bij de verschillende laboratoria varieert tussen de 15 en 17%. De spreiding in Kreti is wat groter en ligt tussen de 20 en 27%. Gelet op het geringe verschil in spreiding zijn beide methoden toepasbaar voor het gebruik als RTI. Het nadeel van de Letzel stoffen is dat ze niet allemaal worden teruggevonden, vooral bij negatieve ionisatie worden veelal maar enkele stoffen gemeten. In bijlage II is aanvullend op figuur 2-1 de berekende Kreti en Letzel indices per individuele stof en per laboratorium weergegeven, incl. de spreiding van de triplo meting.

Naast de RTI's zijn ook de massa-afwijkingen van alle stoffen berekend. De gemiddelde afwijking van de 15 stoffen die een signaal gaven bij de positieve ionen meting per laboratorium ligt tussen de 0,1 en 3,2 ppm (zie voor meer informatie bijlage II), voor de negatieve ionen meting lag deze afwijking tussen de 0,1 en 6 ppm. Bij de meting met negatieve ionisatie werd voor slechts 12 van de 17 stoffen een signaal gemeten. Deze 12 stoffen werden bovendien niet bij alle laboratoria goed teruggevonden.

Samenvattend geldt dat voor het onderling vergelijken en uitwisselen van massaspectra van onbekende stoffen (alleen accurate massa en retentietijd beschikbaar) en ter identificatie/bevestiging van suspects de Retentie Tijd Index (RTI) een handig hulpmiddel is. Met deze RTI wordt een gemeten retentietijd omgerekend naar een relatieve retentietijd met behulp van referentiestoffen. Hiervoor kunnen diverse methoden worden gebruikt zoals de Kreti en de 'Letzel' index van de Universiteit van München. De Kreti heeft als voordeel dat deze al jaren wordt gebruikt voor LC-UV screening en dat onbekende stoffen gemeten met LC-HRMS, gelinkt kunnen worden met onbekende stoffen gemeten met LC-UV. Uit het vergelijkend onderzoek van de Kreti en de Letzel index blijkt dat de Kreti index een wat grotere spreiding heeft dan de Letzel index, beide indices zijn echter goed toepasbaar.

3 Opzet Europees ringonderzoek

3.1 Inleiding

Binnen dit project is een ringonderzoek uitgevoerd waaraan naast de projectpartners ook 12 Europese instituten hebben meegedaan. De bedoeling van dit ringonderzoek was om te inventariseren welke LC-HRMS analysemethoden er worden toegepast, en in welke mate de resultaten bij analyse van dezelfde monsters vergelijkbaar zijn. De belangrijkste resultaten van dit ringonderzoek zijn beschreven in hoofdstuk 4. Hier wordt een beschrijving van de opzet en organisatie van het Europese ringonderzoek gepresenteerd.

NORMAN-netwerk: Europese uitwisseling van informatie over nieuwe opkomende stoffen (emerging contaminants)

Het NORMAN-netwerk verbetert de uitwisseling van informatie over nieuwe opkomende stoffen en moedigt de validatie en harmonisatie van gemeenschappelijke meetmethoden en monitoringinstrumenten aan, zodat beter kan worden voldaan aan de vereisten van risicobeoordelaars en risicomanagers. Het beoogt vooral de synergiën tussen onderzoeksteams uit verschillende landen op het gebied van nieuwe stoffen te bevorderen en te benutten.

3.2 Monsters

In totaal zijn acht watermonsters met addities van 31 tot 38 verschillende doelstoffen en 4 gedeutereerde interne standaarden bereid door KWR. Een overzicht van de stoffen en interne standaarden is opgenomen in resp. bijlage III en IV. De stoffen zijn zodanig gekozen dat een deel ervan een goed signaal geeft met positieve ionisatie en een deel met negatieve ionisatie. In bijlage III is de vermoedelijk beste ionisatiemodus op basis van ervaring bij de NL-drinkwaterlaboratoria aangegeven met een groene kleur. De selectie aan stoffen bestrijkt een breed oplosbaarheidsgebied (logKow -2,8 (iohexol) tot +8,5 (brodifancoum-A)) om zo het bereik van de LC-HRMS methode in beeld te krijgen. Daarnaast zijn er stoffen met dezelfde accurate massa:

- aldicarb-sulphoxide en butocarboxim-sulfoxide ($[M+H]^+$ = 207,07979)
- dinoterb en dinoseb ($[M-H]^-$ = 239,06734)
- clofibrinezuur en mecoprop=MCPP ($[M-H]^-$ = 213,03240).

Voor de non-target monsters 6 en 8 zijn een deel van de stoffen uit bijlage III toegevoegd met daarbij nog 4 extra stoffen (trimethoprim, ketoprofen, propranolol en sulfamethoxazool). Monster 7 is identiek aan monster 5, bij monster 7 was echter de samenstelling van het monster onbekend, bij monster 5 was de samenstelling van het monster wel bekend. Het vergelijk van de resultaten van deze 2 monsters geeft inzicht in de invloed van de workflow (suspect of non-target screening) op het eindresultaat. Het overzicht van de toegevoegde stoffen bij de non-target monsters (6 t/m 8) is opgenomen in bijlage V.

De addities zijn uitgevoerd door steeds aan 1 liter monster de juiste stoffen als mix toe te voegen volgens een vast KWR protocol voor het bereiden van ringonderzoekmonsters organische parameters (KHRO-4.3.4: bereiding monsters LMC organisch). De 8 monsters van 1 liter in een glazen fles zijn samen met de RTI-standaarden (Kreti, Letzel en NORMAN mix, zie voor de samenstelling van deze standaarden bijlage IV) gekoeld verstuurd per koerier

naar de deelnemers. De analyse bij elke deelnemer is met de 'eigen' LC-HRMS analysemethode in triplo uitgevoerd in zowel de positieve als negatieve ionisatie modus.

Monsters 1 t/m 5 zijn bij de uitwerking behandeld als 'suspect screening' waarbij aan de hand van een suspect lijst met accurate massa's naar de specifieke stoffen is gezocht. Deze lijst is door KWR opgesteld en verzonden naar alle deelnemers. Monsters 6 t/m 8 zijn behandeld als 'non-target' screening (monsters met onbekende samenstelling).

In onderstaande tabel is het gebruikte watertype per monster aangegeven met de toegevoegde concentratie.

TABEL 3-1: RINGONDERZOEK MONSTERS MET TYPE WATER, AANTAL TOEGEVOEGDE STOFFEN EN CONCENTRATIE VAN DE ADDITIES IN UG/L

Monster no.	Type screening	Aantal toegevoegde stoffen	Drinkwater	Grondwater	Oppervlakte water
1	Suspect	38	0,025		
2	Suspect	38	0,25		
3	Suspect	38	2,5		
4	Suspect	38		1,0	
5	Suspect	38			1,0
6	Non-target	31			1,0-3,0
7	Non-target	38			1,0
8	Non-target	31			1,0-3,0

3.3 Deelnemers

In juni 2017 is het ringonderzoek (8 watermonsters) voor suspect en non-target screening bereid door KWR en verstuurd naar totaal 17 deelnemers. Naast 3 Nederlandse drinkwaterlaboratoria (Aqualab-Zuid, WLN en Vitens), Rijkswaterstaat en KWR zijn de monsters verstuurd naar 4 Duitse onderzoeksinstituten waarmee in januari 2017 overleg/afstemming is geweest over LC-HRMS screening (Düsseldorf) en 8 leden van het Europese NORMAN-netwerk. In tabel 3-2 is het overzicht opgenomen van alle deelnemers.

TABEL 3-2: OVERZICHT VAN DE 17 DEELNEMERS AAN HET RINGONDERZOEK

Deelnemer	Land	contact persoon	Netwerk
KWR	NL	Ton van Leerdam	
Aqualab Zuid	NL	Gerdien de Kloe	
WLN	NL	Herman Gerdes	
Vitens	NL	Bernard Bajema	
Rijkswaterstaat	NL	Martijn Pijnappels	
Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz	D	Susanne Brüggen	Düsseldorf
Zweckverband Landeswasserversorgung	D	Dr. Wolfgang Schulz	Düsseldorf
Rheinisch-Westfaelisches Institut fuer Wasser (IWW)	D	Dr. Peter Balsaa	Düsseldorf

Berliner Wasserbetriebe	D	Dr. Diana Liebmam	Düsseldorf
Limoges University	F	Sophie Lissalde	NORMAN
Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ)	D	Dr Martin Krauss	NORMAN
Copenhagen University	D	Kristoffer Gulmark Poulsen	NORMAN
CNR – Water Reseach Institute	I	Giuseppe Mascolo	NORMAN
National Research Institute of Science and Technology for Environment and Agriculture (IRSTEA)	F	Guillemain Céline	NORMAN
SUEZ environment	F	Esperanza, Mar	NORMAN
Bordeaux University	F	Dr. Hélène Budzinski	NORMAN
Bundesanstalt für Gewässerkunde (BAFG)	D	Ute Thorenz	NORMAN

Voor het registreren van de gebruikte apparatuur en analysecondities is tegelijk met de monsters een vragenlijst met vaste invulvelden verstuurd in de vorm van een ‘Google Questionnaire’ (zie bijlage V).

Voor de rapportage van LC-MS resultaten is een spreadsheet gemaakt met een strikt formaat en vaste invulvelden (zie bijlage VI). Aan de deelnemers zijn de volgende gegevens gevraagd.

Suspect screening (monsters 1 t/m 5)

- Accurate massa van alle standaarden (m/z) voor zowel positieve als negatieve ionisatie ($[M+H]^+$ en $[M-H]^-$)
- Retentietijd van alle doelstoffen (min)
- Piekoppervlak van alle doelstoffen
- Piekoppervlak van de 4 interne standaarden
- Retentietijd (min) van de 3 Kreti stoffen, de 10 Letzel stoffen en de 18 NORMAN stoffen

Non-target screening (monsters 6 t/m 8)

- Accurate massa van de 50 hoogste pieken (m/z) voor zowel positieve als negatieve ionisatie ($[M+H]^+$ en $[M-H]^-$)
- Meest waarschijnlijke brutoformule van de 50 hoogste pieken
- Mogelijke stofnaam, CAS nummer en identificatielevel (1-5) volgens Schymanski [6]
- Retentietijd van de 50 hoogste pieken (min)
- Piekoppervlak van de 50 hoogste pieken
- Piekoppervlak van de 4 interne standaarden
- Retentietijd (min) van de 3 Kreti stoffen, de 10 Letzel stoffen en de 18 NORMAN stoffen

3.4 Dataverwerking

Voorafgaande aan de dataverwerking zijn alle deelnemers gecodeerd (PT01 t/m PT17) zodat geen onderlinge herkenning van de resultaten mogelijk is. Elke individuele deelnemer is bekend met zijn eigen code, PT01 t/m PT05 zijn de Nederlandse deelnemers.

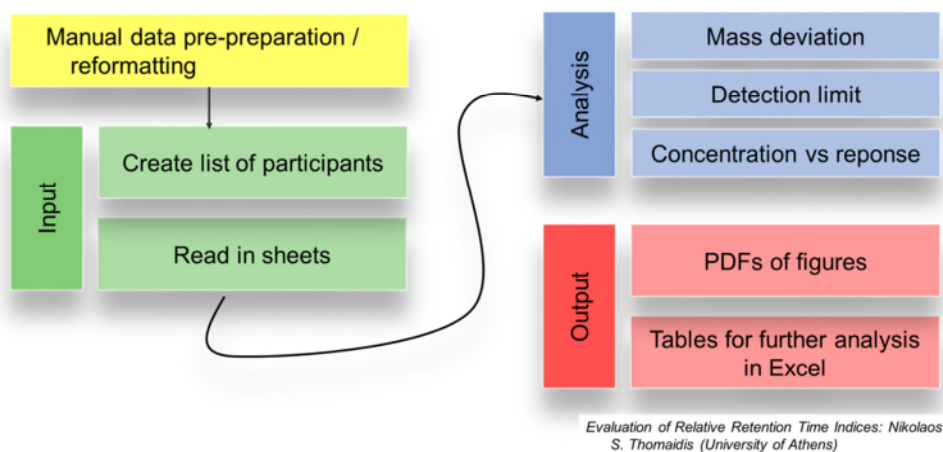
Voor de suspect screening zijn de 17 ingevulde spreadsheets met 16 tabbladen per deelnemer (8 voor monsters positieve ionisatie en 8 voor monsters negatieve ionisatie) geheel automatisch door KWR verwerkt via een in-huis geschreven script in de programmeertaal R. Op deze manier konden de data op een snelle en efficiënte wijze verwerkt en geïnterpreteerd worden. De gegevens in de 2 tabbladen voor de RTI standaarden (positieve en negatieve ionisatie) zijn uitgewerkt door Nikolaos S. Thomaidis en Reza Aalizadeh van de Universiteit van Athene.

De suspect screening dataverwerking heeft zich vooral gericht op

- het aantonen van de toegevoegde stoffen in drinkwater bij een additie van 0,025, 0,25 en 2,5 µg/L, en in grond- en oppervlakte water bij een additie van 1-3 µg/L;
- de maximale massa-afwijking van de toegevoegde stoffen per deelnemer en per stof;
- de respons van geselecteerde stoffen ten opzichte van de concentratie.

Bij de non-target screening is de herkenning van de stoffen uitgevoerd op basis van het CAS-nummer. Bij 5 deelnemers waren de stofnamen wel ingevuld maar niet het CAS-nummer (PT-03, 06, 10, 12 en 15). Om deze deelnemers mee te kunnen nemen in de evaluatie zijn de CAS-nummers handmatig ingevuld. De uitwerking van de 5 pieken met de hoogste intensiteit (top-5) die zijn aangetroffen in de non-target monsters (6 t/m 8) is handmatig in MS-Excel uitgevoerd. De output van de automatische verwerking zijn illustratieve plaatjes en -csv files van de resultaten die vervolgens kunnen worden geopend in MS-Excel voor verdere inspectie, opmaak en kleuring van de velden. Op deze manier zijn illustratieve en duidelijke figuren (zogenaamde 'heatmaps') verkregen.

In onderstaande figuur 3-1 is de werkwijze voor de dataverwerking van de suspect screening schematisch weergegeven.



FIGUUR 3-1: STRATEGIE VOOR DE DATA ANALYSE BIJ SUSPECT SCREENING

4 Resultaten Europees ringonderzoek

4.1 Analysecondities

Door de 17 deelnemers zijn verschillende instrumenten en analysecondities gebruikt. In onderstaand overzicht zijn de belangrijkste parameters met de meest gebruikte instellingen weergegeven. In bijlage VII zijn de verschillende parameters met de gebruikte instellingen grafisch weergegeven.

TABEL 4-1: SAMENVATTING VAN DE TOEGEPASTE ANALYSECONDITIES BIJ DE DEELNEMERS AAN HET RINGONDERZOEK

Parameter	Instelling
<u>Instrument</u>	
Type massaspectrometer	Orbitrap en Q-ToF
Merk massaspectrometer	Thermo (35%), ABSciex (29%), overige <20%
<u>Monstervoorbehandeling</u>	
Materiaal monster fles	Uitsluitend glas (100%)
Monstervolume	100 ml-1 L (>90%)
Reiniging monsterfles	Geen (35%), speciaal wasprogramma (24%), uitbakken (24%). Overige <20%
Toevoegen van stabilisator	Geen (>90%). Methanol of mierenzuur < 10%
Aanpassen pH van monster	Nee (65%)
Eerste bewerkingsstap bij monster	Filtratie (47%), toevoegen interne standaard (41%), pH correctie (<20%)
Verwijderen deeltjes	Filtratie (59%), centrifugeren (23%), niet (18%)
Materiaal filter bij filtratie	Cellulose nitraat (>50%)
Concentrerings monster	Geen concentrering maar directe water injectie (76%)
<u>LC-scheiding</u>	
Samenstelling eluens A	Ultra zuiver water (>90%), eigen laboratorium of gekocht
Samenstelling eluens B	Methanol (59%), acetonitril (41%)
Identieke eluens samenstelling bij positieve en negatieve ionisatie	Ja (65%)
<u>MS-analyse</u>	
Ionisatietechniek	Electrospray (100%), wel of niet verwarmd
Start massa bij scannen (m/z)	100 (41%), 50 (29%), 75 (29%)
Eind massa bij scan	1000 (59%), 1500 (24%), rest < 20%
<u>Data-analyse</u>	
Minimaal aantal scans per piek	10 (41%), 5 (24%)
Minimaal responsverschil tussen stof en blanco	10 (41%), 5 (35%)

De gebruikte massaspectrometers kunnen grofweg ingedeeld worden in Orbitrap en Time-of-Flight instrumenten van in totaal 5 leveranciers. Omdat LC-HRMS apparatuur in de loop van de jaren gevoeliger is geworden, wordt een concentrering van het monster steeds minder toegepast. Bij meer dan 3/4 van de deelnemers wordt het watermonster rechtstreeks geanalyseerd zonder concentreringsstap, vaak wordt wel een filtratie toegepast.

Een identieke eluenssamenstelling bij positieve en negatieve ionisatie geeft identieke retentietijden van stoffen die zowel bij positieve als negatieve ionisatie een signaal geven. Dit vergemakkelijkt het groeperen van stoffen die zowel met positieve als negatieve ionisatie worden aangetoond.

Het meest gebruikte scangebied loopt van m/z 100 tot 1000. Stoffen kleiner dan massa 100 (zoals diglyme en pyrazool) en groter dan massa 1000 (zoals diverse röntgencontraststoffen) vallen hierdoor buiten deze range. De keuze van het scangebied blijft een compromis. Als wordt gestart met een lagere massa dan 100 worden ook allerlei laag moleculaire stoffen en achtergrondionen gemeten, afkomstig van bijvoorbeeld het LC-eluens die het MS-signaal kunnen onderdrukken.

4.2 Suspect screening

4.2.1 Aantoonbaarheidsgrens

Om een indruk te krijgen van de aantoonbaarheidsgrens van de 38 verschillende stoffen in drinkwater, zijn de resultaten van monsters 1 t/m 3 in figuur 4-1 gecombineerd. Dezelfde stoffen zijn aanwezig in deze drie monsters, alleen de concentraties zijn verschillend, nl. 0,025; 0,25 en 2,5 $\mu\text{g/L}$. In onderstaande figuren 4-1 en 4-2 zijn van links naar rechts alle stoffen weergegeven op volgorde van oplopende $\log K_{ow}$. De stof met de laagste waarde (iohexol) staat daarom geheel links, de stof met de hoogste waarde (brodifancoum-A) geheel rechts. Aan de rechter zijde zijn ook de vier interne standaarden weergegeven (atrazin- D_5 , bentazon- D_6 , diclofenac- D_4 en hydrochloorthiazide- $\text{C}_{13}\text{-D}_2$). Van boven naar beneden zijn de deelnemers weergegeven. Deelnemers 7 en 16 zijn niet meegenomen omdat de resultaten niet volledig waren ingevuld of omdat alleen theoretische massa's waren vermeld. Met een groen vakje is aangegeven als de stof is aangetoond bij de additie van 0,025 $\mu\text{g/L}$, met een geel vakje als deze is aangetoond bij 0,25 $\mu\text{g/L}$ en met een rood vakje bij 2,5 $\mu\text{g/L}$. Niet aangetoonde stoffen zijn grijs gekleurd. In deze figuur zijn de resultaten van de meting in de positieve en negatieve ionisatie modus gecombineerd. Aan de rechterkant van de grafiek (kolom 'total') is het totaal aantal aangetoonde stoffen en percentage aangetoonde stoffen per deelnemer weergegeven. Hoe groener het vakje, hoe meer stoffen er zijn aangetoond. Hoe roder het vakje, hoe minder stoffen er zijn aangetoond.



Uit de figuur blijkt dat bijvoorbeeld voor deelnemer 1 dat iohexol bij geen enkele additie wordt teruggevonden en dat pyrazool alleen bij een additie van 2,5 µg/L wordt teruggevonden. Bij deelnemer 1 worden in totaal worden 42 van de 43 toegevoegde stoffen inclusief de interne standaarden (98%) teruggevonden waarbij meer dan 50% bij een concentratie van 0,025 µg/L. Per deelnemer kan zo het aantal teruggevonden stoffen worden bepaald. Het percentage teruggevonden stoffen voor de verschillende deelnemers ligt tussen de 37 en 98%.

Onderaan de figuur zijn de totalen per stof weergegeven. Bijvoorbeeld de stof foramsulfuron (4^e van links) wordt door alle 15 deelnemers teruggevonden. Bij 10 deelnemers bij een concentratie van 0,025 µg/L, 3 deelnemers bij 0,25 µg/L en 2 deelnemers bij 2,5 µg/L.

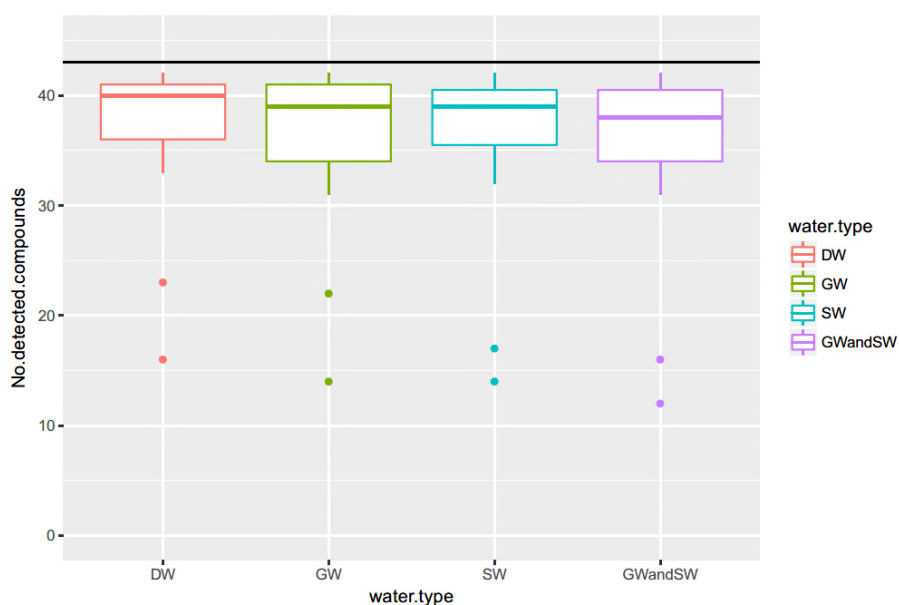
Naast de additie aan drinkwater zijn de stoffen ook toegevoegd aan grondwater (1,0 µg/L) en oppervlaktewater (1,0 µg/L). De opbouw van onderstaande figuur 4-2 is gelijk aan de vorige figuur 4-1. Van links naar rechts de stoffen met oplopende $\log K_{ow}$ vermeld en op de verticale as de 15 deelnemers. Stoffen die in grondwater worden aangetoond zijn blauw gemarkeerd, stoffen die in oppervlaktewater worden aangetoond rood gemarkeerd. Stoffen die zowel in grondwater als oppervlaktewater zijn aangetoond zijn paars gemarkeerd. Stoffen die niet zijn teruggevonden zijn ook hier grijs gemarkeerd. In deze figuur zijn de resultaten van de meting in de positieve en negatieve ionisatie modus gecombineerd.



In de figuur is duidelijk te zien dat de meeste stoffen in zowel grondwater als oppervlaktewater worden teruggevonden (paarse vakjes). Voor bijvoorbeeld deelnemer 2 worden 42 van de 43 stoffen (inclusief 4 interne standaardstoffen) gevonden, alleen pyrazool werd niet aangetoond. In totaal worden in grondwater en oppervlaktewater 81% van de stoffen teruggevonden. In tabel 4-2 zijn de percentages van de aangetoonde stoffen uitgedrukt in mediaan, gemiddelde, minimum en maximum weergegeven. In figuur 4.3 is op de y-as het aantal aangetoonde stoffen en op de x-as het watertype weergegeven. De onderkant van het blokje geeft de 25 % percentiel aan, de bovenkant de 75 % percentiel en de streep in het blokje de 50 % percentiel. Dit betekent dat 25-75% van de data binnen dit blokje valt. De puntjes zijn uitschieters. De zwarte horizontale lijn geeft het aantal toegevoegde stoffen weer (43 stuks).

TABEL 4-2: AANTAL AANGE TOONDE STOFFEN PER WATERTYPE (CONCENTRATIE VAN 1.0 UG/L)

Watertype	Concen- tratie (µg/L)	mediaan	gemiddelde	minimum	maximum
Drinkwater	0,025-2,5	93 %	85 %	37 %	98 %
Grondwater	1,0	91 %	82 %	28 %	98 %
Oppervlaktewater	1,0	91 %	82 %	33 %	98 %
Grond- en oppervlaktewater (gecombineerd)	1,0	88 %	81 %	28 %	98 %



FIGUUR 4-3: AANTAL AANGE TOONDE STOFFEN PER WATERTYPE (CONCENTRATIE VAN 1,0 UG/L).
TOTAAL 43 STOFFEN TOEGEVOEGD.

4.2.2 Massa accuraatheid

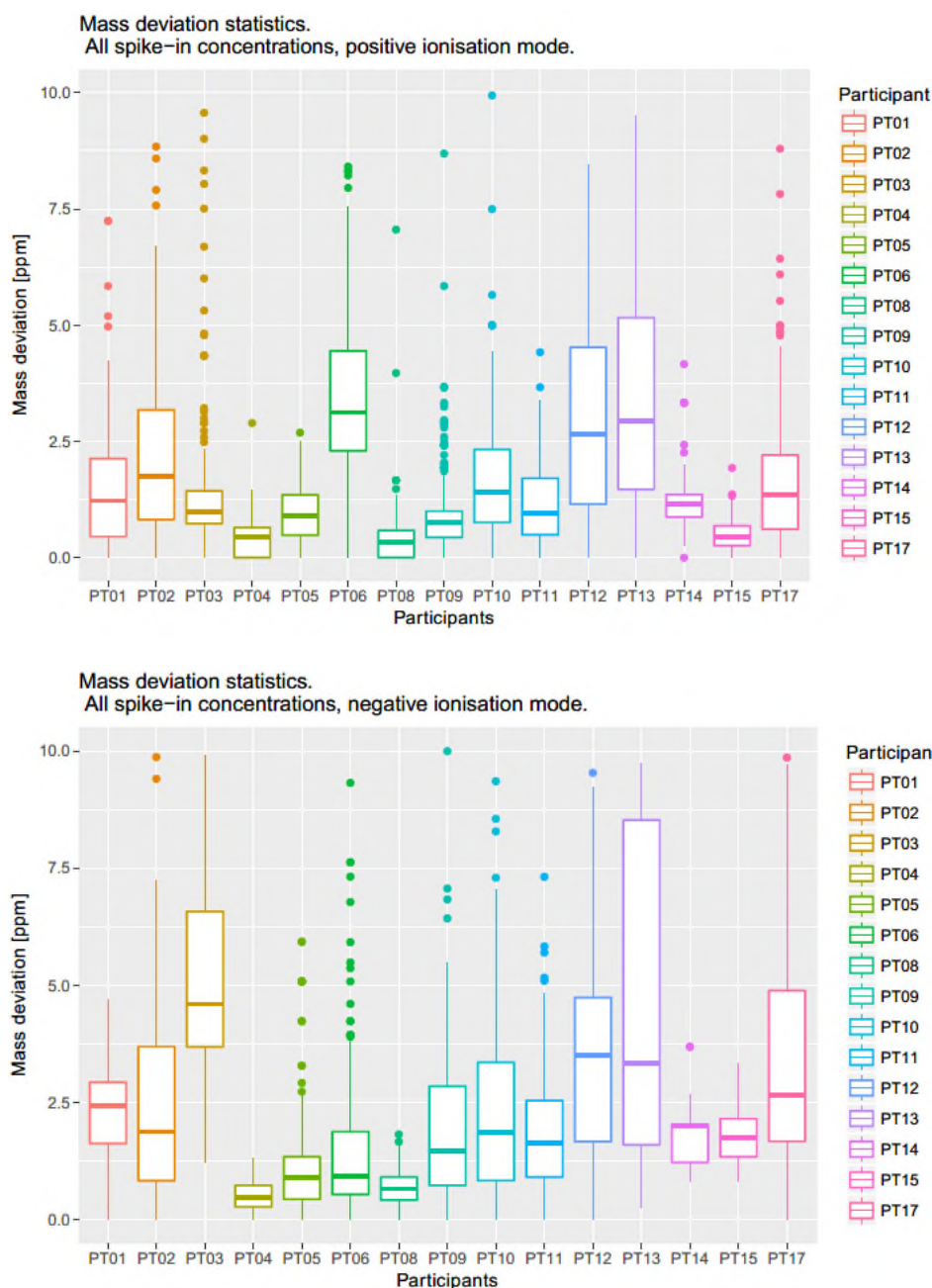
Bij hoge resolutie metingen is de massa accuraatheid belangrijk. Hoe accurater de massa, hoe betrouwbaarder doelstoffen worden herkend op basis van de accurate massa. Ook voor identificatie van onbekende stoffen neemt het aantal mogelijkheden voor de brutoformule af naarmate de massa-accuraatheid hoger is. In tabel 4-3 is het aantal mogelijke brutoformules bij 9 verschillende massa's (150 tot 900 Da) en 5 niveaus van massa-accuraatheid (massa afwijking van 0,1 tot 10 ppm) weergegeven.

TABEL 4-3 AANTAL MOGELIJKE BRUTOFORMULES BIJ VERSCHILLENDE MASSA ACCURAATHEID (KIND AND FIEHN, BMC BIOINFORMATICS 2006)

molecular mass [Da]	10 ppm	5 ppm	3 ppm	1 ppm	0.1 ppm
150	2	1	1	1	1
200	3	2	2	1	1
300	24	11	7	2	1
400	78	37	23	7	1
500	266	115	64	21	2
600	505	257	155	50	5
700	1046	538	321	108	10
800	1964	973	599	200	20
900	3447	1712	1045	345	32

Naarmate de massa afwijking kleiner wordt, neemt het aantal mogelijkheden voor de brutoformule af. De meeste leveranciers van hoge resolutie massaspectrometers (Orbitrap en Q-ToF) geven een specificatie van sub 1 ppm tot 5 ppm. Op basis van de gemiddelde massa-accuraatheid van alle doelstoffen (68 Da voor pyrazool tot 916 Da voor tylosin) in drinkwater bij de drie concentratieniveaus (0,025, 0,25 en 2,5 µg/L) is nagegaan of 5 ppm door de deelnemers wordt gehaald bij zowel positieve als negatieve ionisatie. In figuur 4-4 is per deelnemer de gemiddelde absolute afwijking van de 38 doelstoffen weergegeven. Daarbij zijn negatieve waarden omgezet naar positieve waarden.

