

Project 512.0000

Gehaltebepaling van T2816 in waterige oplossingen met behulp van LC-MS

Projectleider: drs. J.A. van Rhijn

VERTROUWELIJK

Rapport 93.01

februari 1993

Gehaltebepaling van T2816 in waterige oplossingen met behulp van LC-MS

drs. J.A. van Rhijn

afdeling: Instrumentele Analyse

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1993, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Vertrouwelijk rapport

Uit deze uitgave mag niets worden gereproduceerd en/of openbaar gemaakt zonder schriftelijke toestemming van de directeur.

#### VERZENDLIJST

##### INTERN:

directeur

sectorhoofden

hoofd pr en secretariaat

##### EXTERN:

RCC-Notox :

drs. M. Bogers

dr. ir. M.M. Gladdines

<b>INHOUD</b>	<b><u>blz</u></b>
<b>SAMENVATTING</b>	<b>3</b>
<b>1 INLEIDING</b>	<b>5</b>
<b>2 HULPSTOFFEN</b>	<b>5</b>
<b>3 ONDERZOEK</b>	<b>7</b>
3.1 Gehaltebepaling van T2816 met behulp van LC-MS	7
3.1.1 Tuning van de MS	7
3.1.2 Lineariteit	7
3.1.3 Herhaalbaarheid	8
3.2 Methode voor monstervoorbewerking	8
3.2.1 Testen van de methode voor monstervoorbewerking	8
3.2.2 Herhaalbaarheid van de monstervoorbewerking	8
3.2.3 Analyse van de monsteroplossingen	9
<b>4 RESULTATEN</b>	<b>9</b>
<b>FIGUREN EN TABELLEN</b>	<b>11</b>

## **SAMENVATTING**

In opdracht van RCC-Notox is door RIKILT-DLO een analysemethode ontwikkeld en toegepast voor T2816 in waterige oplossingen afkomstig uit een daphnia reproductie studie. Het analyt werd met behulp van solid phase extractie op een C18 cartridge uit de monsteroplossing geïsoleerd en na spoelen van de C18 cartridge om opgeloste zouten te verwijderen, met methanol gedesorbeerd. In het aldus verkregen extract werd het gehalte T2816 bepaald met behulp van thermospray LC-MS in MID mode. Er werd geen HPLC scheiding toegepast; het analyt werd direct geïnjecteerd in de eluensstroom.

De ontwikkelde methode is toegepast voor de analyse van 26 monsters op diverse concentratieniveau's, alle afkomstig uit een daphnia reproductie studie.

## 1 INLEIDING

Ten behoeve van het verkrijgen van een toelating voor het gebruik van een nieuwe industriële hulpstof dient o.a. een daphniareproductie studie te worden uitgevoerd. Hierbij worden daphnia's blootgesteld aan verschillende concentraties van de betreffende stof. Het reproductievermogen van de daphnia's wordt daarbij bestudeerd in relatie tot de concentratie van de teststof waaraan zij worden blootgesteld. De concentratie van de teststof dient bepaald te worden in de oplossingen waarin de daphnia's verblijven. Uit eerder door de fabrikant beschikbaar gestelde gegevens was reeds duidelijk geworden dat thermospray LC-MS de aangewezen techniek is voor de uitvoering van de gehaltebepaling. Voor de uitvoering van de gehaltebepaling van T2816 met LC-MS heeft RCC-Notox een beroep gedaan op het RIKILT-DLO. Voor de toepassing van LC-MS op de te analyseren oplossingen was het noodzakelijk een monsterzuivering uit te voeren, waarmee de opgeloste zouten uit de monsteroplossing verwijderd konden worden.

Dit rapport beschrijft de experimenten, die uitgevoerd zijn om de noodzakelijk geachte monstervoorbewerking te testen. De monstervoorbewerking bestaat uit sorptie van het analyt op een C18 cartridge, spoelen van de C18 cartridge om opgeloste zouten te verwijderen gevolgd door desorptie van het analyt met methanol. Deze procedure is getest met betrekking tot eventuele doorslag van het analyt tijdens applicatie van het monster en tijdens spoelen van de C18 cartridge, volledigheid van de desorptie en herhaalbaarheid van de gehele procedure. Daarnaast is de herhaalbaarheid van de massaspectrometrische gehaltebepaling getest.

De ontwikkelde procedure is vervolgens toegepast op de analyse van 26 monsteroplossingen. De analyseprocedure is beoordeeld en goedgekeurd door de QA/QC afdeling van RCC-Notox met betrekking tot de administratieve aspecten en met betrekking tot de wijze waarop en de mate waarin controle bepalingen worden meegenomen in de analysegang.

