



# Toepassingen van hydrophilic interaction chromatografie (HILIC) voor de analyse van zeer polaire stoffen in water

**BTO 2012.020**  
**September 2012**

**KWR**

*Watercycle Research Institute*



# Toepassingen van hydrophilic interaction chromatografie (HILIC) voor de analyse van zeer polaire stoffen in water

**BTO 2012.020**  
**September 2012**

© 2012 KWR

Alle rechten voorbehouden.

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



# Colofon

**Titel**

Toepassingen van hydrophilic interaction chromatografie (HILIC) voor de analyse van zeer polaire stoffen in water

**Opdrachtnummer**

B111741

**Onderzoeksprogramma**

Chemische Waterkwaliteit

**Projectmanager**

Merijn Schriks

**Opdrachtgever**

BTO

**Kwaliteitsborger(s)**

Pim de Voogt

**Auteur(s)**

Piek Speksnijder en Annemieke Kolkman

**Verzonden aan**

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en is verder niet openbaar.



# Samenvatting

Één van de uitdaging in het huidige analytisch chemisch onderzoek is de analyse van zeer polaire “emerging contaminants” in de watercyclus op zeer laag niveau. Reversed fase (PR) chromatografie, de meest gebruikte fase in vloeistof chromatografie, blijkt hiervoor vaak niet geschikt, omdat zeer polaire stoffen matige of geen retentie hebben op dit type kolom materiaal. De opkomst van “hydrophilic interaction liquid chromatography” (HILIC) lijkt een goede mogelijkheid te bieden voor de analyse van deze zeer polaire verbindingen.

In dit onderzoek is een methode ontwikkeld voor de analyse van de zeer polaire stof urotropine (log Kow -2.8) in water, met behulp van directe injectie en HILIC in combinatie met een triple quadrapole massaspectrometer. Deze methode is toepasbaar voor de meting van urotropine in gefiltreerd drink-, grond- en oppervlaktewater, met concentraties gelijk of groter dan 0,01 µg/l. Urotropine wordt kwantitatief gerapporteerd vanaf 0,05 µg/l.

Tevens wordt in het voorliggende rapport de mogelijke HILIC toepassingen die beschreven staan in de literatuur voor de analyse van polaire stoffen in waterig milieu besproken. HILIC is zeer veelbelovend voor de analyse van zeer polaire stoffen, waaronder ook ionogene stoffen, in water, die met RP chromatografie niet of lastig worden gemeten. Mogelijke voorbeelden zijn geneesmiddelen zoals metformine, en polaire metabolieten van geneesmiddelen, röntgencontrastmiddelen, kwaternaire ammonium verbindingen en pesticiden. Daarnaast is HILIC is goed koppelbaar met massaspectrometrie. Door de hoge concentratie organisch oplosmiddel in de elutiemiddelen, is de ionisatie efficiëntie hoger wat leidt tot hogere gevoeligheid. Daarnaast biedt HILIC mogelijkheden voor een brede screening naar zeer polaire stoffen die voorkomen in water, en die met de huidige op RP gebaseerde brede screeningsmethode worden gemist.



# Inhoud

<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>	
<b>Inhoud</b>	<b>5</b>	
<b>1</b>	<b>Introductie</b>	<b>7</b>
1.1	Chromatografische analyse van organische microverontreinigingen in water	7
1.2	HILIC	7
1.3	Historie van urotropine analyse bij KWR	10
1.4	Doel	11
<b>2</b>	<b>Materiaal en Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Beginsel	13
2.2	Chemicaliën	13
2.3	Monstervoorbewerking	13
2.4	LC condities	13
2.5	Instellingen massaspectrometer	14
2.6	Identificatie en kwantificering	14
<b>3</b>	<b>Resultaten</b>	<b>17</b>
3.1	Opzet HILIC methode voor de analyse van urotropine	17
3.2	Herhaalbaarheid en rapportagegrens	19
3.3	Mogelijke toepassingen van HILIC in wateranalyse	20
<b>4</b>	<b>Conclusie</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Literatuur</b>	<b>25</b>
<b>I</b>	<b>Afkortingen</b>	<b>27</b>