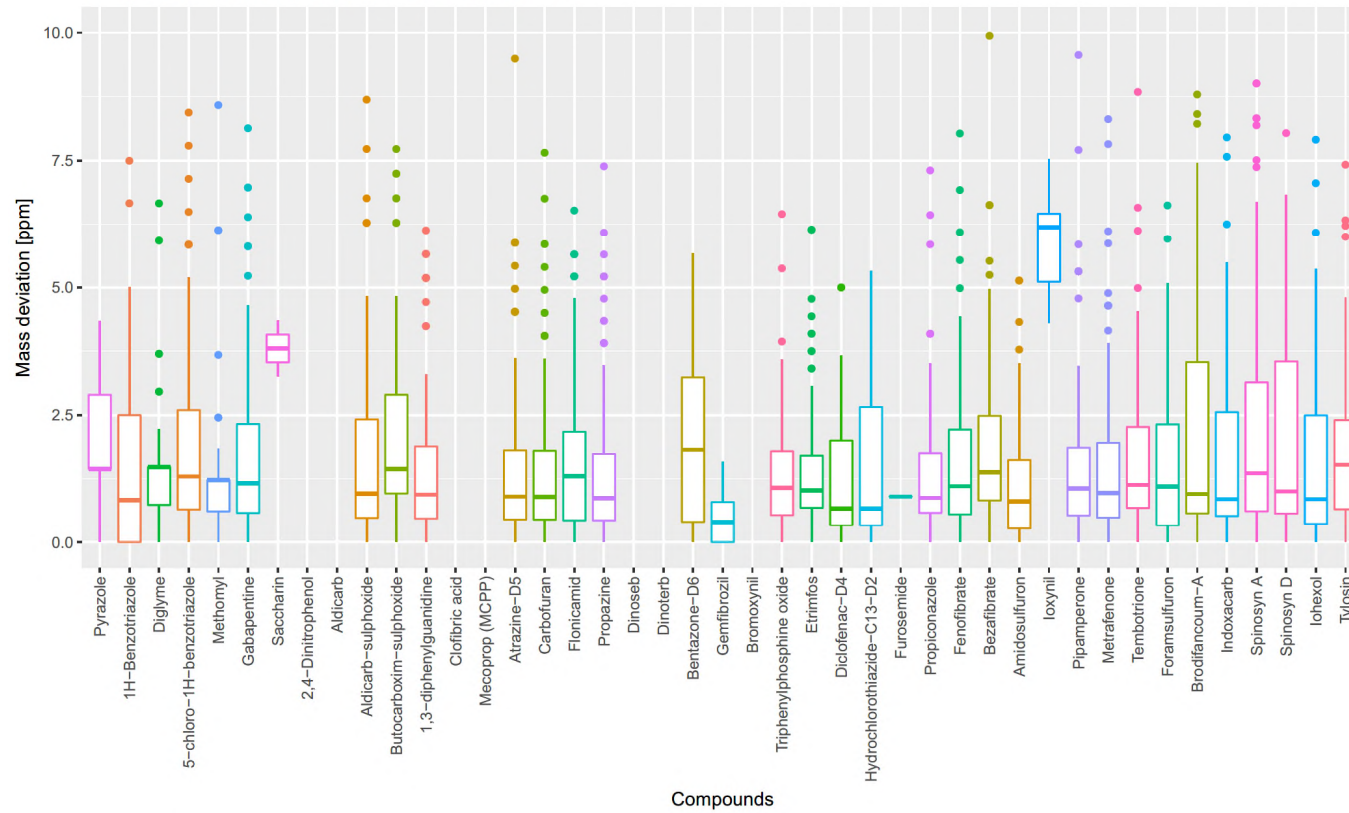
De onderkant van het blokje geeft de 25 % percentiel aan, de bovenkant de 75 % percentiel en de streep in het blokje de 50 % percentiel. Dit betekent dat 25-75% van de data binnen dit blokje valt. De puntjes zijn uitschieters.



FIGUUR 4-4: GEMIDDELDE MASSA ACCURAATHEID EN SPREIDING PER DEELNEMER OVER MONSTER 1 T/M 3 (CONCENTRATIE 0,25 -2,5 UG/L (BOVEN:POSITIEVE IONISATIE, ONDER: NEGATIEVE IONISATIE)).

Uit de figuur blijkt dat voor alle deelnemers de gemiddelde massa-afwijking bij zowel positieve als negatieve ionisatie kleiner is dan 5 ppm. Bij negatieve ionisatie valt bij 2 deelnemers (PT-03 en PT13) de 75% percentiel tussen de 5 en 8,7 ppm. De specificatie van 5 ppm die door de leveranciers van de meeste resolutie Orbitrap en Q-ToF hoge resolutie massaspectrometers veelal als bovengrens wordt gespecificeerd lijkt op basis van bovenstaande resultaten nét haalbaar. De specifieke massa-accuraatheid bij de afzonderlijke additieniveaus van 0,025, 0,25 en 2,5 µg/L geven een vergelijkbaar beeld, de gedetailleerde resultaten zijn opgenomen in bijlage VIII. Naast de massa-accuraatheid per deelnemer is ook de massa-accuraatheid per stof onderzocht. De resultaten zijn weergegeven in figuur 4-5.

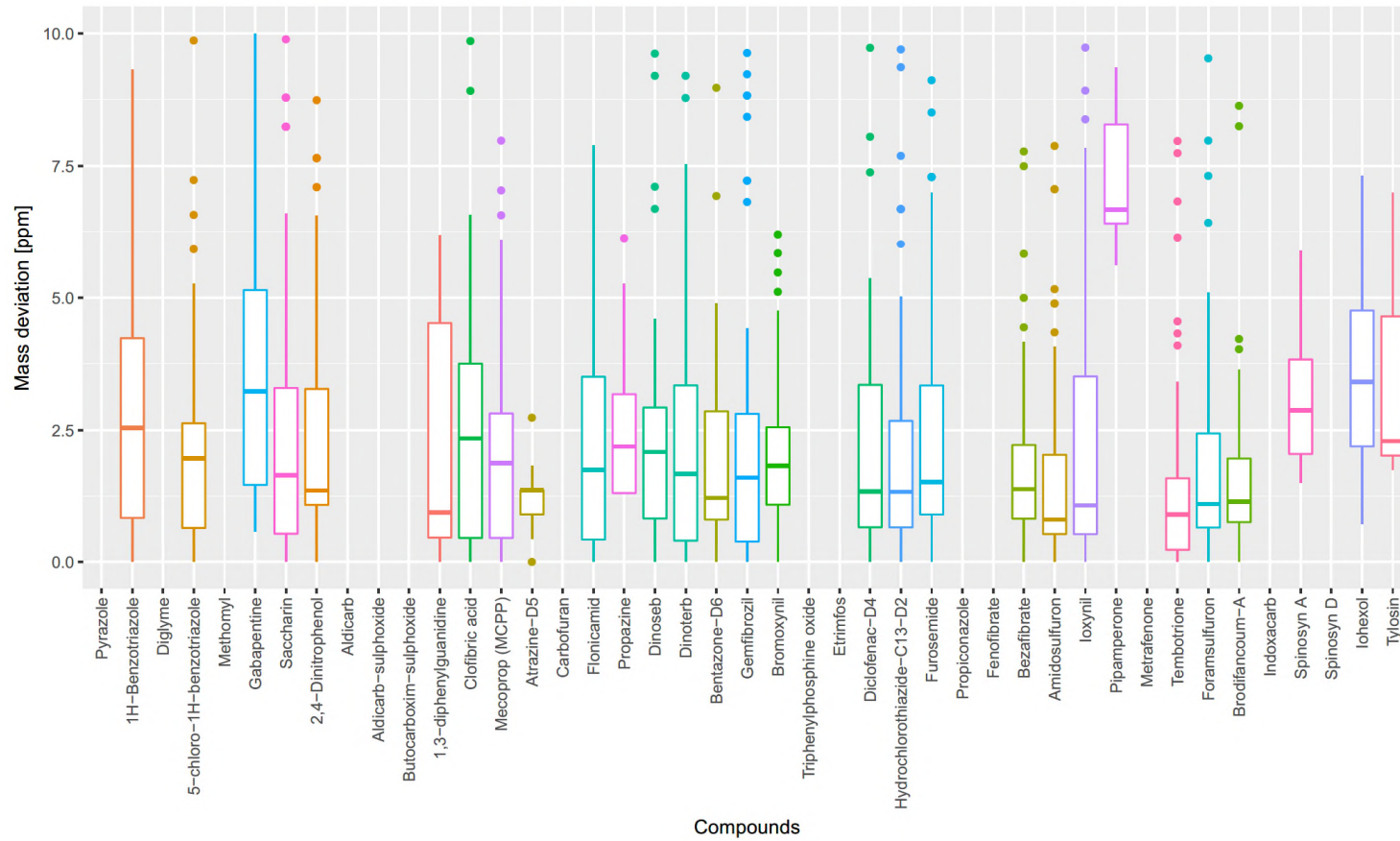
Mass deviation statistics.
All spike-in concentrations, positive ionisation mode.



FIGUUR 4-5A: GEMIDDELDE MASSA ACCURAAATHEID EN SPREIDING PER STOF OVER ALLE DEELNEMERS EN MONSTER 1 T/M 3 (CONCENTRATIE 0,25 -2,5 UG/L BIJ POSITIEVE IONISATIE)

Mass deviation statistics.

All spike-in concentrations, negative ionisation mode.

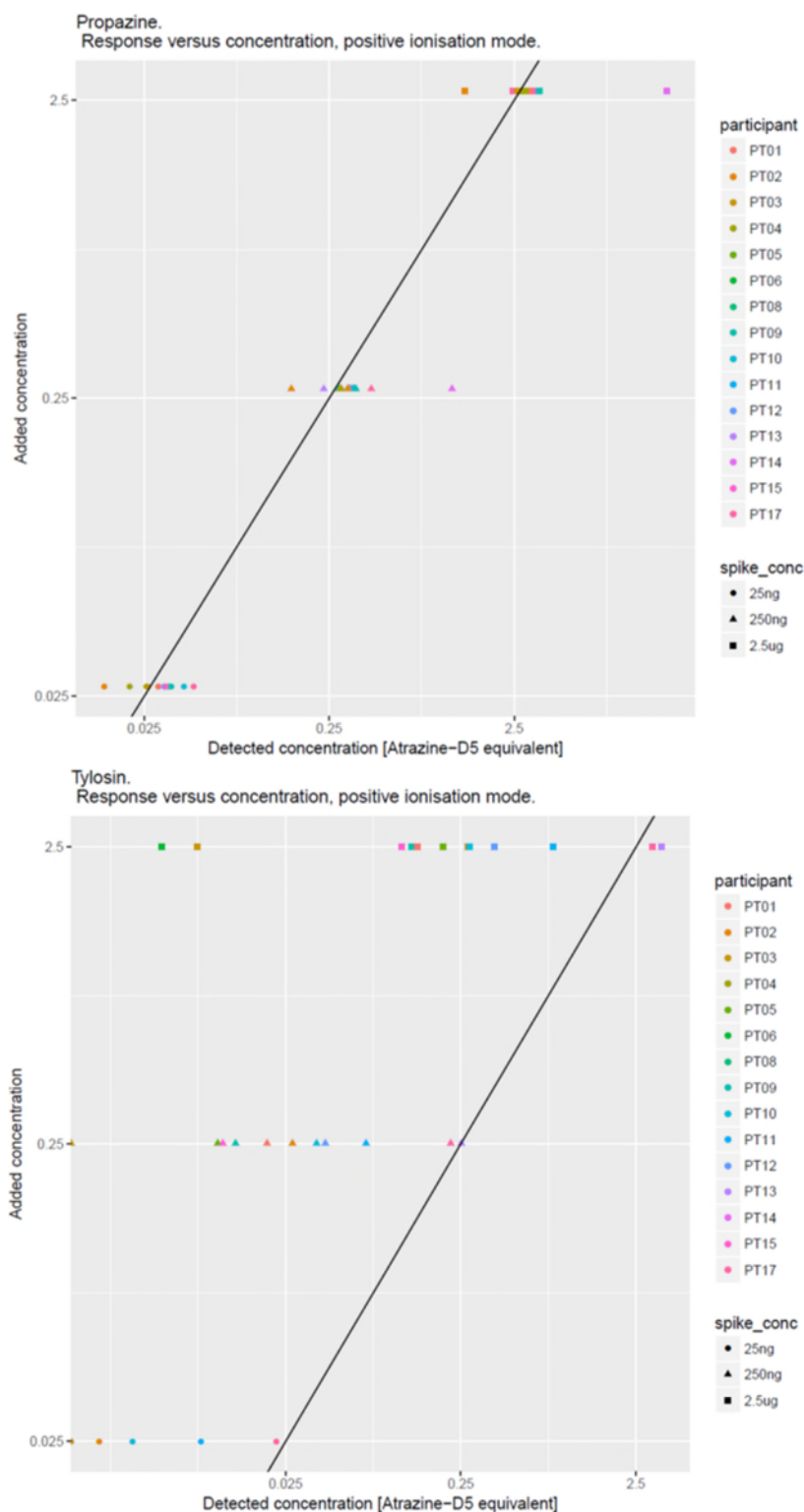


FIGUUR 4-5B: GEMIDDELDE MASSA ACCURAATHEID EN SPREIDING PER STOF OVER ALLE DEELNEMERS EN MONSTER 1 T/M 3 (CONCENTRATIE 0,25 -2,5 UG/L BIJ NEGATIEVE IONISATIE)

Bij positieve ionisatie wordt voor 33 van de 35 aangetoonde stoffen een gemiddelde afwijking lager dan 2,5 ppm verkregen. Voor slechts 2 stoffen (saccharin en ioxynil) is de afwijking tussen de 2,5 en 7,5 ppm. Bij negatieve ionisatie wordt voor 24 van de 29 aangetoonde stoffen een gemiddelde afwijking lager dan 2,5 ppm verkregen. Voor 5 stoffen (1-H-benzotriazool, gabapentine, pipamperone, spinosyn-A en iohexol) is de afwijking tussen de 2,5 en 7,5 ppm. De reden voor de hogere afwijking van de genoemde stoffen is niet onderzocht. De specifieke massa accurateheid van de stoffen bij de afzonderlijke additieniveaus is opgenomen in bijlage VII.

4.2.3 Concentratieberekening

Bij kwalitatieve LC-HRMS metingen worden concentraties meestal uitgedrukt in equivalenten van een interne standaard stof (bijvoorbeeld atrazin-D₅ bij positieve ionisatie). Op deze manier kunnen stoffen gekwantificeerd worden zonder dat de zuivere stof beschikbaar is. Echter is er wel een foutmarge tussen de concentratie, uitgedrukt in equivalenten van een referentiestof en de werkelijke concentratie, omdat de responsfactor van de geïdentificeerde stof af kan wijken van die van de referentiestof. Deze foutmarge wordt groter naarmate de chemische eigenschappen van de stof meer afwijken van de referentiestof en hangen voorts af van het gebruikte instrument. In een recente BTO-studie [5] is geconstateerd dat er grote verschillen voorkomen tussen de responsfactoren van een referentiestof en de geïdentificeerde stof. Om een beeld te krijgen van de gemiddelde foutmarge voor alle deelnemers aan het ringonderzoek, is de werkelijke concentratie vergeleken met de door de deelnemers gerapporteerde relatieve concentratie. In onderstaande figuur is het resultaat weergegeven voor propazin en tylosin (beide positieve ionisatie). De rechte lijn geeft een verhouding van 1 aan (de gemeten en berekende concentraties zijn gelijk).



FIGUUR 4-6: VERHOUDING TUSSEN NOMINALE EN GERAPPORTEERDE RELATIEVE CONCENTRATIE VOOR PROPAZIN (BOVEN) EN TYLOSIN (ONDER)

Bij tylosin liggen de meetpunten vooral links van de lijn. Dit betekent dat de gemeten concentratie lager is dan de werkelijke concentratie. Voor tylosin is dit verschil groter dan voor propazin. Dit komt mogelijk doordat de chemische eigenschappen van tylosin meer

afwijken van de referentiestof atrazin-D₅ dan propazin. In een vervolgonderzoek willen we hier meer zicht op krijgen (zie bijlage XII: Ingediend voorstel bij NORMAN voor een verdere verdieping van het ringonderzoek).

4.3 Non-target screening

In totaal zijn er 3 monsters aangeboden voor de non-target screening. De deelnemers waren niet op de hoogte welke stoffen aan de monsters zijn toegevoegd. Een overzicht van de toegevoegde stoffen incl. de concentratie is opgenomen in bijlage V. Het volgende is gerapporteerd:

- de 50 stoffen met de hoogste intensiteit ([M+H]⁺ of [M-H]⁻)
- resultaat in triplo;
- brutoformule
- CAS nummer
- Schymanski level als maat voor de betrouwbaarheid van de identificatie [6]

In onderstaande tabel zijn de resultaten samengevat.

TABEL 4-4: DOOR DEELNEMERS AANGELEVERDE GEGEVENS BIJ DE NON-TARGET SCREENING (0 IS NIET AANGELEVERD, 1 IS WEL AANGELEVERD). IN DE KOLOM RAPP. CAS-NR IS MET GROEN AANGEGEVEN ALS HET CAS-NUMMER HANDMATIG DOOR KWR IS INGEVULD T.B.V. AUTOMATISCHE GEGEVENSVERWERKING.

Code	Rapp. 50 stoffen (pos)	Rapp. 50 stoffen (neg)	Rapp. triplos	Rapp. brutoformule	Rapp. stofnaam	Rapp. CAS-nr	Schymanski levels <4
PT-01	1	0	1	1	1	1	1
PT-02	1	1	1	1	1	1	1
PT-03	0	0	1	1	1	0	1
PT-04	0	0	1	1	1	1	1
PT-05	1	1	1	1	1	1	1
PT-06	1	1	1	1	1	0	1
PT-07	1	1	1	1	1	1	1
PT-08	1	1	1	1	1	1	1
PT-09	1	1	1	1	1	1	1
PT-10	1	1	1	1	1	0	1
PT-11	0	0	0	0	0	0	0
PT-12	1	1	1	1	1	0	1
PT-13	1	0	1	1	1	1	1
PT-14	1	1	1	1	0	0	0
PT-15	1	1	1	1	1	0	1
PT-16	1	1	1	1	0	0	0
PT-17	1	1	1	1	1	1	1
Total	14	12	16	16	14	9	14

Voor de positieve ionisatie metingen waren bij 14 van de 17 deelnemers de 50 stoffen met de hoogste intensiteit gerapporteerd, voor de negatieve ionisatie meting waren dit 12 deelnemers. Sommige deelnemers hadden minder dan 50 stoffen gerapporteerd. Voor de automatische dataverwerking is het gerapporteerde CAS-nummer gebruikt, dit was gerapporteerd door 9 deelnemers. Omdat bij 5 deelnemers de stofnaam was gerapporteerd

maar geen CAS-nummer is dit handmatig door KWR toegevoegd, zodat een maximaal aantal van 14 deelnemers bij de dataverwerking betrokken kon worden. PT11, PT14 en PT16 zijn buiten beschouwing gelaten omdat er geen stofnamen gerapporteerd waren.

4.3.1 Monster 6

In onderstaande figuur 4-7 zijn de resultaten weergegeven van monster 6 (oppervlaktewater met addities van 31 stoffen met een concentratie tussen de 1,0 en 3,0 µg/L, zie bijlage V). Van boven naar beneden staan alle toegevoegde stoffen op volgorde van oplopende verdelingscoëfficiënt ($\log K_{ow}$), van links naar rechts de 14 deelnemers. Het getal geeft de frequentie aan waarmee een stof is aangetroffen. Bij een rood veld is de stof niet teruggevonden, bij groen is de stof in triplo teruggevonden en oranje geeft aan dat de stof wél is teruggevonden maar niet bij alle drie metingen. Bij de groene vakjes staat soms een getal groter dan 3. In dat geval is de stof naast de $[M+H]^+$ of $[M-H]^-$ ook gevonden als een ander ion, bijvoorbeeld als natrium adduct $[M+Na]^+$.

logKow	Compound	PT01	PT02	PT03	PT04	PT05	PT06	PT07	PT08	PT09	PT10	PT12	PT13	PT15	PT17	total	%
-2.81	Iohexol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-1.29	Amidosulfuron	6	6	3	0	6	6	0	6	2	0	6	3	3	4	11	79
-1.1	Gabapentine	3	3	3	3	3	3	0	3	1	0	0	3	3	0	10	71
-0.82	Foramsulfuron	3	3	3	3	6	5	6	6	2	1	6	3	6	4	14	100
-0.48	Diglyme	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7
-0.2	Aldicarb-sulphoxide	3	3	3	0	2	0	0	0	0	0	0	1	3	0	6	43
-0.2	Butocarboxim-sulphoxide	3	3	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	29
0.3	Pyrazole	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7
0.48	Sulfamethoxazole	3	3	0	0	3	3	3	6	2	2	0	3	3	3	11	79
0.73	Trimethoprim	3	3	0	0	3	3	6	3	1	3	3	3	3	3	12	86
1.73	2,4-Dinitrophenol	0	3	3	3	3	3	0	3	1	0	3	1	3	3	11	79
1.81	5-chloro-1H-benzotriazole	5	0	3	6	6	0	0	0	0	2	6	3	6	3	9	64
2.28	Pipamperone	3	3	3	3	3	0	6	3	1	0	0	3	3	3	11	79
2.3	Carbofuran	3	3	3	3	3	3	2	3	1	0	0	3	3	3	12	86
2.32	Furosemide	1	3	3	3	3	0	0	3	1	2	3	0	3	3	11	79
2.6	Propranolol	3	3	0	0	3	3	0	3	0	3	3	3	3	3	10	71
2.84	Clofibric acid	3	3	3	3	3	3	0	3	1	0	0	0	0	3	9	64
2.87	Triphenylphosphine oxide	3	0	3	3	3	3	12	3	1	2	3	3	3	3	13	93
2.89	1,3-diphenylguanidine	3	3	3	3	3	3	0	3	0	3	6	3	0	3	11	79
2.94	Etrinfos	3	0	3	3	3	3	6	3	1	0	0	3	3	3	11	79
2.94	Mecoprop (MCP)	3	0	3	3	3	3	0	3	0	0	0	0	0	0	6	43
3	Ketoprofen	3	3	0	0	3	3	3	6	1	0	0	3	3	0	9	64
3	Tembotrione	3	3	3	0	3	0	0	6	1	1	3	3	0	2	10	71
3.24	Propazine	3	3	3	3	3	3	9	3	1	3	0	3	6	3	13	93
3.85	Spinosyn D	0	3	3	0	0	0	0	0	1	0	0	3	2	2	6	43
4.72	Metrafenone	3	3	3	0	3	3	0	3	1	0	3	3	3	0	10	71
4.77	Gemfibrozil	6	3	6	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	6	43
4.9	Spinosyn A	3	3	3	0	3	0	0	0	1	0	0	3	3	3	8	57
5.19	Fenofibrate	3	3	3	0	3	3	3	3	1	0	0	3	3	3	11	79
5.21	Indoxacarb	3	3	3	0	1	0	0	0	1	0	0	3	3	0	7	50
8.51	Brodifancoum-A	6	12	3	0	0	0	0	0	2	1	3	0	3	6	8	57
total		26	24	25	13	25	18	10	20	22	11	13	22	22	21		
%		84	77	81	42	81	58	32	65	71	35	42	71	71	68		

FIGUUR 4-7: TERUGGEVONDEN STOFFEN IN MONSTER 6, NON-TARGET SCREENING VAN OPPERVLAKTEWATER 1-3 UG/L.

Door de 14 deelnemers werd tussen de 32 en 84% van de stoffen teruggevonden (zie tabel 4-5). De meest polaire stof iohexol wordt door geen enkele deelnemer teruggevonden, pyrazool slechts bij 7% van de deelnemers. Dit beeld komt overeen met de teruggevonden stoffen in drinkwater (zie figuur 4-1), in drinkwater behoort iohexol naast pyrazool tot slecht teruggevonden stoffen (47 resp. 27%). Voor monster 6 wordt gemiddeld 63% van de toegevoegde stoffen teruggevonden.

TABEL 4-5: KENGETALLEN VAN AANTAL AANGETOONDE STOFFEN IN MONSTER 6

	gemiddelde	mediaan	minimum	maximum
Aantal keer dat stof wordt gevonden door deelnemer (totaal 14 deelnemers)	9 (64%)	10 (71%)	0 (0%)	14 (100%)
Aantal aangetoonde stoffen (totaal 31 stoffen)	19 (63%)	22 (69%)	10(32%)	26 (84%)

4.3.2 Monster 7

In onderstaande figuur 4-8 zijn de resultaten weergegeven van monster 7 (oppervlaktewater met addities van 39 stoffen op een concentratieniveau van 1,0 µg/L). Dit monster is identiek aan monster 5 (zie bijlage V voor het overzicht van de toegevoegde stoffen). Bij monster 5 was echter de samenstelling van het monster bekend (suspect screening met bekende lijst van stoffen), bij monster 7 was de samenstelling van het monster onbekend (non-target screening). In figuur 4-8 geeft het getal de frequentie aan waarmee een stof aangetroffen is. Bij een rood veld is de stof niet teruggevonden, bij groen is de stof in triplo teruggevonden en oranje geeft aan dat de stof wél is teruggevonden maar niet bij alle drie metingen.

logKow	Compound	PT01	PT02	PT03	PT04	PT05	PT06	PT07	PT08	PT09	PT10	PT12	PT13	PT15	PT17	total	%
-2.81	Iohexol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-1.29	Amidosulfuron	6	6	3	0	6	1	0	6	2	0	6	3	3	3	11	79
-1.1	Gabapentine	3	3	3	3	3	3	0	3	1	0	0	3	3	0	10	71
-0.82	Foramsulfuron	3	3	3	0	6	0	6	6	2	0	6	3	3	2	11	79
-0.48	Diglyme	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	14
-0.2	Aldicarb-sulphoxide	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4	29
-0.2	Butocarboxim-sulphoxide	3	3	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	29
0.3	Pyrazole	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7
0.45	Saccharin	3	3	3	0	3	0	0	3	1	2	0	3	2	0	9	64
0.5	Flonicamid	6	6	3	6	6	0	3	6	2	0	3	0	3	0	10	71
0.61	Methomyl	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	14
1.05	Tylosin	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	4	29
1.17	1H-Benzotriazole	6	3	3	3	6	1	0	6	2	0	3	3	2	5	12	86
1.36	Aldicarb	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	14
1.73	2,4-Dinitrophenol	0	3	3	0	3	0	0	3	1	0	3	0	3	2	8	57
1.81	5-chloro-1H-benzotriazole	6	0	3	3	6	0	0	0	0	2	3	3	6	3	9	64
2.28	Pipamperone	3	3	3	3	3	0	6	3	1	3	0	3	3	3	12	86
2.3	Carbofuran	3	3	3	3	3	0	0	3	1	0	0	3	3	3	10	71
2.32	Furosemide	0	3	3	0	3	0	0	3	1	0	3	0	0	1	7	50
2.84	Clofibric acid	3	3	3	3	3	0	0	3	1	0	3	0	0	3	9	64
2.87	Triphenylphosphine oxide	4	0	3	3	3	2	9	3	1	3	3	3	3	3	13	93
2.89	1,3-diphenylguanidine	3	3	3	3	3	3	0	3	0	1	3	3	3	3	12	86
2.94	Etrifos	3	0	2	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	3	11	79
2.94	Mecoprop (MCP)	3	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	5	36
3	Tembotrione	3	3	3	0	3	0	0	3	1	0	3	0	0	0	7	50
3.24	Propazine	3	3	3	3	3	3	6	3	1	3	0	3	0	3	12	86
3.39	Bromoxynil	3	0	3	3	3	3	0	3	1	3	3	0	3	3	11	79
3.64	Dinoterb	3	3	3	3	3	0	0	3	1	3	0	0	0	2	9	64
3.69	Dinoseb	3	3	3	3	3	3	0	3	1	3	3	0	3	2	12	86
3.85	Spinosyn D	1	3	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	3	6	43
3.94	Ioxynil	3	3	3	3	3	3	0	3	1	2	3	0	3	0	11	79
4.13	Propiconazole	3	3	3	0	6	3	6	3	1	0	3	0	0	2	10	71
4.25	Bezafibrate	6	6	3	0	6	3	3	6	2	0	6	0	3	6	11	79
4.72	Metrafenone	3	3	3	0	3	3	0	3	1	0	3	3	3	0	10	71
4.77	Gemfibrozil	6	3	6	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	5	36
4.9	Spinosyn A	3	6	3	0	3	0	0	0	1	0	0	3	3	3	8	57
5.19	Fenofibrate	3	3	3	0	3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	10	71
5.21	Indoxacarb	3	3	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0	3	0	6	43
8.51	Brodifancoum-A	6	12	3	0	0	6	0	0	2	2	3	0	3	6	9	64
total		35	28	37	16	29	15	9	25	28	11	20	14	24	24		
%		90	72	95	41	74	38	23	64	72	28	51	36	62	62		

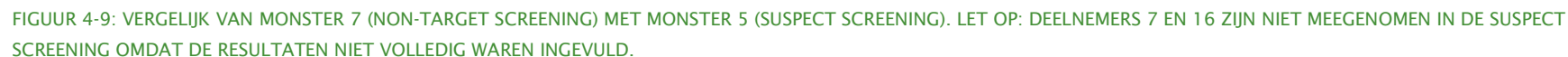
FIGUUR 4-8: TERUGGEVONDEN STOFFEN IN MONSTER 7, NON-TARGET SCREENING VAN OPPERVLAKEWATER 1 UG/L

Zo heeft bijvoorbeeld deelnemer 3 95% van de toegevoegde stoffen teruggevonden. De stof butocarboxim-sulphoxide wordt door deelnemer 3 niet teruggevonden, terwijl de stoffen etrimfos en tylosin worden bij 2 van de 3 metingen worden aangetroffen. Gemiddeld over alle deelnemers worden 22 van de 39 toegevoegde stoffen teruggevonden (56%). In tabel 4-6 zijn een aantal kengetallen van monster 7 opgenomen.