## 2 HULPSTOFFEN

2.1 Teststof 12915, Lot no. 4 , verkregen via RCC-Notox

Brutoformule:  $C_{14}H_{17}N_2O_4SF_{13}$ , MW=556

*in (T)ureto 3 verbindingsnaden →  
oxidanties opaanrijke 100%*

2.2 Medium M4, verkregen via RCC-Notox

2.3 Methanol (Janssen 26.828.56)

2.4 Ammoniumacetaat (Merck 1116)

2.5 BondElut C18 cartridges, 100 mg, Sopachem, België

2.6 0,5 M ammoniumacetaat oplossing, weeg 38,5 gram ammoniumacetaat (2.4) af en los op in 1 liter MilliQ water.

2.7 0,1 M ammoniumacetaat oplossing, weeg 7,7 gram ammoniumacetaat (2.4) af en los op in 1 liter MilliQ water.

2.8 0,05 M ammoniumacetaat oplossing, weeg 3,85 gram ammoniumacetaat (2.4) af en los op in 1 liter MilliQ water.

2.9 Eluens, meng 500 ml methanol (2.3), 400 ml MilliQ water en 100 ml van een 0,5 M ammoniumacetaat oplossing (2.6). Filtreer het eluens voor gebruik over een 0,45 micron membraanfilter.

2.10 Recovery standaard, los op 10 mg van de teststof (2.1) in 100 ml methanol, pipetteer van deze oplossing 1,0 ml in een platbodempolpje en voeg 1 ml MilliQ water toe, Damp aan een rotavapor de methanol af, spoel de resterende waterige oplossing over in een maatkolf van 100 ml en vul aan met medium M4 (2.2). Deze oplossing bevat 1 mg/l van de teststof en wordt gebruikt voor de uitvoering van recoveryexperimenten.

2.11 Standaardreeks, los op 100 mg van de teststof (2.1) in een 10 ml maatkolf, in methanol en vul aan met methanol tot 10 ml pipetteer van deze oplossing 1,0 ml in een 100 ml maatkolf en vul met methanol aan tot 100 ml. Pipetteer van deze oplossing respectievelijk 10, 5, 2, 1, 0,5 en 0,1 ml in 100 ml maatkolven en vul aan tot 100 ml, zodanig dat de uiteindelijke oplossing 0,05 M ammoniumacetaat bevat en 50/50 v/v methanol/MilliQ water. Deze ijkreeks bevat respectievelijk 10, 5, 2, 1, 0,5 en 0,1 mg T2816 per liter.

2.12 Finnigan MAT TSQ70 triple stage quadrupool massaspectrometer uitgerust met een thermospray interface (Finnigan MAT, San Jose, CA)

2.13 Gilson 305 HPLC pomp (Gilson, Villiers le Bel, Frankrijk)

2.14 Gilson 231-401 HPLC autosampler.

2.15 Baker 10-SPE system, vacuum manifold (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)

### 3 ONDERZOEK

#### 3.1 Gehaltebepaling van T2816 met behulp van LC-MS.

Bij het testen van de gehaltebepaling is aandacht besteed aan de tuning van de MS, aan de optimalisatie van de vaporizertemperatuur en het repellervoltage en aan de lineariteit en de herhaalbaarheid van de meting.

##### 3.1.1 Tuning van de MS

Tuning van de MS wordt uitgevoerd door een oplossing van 1 mg/l van het analyt in eluens continu in de MS te brengen met een flow van 1,2 ml/min. Het analyt geeft een massafragment te zien bij m/z 557, overeenkomend met het  $[M+H]^+$  ion. Dit ion wordt gebruikt voor de gehaltebepaling en op dit ion wordt dan ook de optimalisatie gericht. Met behulp van de automatische tuningsprocedures wordt het signaal van m/z 557 geoptimaliseerd. Vervolgens wordt de temperatuur van de thermospray vaporizer geoptimaliseerd teneinde een zo hoog mogelijk en tegelijkertijd zo stabiel mogelijk signaal te verkrijgen. Aansluitend wordt door variatie van het repeller voltage ook voor deze parameter het optimum bepaald waarbij een zo hoog mogelijk signaal wordt verkregen.

Vervolgens worden de automatische tuningsprocedures nogmaals toegepast terwijl de inmiddels gevonden optimale waarden voor vaporizer temperatuur en repellervoltage worden gehandhaafd. Na deze optimalisatie procedure wordt de massaspectrometer beschouwd als optimaal afgeregeld voor de analyse van T2816 aan de hand van m/z 557. De oplossing van T2816 wordt daarna vervangen door blanco eluens.