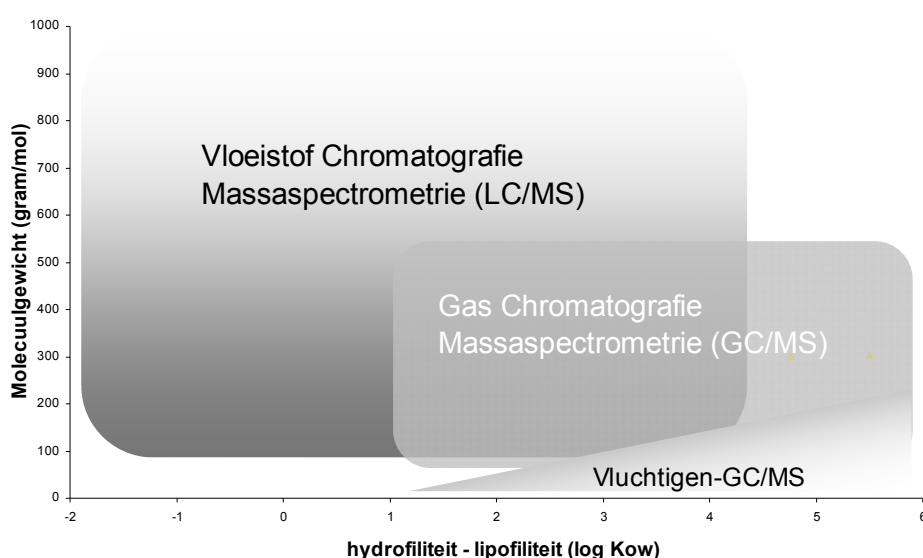




# 1 Introductie

## 1.1 Chromatografische analyse van organische microverontreinigingen in water

De analyse van organische microverontreinigingen in water wordt uitgevoerd met verschillende chromatografische technieken. GC-MS is een geschikte techniek om semivluchtige, thermostabiele, apolaire contaminanten in water te bepalen, terwijl LC-MS analyse methoden geschikt zijn voor niet-vluchtige, thermisch instabiele en polaire verbindingen. GC-MS en LC-MS zijn daarmee complementaire technieken (zie Figuur 1).



**Figuur 1: De bestrijking van de chemische ruimte met gaschromatografische (GC) en vloeistofchromatografische (LC) technieken.**

RP chromatografie (zie Tabel 1 voor achtergrondinformatie) is de meest toegepaste LC techniek voor de analyse van kleine moleculen. Zeer polaire stoffen ( $\log Kow < 0$ ) zijn echter moeilijk te meten met RP chromatografie, omdat ze zeer matige of geen retentie op het RP kolommateriaal vertonen. Één van de uitdaging in het huidige analytisch chemisch onderzoek is de analyse van zeer polaire “emerging contaminants” in de watercyclus op zeer laag niveau. RP chromatografie blijkt hiervoor vaak niet geschikt. De opkomst van “hydrophilic interaction liquid chromatography” (HILIC) lijkt een goede mogelijkheid te bieden voor de analyse van zeer polaire verbindingen, die weinig of geen retentie hebben op een RP kolom.

## 1.2 HILIC

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (hydrofiele interactie-vloeistofchromatografie), meestal afgekort tot HILIC, is een vorm van normale fase-vloeistofchromatografie. Andere namen die worden gebruikt voor HILIC zijn “omgekeerde RP” chromatografie of “waterige normale fase” chromatografie (zie Tabel 1 voor een uitleg van de verschillende LC technieken).

**Tabel 1: Vloeistofchromatografische (LC) technieken**

Soort	Stationaire fase	Mobiel fase	Elutie door	Retentie-mechanisme	Elutie volgorde
Reversed fase (RP)	Apolair • C18, C8	Polair • Water (hoge conc)/organisch oplosmiddel	Conc. organisch oplosmiddel ↑↑	Hydrofobe interactie	Polair → apolair
Normale fase (NP)	Polair • Silica	Apolair • Bijv. hexaan	Meestal isocratisch	Adsorptie	apolair → polair
HILIC	Polair • Silica	Apolair • Organisch oplosmiddel (hoge conc)/water	Conc water ↑↑	Partitie	apolair → polair

De term HILIC is in 1990 gelanceerd (Alpert, 1990) om deze vorm van chromatografie te onderscheiden van "normale fase" chromatografie. Bij normale fase chromatografie (NP) kunnen zeer polaire stoffen te sterk aan de vaste fase binden waardoor ze niet meer van de kolom afkomen. Door een klein percentage water aan de mobiele fase toe te voegen (zoals bij HILIC), kunnen deze zeer polaire stoffen toch van de kolom worden geëluëerd. Door middel van HILIC kunnen sterk polaire en hydrofiele verbindingen, die weinig retentie hebben op een RP kolom, worden gescheiden.

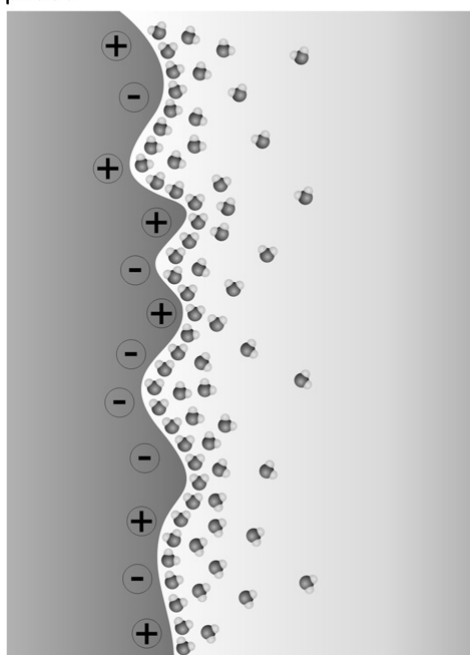
De stationaire fase van HILIC bestaat uit een polair materiaal, zoals klassieke silica, en met polaire groepen, zoals amino, diol, cyano gemodificeerde silicagel.

Als mobiele fase wordt meestal een mengsel van een met water mengbaar organisch oplosmiddel, zoals acetonitril en een kleine hoeveelheid water gebruikt. Alcoholen worden ook toegepast als organisch oplosmiddel, maar dan moet de concentratie hoger zijn in vergelijking met acetonitril, om dezelfde mate van retentie te verkrijgen voor een zelfde component. Daarnaast kan elk polair aprotische oplosmiddel dat met water mengbaar is, zoals dimethylformamide en tetrathydrofuraan gebruikt worden. Deze oplosmiddelen zijn, in tegenstelling tot protische oplosmiddelen, geschikt voor de analyse van basen. Zie (Buszewski and Noga, 2011; Jandera, 2011) voor een overzicht van stationaire en mobiele fasen die worden gebruikt in HILIC.