TABEL 4-6: KENGETALLEN VAN AANTAL AANGETOONDE STOFFEN IN MONSTER 7

	gemiddelde	mediaan	minimum	maximum
Aantal keer dat stof wordt gevonden door deelnemer (totaal 14 deelnemers)	8 (57 %)	9 (64 %)	0 (0 %)	13 (93 %)
Aantal keer dat stof wordt gevonden (totaal 39 stoffen)	22 (56 %)	24 (62 %)	9 (23 %)	37 (95 %)

Omdat monsters 5 en 7 dezelfde spike-in stoffen bevatten is een vergelijking tussen de prestatie van suspect en non-target screening mogelijk aan de hand van de gerapporteerde resultaten. In figuur 4-9 zijn deze resultaten gecombineerd en grafisch weergegeven. Stoffen die alleen in monster 7 (non-target screening) zijn aangetoond zijn blauw gekleurd, stoffen die alleen in monster 5 zijn aangetoond (suspect screening) rood; paars geeft aan dat stoffen zowel in monster 7 als 5 zijn aangetoond.



FIGUUR 4-9: VERGELIJK VAN MONSTER 7 (NON-TARGET SCREENING) MET MONSTER 5 (SUSPECT SCREENING). LET OP: DEELNEMERS 7 EN 16 ZIJN NIET MEEGENOMEN IN DE SUSPECT SCREENING OMDAT DE RESULTATEN NIET VOLLEDIG WAREN INGEVULD.

Bijvoorbeeld de stof 1H-benzotriazool wordt door 75% van de deelnemers aangetoond in zowel monster 7 als monster 5. Deelnemers 10, 11 en 17 vinden deze stof alleen terug in monster 5. Deelnemer 7 vindt deze stof in het geheel niet terug. In tabel 4-7 is het overzicht opgenomen van het aantal en percentage aangetoonde stoffen per deelnemer in de twee monsters met dezelfde samenstelling. Als een deelnemer geen stoffen heeft aangetoond is dit resultaat niet meegenomen bij de berekening van het totaal aantal en percentage.

TABEL 4-7: AANTAL EN PERCENTAGE AANGETOONDE STOFFEN PER DEELNEMER MET SUSPECT SCREENING (MONSTER 5) VERGELEKEN MET NON-TARGET SCREENING (MONSTER 7) IN OPPERVLAKTHERWATER. NUL WAARDEN ZIJN NIET MEEGENOMEN BIJ BEREKENING VAN HET GEMIDDELDE.

Deelnemer	Aangetoond bij suspect screening (monster 5)		Aangetoond bij non-target screenings (monster 7)		Aangetoond bij suspect screening én non-target screening	
	Aantal	percentage	Aantal	percentage	Aantal	percentage
PT01	37	95%	35	90%	35	90%
PT02	38	97%	28	72%	28	72%
PT03	37	95%	37	95%	37	95%
PT04	31	79%	16	41%	16	41%
PT05	37	95%	29	74%	29	74%
PT06	36	92%	15	38%	15	38%
PT07	0	0%	9	23%	0	0%
PT08	32	82%	25	64%	25	64%
PT09	36	92%	28	72%	27	69%
PT10	36	92%	11	28%	11	28%
PT11	29	74%	0	0%	0	0%
PT12	35	90%	20	51%	20	51%
PT13	16	41%	14	36%	11	28%
PT14	10	26%	24	62%	7	18%
PT15	32	82%	24	62%	22	56%
PT17	35	90%	0	0%	0	0%
Gem.	30	81%	23	57%	22	56%

Bij de non-target screening worden minder stoffen aangetoond dan bij de suspect screening van hetzelfde monster (resp. 50 en 76%). Opmerkelijk is het grote verschil in aangetoonde stoffen per deelnemer. Zowel bij de suspect screening als de non-target screening ligt dit tussen de 0 en 95%. Dit verschil heeft mogelijk te maken met het grote verschil in ervaring tussen de verschillende deelnemers maar ook met de beschikbare tijd die aan de uitwerking besteed is.

4.3.3 Monster 8

Aan monster 8 (oppervlaktewater) zijn in totaal 31 stoffen toegevoegd met een concentratie tussen de 1 en 3 µg/L. Een deel van de stoffen komt overeen met de suspects in monster 5. In figuur 4-10 is het overzicht opgenomen van de teruggevonden stoffen per deelnemer.

logKow	Compound	PT01	PT02	PT03	PT04	PT05	PT06	PT07	PT08	PT09	PT10	PT12	PT13	PT15	PT17	total	%
-2.81	Iohexol	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	2	14
-1.29	Amidosulfuron	6	6	3	0	6	0	0	6	2	0	3	1	3	0	9	64
-1.1	Gabapentine	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	1	3	0	11	79
-0.82	Foramsulfuron	0	3	3	0	6	0	5	6	2	0	3	1	3	0	9	64
-0.48	Diglyme	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7
-0.2	Aldicarb-sulphoxide	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4	29
-0.2	Butocarboxim-sulphoxide	3	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	21
0.3	Pyrazole	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7
0.45	Saccharin	3	3	3	0	3	0	0	3	1	2	0	1	2	0	9	64
0.48	Sulfamethoxazole	3	6	0	0	5	3	3	6	2	3	0	0	3	3	10	71
0.5	Flonicamid	6	6	3	6	6	0	3	6	2	0	3	0	3	1	11	79
0.61	Methomyl	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	14
0.73	Trimethoprim	3	3	0	0	3	3	6	2	1	3	0	1	3	3	11	79
1.05	Tylosin	3	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	4	29
1.17	1H-Benzotriazole	6	3	3	3	4	0	0	6	2	0	3	1	0	6	10	71
1.36	Aldicarb	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	14
2.28	Pipamperone	3	3	3	3	3	3	6	3	1	3	0	1	0	3	12	86
2.6	Propranolol	3	3	0	0	3	3	0	3	0	3	0	0	3	3	8	57
2.87	Triphenylphosphine oxide	0	0	3	3	3	3	9	3	1	3	3	1	3	3	12	86
2.89	1,3-diphenylguanidine	3	3	3	3	3	0	0	3	0	1	0	1	3	3	10	71
2.94	Etrinfos	3	0	3	3	3	3	3	3	1	0	0	1	3	3	11	79
2.94	Mecoprop (MCP)	3	0	3	3	3	0	0	3	0	0	3	0	1	0	7	50
3	Ketoprofen	3	3	0	0	3	3	3	6	1	0	0	0	3	0	8	57
3	Tembotrione	3	3	3	0	3	0	0	3	1	0	0	0	0	1	7	50
3.24	Propazine	3	3	3	3	3	3	6	3	1	3	0	1	3	3	13	93
3.39	Bromoxynil	3	0	3	3	3	3	0	3	1	3	0	0	3	3	10	71
3.64	Dinoterb	3	3	3	0	3	0	0	3	1	3	0	0	0	0	7	50
3.69	Dinoseb	3	3	3	3	3	3	0	3	1	3	3	0	3	0	11	79
3.94	Ioxynil	3	3	3	3	3	0	0	3	1	3	0	0	3	0	9	64
4.13	Propiconazole	3	3	3	0	6	3	15	3	1	3	3	0	0	3	11	79
4.25	Bezafibrate	6	6	3	3	6	6	6	6	2	3	6	0	3	8	13	93
total		26	21	25	13	23	14	12	23	22	14	10	11	19	15		
%		84	68	81	42	74	45	39	74	71	45	32	35	61	48		

FIGUUR 4-10: TERUGGEVONDEN STOFFEN IN MONSTER 8, NON-TARGET SCREENING VAN OPPERVLAKTewater 1-3 UG/L.

Gemiddeld wordt 57% van het totaal aantal toegevoegde stoffen teruggevonden. Sommige laboratoria hebben een stof meerdere malen aangetoond omdat er ook adducten zoals $[M+Na]^+$ zijn gerapporteerd. Een verbeterpunt bij het rapportageformulier is om naast het geprotoneerde of gedeprotoneerde ion de mogelijkheid te bieden om ook andere iontypen bij dezelfde stofnaam aan te geven.

In tabel 4-8 zijn een aantal kengetallen van monster 8 opgenomen.

TABEL 4-8: KENGETALLEN VAN AANTAL AANGETOONDE STOFFEN IN MONSTER 8

	gemiddelde	mediaan	minimum	maximum
Aantal keer dat stof wordt gevonden door deelnemer (totaal 14 deelnemers)	8 (57 %)	9 (64 %)	1 (7 %)	13 (93 %)
Aantal keer dat stof wordt gevonden (totaal 31 stoffen)	18 (57 %)	17 (55 %)	12 (32 %)	26 (84 %)

4.3.4 Top-5 van aangetoonde stoffen

Om de non-target screeningsresultaten van de deelnemers met de toegevoegde stoffen te vergelijken zijn de top-5 gerapporteerde stoffen van elke deelnemer bepaald. In figuur 4-11 is een overzicht daarvan weergegeven voor monster 7 (additie van 39 stoffen aan oppervlaktewater, concentratie 1,0 µg/L) waarbij met een kleur is aangegeven op welke positie een stof is gerapporteerd. In het gekleurde vakje is ook de positie aangegeven. De resultaten van monster 6 en 8 zijn opgenomen in bijlage IX.

Sample 7, positive ionisation (first analysis)

Participant (14 out of 17)

Participant (14 out of 27)																	total green (first place)	total
molecular formula (or accurate mass)	compound name (if identified).	CAS-no	PT01	PT02	PT03	PT04	PT05	PT06	PT07	PT08	PT09	PT10	PT12	PT13	PT15	PT17		
C18 H15 O P	Triphenylphosphine oxide	791-28-6					2		3		1	1			2		2	12
C9H16ClN5	propazine	139-40-2	3	1		2	1	5		3	3				3	3	2	24
C13H13N3	1,3-diphenylguanidine	102-06-7	2	2		1	3			2	2*				4	4	1	24
c7h14n2o3s	aldicarb	1646-87-3			1	5											1	6
C6H5N3	1H-benzotriazole	95-14-7	1		5					4							1	10
214.91709	?							1									1	1
C16H22O4 + Na	?								1								1	1
685.4342	?											1					1	1
C3H6N6	Melamine	108-78-1	4										1				0	4
C8H12N4O8	Etrifmos	38260-54-7		4			4		4	5	4					5	0	26
C12 H15 N O3	Carbofuran	1563-66-2				3				5					5		0	13
C5H9NS	aldicarb	116-06-3	5			4					5						0	9
C15H17Cl2N3O2	Propiconazole	60207-90-1		5			5										0	10
C21H30FN3O2	Pipamperone	1893-33-0							5								0	5
487.3603	?											5					0	5
C2H3FO2	Fluoroacetic acid												5				0	5
474.8315	?													5			0	5
9h17no2	gabapentine	60142-96-3			4												0	4
198.9394	?							4									0	4
399.3076	?											4					0	4
C12H20F4O2	?												4				0	4
458.8546	?														4		0	4
Too many formula	Spinosyn A	131929-60-7		3													0	3
c5h10n2o2s	methomyl	16752-77-5			3							3					0	3
443.3339	?																0	3
97.9914	?											3					0	3
C7H6O2	Benzoic acid												3				0	3
c6h14o3	diglyme	111-96-6			2												0	2
220.87338	?							2									0	2
C8H4O3	phthalic anhydride	85-44-9							2								0	2
355.2814	?											2					0	2
C14H20O5	?												2				0	2
223.9896	?													2			0	2
C16 H32 N2	253.264															2	0	2
C18H24O4	?												1				1	1
218.974	?													1			1	1
268.1542	?														1		1	1
C11 H25 N	172.206															1	1	1
																	14	210

* no compound reported, molecular formula correct

Top-5 compounds

Sample 7, negative ionisation (first analysis)

Participant (13 out of 17)																
molecular formula (or accurate mass)	compound name (if identified).	CAS-no	PT01	PT02	PT03	PT04	PT05	PT06	PT07	PT08	PT09	PT10	PT12	PT13 (no results)	PT15	PT17
C10H12N2O5	dinoseb	88-85-7	1	2		1	3	1		1	2		5			
C7H3I2NO	ioxynil	1689-83-4	3	1		3	2	3		2	1	1	4		5	
C10H12N2O5	dinoterb	1420-07-1	2	3		2	1			3	3					
c9h6f3n3o	flonicamid	158062-67-0			1				1							
407.2658	?								1							
C14H30O3S	?											1				
297.1534	?														1	
590.4472	?															1
C6H4N2O5	2,4-Dinitrophenol	51-28-5	4		2	5	5			5	5					
c7h3br2no	bromoxynil	1689-84-5			5		4									
C10H6D6N2O3S	Bentazon-D6							4		4*		4				
C6H4ClN3	5-chloro-1H-benzotriazole	94-97-3	5													
C10H11ClO3	Mecoprop-P	16484-77-8		5												
174.95622	?							5								
523.0724	?								5							
330.8431	?											5				
604.4626	?															5
C4H4ClNO5S	?			4												
c17h20n6o7s	foramsulfuron	173159-57-4			4											
C7 H5 N O3 S	Saccharin					4										
369.8214	?								4							
C31H23BrO3	Brodifacoum Peak 2										4					
265.1483	?														4	
C22H45O9P	?															4
c12h11cln2o5s	furosemide	54-31-9			3											
265.1478	?								3							
C10H6D6N2O3S	Bentazon-D6											3				
C18H29FN4	?												3			
216.9095	?														3	
278.1563	?															3
CHN2O3P3	?							2								
453.2708	?								2							
330.8430	?											2				
C16H34O3S	?												2			
194.9277	?														2	
C22H43O9P	?															2
no colour: compound not spiked																
licht blue: compound spiked at 1 µg/L																
blue: compound at 3 µg/L																
															total green (first place)	total
															13	191

FIGUUR 4-11: TOP-5 VAN AANGETROFFEN STOFFEN IN MONSTER 7, NON-TARGET SCREENING VAN OPPERVLAKTEWATER 1 UG/L (BOVEN: POSITIEVE IONEN MODUS, ONDER: NEGATIEVE IONEN MODUS)

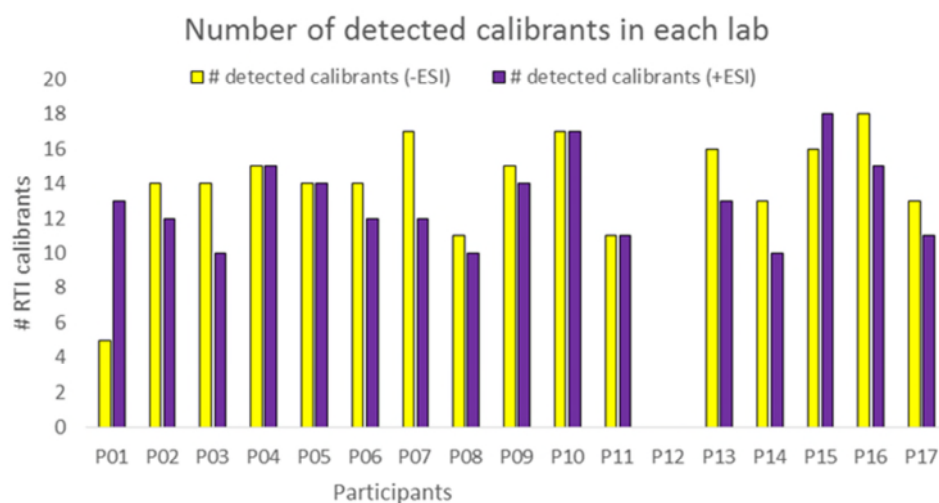
Uit figuur 4-11 en de figuren in de bijlage blijkt dat deze top-5 niet voor elke deelnemer gelijk is. Dit komt o.a. door een instrument afhankelijke meetgevoeligheid voor de verschillende toegevoegde stoffen en de vorming van adducten waardoor er voor 1 stof meerdere ionen aanwezig zijn. In totaal zijn in de 3 monsters tussen de 24 en 42 verschillende top-5 stoffen aangetoond. In tabel 4-9 is per monster en ionisatiemodus het totaal aantal top-5 stoffen weergegeven met daarbij het aantal stoffen dat aan het monster is toegevoegd.

TABEL 4-9: NON-TARGET SCREENING: TOTAAL AANTAL GERAPPORTEERDE TOP-5 STOFFEN VAN ALLE DEELNEMERS

Monster	Totaal aantal gerapporteerde stoffen top-5 stoffen	Totaal aantal geïdentificeerde top-5 stoffen die zijn toegevoegd	Totaal aantal gerapporteerde top-5 stoffen die <u>niet</u> zijn toegevoegd
6, pos	24	10	14
7, pos	38	13	25
8, pos	37	14	23
6, neg	42	11	31
7, neg	36	12	24
8, neg	32	10	22
gemiddeld	35	12	23

4.4 Retentie tijd indices

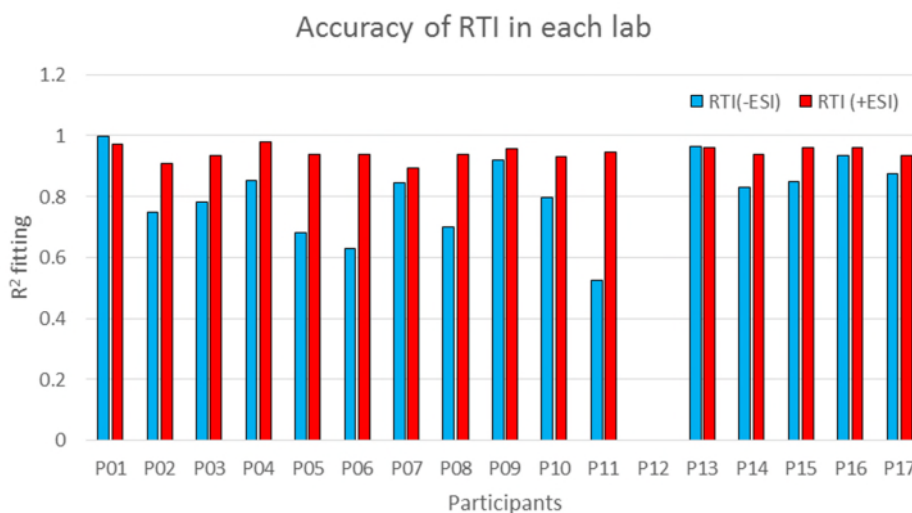
In dit onderzoek zijn stoffen geanalyseerd voor 3 Retentie Tijd Indices (RTI's), nl. de Kreti, de 'Letzel' index volgens de Universiteit van München en de 'NORMAN' index volgens de Universiteit van Athene. In hoofdstuk 2 zijn de Kreti en Letzel index al onderling vergeleken en is geconcludeerd dat beide toepasbaar zijn voor het uitwisselen van relatieve retentietijden van bekende en onbekende stoffen bij LC-HRMS screening. Het nadeel van de Letzel index is dat de referentiestoffen een slecht signaal geven of niet ioniseren bij negatieve ionisatie. De RTI volgens de Universiteit van Athene wordt binnen het NORMAN-netwerk steeds meer toegepast [7]. De uitwerking van de meetdata binnen dit onderzoek is uitgevoerd door de Universiteit van Athene (Nikolaos S. Thomaidis en Reza Aalizadeh). Per deelnemer is een afzonderlijke analyse uitgevoerd. In figuur 4-12 is het aantal gedetecteerde stoffen van de RTI mix per deelnemer weergegeven, uitgesplitst voor de positieve en negatieve ionisatie. Het aantal stoffen in de mix voor zowel de positieve als negatieve ionisatie is 18. Deelnemer 12 heeft geen stoffen gerapporteerd.



FIGUUR 4-12 AANTAL GEDETECTEERDE STOFFEN PER DEELNEMER VAN DE RTI MIX (BESTAANDE UIT 18 STOFFEN)

Het aantal teruggevonden stoffen per deelnemer varieert tussen de 5 en 18 stoffen voor de negatieve ionisatie en tussen de 10 en 18 stoffen voor de positieve ionisatie.

In figuur 4-13 is de accuraatheid van de RTI over alle monsters en toegevoegde stoffen, per deelnemer samengevat. De afzonderlijke gegevens per deelnemer zijn i.v.m. de complexiteit en gedetailleerdheid niet in dit rapport opgenomen maar zijn digitaal beschikbaar. Een R^2 van 1.0 geeft een perfecte overeenkomst weer tussen de berekende en gemeten RTI.



FIGUUR 4-13: ACCURAATHEID PER DEELNEMER VOOR DE NORMAN RTI. EEN R^2 VAN 1.0 IS EEN 100 PROCENT OVEREENKOMST

De accuraatheid van de RTI voorspelling ligt voor de negatieve ionisatie tussen de 0,52 (deelnemer 11) en 0,99 (deelnemer 1) en voor de positieve ionisatie tussen de 0,89 (deelnemer 7) en 0,98 (deelnemer 4). In het algemeen is de accuraatheid bij de positieve ionen meting beter dan voor de negatieve ionen meting.

4.5 Conclusies

De massa-accuraatheid, één van de belangrijkste parameters bij hoge resolutie massaspectrometrie blijkt voor alle deelnemers lager te zijn dan 5 ppm, dit komt overeen met de bovengrens van de specificatie van de meeste Orbitrap en Q-ToF hoge resolutie massaspectrometers. Om een indruk te krijgen tot welk concentratieniveau een breed palet aan stoffen kan worden gemeten zijn addities van 43 stoffen inclusief 4 interne standaarden (logKow van -2,8 tot + 8,5) toegevoegd aan drinkwater met een concentratie van 0,025, 0,25 en 2,5 µg/L. Het overgrote deel (gemiddeld 85%) van deze stoffen wordt teruggevonden reeds bij een concentratie van 0,025 µg/l. De meest hydrofiele stof iohexol (logKow -2,8) wordt niet teruggevonden, de overige stoffen met een logKow in het gebied van -1,3 tot +8,5 wel. In grondwater en oppervlaktewater wordt gemiddeld 81-82% van de stoffen teruggevonden bij een additie van 1,0 µg/L.

In totaal zijn er 3 monsters aangeboden voor de non-target screening. De deelnemers waren niet op de hoogte welke stoffen aan de monsters zijn toegevoegd. Bij 3 van de 17 deelnemers waren de resultaten onvoldoende voor de automatische verwerking door het ontbreken van stofnamen. Deze zijn daarom niet meegenomen bij de data-analyse. De overige 14 deelnemers troffen tussen de 32 en 84% van de toegevoegde stoffen aan. De grote verschillen per deelnemer zijn mogelijk afhankelijk van (i) type massaspectrometer, (ii) de toegepaste analysecondities, (iii) de ervaring van de onderzoeker, (iv) de beschikbare tijd voor de uitwerking en (v) de volledigheid van de rapportage, maar dit is niet verder onderzocht. Dit kan in een nog vorm te geven vervolgonderzoek verder in beeld worden gebracht.

Bij de non-target screening wordt in de drie monsters tussen de 57 en 63% van de toegevoegde stoffen teruggevonden (zie tabel 4-5, 4-6 en 4-8). Bij non-target screening worden minder stoffen teruggevonden dan bij de suspect screening van hetzelfde monster (oppervlaktewater; monster 7 t.o.v. monster 5). Opmerkelijk is het grote verschil in aantal aangetoonde stoffen per deelnemer. Zowel bij de suspect screening als de non-target screening ligt dit tussen de 0 en 95% van het totaal aantal stoffen dat was toegevoegd aan het monster. Om de non-target screening resultaten van de deelnemers met het aantal toegevoegde stoffen te vergelijken zijn de top-5 gerapporteerde stoffen van elke deelnemer bepaald. Deze top-5 blijken niet voor elke deelnemer gelijk te zijn. Dit komt o.a. door een instrument afhankelijke meetgevoeligheid voor de verschillende toegevoegde stoffen. In totaal zijn bij de verschillende deelnemers in de 3 monsters tussen de 24 en 42 verschillende top-5 stoffen aangetoond bij de positieve ionisatie en tussen de 32 en 42 stoffen bij de negatieve ionisatie. Ruim de helft van de geïdentificeerde stoffen in deze top-5 lijsten was niet toegevoegd.

In een vervolgonderzoek kan een extra verdiepingsslag worden uitgevoerd, waarbij de invloed van de gebruikte analysecondities op het eindresultaat verder in beeld kan worden gebracht. De resultaten van dit ringonderzoek, gecombineerd met resultaten van andere onderzoeken zoals in Duitsland, kunnen gebruikt worden als onderbouwing voor een toekomstig op te zetten norm of richtlijn.

5 Discussie en vooruitblik

Door de intrede van risicogestuurde monitoring in de wetgeving heeft de LC-HRMS screening potentie als methode voor het signaleren van nieuwe bedreigingen. Door gedurende het project met een looptijd van 2 jaar samen als Nederlandse drinkwaterlaboratoria en Rijkswaterstaat op te trekken is veel ervaring opgedaan en kennis uitgewisseld m.b.t. LC-HRMS screening. Uit de resultaten van het Europese ringonderzoek zijn gegevens te halen om de twee opgestelde documenten (i) 'richtlijn screening met massaspectrometrie' en (ii) 'methode en kwaliteitseisen screenen met LC-HRMS' verder te onderbouwen. Ook kan in een verdiepingsslag nog meer aanvullende informatie worden verkregen, bijvoorbeeld over de invloed van instrumentele instellingen. Hiervoor is bij het NORMAN netwerk een voorstel ingediend (zie bijlage XII). Het ringonderzoek waarbij de verkregen meetgegevens automatisch zijn verwerkt kan ook de komende jaren door KWR aangeboden worden zodat de laboratoria de kwaliteit van hun eigen methode kunnen vergelijken met anderen.

De screening met LC-HRMS zal zich de komende jaren verder ontwikkelen, op Europees niveau zijn er verschillende initiatieven. Zo wordt er in Duitsland gewerkt aan een richtlijn, in België is een norm ontwikkeld waaraan wordt getoetst door de accrediterende instantie en er zijn plannen om op Europees niveau van gedachten te wisselen met regelgevende instanties waaraan normering moet voldoen.

De vraag blijft of een strakke norm voor screening met LC-MS nodig is of dat een publieke richtlijn voldoende is. De komende tijd zal hier een mening over gevormd moeten worden. Bij de Adviesgroep Waterkwaliteit is in eind 2017 een memo ingediend om een traject te starten voor het opzetten van een publiek normdocument, bijvoorbeeld een Nederlands Technische Afspraak (NTA). Via deze constructie kunnen naast de drinkwaterbedrijven, drinkwaterlaboratoria en NEN ook andere partijen zoals RWS, RIVM en Vitens betrokken worden bij dit traject. De twee ontwikkelde documenten ('Richtlijn screening met massaspectrometrie' en 'Methode en kwaliteitseisen screenen met LC-HRMS') kunnen als uitgangspunt dienen voor de verdere ontwikkeling. Ook een verdere uitwerking en verdieping van de beschikbare ringonderzoeksresultaten kunnen de op te zetten richtlijn verder onderbouwen.

6 Referenties

1. Regeling van de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu van 14 juni **2011**, nr. BJZ2011046947 houdende nadere regels met betrekking tot enige onderwerpen inzake de voorziening van drinkwater, warm tapwater en huishoudwater (Drinkwaterregeling).
2. Corine J. Houtman, Barry J. Pieters, Ilona Velzeboer, Jan Kroesbergen, Organische stoffen in het Drinkwaterbesluit: Hoe geven we invulling aan de eisen van de ‘overige’ antropogene stoffen. H2O-online, oktober **2015**
3. Ton van Leerdam (KWR), Bernard Bajema (Vitens), Bendert de Graaf (Vitens), Jan van der Kooi (WLN) en Leo Puijker (KWR). Brede chemische screening voor het monitoren van de waterkwaliteit. H2O-online, oktober **2015**.
4. Ton van Leerdam (KWR), Bernard Bajema (Vitens), Ronny Bosch (Vitens), Erik Emke (KWR), Herman Gerdes (WLN), Bendert de Graaf (Vitens), Jan van der Kooi (WLN), Leo Puijker (KWR), Dennis Vughs (KWR). Implementatie van LC-MS-screenings-technieken voor monitoring waterkwaliteit. BTO rapport **2015.213**
5. J.A. van Leerdam, B.L. Bajema, R.M.A. Sjerps, B.A. Wols, P.S. Bäuerlein, T.L. ter Laak, M.M.E. van der Kooi en E. Emke. Exploring the boundaries of non-target screening with Liquid Chromatography coupled to ESI-MS. BTO rapport **2017.011**
6. Schymanski et al. **2014**. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. Environ. Sci. & Techn. 48 (4), pp. 2097-2098
7. RTI system for LC-HRMS screening in NORMAN context. **2016**.

Bijlage I: Achtergrondinformatie Kreti en Letzel index

Kreti

$$KretI = Rty_a = Rt_{Fn} + \frac{(Rt_{Nb} - Rt_{Fn})}{(Rt'_{Nb} - Rt'_{Fn})} (Rt_{Xa} - Rt'_{Fn})$$

Rty_a = Gecorrigeerde retentietijd van component a ten opzichte van de interne standaarden Fenuron en Neburon

Rt_{Xa} = Gemeten retentietijd van component a.