##### 3.1.2 Lineariteit

Wanneer het signaal tengevolge van T2816 (m/z 557) geheel verdwenen is wordt de lineariteit van het systeem getest door met behulp van de Gilson autosampler (2.14) drie aliquots van elk 100  $\mu$ l van elk van de oplossingen van de standaardreeks te injecteren. Er wordt direct in de eluensstroom geïnjecteerd zonder toepassing van een chromatografische scheiding. De intensiteit van het signaal van m/z 557 wordt geregistreerd en de oppervlakte van de pieken die corresponderen met de injectie van de aliquots wordt bepaald. Vervolgens wordt de gemiddelde piekoppervlakte van de triplo analyses uitgezet als functie van de concentratie. De resultaten zijn weergegeven in paragraaf 4, figuur 1.

### 3.1.3 Herhaalbaarheid

Teneinde de herhaalbaarheid van de gehaltebepaling te testen wordt een oplossing van 1,0 mg/l van het analyt in eluens 12 keer achtereenvolgend geïnjecteerd. De piekoppervlakte van de 12 pieken wordt bepaald en het gemiddelde, de standaardafwijking en de variatiecoëfficiënt wordt berekend. De resultaten zijn weergegeven in tabel 1.

## 3.2 Methode voor monstervoorbewerking

### 3.2.1 Testen van de methode voor monstervoorbewerking

De methode voor monstervoorbewerking bestaat uit sorptie van het analyt op een C18 cartridge, spoelen van de cartridge om opgeloste zouten te verwijderen, gevolgd door desorptie van het analyt met methanol.

Bij het testen van de methode voor monstervoorbewerking is aandacht besteed aan de doorslag van het analyt tijdens applicatie van de monsteroplossing, aan de doorslag tijdens spoelen van de C18 cartridge, aan volledigheid van de desorptie van het analyt en aan de herhaalbaarheid van de totale procedure. De C18 cartridge wordt op een Baker 10-SPE vacuum manifold geplaatst en voor gebruik geconditioneerd met behulp van 2 ml methanol gevolgd door 2 ml 0,1 M ammoniumacetaat (2.7). Vervolgens wordt een aliquot van 9 ml van een oplossing van T2816 (1 mg/l) in water over de C18 cartridge geleid met een snelheid van ca 2 ml/min. De doorgelopen vloeistof wordt opgevangen en gecontroleerd op aanwezigheid van het analyt. Daarna wordt de C18 cartridge gespoeld met 2 ml 0,1 M ammoniumacetaat, ook hierbij wordt de doorgelopen vloeistof opgevangen en gecontroleerd op de aanwezigheid van T2816. Vervolgens wordt het analyt gedesorbeerd door de C18 cartridge te elueren met 3 ml methanol. Het monsterflesje waarin zich de oorspronkelijke hoeveelheid van 9 ml monsteroplossing bevond, wordt gespoeld met 0,5 ml methanol, deze methanolfractie wordt bij het eluaat gevoegd. Het resulterende methanol extract dient het analyt kwantitatief te bevatten en in deze fractie wordt de hoeveelheid analyt dan ook kwantitatief bepaald met behulp van LC-MS. Daartoe wordt het methanol extract verdund met 3,5 ml 0,1 M ammoniumacetaat zodat het extract dezelfde samenstelling heeft als het eluens en de standaardoplossingen. De resultaten zijn weergegeven in tabel 2.

### 3.2.2 Herhaalbaarheid van de monstervoorbewerking

Teneinde de herhaalbaarheid van de onder 3.2.1 beschreven procedure te evalueren is de monstervoorbewerking toegepast op 6 aliquots van de recovery standaard. De resultaten zijn



weergegeven in tabel 2.

### 3.2.3 Analyse van de monsteroplossingen

Door RCC-Notox is een totaal van 32 monsteroplossingen ter analyse aangeboden in vier groepen van 8 monsters. In overleg is besloten de monsteroplossingen afkomstig uit het blanco experiment in slechts één van de vier groepen te analyseren. In totaal zijn daarom 26 analyses verricht. De monsters worden alle volgens de onder 3.2.1 beschreven procedure voorbereid. De analyse vindt plaats door injectie in duplo van een 100 µl aliquot uit het verkregen extract. Voor elke serie van 8 resp. 6 monsters wordt een analysegang uitgevoerd met bijbehorende controlemonsters, blanco experimenten en standaarden. Voorafgaand aan de uitvoering van de analyse wordt nogmaals het LC-MS systeem geoptimaliseerd en de lineariteit van de respons wordt gecontroleerd. Gezien het prima lineair verband tussen piekoppervlakte en concentratie wordt 1-puntscalibratie toegepast. Deze procedure is overlegd met de QA/QC unit van RCC-Notox en akkoord bevonden. De resultaten van de gehaltebepaling worden weergegeven in tabel 3 t/m 6.

## 4 RESULTATEN

In figuur 1 is de piekoppervlakte van T2816 uitgezet tegen de concentratie van de geïnjecteerde standaardoplossing. Het is duidelijk dat een prima lineair verband bestaat tussen piekoppervlakte en concentratie.