De gradiënten die in HILIC gebruikt worden, zijn precies het tegenovergesteld van die worden gebruikt in RP chromatografie, De startcondities zijn een hoge concentratie organisch oplosmiddel met een klein beetje water, en tijdens het gradiënt neemt de hoeveelheid water toe. Vandaar ook de term "omgekeerde RP" chromatografie.

Over het precieze scheidingsmechanisme van HILIC bestaat nog enige discussie. Over het algemeen wordt aangenomen dat er een twee-lagensysteem ontstaat: de polaire stationaire fase met daaromheen een waterige laag tegenover de organische mobiele fase (Figuur 2). De stof die over de kolom wordt gebracht, verdeelt zich over de twee lagen als functie van polariteit en oplosbaarheid (Alpert, 1990). De elutievolgorde in de HILIC modus is omgekeerd als die in RP chromatografie, van de minst polaire naar de meest polaire. Naast dit verdelingsmechanisme spelen andere mechanismen een rol, zoals electrostatische interacties, waterstofbruggen, dipool-dipool-interacties, en hydrofobe interacties (Dinh et al., 2011). Voor stoffen met verschillende functionele groepen, zullen dan ook "mixed-mode" retentiemechanismen een rol spelen.

Polar stationary phase      Aqueous sublayer      Mostly organic mobile phase



**Figuur 2: Schematische weergave van de vorming van een twee-lagensysteem in HILIC chromatografie. Rond de polaire stationaire fase ontstaat een waterige laag en een organische mobiele fase (overgenomen van (Jandera, 2011)).**

HILIC biedt verschillende voordelen ten opzichte van RP chromatografie:

- Ten eerste kunnen zeer polaire stoffen, die geen retentie hebben op een RP kolom, wel worden vastgehouden op een HILIC kolom.
- HILIC is ook geschikt voor de analyse van geladen verbindingen, zoals kleine organische zuren.
- Daarnaast biedt HILIC complementaire selectiviteit aan RP.
- Door de hoge concentratie organisch oplosmiddel is de "backpressure" van de kolom laag.
- Tevens is de koppeling met electrospray ionisatie MS (ESI-MS) makkelijker en de gevoeligheid is groter. De reden hiervoor is dat het gebruikte organische oplosmiddel veel vluchtiger is, wat leidt tot hogere ionisatie efficiëntie en dus hogere gevoeligheid.
- Bovendien kan de monstervoorbewerking aanzienlijk worden verkort. Bij zowel vaste fase extractie (SPE) en vloeistof-vloeistof extractie (LLE) bevat het extract vaak een hoge concentratie organisch oplosmiddel, dat voor analyse met RP chromatografie moet worden verwijderd, meestal door droogdampen. Bij HILIC is het mogelijk een hogere concentratie organisch oplosmiddel op de kolom te injecteren, waardoor de tijdrovende en eventueel stofverlies gevende droogdampstap niet nodig is.
- Verder biedt HILIC de mogelijkheid van het online koppelen van vaste fase extractie (SPE) aan chromatografie. De SPE koppeling aan HILIC-MS/MS is makkelijker te realiseren dan de koppeling waarbij van RP chromatografie wordt gebruik gemaakt, omdat het eluaat, dat een hoge concentratie organisch oplosmiddel bevat, direct, zonder droogdampstap, op de HILIC kolom kan worden geïnjecteerd. Deze techniek is toegepast voor de bepaling van polaire geneesmiddelen in verschillende watermonsters op het lage ng/l niveau (Fontanals et al., 2011).

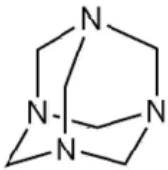
### 1.3 Historie van urotropine analyse bij KWR

In 2003 stroomde door een brand bij het bandenbedrijf Vredestein ernstig vervuild bluswater in het Twentekanaal. Door de brand in het grondstofmagazijn van de bandenfabriek kwam via het bluswater een cocktail van 10.000 ongewenste stoffen in het Twentekanaal terecht. Om de vervuiling van het Twentekanaal in kaart te brengen en te saneren is ervoor gekozen de stoffen urotropine en HMMM als gidsstoffen te monitoren (Vink, november 2003).

Bij KWR werd de monitoring van deze 2 componenten uitgevoerd met een HPLC-MS/MS analyse. Deze analyse werd uitgevoerd door een gefiltreerd watermonster (filter 0,45 µm) met groot volume direct op een klassieke HPLC te injecteren die was gekoppeld aan een triple quadrupole massaspectrometer. De HPLC kolom was een RP C18 kolom. De precursor  $[M+H]^+$  en twee produktionen werden gemeten met de triple quadrupole massaspectrometer. Piekidentificatie vond plaats op basis van de retentietijd en twee specifieke overgangen per component en kwantificering m.b.v. van een kalibratiecurve.