Rt_{Nb} en Rt_{Fn} = Vastgestelde retentietijden van de interne standaarden. Fenuron 21,12 minuut en Neburon 43,60 minuut

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

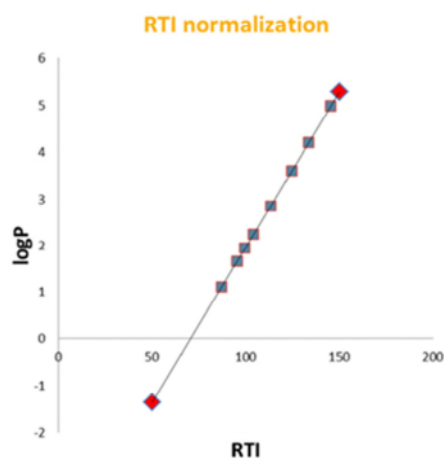
Fenuron: 21.12 (min.) logKow 1.38

Neburon: 43.60 (min.) logKow 4.15

Letzel

Normalization Retentionszeitindex – Known Standards

compound	logP	RTI
Metformin	-1.36	50.0
Chloridazon	1.11	87.2
Carbetamide	1.65	95.3
Monuron	1.93	99.5
Metobromuron	2.24	104.2
Chlorbromuron	2.85	113.4
Metconazole	3.59	124.5
Diazinon	4.19	133.6
Quinoxifen	4.98	145.5
Fenofibrate	5.28	150.0



Bijlage II: Resultaten RTI onderzoek

Kreti positieve ionen (met spreiding in minuten)

		Aqualab-HWL						Aqualab-HWL						spreading alle labs (min.)
		Vitens	KWR	RWS	WLN		Vitens	KWR	RWS	WLN				
		Kreti gemiddeld (n=3)						Kreti spreiding (min)						
Metformin	pos	6.429	6.375	-3.516	10.057	-3.457	2.420	0.100	0.076	0.132	0.075	0.081	0.262	5.611
Chloridazon	pos	21.964	21.984	21.539	22.039	21.802	23.272	0.001	0.025	0.011	0.010	0.032	0.025	0.602
Carbetamide	pos	26.874	26.986	26.526	26.867	26.129	28.565	0.235	0.017	0.007	0.016	0.031	0.073	0.832
Monuron	pos	28.294	28.291	28.001	27.958	27.060	31.737	0.036	0.013	0.013	0.010	0.056	0.078	1.622
Metobromuron	pos	33.274	33.316	34.682	34.753	31.633	36.721	0.031	0.008	0.006	0.028	0.037	0.061	1.733
Chlorbromuron	pos	38.972	38.982	39.344	39.544	37.766	41.482	0.027	0.002	0.004	0.012	0.025	0.050	1.214
Metconazole	pos	45.752	45.767	42.413	42.348	46.361	44.388	0.002	0.006	0.010	0.003	0.010	0.023	1.768
Diazinon	pos	44.754	44.949	46.925	46.220	44.915	43.349	0.026	0.008	0.009	0.019	0.015	0.025	1.248
Quinoxifen	pos	51.900	52.064	49.650	49.104	52.212	49.732	0.030	0.009	0.015	0.006	0.030	0.082	1.424
Fenofibrate	pos	50.207	50.477	52.612	53.180	51.565	46.939	0.039	0.010	0.018	0.009	0.031	0.059	2.231
Atrazin-D5	pos	33.134	33.227	32.501	31.552	31.774	34.680	0.011	0.014	0.009	0.023	0.014	0.066	1.143
Diclofenac-D4	pos	42.264	42.300	40.613	41.689	43.985	43.164	0.066	0.104	0.009	0.013	0.011	0.029	1.166

Kreti positieve ionen (met spreiding in procenten)

	Aqualab HWL		Vitens	KWR	RWS	WLN	
	spreiding Kreti (% std/gem)						spreiding alle labs
Metformin	1.554	1.196	-3.740	0.751	-2.349	10.830	183.9
Chloridazon	0.004	0.114	0.049	0.044	0.147	0.109	2.7
Carbetamide	0.875	0.063	0.027	0.060	0.118	0.255	3.1
Monuron	0.126	0.044	0.046	0.035	0.206	0.246	5.7
Metobromuron	0.095	0.025	0.017	0.079	0.116	0.167	5.1
Chlorbromuron	0.070	0.004	0.009	0.030	0.066	0.120	3.1
Metconazole	0.005	0.012	0.024	0.008	0.021	0.051	4.0
Diazinon	0.057	0.017	0.018	0.042	0.033	0.057	2.8
Quinoxyfen	0.058	0.016	0.031	0.012	0.057	0.166	2.8
Fenofibrate	0.077	0.020	0.034	0.018	0.060	0.126	4.4
Atrazin-D5	0.034	0.042	0.028	0.072	0.043	0.189	3.5
Diclofenac-D4	0.155	0.246	0.022	0.032	0.025	0.068	2.8
gemiddelde	0.141	0.099	0.028	0.046	0.079	0.141	4.968

Kreti negatieve ionen (met spreiding in minuten)

		Aqualab HWL					Vitens	KWR	RWS	WLN		Aqualab HWL					Vitens	KWR	RWS	WLN		

Massa afwijking positieve ionen meting. Stoffen zonder signaal (bentazon-d6 en hydrochlorothiazide-C₁₃-D₂) zijn niet opgenomen in de tabel.

	Aqualab-Zuid	HWL	Vitens	KWR	RWS	WLN	gemiddeld
Afw. ppm							
Fenuron	0.4	2.2	0.4	1.6	<0.1	2.7	1.5
Neburon	0.9	1.1	1.8	1.5	<0.1	3.8	1.8
Chlooroxuron	1.0	1.0	0.5	1.3	<0.1	3.4	1.4
Metformin	3.7	1.7	0.5		0.1	3.2	1.8
Chloridazon	0.8	2.0	0.6	1.9	<0.1	3.9	1.8
Carbetamide	2.0	2.0	0.9	2.2	<0.1	3.7	2.2
Monuron	1.3	2.3	0.7	1.9	0.1	3.3	1.6
Metobromuron	1.4	1.8	1.1	1.7	<0.1	3.3	1.9
Chlorbromuron	1.0	1.3	1.0	1.9	<0.1	2.7	1.6
Metconazole	1.3	1.1	2.2	2.2	<0.1	3.5	2.1
Diazinon	0.8	0.5	0.9	2.6	<0.1	2.7	1.5
Quinoxifen	0.6	0.6	2.5	2.3	<0.1	2.8	1.8
Fenofibrate	0.5	1.0	2.4	1.6	<0.1	3.4	1.8
Atrazin-D5	1.9	1.5	0.8	1.4	<0.1	3.3	1.8
Diclofenac-D4	0.6	1.2	0.7	1.9	<0.1	1.6	1.2
	1.2	1.4	1.1	1.9	0.1	3.2	

Massa afwijking negatieve ionen meting. Stoffen zonder signaal (fenuron, metformin, metobromuron, quinoxifen en atrazin-d5) zijn niet opgenomen in de tabel)

	Aqualab-Zuid	HWL	Vitens	KWR	RWS	WLN	gemiddeld
Afw. ppm							
Hydrochlorothiazide-C ₁₃ -D ₂		1.8			0.1		1.0
Bentazon-D6		1.3		2.8	0.0		1.4
Neburon	1.1	0.9		0.1			
Chlooroxuron	0.1	0.6		0.3			0.3
Hydrochlorothiazide	0.1	0.3	0.8	2.5		6.2	2.0
Chloridazon	0.0	1.0		1.8			0.9
Carbetamide		0.4		0.5			0.4
Monuron	0.5	0.7					0.6
Chlorbromuron	1.5	3.8		0.2			1.8
Fenofibrate				0.2			0.2
Bentazon-D6	0.6	1.7	0.7	0.7		5.9	1.9
Diclofenac-D4	1.0	0.2					0.6
	0.6	1.2	0.7	1.0	0.1	6.0	1.6

Bijlage III Overzicht van de toegevoegde stoffen bij ringonderzoek suspects screening (monsters 1 t/m 5)

Compound name	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	LogKow EPI suite (KOWWIN estimate)	
Iohexol	821.88760	819.87300	-2.81	
Amidosulfuron	370.04860	368.04000	-1.29	
Gabapentine	172.13321	170.11865	-1.1	*
Foramsulfuron	453.11870	451.10410	-0.82	
Di-glyme	135.10160	133.08700	-0.48	
Aldicarb-sulphoxide	207.07979	205.06524	-0.20	*
Butocarboxim-sulphoxide	207.07979	205.06524	-0.20	*
Pyrazool	69.04472	67.03017	0.3	*
Saccharin	184.00630	181.99170	0.45	
Flonicamid	230.05360	228.03900	0.50	
Methomyl	163.05360	161.03900	0.61	
Tylosin	916.52640	914.51190	1.05	
1H-Benzotriazole	120.05560	118.04110	1.17	
Aldicarb	191.08490	189.07030	1.36	
2,4-Dinitrophenol	185.01930	183.00470	1.73	
5-chloro-1H-benzotriazole	154.01670	152.00210	1.81	
Pipamperone	376.23950	374.22490	2.28	
Carbofuran	222.11250	220.09790	2.30	
Furosemide	331.01500	329.00040	2.32	
Clofibric acid	215.04690	213.03240	2.84	
Triphenylphosphine oxide	279.09330	277.07880	2.87	
1,3-diphenylguanidine	212.11820	210.10370	2.89	
Mecoprop (MCP)	215.04690	213.03240	2.94	
Etrifos	293.07190	291.05740	2.94	
Tembotrione	441.03810	439.02350	3.00	
Propazine	230.11670	228.10210	3.24	
Bromoxynil	275.86540	273.85090	3.39	
Dinoterb	241.08190	239.06734	3.64	*
Dinoseb	241.08190	239.06734	3.69	*
Ioxynil	371.83770	369.82310	3.94	
Propiconazole	342.07710	340.06250	4.13	
Bezafibrate	362.11540	360.10080	4.25	

Metrafenone	409.06450	407.05000	4.72	
Gemfibrozil	251.16420	249.14960	4.77	
Spinosyn A en D (mengsel)	732.46810	730.45360	4.90	*
Fenofibrate	361.12010	359.10560	5.19	
Indoxacarb	528.07800	526.06340	5.21	
Brodifancoum-A	523.09030	521.07580	?	

* via Pubchem

Bijlage IV overzicht van de interne standaarden en RTI stoffen bij ringonderzoek

Interne standaarden voor kwantificering

compound name	CAS nr.	brutoformule	MW	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Atrazin-D5	163165-75-1	C ₈ H ₉ D ₅ ClN ₅	220	221.1324	219.1179
Bentazon-D6	25057-89-0	C ₁₀ H ₆ D ₆ N ₂ O ₃ S	246	247.1018	245.0872
Diclofenac-D4	153466-65-0	C ₁₄ H ₇ D ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂	299	300.0491	298.0345

Stoffen voor het berekenen van de Retentie Tijd Index volgens Kreti en Letzel

compound name	CAS nr.	brutoformule	MW	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Kreti compounds					
Fenuron	101-42-8	C ₉ H ₁₂ N ₂ O	164	165.1022	163.0877
Neburon	555-37-3	C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O	274	275.0712	273.0567
Chlooroxuron	1982-47-4	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	290	291.0895	289.0749
Letzel compounds					
Metformin	657-24-9	C ₄ H ₁₁ N ₅	129	130.1087	128.0942
Chloridazon	1968-60-8	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O	221	222.0429	220.0283
Carbetamide	16118-49-3	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	236	237.1234	235.1088
Monuron	150-68-5	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O	198	199.0633	197.0487
Metobromuron	3060-89-7	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	258	259.0077	256.9931
Chlorbromuron	13360-45-7	C ₉ H ₁₀ BrClN ₂ O ₂	292	292.9666	290.9541
Metconazole	125116-23-6	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O	319	320.1524	318.1379
Diazinon	333-41-5	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304	305.1083	303.0938
Quinoxifen	124495-18-7	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	307	308.004	305.9894
Fenofibrate	49562-28-9	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄	360	361.1201	359.1056

Stoffen voor het berekenen van de Retentie Tijd Index volgens NORMAN (Universiteit van Athene)

Norman compounds					
Calibrants LC-(+)ESI-HRMS	Mol. Formula	[M+H] ⁺	Calibrants LC-(-)ESI-HRMS	Mol. Formula	[M-H] ⁻
Guanylurea	C2H6N4O	103.0614	Amitrole	C2H4N4	83.0363
Amitrol	C2H4N4	85.05087	Benzoic acid	C7H6O2	121.0295
Histamine	C5H9N3	112.0869	Acephate	C4H10NO3PS	182.0046
Chlormequate	C5H13ClN	123.0809	Salicylic acid	C7H6O3	137.0244
Methamidophos	C2H8NO2PS	142.0086	Simazine 2-Hydroxy	C7H13N5O	182.1047
Vancomycin	C66H75Cl2N9O24	1448.437	Tepraloxym Peak1	C17H24ClNO4	340.1321
Cefoperazone	C25H27N9O8S2	646.1497	Bromoxynil	C7H3Br2NO	273.8509
Trichlorfon	C4H8Cl3O4P	256.9299	MCPA	C9H9ClO3	199.0167
Butocarboxim	C7H14N2O2S	191.0849	Valproic acid	C8H16O2	143.1078
Dichlorvos	C4H7Cl2O4P	220.9532	Phenytoin	C15H12N2O2	251.0826
Tylosin	C46H77NO17	916.5264	Flamprop	C16H13ClFNO3	320.0495
TCMTB	C9H6N2S3	238.9766	Benodanil	C13H10INO	321.9734
Rifaximin	C43H51N3O11	786.3596	Dinoterb	C10H12N2O5	239.0673
Spinosad A	C41H65NO10	732.4681	Inabenfide	C19H15ClN2O2	337.0749
Emamectin B1a	C49H75NO13	886.5311	Coumaphos	C14H16ClO5PS	361.0072
Abamectin	C48H72O14	873.4995	Triclosan	C12H7Cl3O2	286.9439
Nigericin	C40H68O11	725.4834	AvermectinB1a	C48H72O14	871.4849
Ivermectin B1a	C48H74O14	875.5151	Salinomycin	C42H70O11	749.4845

Bijlage V Overzicht van de toegevoegde stoffen bij het ringonderzoek non-target screening (monsters 6 t/m 8)

Nr.	Component	Monster 6	Monster 7	Monster 8
1	amidosulfuron	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
2	foramsulfuron	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
3	aldicarbulsulfoxide	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
4	butocarboximsulfoxide	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
5	sacharine		ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
6	flonicamid		ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
7	methomyl		ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
8	benzotriazole		ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
9	aldicarb		ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
10	tylosin		ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
11	2,4-dinitrofenol	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	
12	5-chloor-1H-benzotriazool	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	
13	carbofuran	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	
14	furosemide	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	
15	clofibrinezuur	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	
16	TPPO	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
17	1,3-diphenylguanide	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
18	mecoprop	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
19	tembotrione	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
20	etrimfos	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
21	propazin	ca. 3 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l
22	bromoxynil		ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
23	dinoterb		ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
24	dinoseb		ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
25	ioxinil		ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
26	bezafibraat		ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
27	propiconazool		ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
28	metrafenon	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	
29	gemfibrozil	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	
30	fenofibraat	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	
31	indoxocarb	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	
32	brodifancoum	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	
33	spinosad (mengsel van spinosyn A en D)	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	
34	iohexol	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l

35	gabapentine	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
36	pyrazool	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
37	diglyme	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
38	pipamperon	ca. 1 µg/l	ca. 1 µg/l	ca. 3 µg/l
39	trimethoprim	ca. 3 µg/l		ca. 3 µg/l
40	ketoprofen	ca. 3 µg/l		ca. 3 µg/l
41	Propranolol	ca. 3 µg/l		ca. 3 µg/l
42	sulfamethoxazool	ca. 3 µg/l		ca. 3 µg/l
Totaal aantal stoffen		31	39	31

Bijlage VI Google vragenlijst bij ringonderzoek

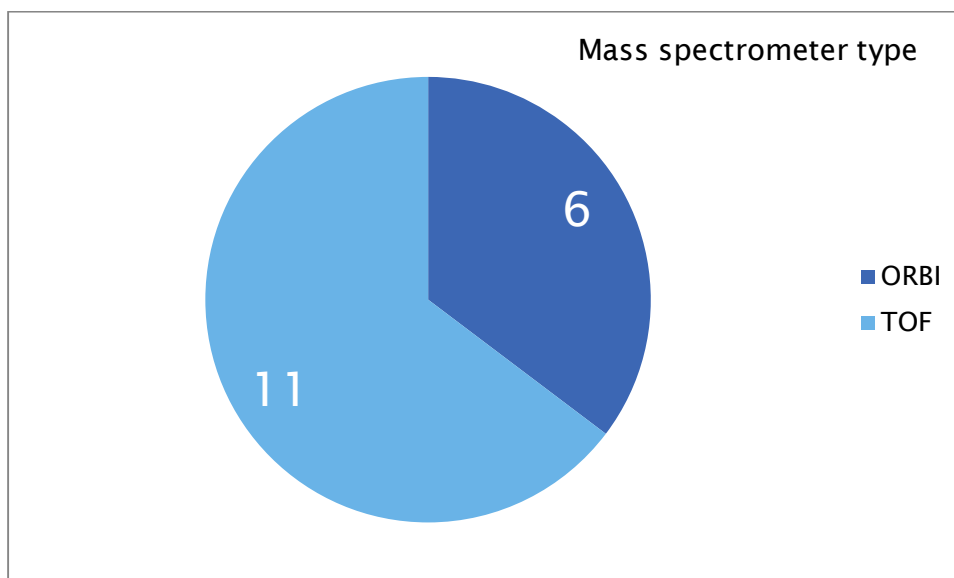
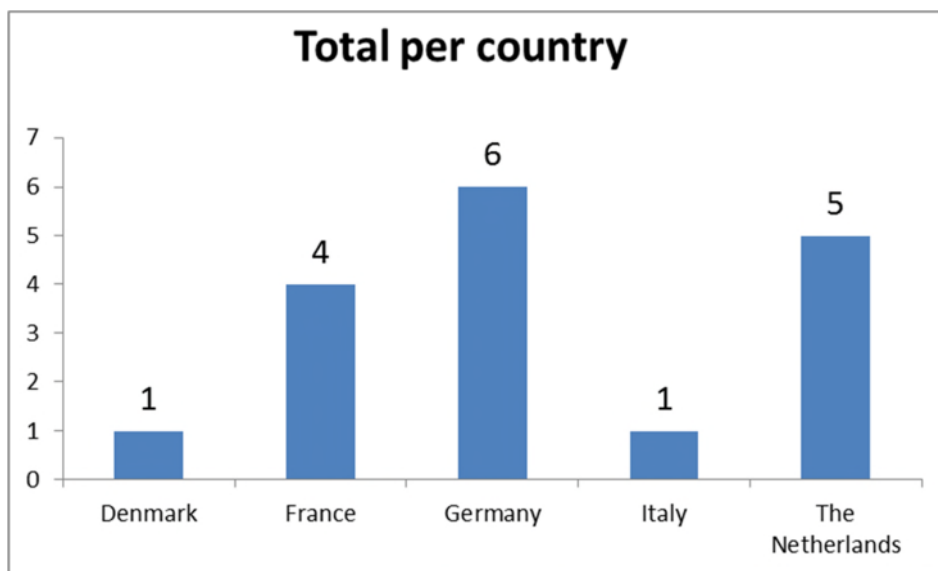
Sampling	Material blank bottle
	volume blank bottle
	sample bottles cleaned before use
	stabiliser added to sample bottle
	Kind of stabiliser and amount
sample handling solid phase extraction	Sample preparation
	Sample volume used in ml
	pH adjusted to
	Removal of particles
	Used material
	Pore size in μm
	amount of internal standard solution spiked
	concentration of the internal standard solution
	final internal standard concentration in sample
	sample handling order
	type of solid phase extraction
	SPE done
	Cartridge brand
	Type
	Material of the cartridge
	Amount of sorbent
	Extraction performed by
	Conditioning by
	clean-up
	flow rate [mL/min]
	drying time of the cartridge
	drying method
	elution with
	evaporation with
	evaporation method/temperature
	collection tubes heated
	heating temperature
	evaporating until which volume
	final volume of the extract
	composition of the extract
	addition of a second internal standard?

	Filtration of the extract
	Material of the filter
	Pore size in μm
	material of the syringe used for filtration
	type of vial used
	time in vial before analysis in days
sample handling direct injection	Sample preparation
	Sample volume used in ml
	pH adjusted to
	Removal of particles
	Used material
	Pore size in μm
	amount of internal standard solution spiked
	concentration of the internal standard solution
	final internal standard concentration in sample
	sample handling order
	material of the syringe used for filtration
	type of vial used
	time in vial before analysis in days
HPLC	Instrument
	Manufacturer
	column
	Manufacturer
	part number of the supplier
	Dimension [LxID in mm]
	particle size [μm]
	Manufacturer guard column
	part number of the supplier
	solvent A
	pH solvent A
	solvent B
	pH solvent B
	flow rate [mL/min]
	inj. Volume [μL]
	temp. Oven [$^{\circ}\text{C}$]
	gradient
MS	Instrument
	brand of mass analyser
	type

	ionisation
	Single method?
	Resolution
	mode
Software	Software used for identification
	Software used for calculation peak areas
	Correction factor for blank

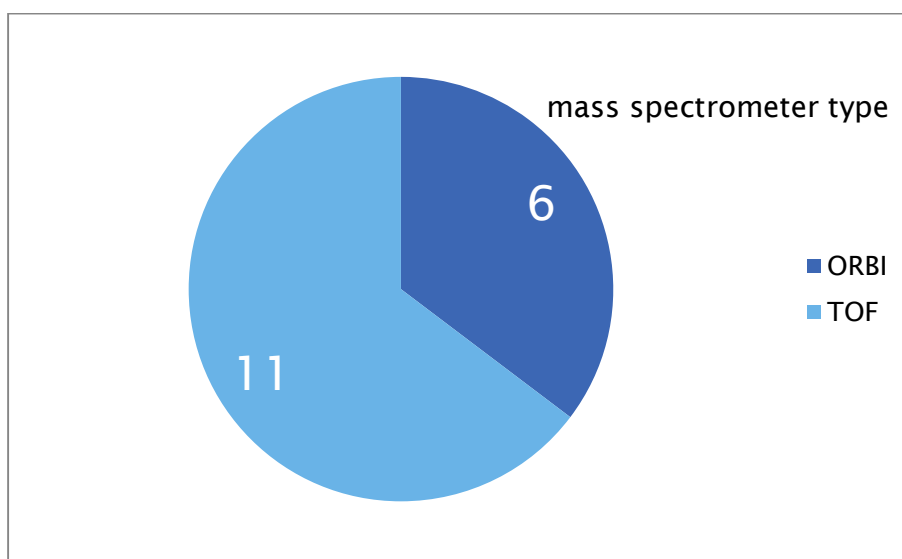
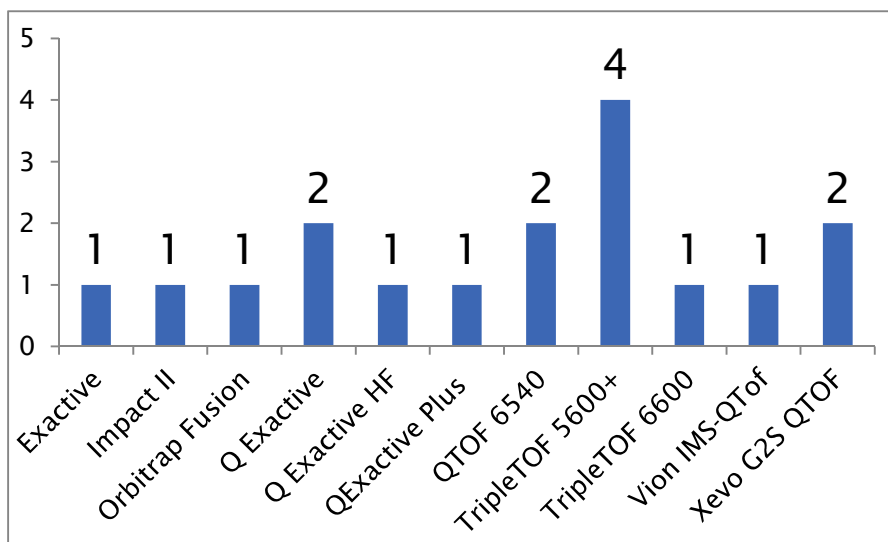
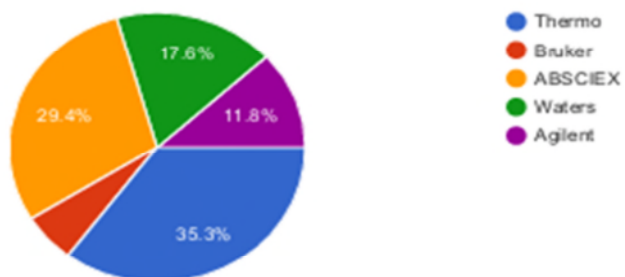
Other relevant information

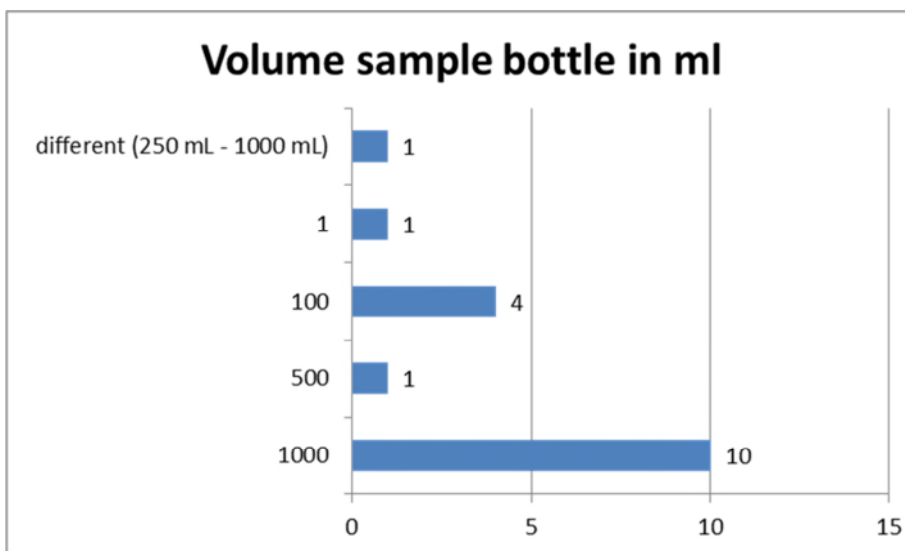
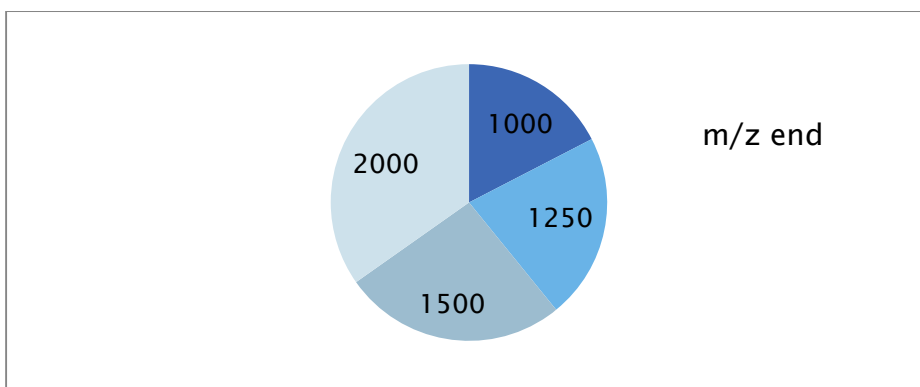
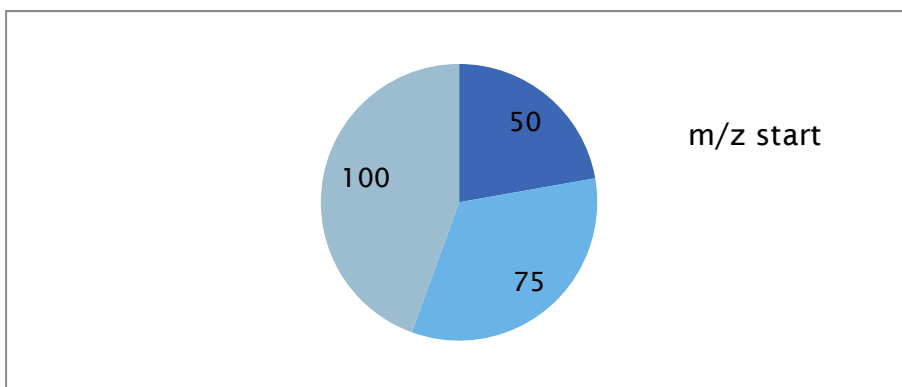
Bijlage VII Overzicht van toegepaste analysecondities bij Europees ringonderzoek