De gegevens met betrekking tot de herhaalbaarheid van de gehaltebepaling zijn weergegeven in tabel 1. Het experiment is uitgevoerd op een concentratieniveau van 1,0 mg/l en de variatiecoëfficiënt blijkt ca. 10 % te bedragen (n=12). Voor de nauwkeurigheid van de gehaltebepaling betekent dit een spreiding van +/- 20% in het analyseresultaat. Daarin is niet de variatie begrepen, die veroorzaakt wordt door de monstervoorbereiding.

Uit de analyseresultaten zoals weergegeven in tabel 2 wordt duidelijk dat doorslag van het analyt niet of nauwelijks plaatsvindt tijdens applicatie van het monster en spoelen van de C18 cartridge. De desorptie blijkt goed te verlopen en resulteert in hoge recovery percentages.

Op basis van deze resultaten is in overleg met RCC-Notox besloten over te gaan tot de analyse van de aangeboden monsteroplossingen. De resultaten van de analyses zijn weergegeven in tabel 3 t/m 6. De vermelde resultaten zijn gecorrigeerd voor het recoverypercentage wat voor de betreffende serie is bepaald. Eveneens zijn in tabel 3 t/m 6 de nominale concentraties van de monsteroplossingen vermeld. De monsteroplossingen met nominale concentraties 16, 50 en 160 mg/l zijn voorafgaand aan

de gehaltebepaling verdund met een factor van respectievelijk 10 en 100, zodat de concentratie van de monsteroplossing binnen de range van de ijkreeks ligt.

Het analyseresultaat blijkt in alle gevallen, binnen de te verwachten spreiding, overeen te komen met de opgegeven nominale concentratie.

**Tabel 1.** Herhaalbaarheid van de respons van T2816 op een niveau van 1 mg/l met behulp van thermospray LC-MS in MID mode (m/z 557).

Injectie	Peak area (counts)
1	799656
2	671995
3	845333
4	679497
5	739453
6	757330
7	658088
8	819846
9	820396
10	813095
11	793397
12	648583
Gemiddeld	753889
St. Afwijking	72000
Variatiecoëff.	9,5%

**Tabel 2.** Herhaalbaarheid van de monstervoorbewerkingsmethode voor de analyse van T2816 op een niveau van 1 mg/l

Nummer	Peakarea (counts)	Recovery (%)
1	564924	70
2	618179	76
3	613783	76
4	569229	70
5	593881	73
6	596048	74
Gemiddeld:	592674	73
St. Afwijking	22039	2,7
Variatiecoëfficiënt	3,7%	3,7

**Tabel 3.** Analyseresultaten van de analyse van T2816, tijdstip van monstername 0/0.  
De analyseresultaten zijn gecorrigeerd voor een recovery percentage van 78%

RIKILT-code	RCC-code	Volume (ml)	Nominaal (mg/l)	Resultaat (mg/l)
21794	1	8,1	0	0
21795	2	8,3	0	0
21796	3	7,1	1,6	1,6
21797	4	8,1	1,6	1,6
21798	5	7,0	16	16
21799	6	7,2	16	18
21800	7	7,9	160	175
21801	8	3,0	160	160

**Tabel 4.** Analyseresultaten van de analyse van T2816, tijdstip van monstername 3/72.  
De analyseresultaten zijn gecorrigeerd voor een recovery percentage van 78%.

RIKILT-code	RCC-code	Volume (ml)	Nominaal (mg/l)	Resultaat (mg/l)
21804	17	8,3	1,6	1,2
21805	18	8,2	1,6	1,4
21806	19	7,1	16	17
21807	20	7,0	16	17
21808	21	5,6	160	137
21809	22	7,1	160	176

**Tabel 5.** Analyseresultaten van de analyse van T2816, tijdstip van monstername 19/0.  
De analyseresultaten zijn gecorrigeerd voor een recovery percentage van 72%.

RIKILT-code	RCC-code	Volume (ml)	Nominaal (mg/l)	Resultaat (mg/l)
21812	43	8,2	1,6	1,4
21813	44	8,2	1,6	1,1
21814	45	7,1	16	14
21815	46	7,2	16	14
21816	47	7,6	50	64
21817	48	7,6	50	61

**Tabel 6.** Analyseresultaten van de analyse van T2816, tijdstip van monstername 21/48  
De analyseresultaten zijn gecorrigeerd voor een recovery percentage van 72%.

RIKILT-code	RCC-code	Volume (ml)	Nominaal (mg/l)	Resultaat (mg/l)
21820	57	8,4	1,6	1,4
21821	58	7,8	1,6	1,4
21822	59	7,7	16	14
21823	60	7,8	16	15
21824	61	7,7	50	60
21825	62	7,6	50	65