De retentie van HMMM was voldoende op RP kolom om een betrouwbare analyse uit te voeren vanaf een analysegrens van 0,1 µg/l. De zeer polaire heterocyclische stof urotropine, die onder andere wordt toegepast in de synthese van andere chemische componenten, zoals plastic, geneesmiddelen, rubber (zie Tabel 2 voor achtergrond informatie over urotropine) was echter lastiger te meten met deze analysemethode. Urotropine vertoonde zeer matige retentie op de gebruikte RP kolom, de piekvorm was asymmetrisch, en de storingsgevoeligheid van de meting was hoog door ionsuppressie van de matrix. De rapportagegrens voor urotropine lag met deze methode op 0,5 µg/l.

**Tabel 2: Achtergrondinformatie urotropine**

IUPAC name	1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decane
Synoniemen	Urotropine Hexamine Methenamine
Brutoformule	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>
Structuurformule	
Moleculair gewicht	140,186 g/mol
Log Kow	-2,8
Oplosbaarheid	85,3 g/100 mL
Kookpunt	280 °C (sublimeert)
Dampspanning	< 0,01 hPa bij 20 °C
Dichtheid	1,331 g/cm <sup>3</sup>

Bij het omzetten van de HPLC-MS/MS methode naar een UPLC-MS/MS methode waarin hetzelfde type RP C18 kolommateriaal werd toegepast bleek dat urotropine hierop helemaal geen retentie vertoonde. Daarom is er een nieuwe applicatie ontwikkeld om urotropine te kunnen meten in drink- en oppervlaktewater. Voor de chromatografie is gekozen voor een HILIC kolom omdat deze methode de retentie van zeer polaire stoffen aanzienlijk vergroot.

## **1.4 Doel**

Een belangrijk onderdeel van het BTO project “Analysis of Emerging Compounds” is de selectie, applicatie (inclusief het ontwikkelen van een analytische meetmethode) en kwantificering van “emerging compounds” in water. In het voorliggende rapport is gekeken, naar de mogelijkheden van HILIC voor de analyse van zeer polaire stoffen in water. De ontwikkeling en prestatiekenmerken van een HILIC-MS/MS analysemethode voor de zeer polaire component urotropine in drink- en oppervlaktewater wordt besproken. Daarnaast worden de mogelijke HILIC toepassingen die beschreven staan in de literatuur voor de analyse van polaire stoffen in waterig milieu besproken.



## 2 Materiaal en Methoden

De analytische methode die hieronder wordt beschreven is in meer detail beschreven in het KWR-huisvoorschrift LOA-544 met de titel "Bepaling van urotropine in water met behulp van UPLC-MS-MS".

### 2.1 Beginsel

De methode is gebaseerd op een directe injectie van het watermonster zodat naast filtratie geen voorbehandeling nodig is. Aan het watermonster wordt vooraf 0,5 µg/l interne standaard toegevoegd, vervolgens wordt het monster gefiltreerd over een 0,20 µm filter. Hierna wordt er 50 µl monster geanalyseerd met behulp van (HILIC) UHPLC-MS/MS. Het gehalte aan urotropine wordt berekend aan de hand van een externe kalibratiecurve, waarbij gecorrigeerd wordt voor de interne standaard. De beschreven methode is toepasbaar voor de meting van urotropine in gefiltreerd drink-, grond- en oppervlaktewater, met concentraties gelijk of groter dan 0,05 µg/l. Urotropine wordt kwantitatief gerapporteerd vanaf 0,05 µg/l.

### 2.2 Chemicaliën

Int Tabel 3 staan de componenten die met de beschreven methode worden geanalyseerd.

Tabel 3: Verbindingen

Component	Brutoformule	CAS nummer	massa
Urotropine	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	100-97-0	140,11
Urotropine-d12 (interne standaard)	C <sub>6</sub> D <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	23304-08-7	152,18

### 2.3 Monstervoorbewerking

Aan 50 ml monster wordt interne standaard oplossing (urotropine-d12) toegevoegd in een eindconcentratie van 0,5 µg/L. Hierna wordt elk monster gefiltreerd met behulp van een 0,20 µm filter, en vervolgens in een 1,8 ml vial overgebracht en geanalyseerd.

### 2.4 LC condities

De instellingen gebruikt voor de chromatografische scheiding van de te analyseren stoffen staan vermeld in Tabel 4. Bij de UPLC analyse is gebruik gemaakt van een gradiëntprogramma zoals aangegeven in Tabel 5. Het gebruikte eluens A is milliq met 5 mM ammoniumformiaat, pH 3,2 en eluens B is acetonitril.



**Tabel 4: LC condities gebruikt voor de scheiding van te analyseren componenten**

UHPLC-pomp	Accela (Thermo Scientific)
Monsterwisselaar	Accela (Thermo Scientific)
Analytische kolom	Kinetex HILIC 2.6 $\mu\text{m}$ , 150 x 2,1 mm (Phenomenex)
Guardkolom	Krudkatcher Ultra HPLC in-line Filter 0,5 $\mu\text{m}$ (Phenomenex)
Kolomthermostaat	Accela 30 °C
Autosampler vials	1,8 ml 12 x 32 mm
Filtratie watermonster	Spartan 0,20 $\mu\text{m}$ filter
Autosampler spoelvloeistof	70% acetonitril, 15% methanol, 15% milliQ
Injectieloop	50 $\mu\text{l}$
Divert valve (heart-cutting)	2 - 6 min

**Tabel 5: UPLC mobiele fase gradiënt toegepast voor scheiding van te analyseren componenten**

Stap	Tijd in minuten	A%	B%	Flow ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )
0	0,00	30	70	400
1	6,00	50	50	400
2	8,50	50	50	400
3	9,00	30	70	400
4	12,00	30	70	400

## 2.5 Instellingen massaspectrometer

De instellingen gebruikt voor de massaspectrometrische detectie van de te analyseren componenten staan vermeld in Tabel 6.