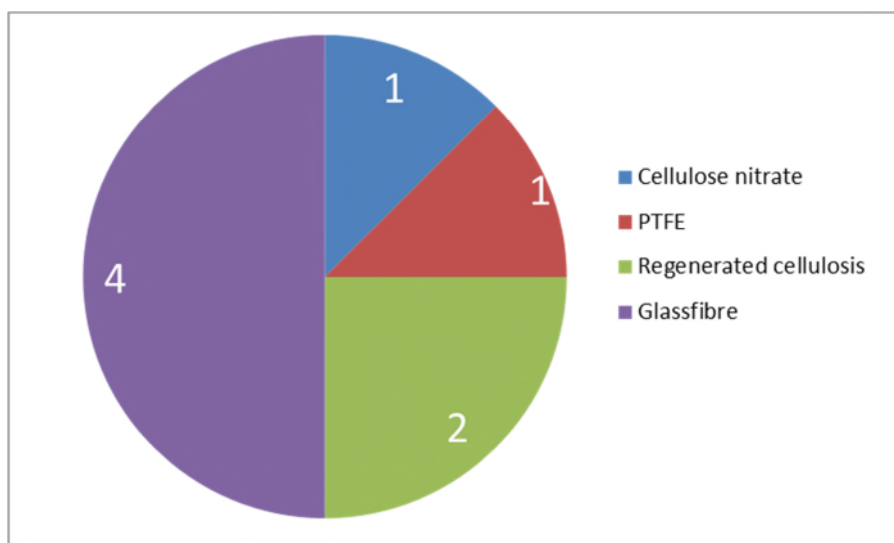
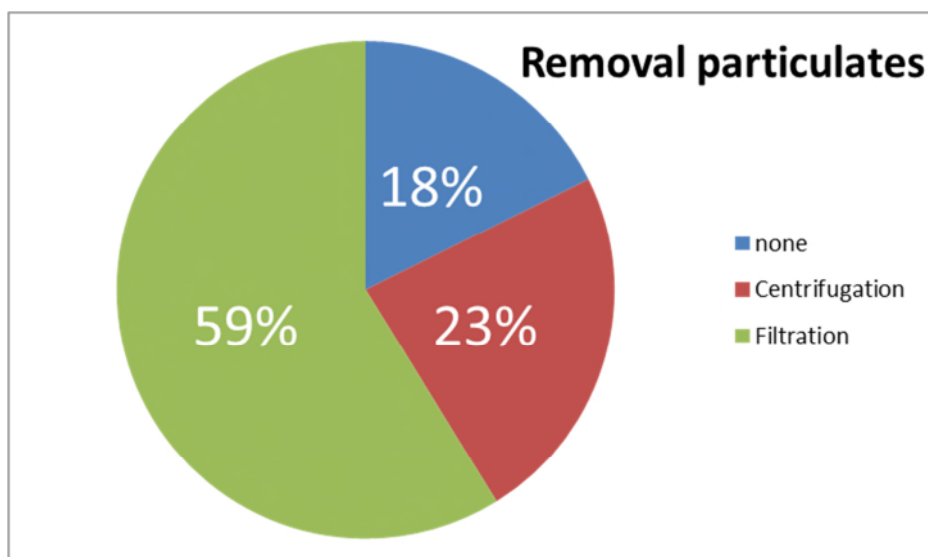
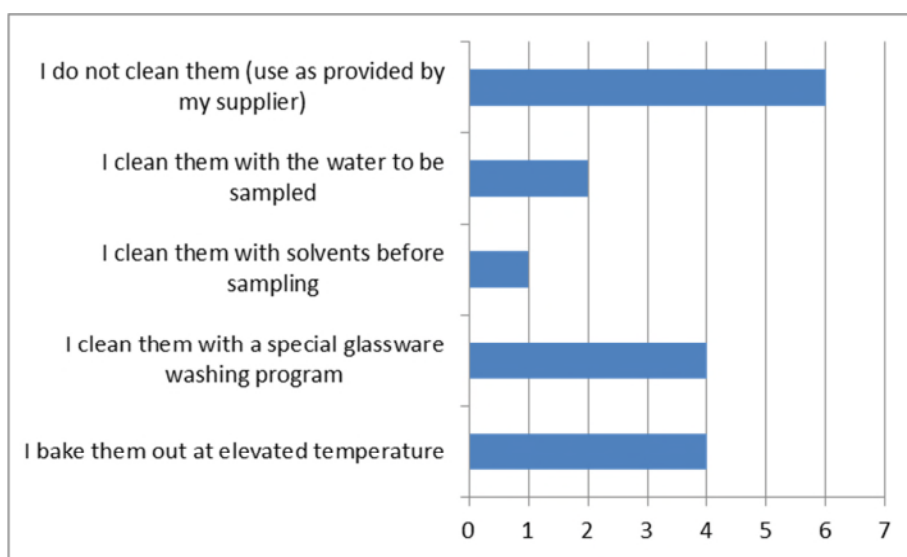


What is the brand of your mass spectrometer

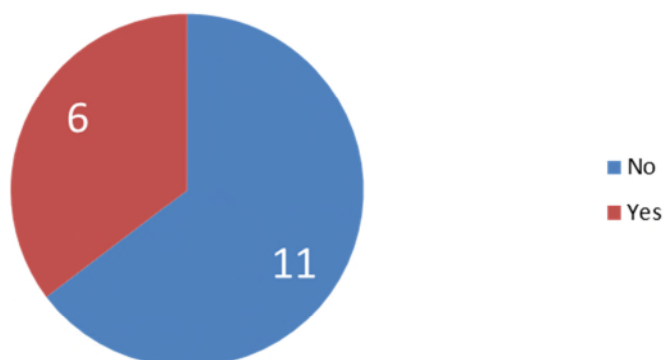
17 responses



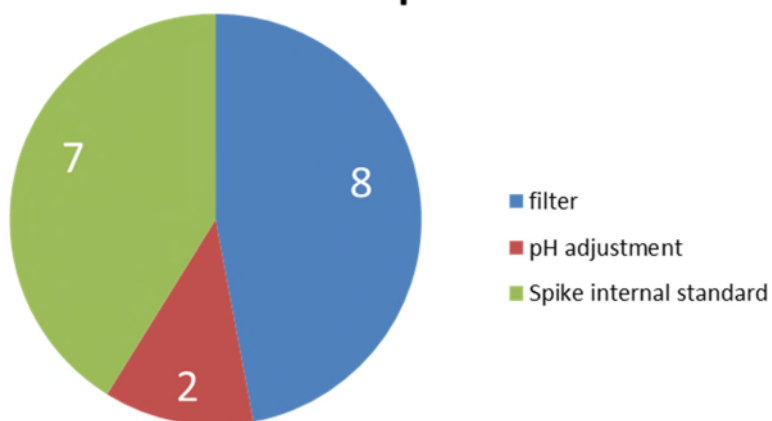




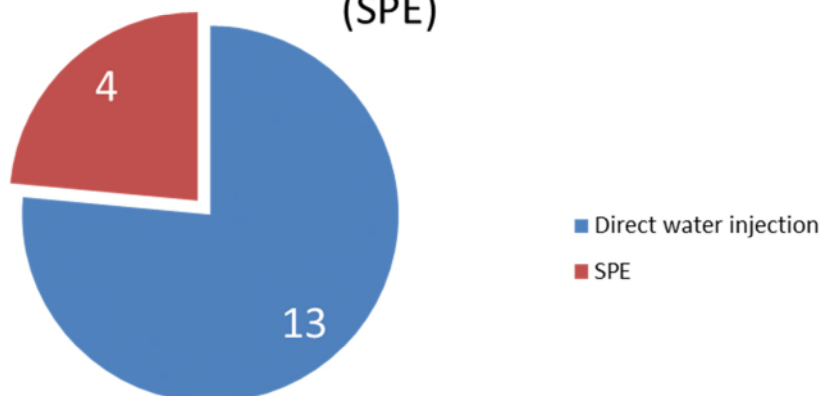
Do you adjust the pH of your sample



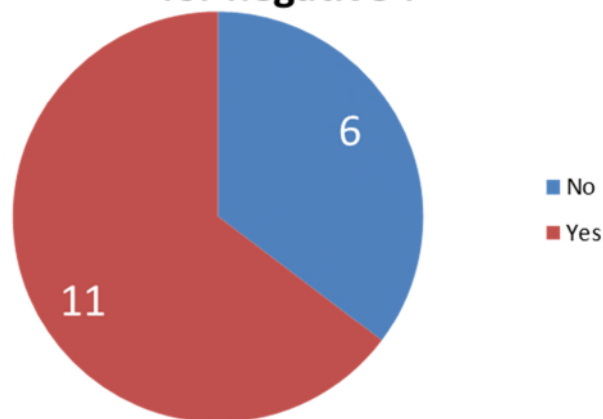
First step



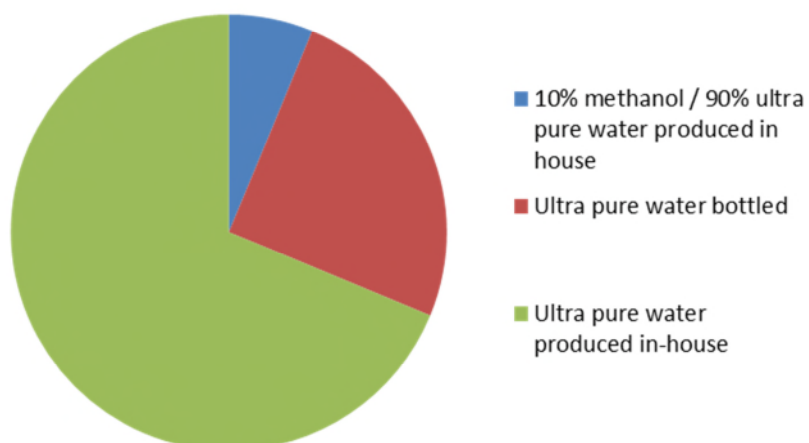
Are you using solid phase extraction (SPE)



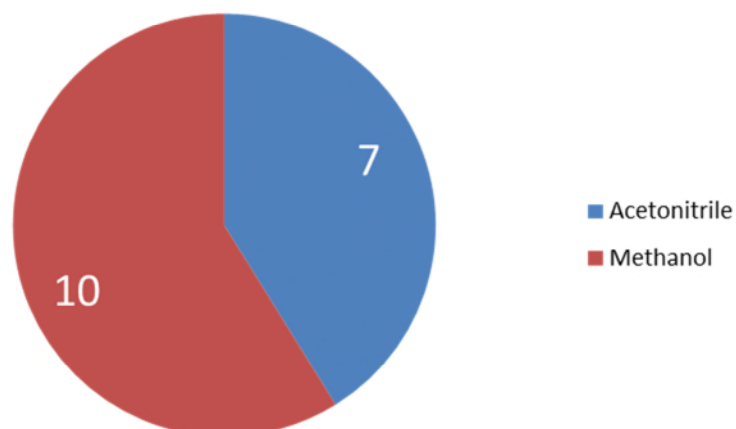
Are you using the same composition for negative ?

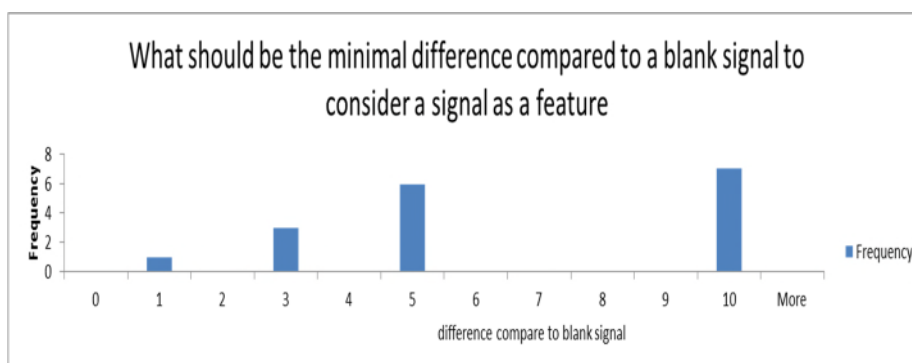
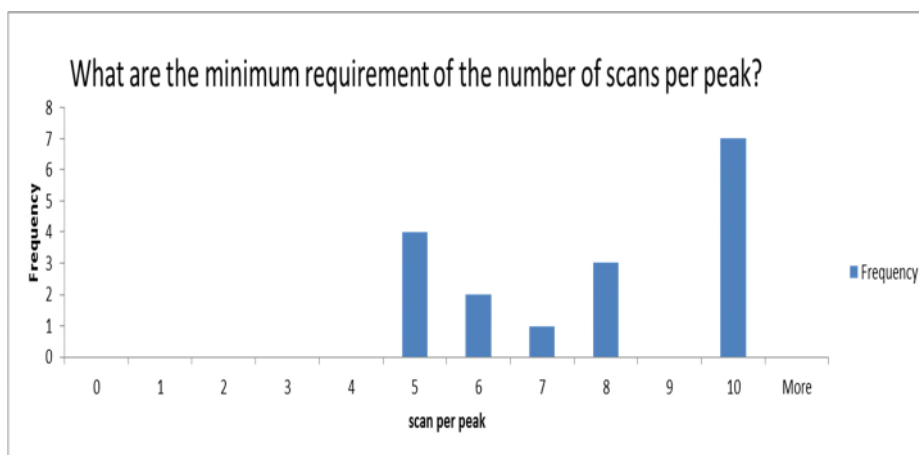
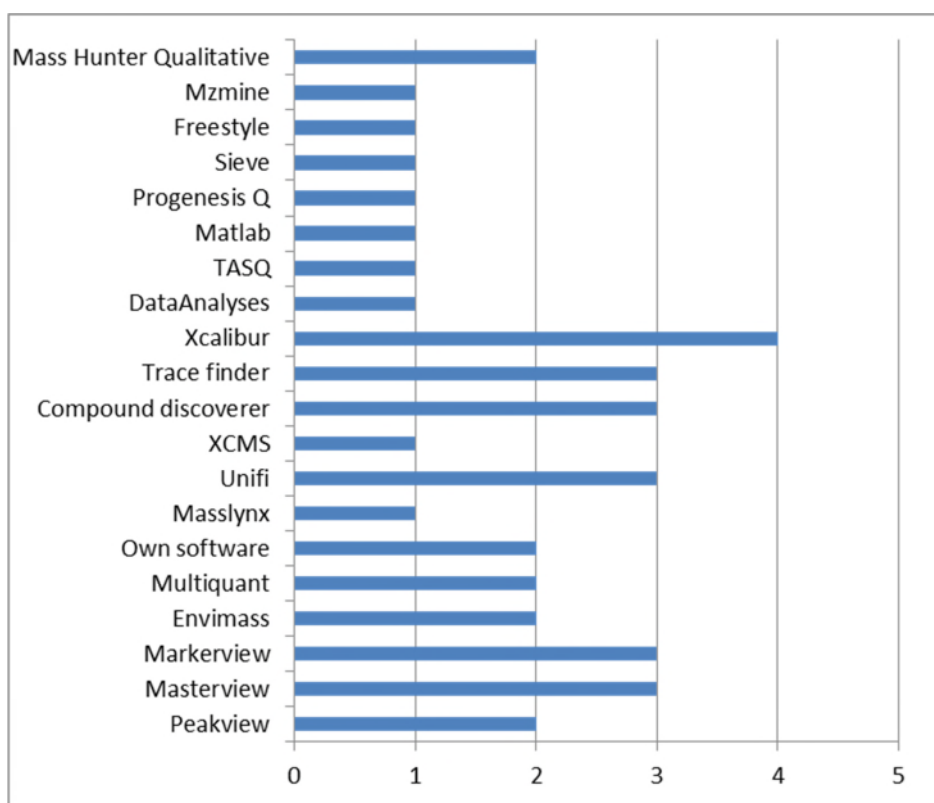


Solvent A



Solvent B

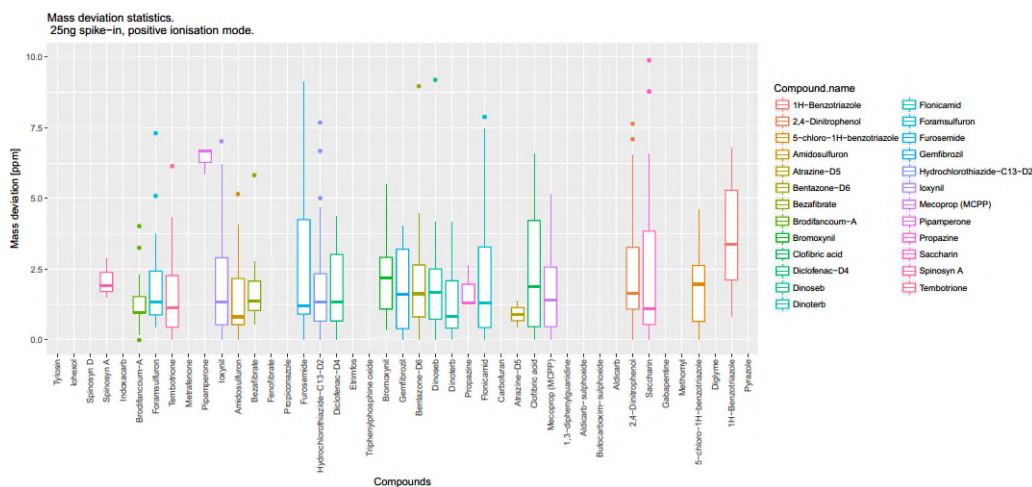




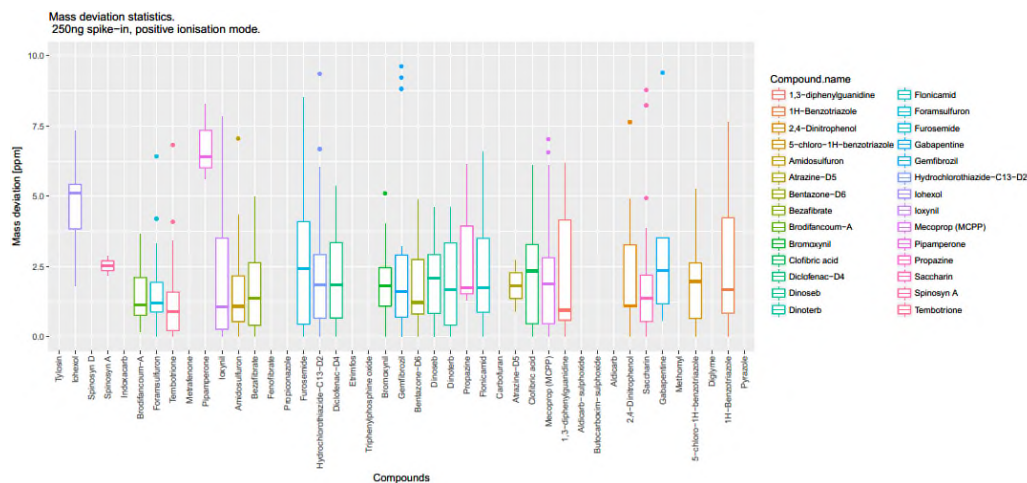
Bijlage VIII massa-afwijking met spreiding van doelstoffen bij een additie van 0,025 en 2,5 µg/L aan drinkwater