**Tabel 6: Instellingen gebruikt voor de massaspectrometrische detectie van de te analyseren componenten**

Massaspectrometer	TSQ Vantage Triple Quadrupole MS (Thermo Scientific)
Scanmethode	SRM
Druk botsingscel (Ar)	1,2 mTorr
LC/MS interface	ESI
Ionisatie mode	Positief
Cycle time	0,80 s
Spray voltage	3,0 kV
Capillary temperatuur	250 °C
Vaporizer temperatuur	350 °C
Sheath gas (N <sub>2</sub> )	30 (Arb)
Auxilliary gas (N <sub>2</sub> )	10 (Arb)
Ion sweep gas (N <sub>2</sub> )	10 (Arb)
Resolutie Q1	0,7 (FWHM)
Resolutie Q3	0,7 (FWHM)

## 2.6 Identificatie en kwantificering

Met een LC-MS/MS wordt met Selected Reaction Monitoring (SRM) de analyse uitgevoerd. Selected Reaction Monitoring is een scantechniek waarbij in quadropool 1 (Q1) één ion (precursor) uit de matrix worden geselecteerd, waarna in de botsingscel (Q2) de fragmentatie (producties) plaatsvindt en in

quadrupool 3 (Q3) het product ion wordt geselecteerd en vervolgens gedetecteerd door de detector. Identificatie van de componenten gebeurt op basis van retentietijd en via 2 specifieke transitie per component (Tabel 7) volgens Council Directive 96/23/EC. Kwantificering van de componenten vindt plaats door middel van een externe calibratiecurve in de concentratierange van 0,05 – 4 µg/l.

**Tabel 7: Instellingen van de massaspectrometer en transitie gebruikt voor de analyse van urotropine**

Component	Parent mass <i>m/z</i>	Product ion	Collision energy [eV]	S- lens	Mode
Urotropine	141,1	112,1*	15	50	positief
		42,1	30	50	
Urotropine-d12	153,2	122,2*	26	53	positief
		46,1	29	53	

\* kwantificatie ion

Een component wordt als positief geïdentificeerd beschouwd wanneer twee productionen van de desbetreffende precursor aanwezig zijn en de retentietijd niet meer afwijkt dan 2,5 % voor de betreffende component in de meest recent geïnjecteerde standaard (performance standaard). Verder moet de ionratio (de verhouding tussen de responsies in de MS detector van de precursor en het product) van de betreffende component overeenkomen met die van de meest recent geïnjecteerde standaard, zie Tabel 8 voor de ionratio criteria.

**Tabel 8: Maximaal toelaatbare toleranties voor de ionratio**

Relatieve intensiteit (% van base piek)	Ionratio tolerantie
> 50 %	± 20 %
> 20 % tot 50 %	± 25 %
> 10 % tot 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

De kwantificering vindt vervolgens plaats aan de hand van de piekoppervlakte van één enkel product ion. Wanneer er twee kalibratiecurven gebruikt worden, vindt de kwantificering plaats aan de hand van de gemiddelde kalibratiecurve. De kalibratiecurve mag gemiddeld worden wanneer de richtingscoëfficiënt van curve 1 t.o.v. curve 2 niet meer dan 10% afwijkt. Bij overschrijding van dit criterium wordt dit genoteerd en aan de hand van de controlepunten (performancestandaard) en wordt bepaald welk monster met welke kalibratiecurve gekwantificeerd moet worden. Wanneer de richtingscoëfficiënt van de curve 1 meer dan 30% van curve 2 afwijkt, dient men in overleg met de onderzoeksmedewerker van LMC of het labhoofd actie te ondernemen.

Van de mengstandaardoplossing wordt per component een kalibratiecurve berekend volgens de methode van de kleinste kwadraten (lineaire regressie) m.b.v het kwantificeringsprogramma Xcalibur. Hierbij wordt de concentratie (horizontaal) uitgezet tegen de som van de piekoppervlakten (verticaal). De kalibratiecurve bevat een nul standaard welke in de kalibratie wordt meegenomen in de berekening. De oorsprong wordt, als meetpunt, niet meegenomen in de berekening van de kalibratiecurve.