I.1 Positieve ionisatie meting: massa-accuraatheid per stof

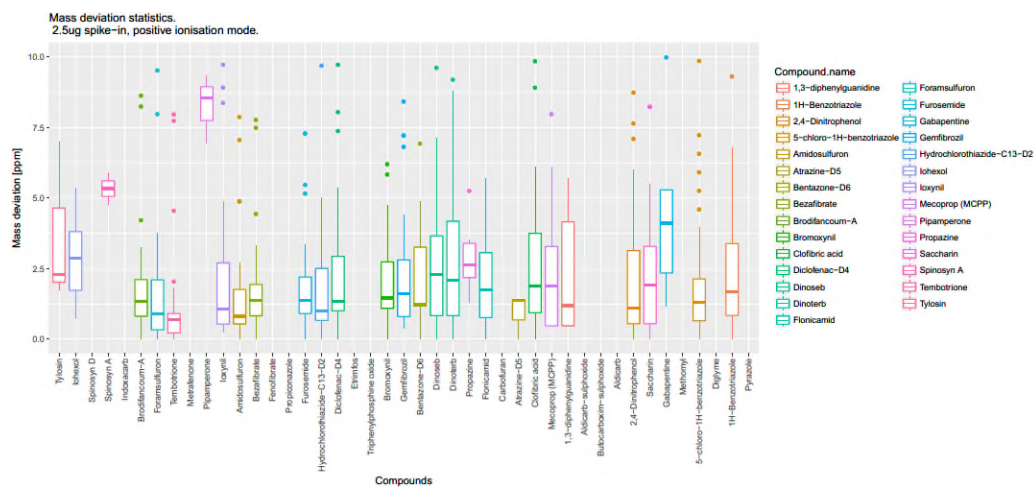
Concentratie 0,025 µg/L



Concentratie 0,25 µg/L

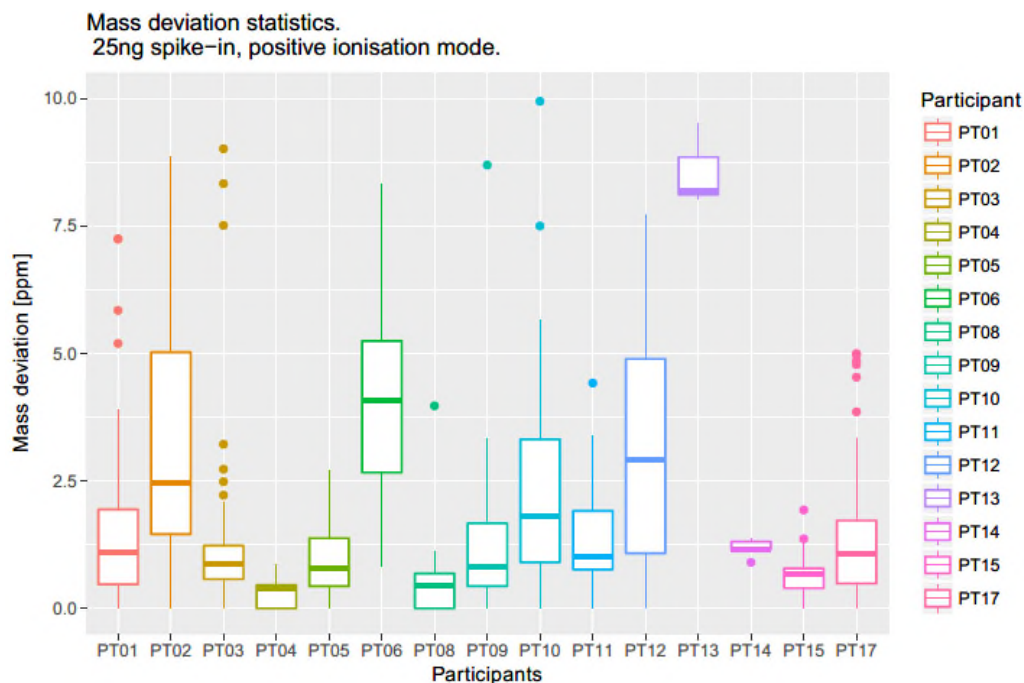


Concentratie 2,5 µg/L

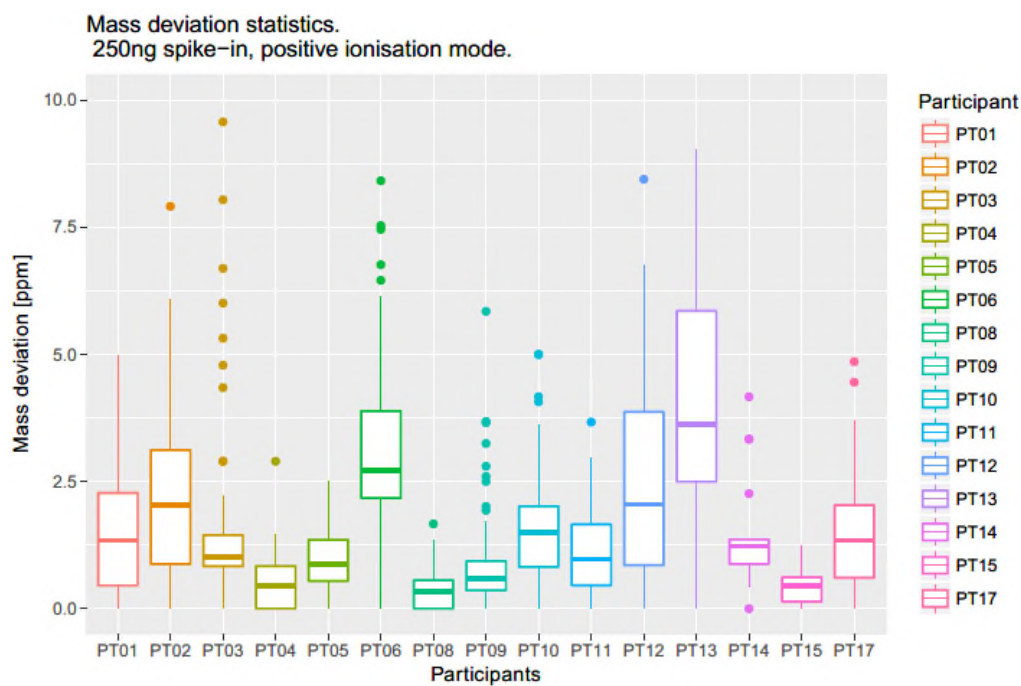


I.2 Positieve ionisatie meting: massa-accuraatheid per deelnemer

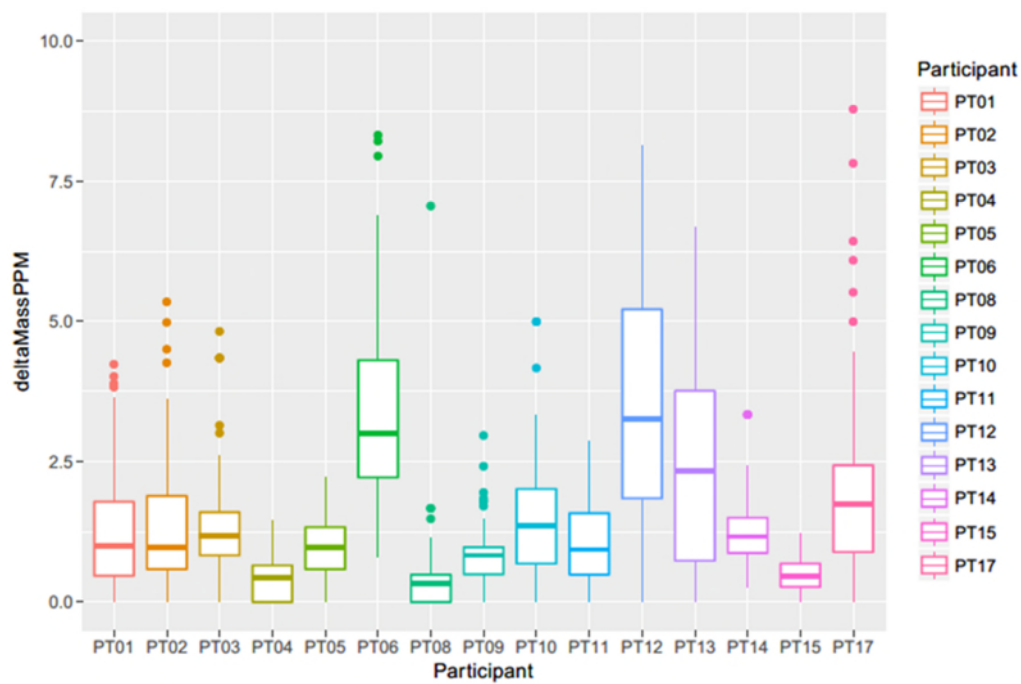
Concentratie 0,025 µg/L



Concentratie 0,25 µg/L



Concentratie 2,5 µg/L

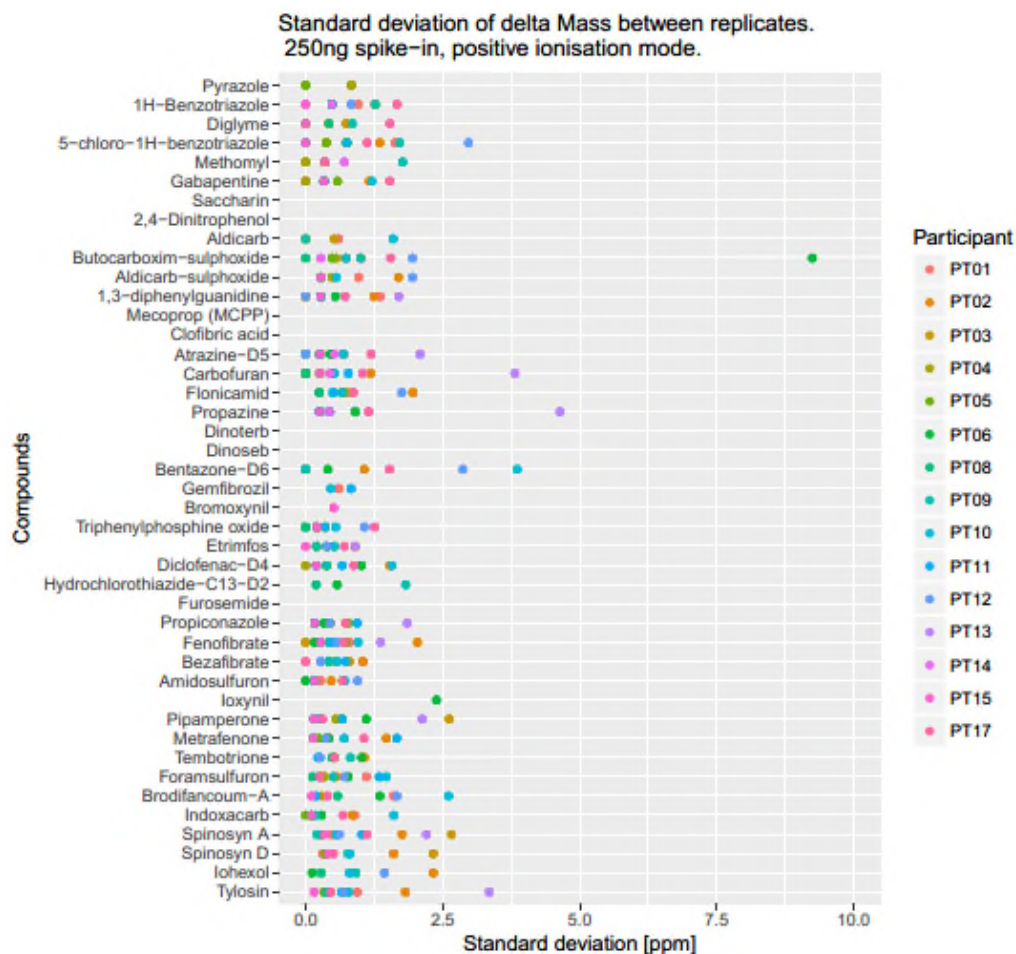


I.3 Positieve ionisatie meting: standaard deviatie massa-accuraatheid per stof

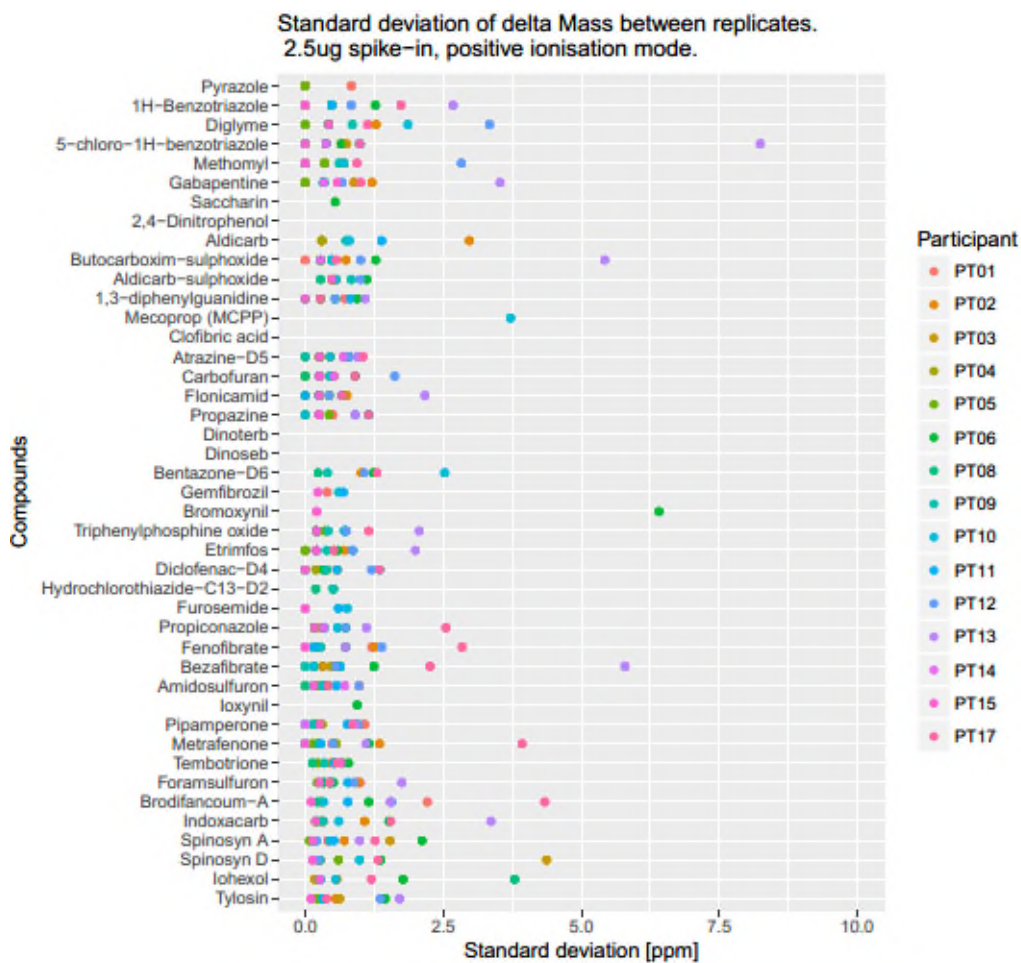
Concentratie 0,025 µg/L



Concentratie 0,25 µg/L

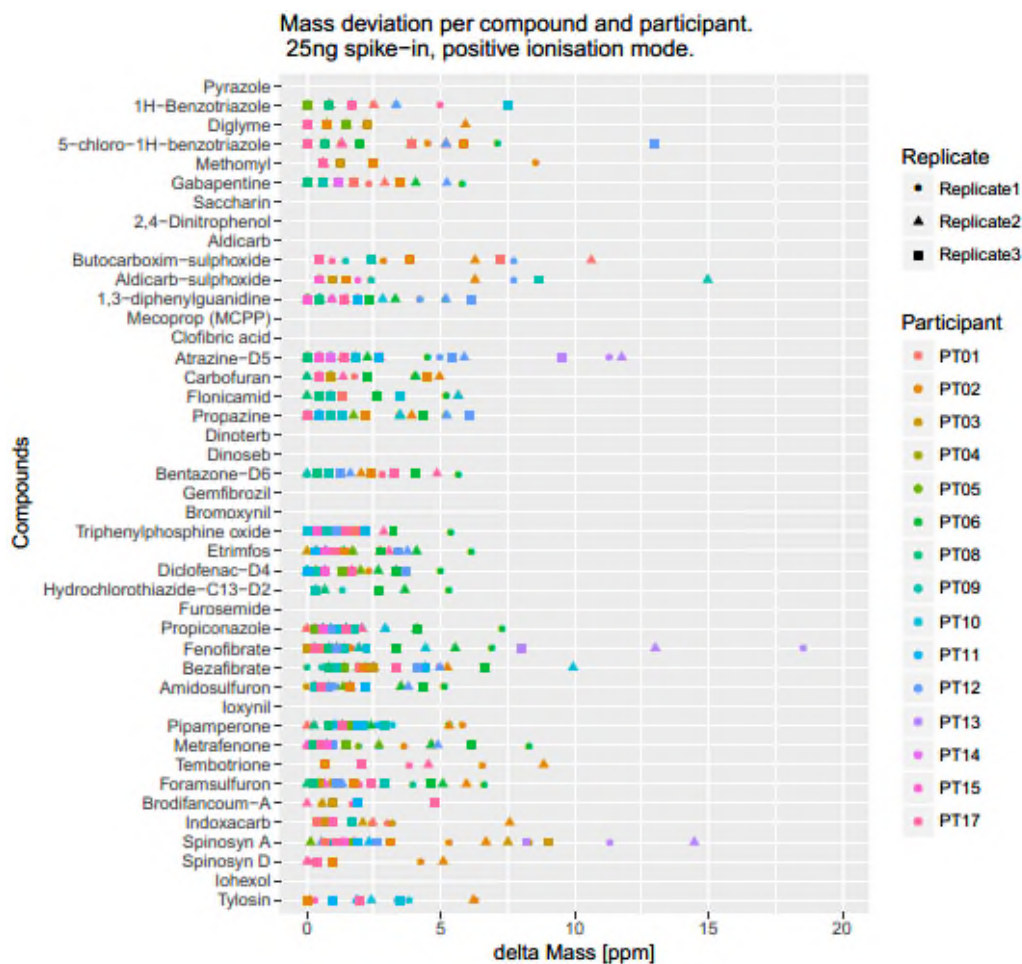


Concentratie 2,5 µg/L

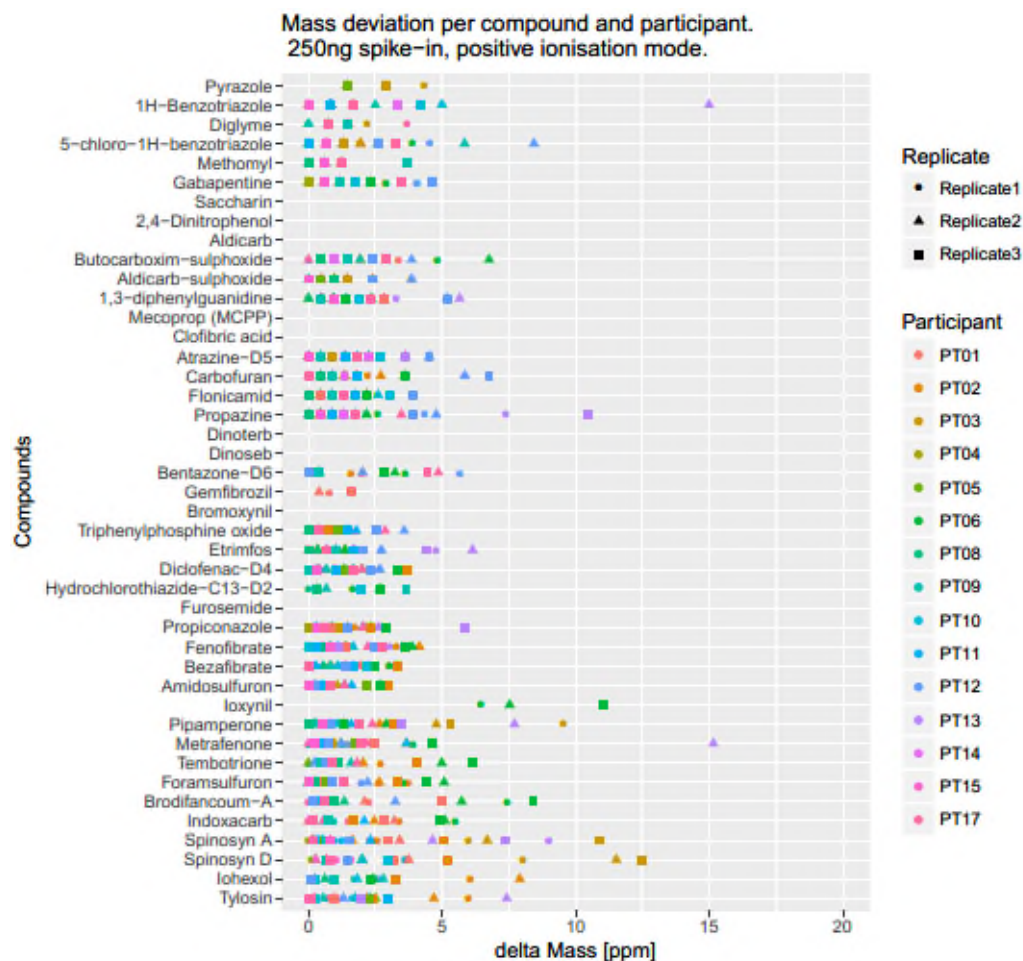


I.4 Positieve ionisatie meting: standaard deviatie van de massa-accuraatheid per stof en per deelnemer

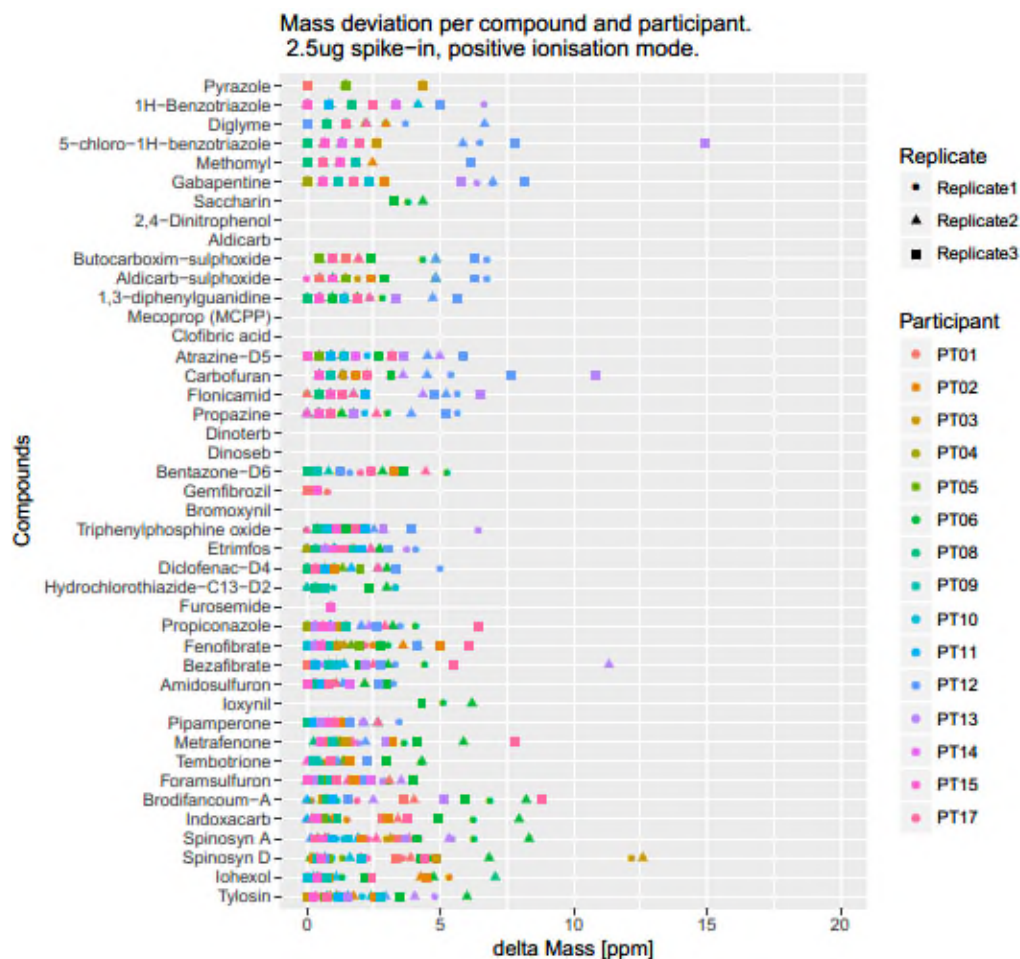
Concentratie 0,025 µg/L



Concentratie 0,25 µg/L

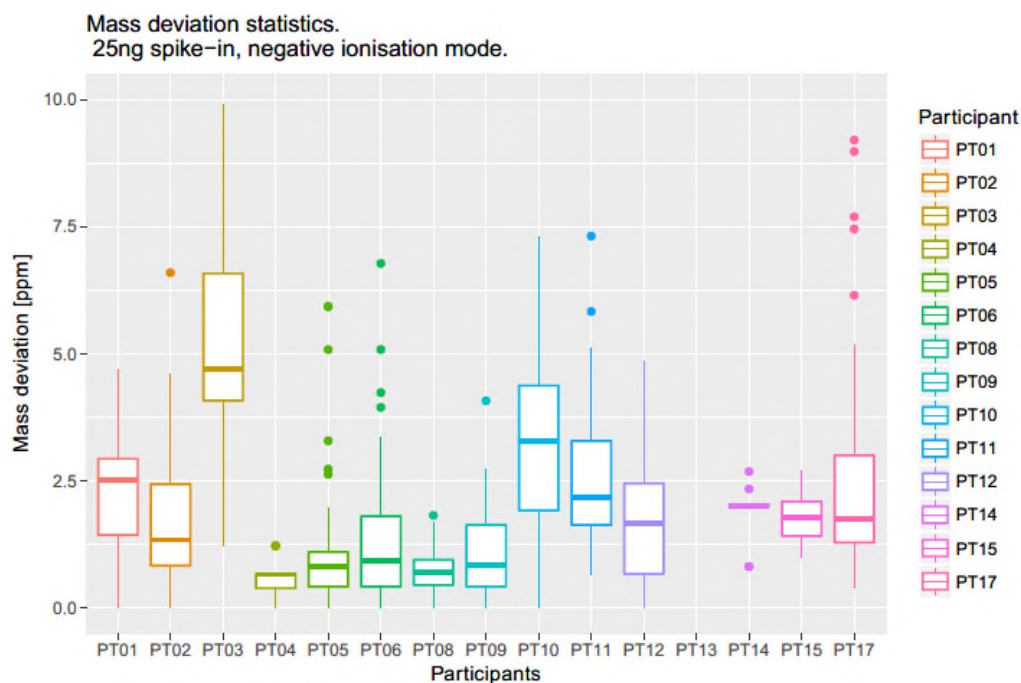


Concentratie 2,5 µg/L

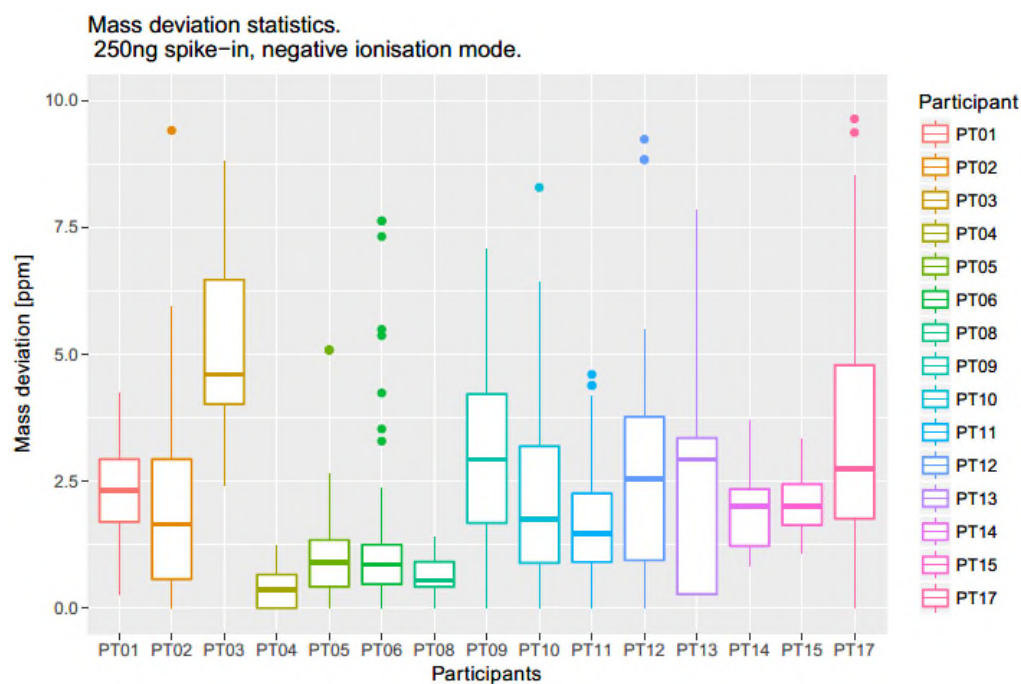


I.5 Negatieve ionisatie meting: massa-accuraatheid per deelnemer

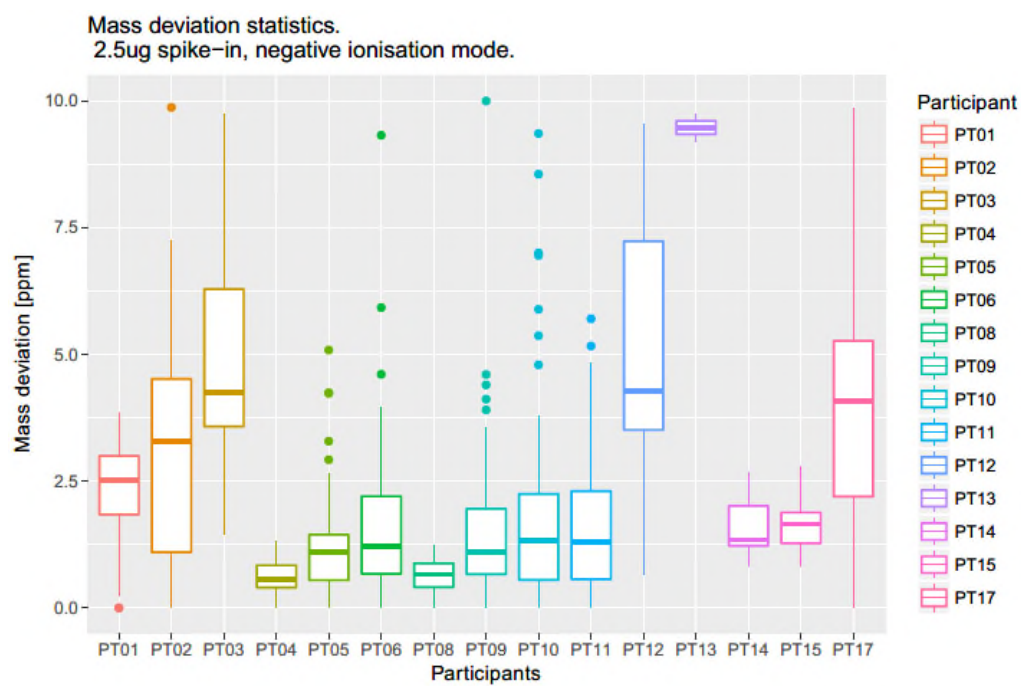
Concentratie 0,025 µg/L



Concentratie 0,25 µg/L

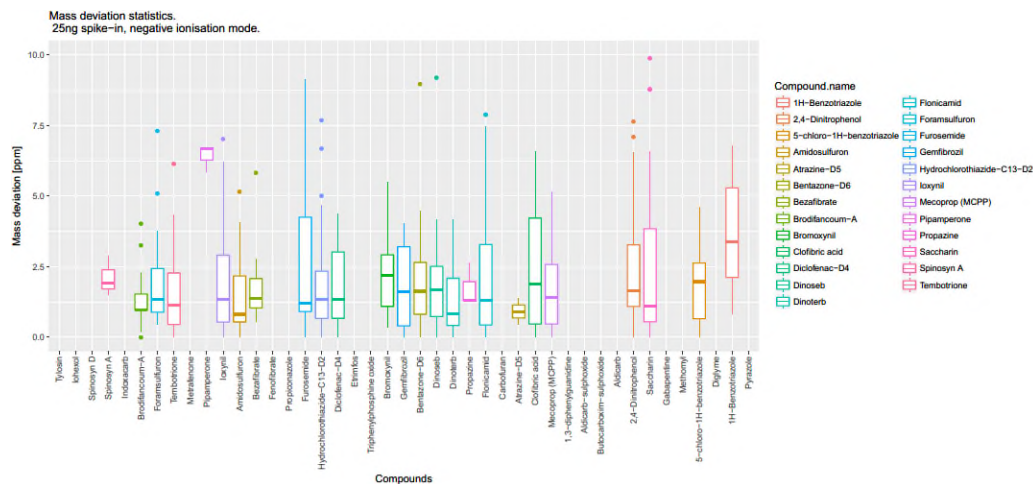


Concentratie 2,5 µg/L

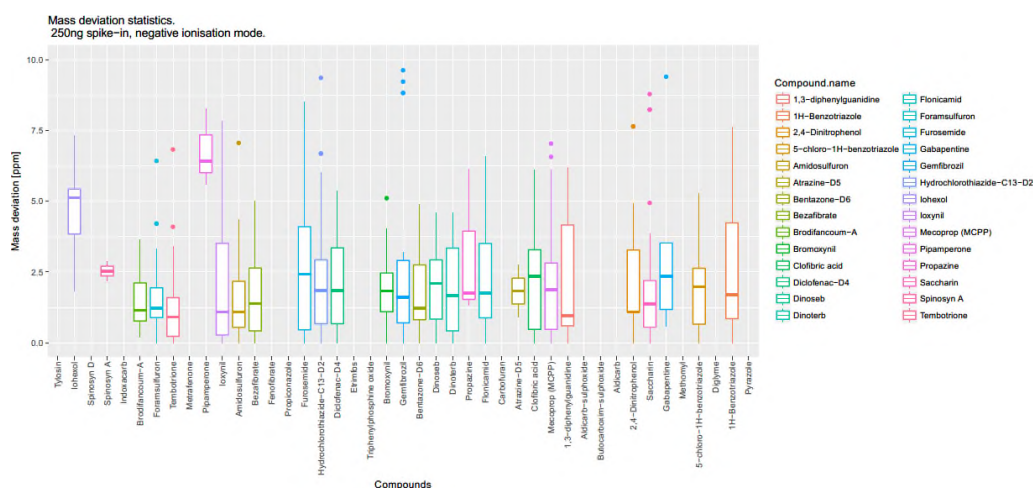


I.6 Negatieve ionisatie meting: massa-accuraatheid per stof

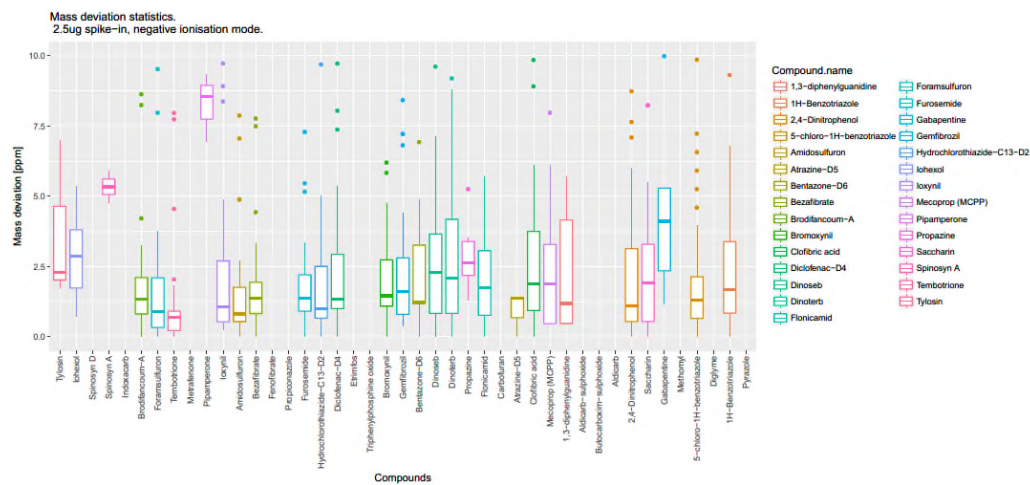
Concentratie 0,025 µg/L



Concentratie 0,25 µg/L

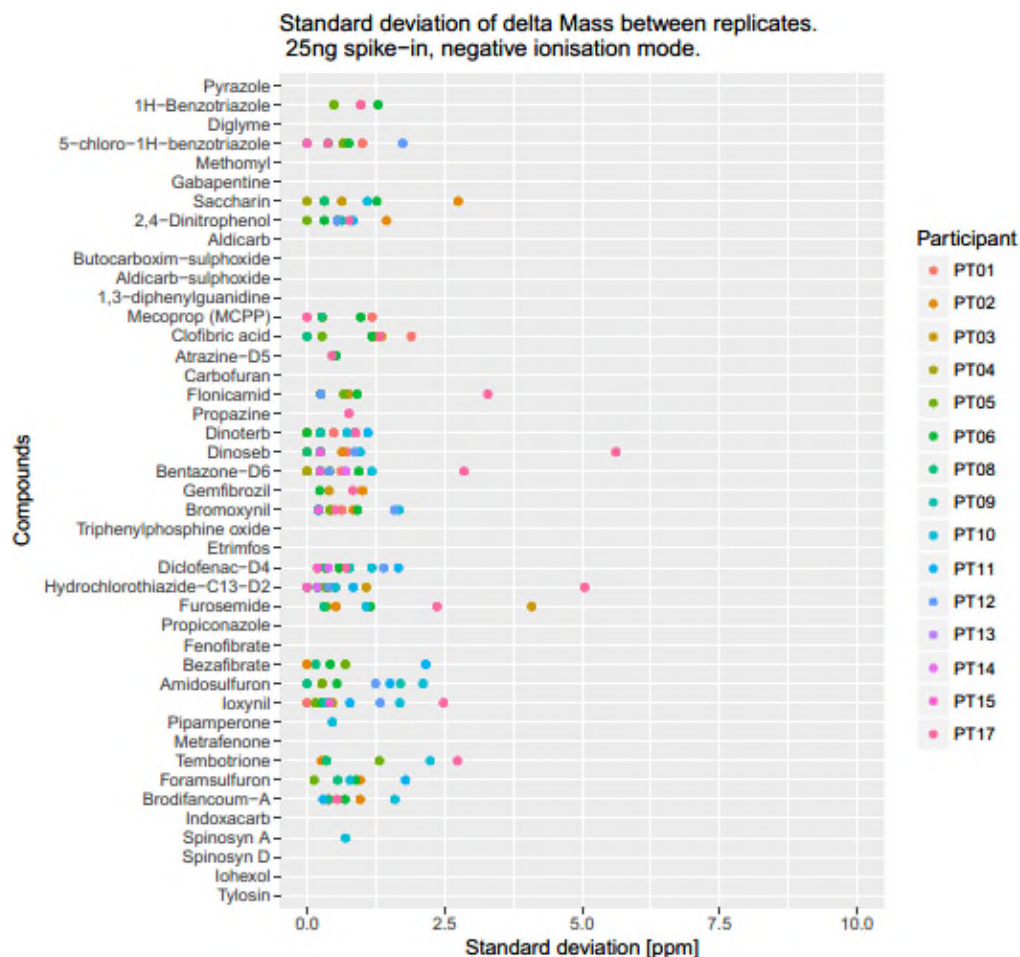


Concentratie 2,5 µg/L

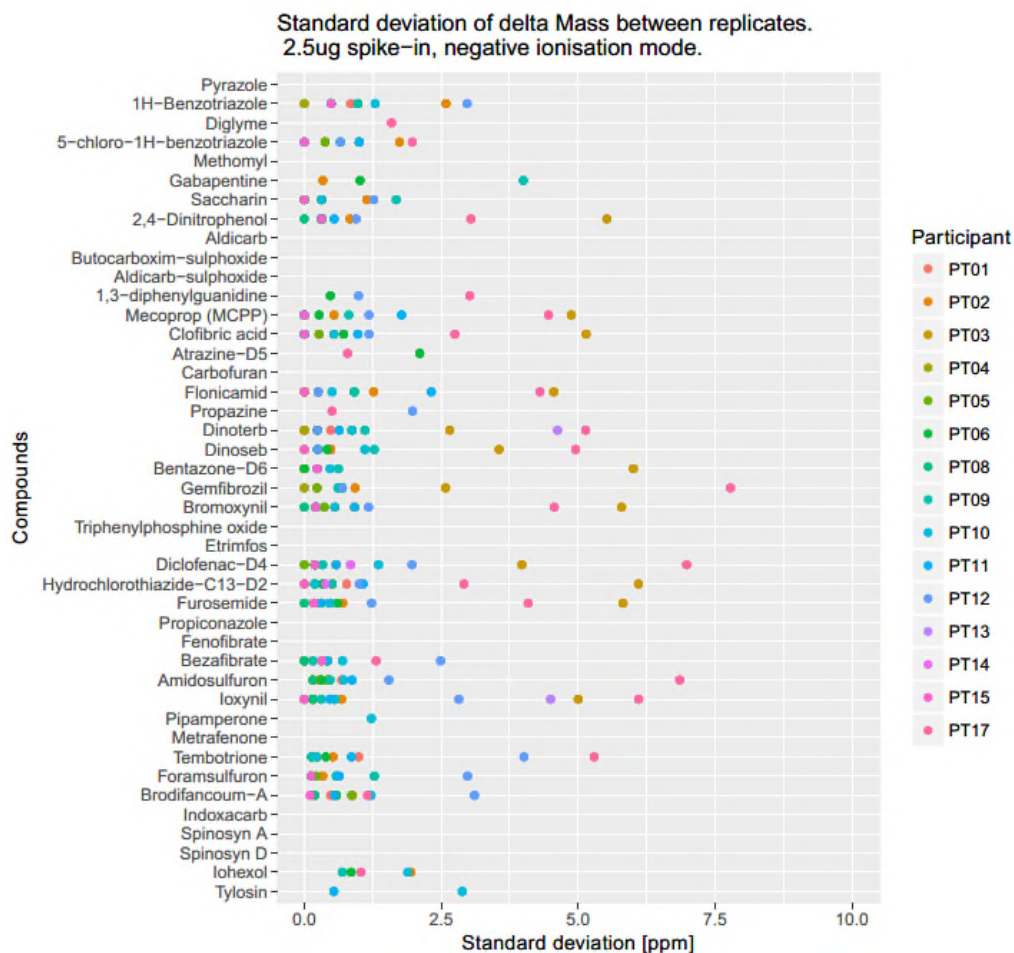


I.7 Negatieve ionisatie meting: standaard deviatie van triplo meting massa-accuraatheid per stof