# 3 Resultaten

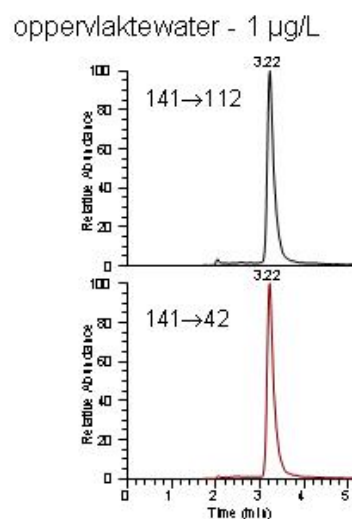
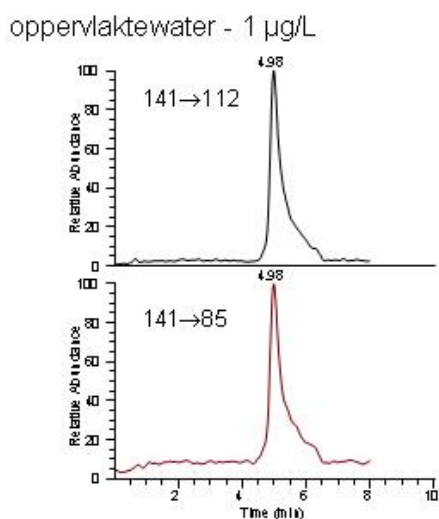
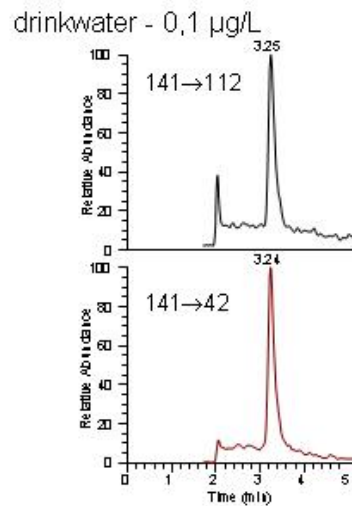
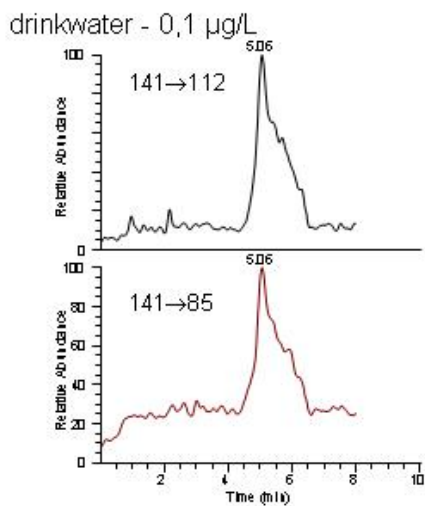
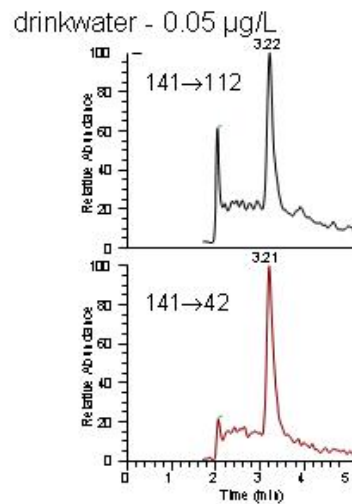
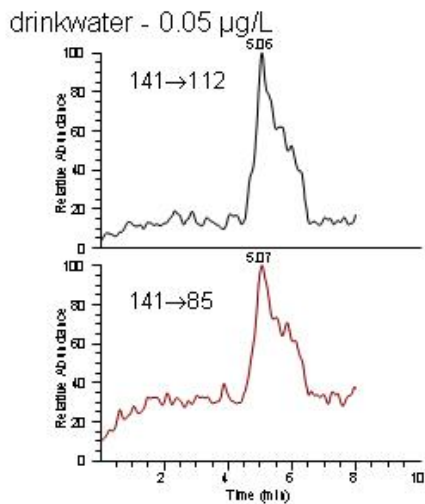
## 3.1 Opzet HILIC methode voor de analyse van urotropine

In het in dit rapport beschreven onderzoek is een analysemethode ontwikkeld gebaseerd op HILIC gekoppeld aan massaspectrometrie voor de analyse van de zeer polaire stof urotropine in drinkwater en oppervlaktewater. Urotropine werd bij KWR oorspronkelijk geanalyseerd met RP chromatografie, maar de prestatiekenmerken van deze methode waren niet voldoende.

In Figuur 3 staan de chromatogrammen van de analyse van urotropine van de oude RP methode (links) en nieuw ontwikkelde HILIC methode (rechts). Er is duidelijk te zien dat de piekvorm met de HILIC methode beter is dan met de RP methode. De piekvorm is namelijk symmetrischer, de pieken zijn veel smaller (0,25 min i.p.v. 1,5 min), en bovendien is de piektailing minder.

Daarnaast is de retentie van urotropine op HILIC materiaal beter dan op RP materiaal, wat resulteert in een verbeterde gevoeligheid. Bij de RP methode was vertoende urotropine nauwelijks retentie, namelijk een retentietijd van 5 minuten op een gradiënt van 30 minuten. Aan het begin van het RP gradiënt elueren de meeste storende componenten (bijvoorbeeld humuszuren), en dit zogeheten matrixeffect heeft negatieve invloed op de gevoeligheid.. Door gedeutereerd urotropine toe te voegen als interne standaard kan hiervoor worden gecorrigeerd zodat een nauwkeurige kwantitatieve analyse mogelijk is.

Een ander voordeel van deze methode t.o.v. de oude RP methode, is dat door het gebruik van UPLC de analyse zeer snel is. Bovendien kost de monstervoorbewerking nauwelijks tijd, aangezien er gebruikt wordt gemaakt van directe injectie van een groot volume.