Concentratie 0,025 µg/L

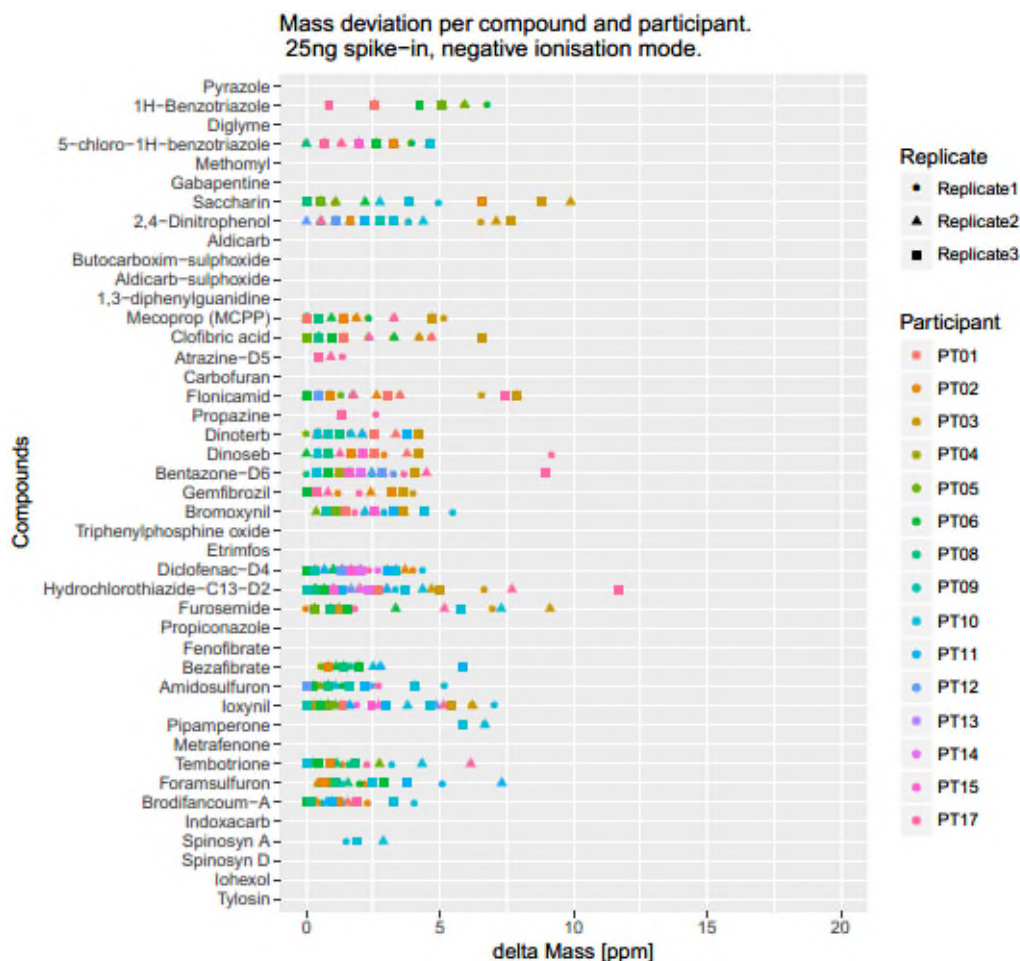


Concentratie 2,5 µg/L

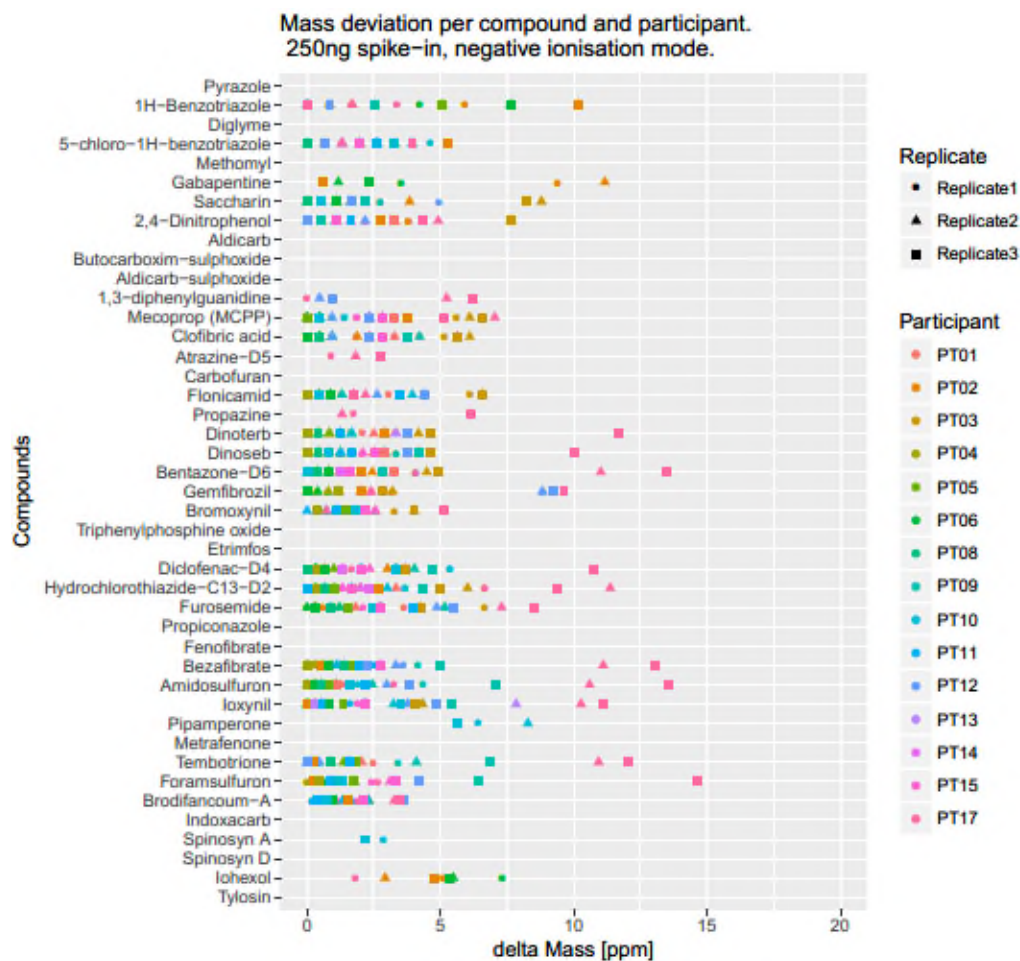


I.8 Negatieve ionisatie meting: standaard deviatie van de massa-accuraatheid per stof en per deelnemer

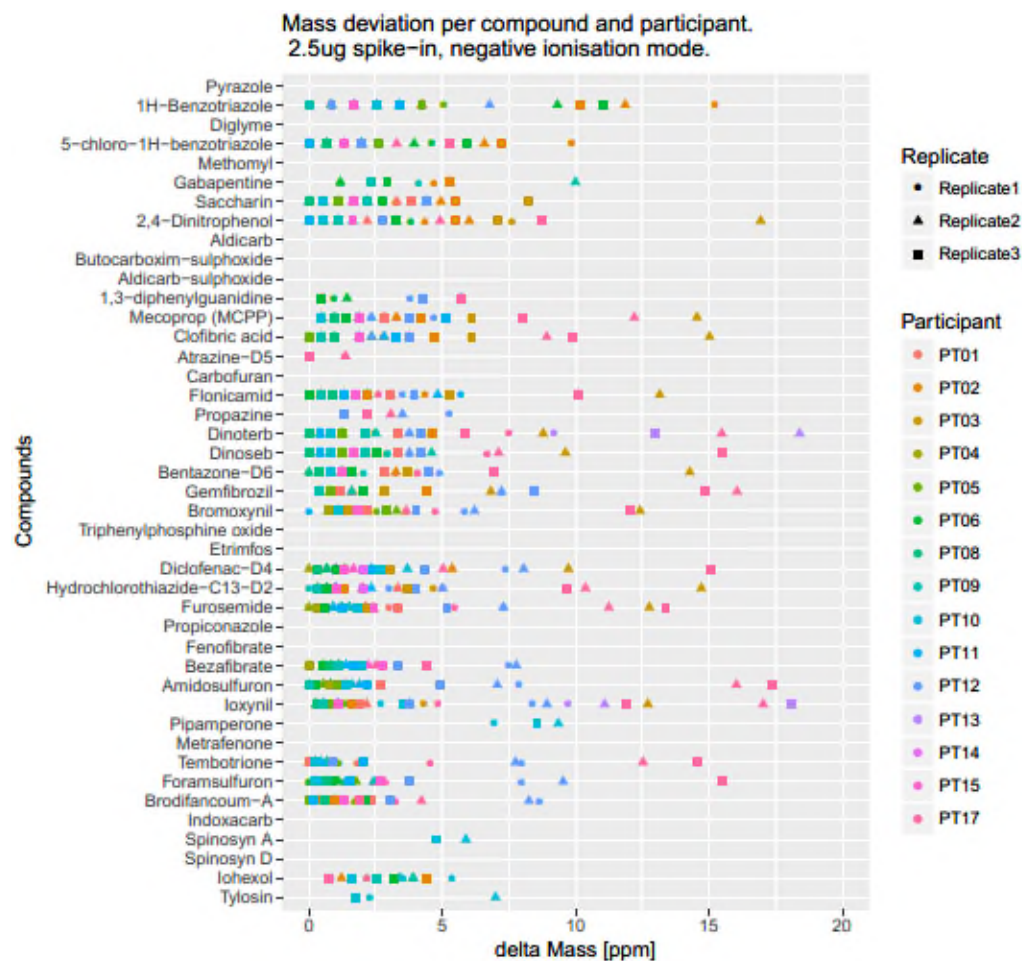
Concentratie 0,025 µg/L



Concentratie 0,25 µg/L



Concentratie 2,5 µg/L



Bijlage IX Non-target screening: overzicht top-5 aangetoonde stoffen

Monsters 6 en 8 positieve ionisatie

Top-5 compounds																	total green (first place)	total
Sample 6, positive ionisation (first analysis)																		
Participant (14 out of 17)																		
molecular formula (or accurate mass)	compound name (if identified).	CAS-no	PT01	PT02	PT03	PT04	PT05	PT06	PT07	PT08	PT09	PT10	PT12	PT13	PT15	PT17		
C18H15OP	Triphenylphosphinoxid	703-28-6						2	1	1	1	1	1		5	1		
C13H11N13	Biphenylguanidine	102-06-7	1	2	5	1	5			3	3			3	4			
C9H16ON3S	Propazine	139-40-2	3	1			2	1	2	5	2	4			2	2		
C14H18N4O3	Trimethoprim	738-70-5	2	5			4		5	2	4	2	4					
C17H14N2O3S	Adicarbonyl oxide/autocarbonyl oxide	?				1												
C18H24O4	?	?																
C16H21NO2	Propranolol	525-66-6	4	3			3	3		4	5	5						
C10H17N2O4P5	Trifosfom	38260-54-7			4			4	3	3				4		4		
C12H15NO3	Carbolfuran	1563-66-2	5												5			
C9H19N4O4	?	?					5									5		
C14H25N	?	?																
525.2884	?	?										5						
157.02718	?	?																
C6H5N3	1-H-benzotriazole	?			4													
234.93722	?	?						4										
C15H21F3O4	?	?																
C9H17NO2	gabapentine	60142-96-3			3									4				
443.3341	?	?																
C2H3FO2	Fluoroacetic acid	?										3						
218.594	?	?											3					
C9H14O3	diglyme	111-96-6			2									2				
229.1413	?	?										2						
97.99142	?	?											2					
253.2643	?	?													1			
no colour: compound not spiked																	14	210
light blue: compound spiked at 1 µg/L																		
blue: compound at 3 µg/L																		

[illegible]

Top-5 compounds
Sample 6, negative (first analysis)

[illegible][illegible]

Bijlage X richtlijn screening met massaspectrometrie

Richtlijn voor chemische screening van watermonsters met massaspectrometrie.

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Wereldwijd worden steeds meer stoffen geproduceerd. Een deel van die stoffen komt uiteindelijk in het milieu terecht (Schwarzenbach et al. 2006). Een groot aantal van deze antropogene stoffen valt onder de reguliere monitoring en is onderdeel van de wettelijke parameters genoemd in het Drinkwaterbesluit.

Naast onderzoek van deze doelstoffen ('target compounds') is het belangrijk om ook inzicht te hebben in overige antropogene stoffen die in de bronnen voor de drinkwaterbereiding aanwezig kunnen zijn. Onderzoek naar overige antropogene stoffen (zoals bestrijdingsmiddelen, geneesmiddelen, oplosmiddelen en zoetstoffen) wordt uitgevoerd voor het tijdig signaleren van verontreinigingen van drinkwaterbronnen. In het Drinkwaterbesluit wordt in de tabel met signaleringsparameters voor overige antropogene stoffen een maximum waarde van 1 µg/L per individuele stof vermeld. Bij overschrijding van deze waarde is er niet direct een risico voor de volksgezondheid, maar er dient dan verder onderzoek uitgevoerd te worden naar herkomst en betekenis van de aanwezigheid van de betreffende stof.

Een zo compleet mogelijke chemische screening is daarom noodzakelijk om de verspreiding van de stoffen met de bijbehorende mogelijke risico's goed in te kunnen schatten

2. Doelstelling

Met non-target screening worden chemische stoffen in water boven een drempelwaarde zo compleet mogelijk in beeld gebracht. Voor deze screening kunnen diverse (complementaire) analytische methoden worden gebruikt zoals GC-MS en LC-HRMS.

De doelstelling is om in een richtlijn de eisen aan de kwaliteit van resultaten van een non-target screening met massaspectrometrie te beschrijven. In het kader van het drinkwaterbesluit kan met een non-target screening de veelheid aan antropogene stoffen (naast de natuurlijke stoffen) kwalitatief in beeld worden gebracht. Daarnaast kan de methode ook worden toegepast ter vervanging van of als aanvulling op doelstofanalyses, daarvoor gelden diverse normen of streefwaarden.

Dit moet ertoe leiden dat resultaten van een non-target screening zo goed mogelijk vergelijkbaar zijn tussen laboratoria.

Het uiteindelijke doel is te komen tot een blauwdruk voor het opstellen van een Guideline, bijvoorbeeld een Nederlands Technische Afspraak (NTA).

3. Uitgangspunten

De kwaliteitseisen in deze richtlijn zijn generiek geformuleerd zodat deze toepasbaar zijn met non-target screening met o.a. GC-MS en LC-HRMS. In een apart document is de specifieke screeningsmethode met LC-HRMS beschreven.

4. Kwaliteitseisen

a. Reagentia en hulpstoffen

Gebruik alleen reagentia van analytisch zuivere kwaliteit (zuiverheid >99.9%) en ultra-zuiver water uit bijvoorbeeld een Milli-Q systeem. Laboratoriumglaswerk dient vrij te zijn van contaminanten, de geschiktheid moet door een ingangscontrole worden vastgesteld.

b. Bemonstering

De bemonstering wordt uitgevoerd door een opgeleide monsternemer die op de hoogte is van de eisen met betrekking tot de bemonstering, conservering en vervoer van de monsters volgens NEN-EN-ISO 5667 (2012).

Voor de bemonstering kunnen zowel nieuwe schone flessen van glas (waarvan met een ingangscontrole de geschiktheid is vastgesteld) of speciaal gereinigde monsterflessen worden gebruikt. Gekleurde flessen worden gebruikt zodat afbraak van stoffen door de inwerking van UV-licht wordt voorkomen. De monsterslangen en eventuele leidingen bij putten moeten minimaal 5 minuten worden doorgespoeld zodat een betrouwbaar en consistent monster wordt verkregen.

Het monster wordt na de bemonstering koel vervoerd ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) en zo snel mogelijk koel opgeslagen in een koelkast ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) en dient binnen 7 dagen geanalyseerd te worden. Andere conserveringswijzen en termijnen zijn mogelijk mits deze beschreven en getoetst worden vanaf moment monsternamen tot aan de uitvoering van de daadwerkelijke analyse.

c. Monstervoorbewerking

Het watermonster kan rechtstreeks of na een voorbehandelstap (bijv. aanzuren, filtratie, concentrering) in behandeling worden genomen. De reikwijdte (niveau/polariteit) van de chemische screening is echter mede afhankelijk van een eventuele voorbewerking. In de rapportage is het daarom noodzakelijk te vermelden welke voorbewerking is gehanteerd.

Aan het monster of het monsterextract worden interne standaard stoffen toegevoegd. De interne standaardstoffen worden gebruikt voor de volgende doelen:

- Het aantonen dat de voorbewerking goed is uitgevoerd.
- Het berekenen van een relatieve concentratie op basis van respons ten opzichte van een interne standaardstof
- Het berekenen van een retentie tijd index (RTI)?: Deze RTI geeft extra kracht bij het identificeren van de aangetroffen stoffen en is een hulpmiddel bij het zoeken in databases. Deze RTI is ook een hulpmiddel om stoffen te karakteriseren en gegevens uit te wisselen met andere laboratoria.

Opmerking:

Voor het vaststellen van een RTI zijn verschillende methoden beschikbaar. Voor GC-MS wordt vaak de Kovats-index gebruikt, gebaseerd op een homologe reeks van n-alkanen. Voor LC-MS kan de Kreti (gebaseerd op de interne standaardstoffen fenuron en neburon) of een andere internationaal toegepaste RTI worden gebruikt zoals de methode van de Universiteit van München (Thomas Letzel) of de Universiteit van Athene (Nikolaos S. Thomaidis).

d. Chromatografie

Met behulp van chromatografie worden de stoffen gescheiden op basis van chemische eigenschappen. Bij GC-MS worden de stoffen gescheiden op basis van o.a. het kookpunt en vluchtigheid van de stof. Bij LC-MS worden stoffen gescheiden op o.a. de polariteit en kan onderscheid gemaakt worden tussen bijvoorbeeld Reversed Phase (RP), Normal Phase (NP) en HILIC chromatografie. Om te borgen dat de chromatografische scheiding optimaal werkt dient het gehele chromatografische gebied zo goed mogelijk afgedekt te worden met teststoffen. Hiervoor kan ook de set stoffen worden gebruikt die toegepast worden voor het berekenen van de RTI.

e. Massaspectrometrische analyse

Met behulp van massaspectrometrie worden de stoffen geanalyseerd en wordt een massaspectrum verkregen. Bij GC-MS is elk massaspectrum in principe karakteristiek voor één chemische stof. Bij LC-HRMS is voor identificatie ook informatie nodig over het fragmentatiepatroon. De analyse met GC-MS levert een lijst op met Electron Impact (EI) massaspectra en GC-retentietijden op. Bij LC-MS worden accurate massa's verkregen samen met de LC-retentietijd.

Voorafgaande aan de analyse wordt de massaspectrometer optimaal ingesteld volgens de aanwijzingen van de leverancier.

Om aan te kunnen tonen dat een minimale gevoeligheid is verkregen kan een set aan doelstoffen worden gebruikt. Deze lijst van stoffen is niet strikt voorgeschreven, wel moet het een representatieve lijst zijn met een verdeling over zowel het gehele LC-retentiegebied als het gehele gevoeligheidsgebied (stoffen met een lage, middelmatig en hoge gevoeligheid).

f. Data-analyse

Bij de data-analyse worden de gemeten stoffen in kaart gebracht boven een vaste drempelwaarde voor de intensiteit van het meetsignaal (piekintensiteit). Voor een goede data-analyse zijn ook de juiste software-instellingen van belang (bijvoorbeeld piekherkenning, piekintegratie, blanco-correctie, herkennen van adducten etc.). Het aantal vals positieve en vals negatieve stoffen is daarbij zo laag mogelijk.

Hoe lager de drempelwaarde voor de piekintensiteit van een stof, hoe groter de kans op vals positieve stoffen (onterecht aangetoonde stoffen). Het rapporteren van vals positieve stoffen wordt beperkt door middel van een juiste blanco correctie. Sommige stoffen zijn karakteristiek voor de blanco, andere blanco stoffen komen echter incidenteel voor. Als richtlijn kan worden aangehouden dat een stof in het monster aanwezig is als het meetsignaal in het monster binnen één meetserie >10 hoger is dan het signaal in de blanco.

Als een stof wordt gerapporteerd die ook in de blanco aanwezig is kan dat met een voetnoot in het analyserapport worden aangegeven. Onderscheid kan hierbij gemaakt worden tussen een stof die in de blanco van dezelfde meetserie aanwezig is of een stof die in andere blanco analyses (binnen of buiten het eigen laboratorium) wordt aangetoond.

Bij een hoge drempelwaarde van de piekintensiteit is de kans op vals negatieve stoffen (stof is wel aanwezig in het monster maar wordt niet gerapporteerd) groter en kunnen stoffen buiten beeld blijven. Een juiste instelling van deze drempelwaarde en software instellingen is daarom essentieel en ook afhankelijk van de vraagstelling.

Opmerking:

Vals positieve en vals negatieve stoffen kunnen óók worden veroorzaakt door een niet optimale instelling van het integratiealgoritme in de software. Dit type valse stoffen kan worden opgespoord door een duplo of triplo meting. Een stof is in het monster aanwezig als deze ook in de duplo meting wordt aangetoond. Als de stof slechts in 1 van de 2 metingen wordt aangetoond betreft het waarschijnlijk een vals positieve stof en kan hierover een opmerking worden geplaatst in het analyserapport.

g. Identificatie

Identificatie van stoffen wordt uitgevoerd op basis van de informatie uit het massaspectrum waarbij gebruik gemaakt kan worden van databases. Voor GC-MS kan bijvoorbeeld de Wiley bibliotheek worden gebruikt waarin meer dan 100.000 referentiestoffen zijn opgenomen. Daarnaast kunnen ook andere gegevens voor de identificatie worden gebruikt zoals de relatieve retentietijd. Bij elke aangetoonde stof wordt de betrouwbaarheid van de identificatie aangegeven volgens een vaste systematiek. Voor GC-MS zie NTA 8379 (2014). Bij LC-HRMS worden meestal de 5 betrouwbaarheidsniveaus van Schymanski gebruikt (Schymanski et al. 2014).

h. Kwantificering

Bij massaspectrometrie heeft elke stof een andere meetgevoeligheid (Van Leerdam et al. 2017). Bij onbekende stoffen kan geen concentratie berekening ten opzichte van de zuivere stof worden uitgevoerd, daarom wordt de concentratie uitgedrukt in equivalenten van een referentiestof. Omdat de keuze van de referentiestof veel invloed kan hebben op de berekende concentratie is het van belang dat bij de rapportage altijd wordt vermeld ten opzichte van welke referentiestof(fen) is gekwantificeerd. Bij vergelijking van resultaten kan daar dan rekening mee worden gehouden. Bij geïdentificeerde stoffen kan de concentratie kwantitatief worden berekend ten opzichte van de zuivere stof, mits de zuivere stof in dezelfde meetserie wordt geanalyseerd.

Referenties

Schwarzenbach, R.P.; Escher, B.I.; Fenner, K.; Hofstetter, T.B. Johnson, C.A.; von Gunten, U.; Wehrli, B. (2006). The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313, (5790), 1072-1077.

Drinkwaterbesluit: besluit van 23 mei 2011, houdende bepalingen inzake de productie en distributie van drinkwater en de organisatie van de openbare drinkwatervoorziening, zie <http://wetten.overheid.nl/BWBR0030111/2015-11-28>

NEN-EN-ISO 5667 (2012): Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples.

NTA 8379 (2014): Water quality - Guidelines for the identification of target compounds by gas and liquid chromatography and mass spectrometry.

Schymanski et al. 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. & Technol.* 48 (4), pp. 2097-2098.

Van Leerdam, J.A.; Bajema, B.L. (Vitens); Sjerps, R.M.A.; Wols, B.A.; Bäuerlein, P.S.; Ter Laak, T.L.; Van der Kooi, M.M.E. en Emke, E.; Exploring the boundaries of non-target screening with Liquid Chromatography coupled to ESI-MS. BTO 2017.011

Bijlage XI Methode en kwaliteitseisen screenen met LC-HRMS

Methodebeschrijving en kwaliteitseisen voor non-target screening met LC-HRMS

1. Onderwerp en toepassingsgebied

In een aparte richtlijn wordt de non-target screening van watermonsters met massaspectrometrie beschreven. Hiervoor kunnen verschillende analytische methoden worden gebruikt.

In dit document wordt de methode met vloeistofchromatografie (LC) in combinatie met hoge resolutie massaspectrometrie (HRMS) beschreven. Bij deze manier van screenen wordt boven een vastgestelde piekintensiteit een lijst met accurate massa/retentietijd combinaties verkregen (zogenaamde 'features'). De verkregen features kunnen gebruikt worden voor het zoeken in databanken. De brutoformule die op basis van de accurate massa wordt vastgesteld kan helpen om de identiteit van een potentiële stof te bevestigen.

Met behulp van non-target screening met LC-HRMS worden in één analysegang zowel bekende als onbekende stoffen in beeld gebracht. Deze methode is inmiddels ruim 10 jaar beschikbaar en wordt wereldwijd steeds meer toegepast (Hogenboom et al. 2009, ter Laak et al. 2012, Schwarzbauer et al. 2013, Leendert et al. 2015, Sjerps et al. 2015). In 2013 is een begin gemaakt met het harmoniseren van deze methode voor de drinkwaterlaboratoria in Nederland. De resultaten zijn beschreven in een BTO-rapport en H2O publicatie (van Leerdam et al. 2015)

In het kader van het drinkwaterbesluit kan met een non-target screening de veelheid aan antropogene stoffen (naast de natuurlijke stoffen) kwalitatief in beeld worden gebracht. Daarnaast kan de methode ook worden toegepast ter vervanging of als aanvulling op doelstofanalyses, daarvoor gelden diverse normen of streefwaarden zoals beschreven in het drinkwaterbesluit (<http://wetten.overheid.nl/BWBR0030111/2015-11-28>).

De beschreven kwaliteitseisen zijn getoetst door middel van een uitgebreid ringonderzoek van watermonsters met bekende doelstoffen en watermonsters met de (voor de uitvoerder) onbekende stoffen. De in totaal 17 deelnemers aan dit ringonderzoek zijn Aqualab Zuid, Vitens, WLN, Rijkswaterstaat, KWR en diverse buitenlandse onderzoeksinstituten en Norman deelnemers. Het Waterlaboratorium gaat de ringstudiemonsters in 2018 analyseren.

De methode is toepasbaar voor drinkwater, grondwater en oppervlaktewater. De aantoonbaarheids-grens is 0,025 µg/L, de rapportagegrens is gelijk of hoger aan de aantoonbaarheidsgrens en is afhankelijk van de vraagstelling.

De signaleringswaarde volgens het Drinkwaterbesluit voor individuele antropogene stoffen is 1,0 µg/L. Bij het in 2017 uitgevoerde ringonderzoek (Van Leerdam et. al. 2017, in voorbereiding) is de aanwezigheid van 39 doelstoffen en 4 gelabelde interne standaardstoffen in drinkwater met een breed oplosbaarheidsgebied (logKow -1,29 – 8,51) onderzocht bij een additie van 0,025 µg/L. Door de 5 Nederlandse deelnemers werd 70 % van de toegevoegde stoffen teruggevonden.

2. Doelstelling

De doelstelling is om met de non-target screening onderling goed vergelijkbare resultaten te krijgen met zo min mogelijk vals positieve en vals negatieve stoffen. Hierbij wordt zoveel mogelijk gebruik gemaakt van de ervaringen die de afgelopen 10-15 jaar zijn opgedaan door vooral de Nederlandse drinkwaterlaboratoria, Rijkwaterstaat en KWR. Ook wordt onderzoek binnen het Norman netwerk op dit gebied gevolgd en worden bruikbare resultaten meegenomen. Uiteindelijk kan de beschrijving van de methode en de kwaliteitseisen worden vastgelegd in een openbaar normdocument waar naar verwezen kan worden, bijvoorbeeld een Nederlands Technische Afspraak (NTA).

3. Normatieve verwijzingen

Als leidraad bij de bemonstering, conservering en vervoer van de monsters wordt de norm NEN-EN-ISO 5667 gebruikt. Voor de uitvoering van de validatie van analysemethoden met doelstoffen is norm NEN 7777 beschikbaar, voor de identificatie van specifieke doelstoffen is norm NTA 8379 beschikbaar. Beide normen zijn echter voor deze LC-HRMS methode minder goed toepasbaar omdat de identiteit en eigenschappen van de aangetoonde stoffen veelal onbekend is.

4. Kwaliteitseisen

a. Reagentia en hulpstoffen

Gebruik alleen reagentia van analytisch zuivere kwaliteit (zuiverheid >99.9%) en ultra-zuiver water uit bijvoorbeeld een Milli-Q systeem. Laboratoriumglaswerk dient vrij te zijn van contaminanten, de geschiktheid moet door een ingangscontrole worden vastgesteld.

b. Bemonstering

Als aanvullingen op de leidraad zoals vermeld onder de Normatieve verwijzingen (punt 3) zijn onderstaande instructies belangrijk.

Voor de bemonstering kunnen zowel nieuwe schone glazen flessen (waarvan met een ingangscontrole de geschiktheid is vastgesteld) of speciaal gereinigde glazen monsterflessen worden gebruikt. Om afbraak van stoffen door de inwerking van UV-licht te voorkomen worden gekleurde glazen flessen gebruikt. Het monstertappunt moet zo dicht mogelijk bij de monsterstroom zijn. Bij voorkeur moet de monsterkraan direct op de leiding met het doorstromende monsterwater gemonteerd zijn. Als het echt niet anders is en de kraan zit via een stuk leiding verbonden met de monsterstroom dan moet de leiding eerst (afhankelijk van de lengte) geruime tijd doorstromen. Wanneer er sprake is van een kunststof leiding dan moet dit bij het monster vermeld worden.

Ook wanneer de kraan direct op de doorstromende leiding gemonteerd is moet er toch tenminste 20 tot 30 liter gespoeld worden om verontreinigingen uit de kraan te spoelen. De kraan mag tijdens of na het spoelen niet meer versteld worden.

De fles wordt niet met monster voorgespoeld. Laat de hals van de fles niet de monsterkraan raken. Zorg dat er geen materiaal in de monsterfles en dop kan terechtkomen en raak de flessenhals niet aan, zeker niet aan de binnenkant. Ook moet te allen tijde voorkomen worden dat de dop aan de binnenkant aangeraakt wordt.

Vermeld bij de monstername of er recent werkzaamheden aan de pomp of de leidingen zijn uitgevoerd.

- Het monster wordt na de bemonstering koel vervoerd ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) en zo snel mogelijk koel opgeslagen in een koelkast ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) zonder de pH aan te passen* en dient binnen 7 dagen geanalyseerd te worden. Voor de blanco wordt hetzelfde water gebruikt als het LC-eluens, bij voorkeur ultra-zuiver water.
- De blanco correctie moet aantoonbaar worden uitgevoerd, bijvoorbeeld door een monsterfles die geschikt is bevonden door middel van de ingangscntrole te vullen met ultra-zuiver water en de gehele procedure vanaf bemonstering en opslag te doorlopen.

* Eventueel kan het monster op een lagere pH worden gebracht zo kort mogelijk voorafgaand aan de werkelijke analyse.

c. Monstervoorbewerking

Het monster kan voorafgaande aan de analyse worden geconcentreerd door middel van bijvoorbeeld een Solid Phase Extraction (SPE). Ook is een directe injectie van het watermonster mogelijk (na een eventuele filtratiestap) zonder verdere voorbewerking. Extracten kunnen in de vriezer worden bewaard bij $-20^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$ voor maximaal 12 maanden.

Aan het monster of het monsterextract worden interne-standaardstoffen toegevoegd. De interne standaardstoffen worden gebruikt om aan te tonen dat de voorbewerking goed is uitgevoerd en om van een relatieve concentratie te berekenen op basis van de gemeten respons ten opzichte van een interne standaardstof. De interne standaardstoffen dienen een goed signaal te geven, voorbeelden zijn atrazin- d_5 bij positieve ionisatie, bentazon- d_6 bij negatieve ionisatie. Ook zijn er stoffen die bij zowel positieve als negatieve ionen een goed signaal geven, voorbeelden hiervan zijn diclofenac- d_4 en deuterium gelabeld neburon. De aanbevolen concentratie van de interne standaardstoffen ligt tussen de 0,1 en 1,0 $\mu\text{g/L}$. Aan het monster worden eveneens stoffen toegevoegd ter controle van het goede verloop van de chromatografische scheiding.

Voor het berekenen van de retentie tijd index (RTI) kunnen verschillende methoden worden gebruikt. Naast de methode van Kreti (gebaseerd op de interne standaardstoffen fenuron en neburon) die al meer dan 15 jaar binnen de drinkwatersector wordt gebruikt voor LC-UV screening (Bäuerlein et al. 2016), kan óók de methode van Letzel worden gebruikt, gebaseerd op een evenwichtige verdeling van C18-retentie en octanol-water partiticoëfficiënt van 10 stoffen (voor de lijst met stoffen, zie bijlage 1) of de index die binnen Norman verband wordt gebruikt (voor een overzicht van de stoffen, zie bijlage 2). Deze RTI is een hulpmiddel om (i) stoffen te karakteriseren, (ii) gegevens uit te wisselen met andere laboratoria en (iii) te zoeken in (inter)nationale databases. Aan het begin en/of het eind van de meetserie wordt een monster of blanco met additie van de RTI stoffen geanalyseerd. Voor het berekenen van de 'Letzel' index wordt een rekentool op Internet gebruikt (FOR-IDENT), de formule voor het berekenen van de 'Kreti' is opgenomen in bijlage III.

Interne standaarden binnen de internationale expertgroep "Analysemethoden" (EG SANA) van de commissie ter bescherming van de Rijn

Binnen IKSRL/ Sana wordt gestreefd naar een consensus t.a.v. gebruik interne standaarden bij LC-HRMS screening. De huidige conceptlijst van 14 stoffen is metformin- d_6 , atenolol- d_7 , carbendazim- d_4 , atrazin-desethyl- d_6 , carbamazepin- d_8 , clarithromycin- d_3 , valsartan- d_3 , pendimethalin- d_5 , hydrochloorthiazide- $c_{13}-d_2$, sucralose- d_6 , bentazon- d_6 , MCPA- d_6 , dichlorprop- d_6 en diclofenac- d_4 . Via Rijkswaterstaat wordt aangedrongen om binnen de expertgroep ook atrazine- d_5 op te nemen zodat atrazine- d_5 en bentazon- d_6 de twee stoffen

zijn die bij beide methoden wordt gebruikt. Hiermee worden analyseresultaten van deze twee methoden onderling beter vergelijkbaar.

d. Chromatografie

Met behulp van chromatografie worden stoffen gescheiden op basis van chemische eigenschappen. Bij LC-MS worden stoffen gescheiden op basis van o.a. de polariteit en kan onderscheid gemaakt worden tussen o.a. Reversed Phase (RP), Normal Phase (NP) en HILIC chromatografie. Het gehele chromatografisch gebied moet afgedekt zijn met meerdere teststoffen (bijvoorbeeld 5-10 stuks) zodat een juiste indruk van de chromatografische scheiding wordt verkregen. Door middel van prestatiekenmerken van teststoffen (bijvoorbeeld minimale piekrespons en maximaal verschil in RTI tussen duplo metingen) wordt bij elke analyseserie gecontroleerd dat de scheiding goed werkt.

Bij de LC-HRMS analyse kunnen verschillende eluentia worden gebruikt zoals methanol en acetonitril. Daarnaast kan een buffer of zuur worden toegevoegd om de chromatografie te optimaliseren. Bij voorkeur is de eluens samenstelling voor de meting van positieve en negatieve ionen identiek, relatieve retentietijden zijn dan bij beide metingen gelijk.

De LC-gradiënt kan lineair of niet-lineair zijn. Het voordeel van een lineaire gradiënt is mogelijk een kleinere variatie in de relatieve retentietijd door een betere reproduceerbaarheid van de gradiënt.

De LC-kolom wordt op een constante temperatuur gehouden (bijvoorbeeld 21 °C) om de variatie in retentietijd te minimaliseren en een stabiele retentietijd te garanderen.

e. Massaspectrometrische analyse

Met behulp van massaspectrometrie worden de stoffen geanalyseerd en worden na de LC-scheiding een chromatogram en accurate massa's verkregen. Om een stof betrouwbaar te identificeren is naast de accurate massa ook informatie over het fragmentatiepatroon. Om deze reden worden bij de analyse ook fragmentionen opgenomen (bijvoorbeeld ms²).

Om de meetgevoeligheid te kunnen borgen wordt voor enkele stoffen (bijv. de kwantificeringsstandaarden atrazin-d₅, bentazon-d₆ en neburon) de piekrespons bijgehouden. In de meetserie kan tegelijkertijd ook een set met voor het laboratorium belangrijke doelstoffen worden geanalyseerd. Als deze stoffen in de monsters aanwezig zijn kan de concentratie m.b.v. een éénpuntskalibratie wordt vastgesteld.

Voorafgaande aan de meetserie wordt de massaspectrometer intern gekalibreerd (massakalibratie)

De belangrijkste instellingen:

Scanprofiel	full scan met accurate massa meting, eventueel opnemen van fragmentatieprofiel
Massa range	minimaal bereik 100-1000 amu, een groter bereik is toegestaan
Massa resolutie	minimaal 10.000 FWHM bij m/z 200 met minimaal 5 scans per piek over de chromatografische piek (> 5 scans per piek wordt

door alle deelnemers van het in 2017 uitgevoerde ringonderzoek aangehouden).

Massa nauwkeurigheid ('mass error') minimaal 5 ppm (dit controleren a.d.h.v. enkele stoffen bij begin en eind van de analyse serie). Bij voorkeur ook stoffen met zowel lage als hoge massa. (*< 5 ppm wordt door alle deelnemers van het in 2017 uitgevoerde ringonderzoek gehaald).*

Eventueel kan ná de analyse een hercalibratie worden uitgevoerd.

Meetgevoeligheid Iedere analyserun controleren op gevoeligheid (zie hiervoor ook ander par 12: aantoonbaarheidsgrens). Hiermee wordt ook een indruk verkregen van mogelijke signaalonderdrukking ('signal suppression') of signaalverhoging ('signal enhancement').

De overige instellingen zoals gas flows, cone voltage en temperatuur zijn sterk instrumentafhankelijk en worden ingesteld volgens voorschrift van de fabrikant.

Signaalonderdrukking/verhoging

Dit effect is o.a. afhankelijk van de matrix in het monster. Voor het vaststellen van dit effect kan bij de methodeontwikkeling een set van stoffen worden toegevoegd aan zowel ultra-zuiver water als aan het monster. Uit het verschil in respons van de set van stoffen is het effect te bepalen.

f. Data-analyse

Bij de data-analyse worden de gemeten stoffen in kaart gebracht die boven een vaste drempelwaarde voor de intensiteit van het meetsignaal (piekintensiteit) aanwezig zijn in het monster maar niet in de blanco. Bij LC-MS worden accurate massa's (veelal $[M+H]^+$ en $[M-H]^-$) verkregen samen met de retentietijd (zogenaamde features).

Belangrijk voor een goede automatische dataverwerking is het goed herkennen van de verschillende stoffen (accurate massa/retentietijd combinaties) in het chromatogram met de bijbehorende piekintegratie. Dit wordt vaak 'Peak Picking' genoemd en de accuratesse hiervan is afhankelijk van de ingestelde drempelwaarde signaal/ruis, piekbreedte en pieksymmetrie.

Daarnaast is het belangrijk dat adducten en isotoopclusters van één stof als zodanig worden herkend en er (automatisch) wordt gecorrigeerd voor spreiding in de retentietijd binnen één analyse.

De kwaliteit van de software zal indirect getoetst worden door complete kwaliteitsborging en de criteria die worden gesteld voor o.a. het percentage vals negatieve en vals positieve stoffen.

Hoe lager de drempelwaarde voor de piekintensiteit hoe groter de kans op vals positieve stoffen, bij een hoge drempelwaarde is kans op vals negatieve stoffen groter en kunnen

stoffen buiten beeld blijven. Een juiste instelling van deze drempelwaarde en software instellingen is daarom essentieel en ook afhankelijk van de vraagstelling. De kwaliteitsborging op dit aspect is essentieel voor een non target screening. Dit moet iedere meetserie worden gecontroleerd.

Vals positieve stoffen

Het probleem van vals positieve stoffen kan voor een groot deel worden ondervangen door het corrigeren voor de blanco. Stoffen worden aangemerkt als aanwezig in het monster als de stof wordt aangetoond in het monster maar niet in de blanco. Hierbij moet de respons (piekoppervlak) boven een door het laboratorium specifieke minimale grenswaarde uitkomen. Als richtlijn kan worden aangehouden dat het meetsignaal (piekoppervlak) van de stof in het monster binnen één meetserie minimaal 5 maal hoger moet zijn dan het signaal (piekoppervlak) van de stof in de bijbehorende blanco. *Deze waarde worden door meer dan 75% van de deelnemers van het in 2017 uitgevoerde ringonderzoek aangehouden.*

Daarnaast zijn sommige stoffen karakteristiek voor een blanco, andere stoffen komen echter slechts incidenteel voor in een blanco. Het is een optie om een lijst met specifieke blanco stoffen te registreren en hiervoor bij elke analyse te corrigeren. Met een voetnoot in het analyserapport kan worden aangegeven als (i) een stof wordt gerapporteerd in het monster die ook in de blanco van dezelfde meetserie aanwezig is of (ii) een stof die in andere blanco analyses (binnen of buiten het eigen laboratorium) wordt aangetoond.

N.B. Vals positieve stoffen kunnen óók worden veroorzaakt door het integratiealgoritme (software). Dit type valse stoffen worden niet ondervangen door een blanco correctie maar door bijvoorbeeld een meervoudige meting. Stoffen moeten in alle metingen reproduceerbaar aangetoond zijn.

Mogelijkheden:

1. analyse in duplo: stof in beide analyses aanwezig. Als de stof slechts in 1 van de 2 metingen wordt aangetoond is dit een aanwijzing dat het een vals positieve stof is. Dit vraagt om een nadere analyse van de ruwe data. Het direct weggooien van het feature kan leiden tot een vals negatief resultaat.
2. analyse in triplo. Stof minimaal in 2 van de 3 analyses aanwezig.

Vals negatieve stoffen

De kans op het ‘missen’ van stoffen neemt toe naarmate (i) de meetdrempel in de software hoger wordt ingesteld en (ii) sterker wordt gecorrigeerd voor de blanco.

Evenals bij vals positieve stoffen kunnen vals negatieve stoffen óók worden veroorzaakt door het integratie algoritme (software) waarbij de piek niet of onvoldoende wordt herkend. Een controle van de juiste instelling op basis van een test set aan stoffen zal de kans op vals negatieve stoffen verlagen. De mogelijkheden voor het opsporen van vals negatieve stoffen is gelijk aan de mogelijkheden bij het opsporen van vals positieve stoffen.

g. Identificatie

Identificatie van stoffen wordt uitgevoerd op basis van de informatie uit het massaspectrum zoals de gemeten accurate massa, het fragmentatiepatroon, specifieke informatie van karakteristieke isotoppatronen (o.a. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) en adducten, databases en de RTI. Hierbij wordt in eerste instantie de gemeten accurate massa en RTI vergeleken met bestaande databanken. De brutoformule, het fragmentatiepatroon en specifieke informatie zoals het isotoppatroon kan dienen als een extra hulpmiddel bij de interpretatie. Bij elke aangetoonde stof wordt de betrouwbaarheid van de identificatie aangegeven met identificatie niveau 1 t/m 5, volgens de systematiek van Schymanski et al. (zie bijlage 3 voor een beschrijving van de 5 niveaus).

De Retentietijd Index (RTI) wordt gebruikt voor het onderling vergelijken van de RRT van zowel bekende als onbekende stoffen tussen verschillende analyses en tussen laboratoria. Daarnaast kan de RTI worden gebruikt om de gemeten waarde te vergelijken met internationale databases zoals Massbank (www.massbank.jp).

Nb. Onbekende stoffen kunnen onderverdeeld worden in 2 categorieën: bekende-onbekende stoffen en onbekende-onbekende stoffen. Bekende-onbekende stoffen zijn stoffen die niet zijn geïdentificeerd maar wél eerder zijn aangetoond en als zodanig worden herkend. Onbekende-onbekende stoffen zijn stoffen die niet eerder zijn aangetoond.

Dit onderdeel kan wellicht nog verder worden uitgewerkt in een vervolgtraject. Mogelijk geeft NTA8379 hiervoor eerste voorbeelden. Bijv. Identificatiepunten toekennen bij RT match, een accurate massa match binnen 5 ppm, overeenkomst isotopclusters, aanwezigheid fragmenten enz.

h. kwantificering

Bij massaspectrometrie heeft elke stof een andere meetgevoeligheid (Van Leerdam et al. 2017). Bij onbekende stoffen kan geen concentratie berekening ten opzichte van de zuivere stof worden uitgevoerd, daarom wordt de concentratie uitgedrukt in equivalenten van een referentiestof. Bijvoorbeeld atrazin-d5 bij positieve ionisatie, bentazon-d6 bij negatieve ionisatie of neburon bij zowel positieve als negatieve ionisatie. De op deze manier berekende relatieve concentratie van één bepaalde stof in verschillende monsters met dezelfde matrix zijn onderling goed vergelijkbaar.

Bij geïdentificeerde stoffen kan de concentratie kwantitatief worden berekend ten opzichte van een éénpuntskalibratie van de zuivere stof, mits de zuivere stof in dezelfde meetserie wordt geanalyseerd.

Samenvatting 1^e-lijnscontrole

Aantoonbaarheidsgrens: voor 38 doelstoffen is nagegaan of een concentratie van 0,025 µg/L haalbaar is. Dit blijkt voor het overgrote deel van de stoffen mogelijk. Een selectie van deze stoffen kan periodiek worden gemeten om te toetsen of de grens van 0,025 µg/L wordt gehaald.

Massa-accuraatheid: voor een selectie van stoffen toetsen of de vastgestelde maximale massa-afwijking (bijvoorbeeld 5 ppm) niet wordt overschreden.

Reproduceerbaarheid: onder kopje 'Aantoonbaarheidsgrens' vermelde experimenten herhalen onder reproduceerbaarheidsomstandigheden, aangevuld met regelmatig deelnemen aan ringonderzoeken.

Referenties

Drinkwaterbesluit: besluit van 23 mei 2011, houdende bepalingen inzake de productie en distributie van drinkwater en de organisatie van de openbare drinkwatervoorziening, zie <http://wetten.overheid.nl/BWBR0030111/2015-11-28>

Patrick Bäuerlein en Annemieke Kolkman, HPLC UV Screening 2016. KWR 2017.043

Hogenboom, A.C.; Van Leerdam, J.A.; De Voigt, P. (2009). Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-LTQ FT Orbitrap mass spectrometry. J. Chrom. A 2009, 1216, 510-519.

Van Leerdam, Ton (KWR); Bajema, Bernard (Vitens); Bosch, Ronnie (Vitens); Emke, Erik (KWR); Gerdes, Herman (WLN); De Graaf, Bendert (Vitens); Van der Kooi, Jan (WLN); Puijker, Leo (KWR); Vughs, Dennis (KWR). Implementatie van LC-MS-screenings-technieken voor monitoring waterkwaliteit. BTO rapport 2015.213(s).

Van Leerdam, Ton (KWR); Bajema, Bernard (Vitens); De Graaf, Bendert (Vitens); Van der Kooi, Jan (WLN) en Puijker, Leo (KWR). Brede chemische screening voor het monitoren van de waterkwaliteit. H2O online oktober 2015

Van Leerdam, J.A.; Bajema, B.L. (Vitens); Sjerps, R.M.A.; Wols, B.A.; Bäuerlein, P.S.; Ter Laak, T.L.; Van der Kooi, M.M.E. en Emke, E.; Exploring the boundaries of non-target screening with Liquid Chromatography coupled to ESI-MS. BTO 2017.011

Van Leerdam, J.A., Brunner, A. M. en anderen. Resultaten ringonderzoek screening met LC-HRMS. In voorbereiding.

Ter Laak, T.L.; Puijker, L.M.; Van Leerdam, J. A.; Raat, K. J.; Kolkman, A.; De Voigt, P.; Van Wezel, A. P. (2012). Broad target chemical screening approach used as tool for rapid assessment of groundwater quality. Sci. Tot. Environ. 2012, 427-428, 308-313.

Leendert, V.; Van Langenhove, H., & Demeestere, K. (2015). Trends in liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry for multi-residue analysis of organic micropollutants in aquatic environments. Trends in Analytical Chemistry, 67, 192-208.

NEN 7777 (2011): Milieu en voedingsmiddelen - Prestatiekenmerken van meetmethoden.

NEN-EN-ISO 5667 (2012): Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples.

NTA 8379 (2014): Water quality - Guidelines for the identification of target compounds by gas and liquid chromatography and mass spectrometry.

Schymanski et al. 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. Environ. Sci. & Techn. 48 (4), pp. 2097-2098.

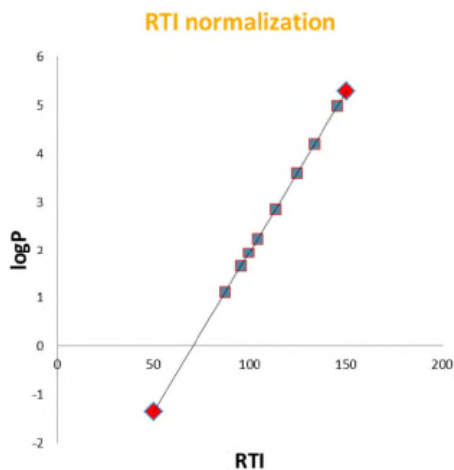
Schwarzbauer, J., & Ricking, M. (2010). Non-target screening analysis of river water as compound-related base for monitoring measures. Environmental Science and Pollution Research, 17(4), 934-947.

Sjerps, Rosa; Vughs, Dennis; Van Leerdam, Ton; Ter Laak, Thomas en Van Wezel, Annemarie; 'Suspect screening' voor datagestuurde prioritering van stoffen in (bronnen van) drinkwater. H2O, 2015

Bijlage 1: Interne standaardstoffen voor berekenen van 'Letzel index' (Universiteit München)

Normalization Retentionszeitindex – Known Standards

compound	logP	RTI
Metformin	-1.36	50.0
Chloridazon	1.11	87.2
Carbetamide	1.65	95.3
Monuron	1.93	99.5
Metobromuron	2.24	104.2
Chlorbromuron	2.85	113.4
Metconazole	3.59	124.5
Diazinon	4.19	133.6
Quinoxifen	4.98	145.5
Fenofibrate	5.28	150.0



Bijlage 2: Interne standaardstoffen die binnen Norman worden toegepast (Universiteit van Athene)

Norman compounds					
Calibrants LC-(+)ESI-HRMS	Mol. Formula	[M+H] ⁺	Calibrants LC-(-)ESI-HRMS	Mol. Formula	[M-H] ⁻
Guanylurea	C2H6N4O	103.0614	Amitrole	C2H4N4	83.0363
Amitrol	C2H4N4	85.05087	Benzoic acid	C7H6O2	121.0295
Histamine	C5H9N3	112.0869	Acephate	C4H10NO3PS	182.0046
Chlormequate	C5H13ClN	123.0809	Salicylic acid	C7H6O3	137.0244
Methamidophos	C2H8NO2PS	142.0086	Simazine 2-Hydroxy	C7H13N5O	182.1047
Vancomycin	C66H75Cl2N9O24	1448.437	Tepraloxym Peak1	C17H24ClNO4	340.1321
Cefoperazone	C25H27N9O8S2	646.1497	Bromoxynil	C7H3Br2NO	273.8509
Trichlorfon	C4H8Cl3O4P	256.9299	MCPA	C9H9ClO3	199.0167
Butocarboxim	C7H14N2O2S	191.0849	Valproic acid	C8H16O2	143.1078
Dichlorvos	C4H7Cl2O4P	220.9532	Phenytoin	C15H12N2O2	251.0826
Tylosin	C46H77NO17	916.5264	Flamprop	C16H13ClFNO3	320.0495
TCMTB	C9H6N2S3	238.9766	Benodanil	C13H10INO	321.9734
Rifaximin	C43H51N3O11	786.3596	Dinoterb	C10H12N2O5	239.0673
Spinosad A	C41H65NO10	732.4681	Inabنفide	C19H15ClN2O2	337.0749
Emamectin B1a	C49H75NO13	886.5311	Coumaphos	C14H16ClO5PS	361.0072
Abamectin	C48H72O14	873.4995	Triclosan	C12H7Cl3O2	286.9439
Nigericin	C40H68O11	725.4834	AvermectinB1a	C48H72O14	871.4849
Ivermectin B1a	C48H74O14	875.5151	Salinomycin	C42H70O11	749.4845

Bijlage 3: Formule voor het berekenen van de Kreti

$$Kretl = RtFn + \{(RtCx - RtFn) / (Rt'Cx - Rt'Fn)\} \times (Rt'Xa - Rt'Fn)$$

Waarin:

Kretl = De gecorrigeerde retentietijd van de onbekende component (in minuten);

RtNe = De vastgestelde retentietijd van neburon (in minuten), dit is 43,60 min

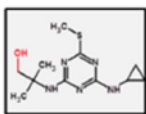
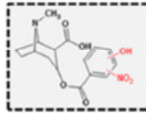
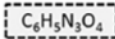
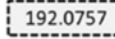
RtFn = De vastgestelde retentietijd van fenuron (in minuten), dit is 21,12 min

Rt'Ne = De gemeten retentietijd van neburon (in minuten)

Rt'Fn = De gemeten retentietijd van fenuron (in minuten)

Rt'Xa = De gemeten retentietijd van de onbekende component (in minuten).

Bijlage 4: Identificatie niveaus volgens Schymanski

Example	Identification confidence	Minimum data requirements
	Level 1: Confirmed structure by reference standard	MS, MS ² , RT, Reference Std.
	Level 2: Probable structure a) by library spectrum match b) by diagnostic evidence	MS, MS ² , Library MS ² MS, MS ² , Exp. data
	Level 3: Tentative candidate(s) structure, substituent, class	MS, MS ² , Exp. data
	Level 4: Unequivocal molecular formula	MS isotope/adduct
	Level 5: Exact mass of interest	MS

Bijlage XII Ingediend voorstel bij NORMAN voor een verdere verdieping van het ringonderzoek

Title	LC-HRMS inter-laboratory study – in-depth data interpretation of suspect and non-target screening results
Type of activity	Data interpretation
Leader	KWR Watercycle Research Institute (Andrea Mizzi Brunner, Annemieke Kolkman and Ton van Leerdam)
Topic / activities	Background / Justification for the proposed activity: In 2017, KWR organized an inter-laboratory study (ILS) funded by the Dutch drinking water companies to assess the status quo of LC-HRMS suspect and non-target screening methods for the analysis of different water types. Therefore drinking water, groundwater and surface water were spiked with organic contaminants relevant for the water sector and analysed with LC-HRMS. In addition to the 5 Dutch participants, 12 participants joined the ILS via NORMAN, which returned high density data which was to date analysed in regards to: • Set-up of LC-MS analysis: ◦ Overview of analysis conditions, instruments and software used by the different participants • MS results ◦ Mass error per participant and spiked compound, in the positive and negative ionisation mode ◦ Lowest spiked concentration detected in drinking water ◦ Detection of spiked-in compounds in ground- and surface water ◦ False negative hits in non-target screening, i.e. spiked-in compounds that were not detected • Retention time index – <i>Nikolaos S. Thomaidis (University of Athens)</i> Further data analysis of the results was beyond the scope of the initial project. Description of the proposed activity: To take advantage of the information inherent to this data set we propose to deepen the current data analysis and apply data science methods to reach a comprehensive interpretation of the ILS which in turn can form the basis for suspect and non-target screening guidelines and policy making. We plan to perform the following: • Connect the descriptive analysis of experimental setup and analysis conditions with the MS results • Statistical analysis of participant performance in regards to mass error, detected spike-in concentrations, etc. • Hierarchical clustering of compounds in regards to the above mentioned • Analysis of semi-quantitative results, i.e. internal standard equivalents versus concentration of spike-in – compared to estimated response. • Comprehensive comparison of non-target screening results – including but not limited to which accurate masses are reported by how many participants, which adducts are detected, etc. • Evaluation of identification performance – translation of accurate mass to elemental composition, compound name and CAS number. The proposed activities will be carried out in a research project (e.g. MSc student on chemical/bioinformatics/data science) and will be supervised by KWR and UoA. Expected outcomes for 2018

	• Determination of the status quo of suspect and non-target screening • Insight into what needs to be optimized • Proposal for optimized suspect and non-target ILS set-up addressing the issues faced • Publication of the results in a peer-reviewed journal Added value / Link with other NORMAN activities and / or other projects The added value will be an increased knowledge about the suitability of screening with LC-HRMS for a broad spectrum of organic contaminants in different types of water. There is a link to the activities in the NORMAN Cross-Working Group Activity Non-target Screening (NTS) and the JPA 2018 proposal of 'Workshop on NTS for regulators' by J. Hollender (Eawag) and J. Koschorreck (UBA). The proposed in-depth data interpretation will provide valuable information for the proposed workshop.
Participants	KWR, Nikolaos S. Thomaidis (University of Athens), any interested participants
Proposed in-kind contribution	Review of the manuscript by the 17 participants of the ILS including the NORMAN members
Contribution needed from NORMAN Association¹	Travel costs to support exchange for 2 month stay for researcher 3000€ (housing 1500€, flight 1500€) Publication efforts for dissemination to NORMAN network, incl. supervision work at KWR/UoA 5000€ Total 8000€

¹ Please, provide here a transparent justification of the requested resources and of the in-kind contribution, thereby distinguishing between the costs associated with "person-months" for the organisation, the "travelling costs" for invited speakers and the costs for the logistics (e.g. meals, room rental etc.)

Bijlage XIII Memo aan Adviesgroep Waterkwaliteit

Bestemd voor: adviesgroep Waterkwaliteit
Onderwerp: financiering normalisatietraject LC-HRMS-screening
Van: Ton van Leerdam
Datum: 25 september 2017

Beste leden van de adviesgroep Waterkwaliteit,

In 2005 vond een doorbraak plaats op het gebied van screeningsonderzoek met de introductie van hoge resolutie massaspectrometrie (HRMS) bij het onderzoek naar de aanwezigheid van organische microverontreinigingen in grondwater. Met de huidige non-target LC-HRMS screening die in gebruik is bij de drinkwaterlaboratoria en KWR wordt op laag niveau (ng/L range) naar een breed palet van stoffen gescreend. In 2016 is het BTO-project 'Brede screening – op weg naar wettelijke verankering' gestart, een samenwerking van de 4 drinkwaterlaboratoria, Rijkswaterstaat, RIVM en KWR. In dit onderzoek wordt het onderbouwend voorwerk uitgevoerd om te komen tot een wettelijk geaccepteerde methode. Eén van de geplande activiteiten daarbinnen is een uitgebreid ringonderzoek met 16 deelnemers, waaronder diverse buitenlandse instituten die zijn aangesloten bij het Europese Norman-netwerk.

Ruim 10 jaar na de introductie van non-target screening lijkt er voldoende ervaring en onderbouwing van deze methode beschikbaar om de werkwijze te normaliseren zodat uiteindelijk in wetgeving wordt verwezen naar de afgesproken methode. In lopend BTO-onderzoek worden minimale kwaliteitseisen vastgesteld die vervolgens in een normdocument of praktijkrichtlijn 'officieel' vastgelegd kunnen worden (bijvoorbeeld door middel van een Nederland Technische Afspraak (NTA), Voorlopige Praktijk Richtlijn (VPR) of Nederlandse Norm (NEN)). Het opzetten van een dergelijk document heeft te weinig onderzoeks karakter om onder te brengen in het BTO. Daarom wordt middels deze memo gevraagd om financiering vanuit het doorlopende project 'Water Quality Services bedrijven'. Via deze constructie kunnen naast de drinkwaterbedrijven, drinkwaterlaboratoria en NEN ook andere partijen zoals RWS, RIVM en Vitens betrokken worden bij dit traject. Daarnaast zullen Europese ontwikkelingen op dit gebied worden gevolgd en zo nodig worden verwerkt. De kosten voor dit project zullen in overleg met NEN worden vastgesteld en liggen naar verwachting tussen de 60 en 80 k€ (incl. faciliteren door NEN met een omvang van 30-35 k€), dit zal op verzoek nader worden uitgewerkt in een projectplan en begroting. De beoogde einddatum van het project is 31-12-2019.

Wij verzoeken u om middelen vrij te maken voor dit project.

Voor meer informatie kunt u contact opnemen met Ton van Leerdam, tel. 06 – 15 18 9535

Met vriendelijke groet.