**Figuur 3: Chromatogrammen van de analyse van urotropine met RP chromatografie (links) en met HILIC chromatografie (rechts). Getoond worden een standaard in drinkwater op het concentratieniveau 0,05 µg/l (boven) en 0,10 µg/l (midden) en oppervlaktewater op een concentratieniveau van 1 µg/l (onder). Er zijn 2 transitie's uitgezet. Hierbij dient te worden opgemerkt dat 1 SRM overgang (141→112) hetzelfde was bij beide methodes, en 1 SRM overgang anders ((141→85) en (141→42)).**

### 3.2 Herhaalbaarheid en rapportagegrens

De herhaalbaarheid van de analysemethode werd bepaald voor 2 concentraties, namelijk 0,05 en 2 µg/l in drinkwater en oppervlaktewater. In Tabel 9 staan de herhaalbaarheid (RSD), aantoonbaarheidsgrens (Ag) en de rapportagegrens (Rg) van urotropine in drinkwater en oppervlaktewater vermeld.

**Tabel 9: Vastgestelde prestatiekenmerken van de analysemethode voor urotropine**

	Drinkwater	Oppervlaktewater
Herhaalbaarheid 0,05 µg/l (%)	5,6	*
Herhaalbaarheid 2 µg/l (%)	2,3	4,7
Aantoonbaarheidsgrens (µg/l)	0,01	0,01*
Rapportagegrens (µg/l)	0,05	0,05*

\* Vanwege een hoge blanco van urotropine in oppervlaktewater, is het niet mogelijk om de herhaalbaarheid en aantoonbaarheidsgrens op 0,05 µg/l te bepalen. De aantoonbaarheidsgrens en rapportagegrens zijn geschatte waarden op basis van de resultaten in drinkwater.

De herhaalbaarheid van de ontwikkelde methode valt binnen de 10% (interne eis KWR). Urotropine wordt in concentraties tot 2.3 µg/l aangetroffen in oppervlaktewater (Lekkanaal, Nieuwegein, metingen KWR van 2011) en daardoor was het niet mogelijk om de herhaalbaarheid en aantoonbaarheidsgrens in oppervlakte water te bepalen op een niveau van 0,05 µg/l, maar zijn de waarden van oppervlaktewater geschatte waarden op basis van de resultaten in drinkwater..De rapportagegrens voor urotropine in drinkwater en oppervlaktewater bedraagt 0,05 µg/l (Tabel 9). Deze vernieuwde methode laat dus een duidelijke verbetering in gevoeligheid zien met ongeveer een factor 10 (0,5 µg/l versus 0,05 µg/l).

### 3.3 Mogelijke toepassingen van HILIC in wateranalyse

In de literatuur zijn diverse applicaties beschreven van HILIC-MS/MS voor de analyse van zeer polaire stoffen in milieumonsters (zie bijvoorbeeld het review van van Nuijs (2011)).

Hieronder worden enkele voorbeelden beschreven.

#### Drug of Abuse (DOAs)

Er zijn al veel methoden beschreven in de literatuur voor de analyse van DOAs die gebruik maken van RP chromatografie. Gezien het polaire karakter van de meeste DOAs lijkt HILIC een goed alternatief te bieden voor de detectie en kwantificering in water. In de studie van Gheorghe et al. is een direct vergelijk gemaakt tussen RP en HILIC voor de analyse van cocaïne en de belangrijkste metabolieten benzoylecgonine en ecgoninemethylester, en er bleek een duidelijke verbetering in gevoeligheid bereikt te worden als HILIC-MS/MS werd vergeleken met RPLC-MS/MS (Gheorghe et al., 2008).

#### Metformine

Metformine, een oraal antidiabeticum en één van de meest voorgeschreven medicijnen is een zeer polaire stof (log Kow - 2,64) die nauwelijks tot geen retentie heeft op een klassieke RP kolom. Verschillende applicaties met HILIC-MS/MS voor de analyse van metformine zijn beschreven. Scheurer et al. hebben een HILIC methode ontwikkeld voor de analyse van metformine in oppervlakte- en afvalwater. Concentraties tot 17000 ng/L metformine werden aangetroffen in oppervlaktewater. (Scheurer et al., 2009). In een andere studie van van Nuijs et al. werden 13 geneesmiddelen, waaronder metformine geanalyseerd met HILIC MS/MS, in influent afvalwater in België. Metformine werd terug gevonden in influent afvalwater met een hoogste concentratie van 94 µg/l (van Nuijs et al., 2010). Bij KWR is ook ervaring met de analyse van metformine in gefiltreerd drink-, grond- en oppervlaktewater met HILIC-MS/MS. De rapportagegrens voor metformine met deze methode is vastgesteld op 50 ng/l (zie KWR huisvoorschrift-548 "Bepaling van geneesmiddelen en metabolieten in water met behulp UPLC-MS/MS").

#### Pesticiden

Pesticiden worden vaak met GC-MS en RP-MS gemeten en vele methoden zijn hiervoor in de literatuur beschreven. Voor zeer polaire en voor thermolabele pesticiden, die niet met GC-MS of RP chromatografie kunnen worden geanalyseerd, lijkt HILIC een goed alternatief te bieden. Hayama et al. analyseerden zes zeer polaire organofosfaat pesticiden, namelijk acephate, methamidophos, monocrotophos, omethoate, oxydemeton-methyl en vamidothon, in watermonsters met HILIC-MS/MS. Als monstervoorbewerking werd SPE gebruikt. Het bijkomende voordeel was dat het eluaat direct op de analytische kolom kon worden geïnjecteerd, zonder droogdampstap (Hayama et al., 2008).

#### Kwaternaire ammonium verbindingen

Kwaternaire ammonium verbindingen, zoals paraquat en diquat, zijn verbindingen die een geladen structuur (ionische structuur) bevatten. Deze worden vaak met ionpaar RP chromatografie geanalyseerd. Er is dan een ion-paar reagens, zoals HFBA of TFA nodig in de mobiele fase om de te analyseren componenten te elueren. De aanwezigheid van het ion-paar reagent heeft een negatief effect op de ionisatie efficiëntie in de MS, waardoor de gevoeligheid van de MS meting minder wordt. Door de analyse uit te voeren met HILIC wordt het gebruik van ion-paar reagentia voorkomen, en kan de gevoeligheid aanzienlijk worden verbeterd (Whitehead jr et al., 2010).

#### MRI contrast vloeistoffen

De speciatie analyse van gadolinium (Gd) chelaten, die worden gebruikt als MRI contrastvloeistof, in de effluënten van ziekenhuizen en in afvalwaterzuiveringsinstallaties, wordt beschreven in een studie van Künnemeyer et al. In de beschreven methode wordt HILIC gekoppeld aan ICP MS en wordt er een goede scheiding verkregen voor de vijf meest gebruikte MRI contrastmiddelen (Künnemeyer et al., 2009).

### **Aromatische amines**

Li et al (Li et al., 2010) beschrijven een methode gebaseerd op HILIC voor de bepaling van vijf aromatische amines (o.a aniline en benzidine) in verschillende typen water, namelijk oppervlaktewater en influenten van afvalwaterzuiveringsinstallaties.

### **Screening**

Het screenen van zeer polaire stoffen in water met behulp van HILIC gekoppeld aan hoge resolutie accurate massaspectrometrie (bijvoorbeeld de Orbitrap) zou een interessante aanvulling zijn op de huidige brede screening met RP chromatografie zoals die nu wordt toegepast bij KWR (Zie KWR huisvoorschrift LOA-600) Onderzoek naar bekende en onbekende polaire stoffen in watermonsters m.b.v. LC-DAD-LTQ-Orbitrap MS"). Er zijn applicaties beschreven in de literatuur van HILIC- MS/MS voor het bepalen van het van het metabole profiel van rat urine monsters (Spagou et al., 2011), en het screenen naar zeer polaire metabolieten in humaan plasma (Cai et al., 2009)..





## 4 Conclusie

Er is een methode ontwikkeld voor de analyse van urotropine in water, met behulp van directe injectie en HILIC in combinatie met een triple quadrupole massaspectrometer. Deze methode is toepasbaar voor de meting van urotropine in gefiltreerd drink-, grond- en oppervlaktewater, met concentraties gelijk of groter dan 0,01 µg/l. Urotropine wordt kwantitatief gerapporteerd vanaf 0,05 µg/l.

Voor de toekomst is HILIC veelbelovend voor de analyse van zeer polaire stoffen, waaronder ook ionogene stoffen, in water, die met RP chromatografie niet of lastig worden gemeten. Mogelijke voorbeelden zijn geneesmiddelen zoals metformine, en polaire metabolieten van geneesmiddelen, röntgencontrastmiddelen, kwartenaire ammonium verbindingen en pesticiden.

HILIC is goed koppelbaar met massaspectrometrie. Door de hoge concentratie organisch oplosmiddel in de elutiemiddelen, is de ionisatie efficiëntie hoger wat leidt tot hogere gevoeligheid. Daarnaast biedt HILIC mogelijkheden voor een brede screening naar zeer polaire stoffen die voorkomen in water, en die met de huidige op RP gebaseerde brede screeningsmethode worden gemist.



## 5 Literatuur

Alpert, A.J., 1990. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* 499, 177-196.

Buszewski, B., Noga, S., 2011. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-17.

Cai, X., Zou, L., Dong, J., Zhao, L., Wang, Y., Xu, Q., Xue, X., Zhang, X., Liang, X., 2009. Analysis of highly polar metabolites in human plasma by ultra-performance hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 650, 10-15.

Dinh, N.P., Jonsson, T., Irgum, K., 2011. Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218, 5880-5891.

Fontanals, N., Marcé, R.M., Borrull, F., 2011. On-line solid-phase extraction coupled to hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry for the determination of polar drugs. *Journal of Chromatography A* 1218, 5975-5980.

Gheorghe, A., Van Nuijs, A., Pecceu, B., Bervoets, L., Jorens, P.G., Blust, R., Neels, H., Covaci, A., 2008. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 1309-1319.

Hayama, T., Yoshida, H., Todoroki, K., Nohta, H., Yamaguchi, M., 2008. Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 2203-2210.

Jandera, P., 2011. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta* 692, 1-25.

Künnemeyer, J., Terborg, L., Meermann, B., Brauckmann, C., Möller, I., Scheffer, A., Karst, U., 2009. Speciation analysis of gadolinium chelates in hospital effluents and wastewater treatment plant sewage by a novel HILIC/ICP-MS method. *Environmental Science and Technology* 43, 2884-2890.

Li, R., Zhang, Y., Lee, C.C., Lu, R., Huang, Y., 2010. Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatographic method for determination of aromatic amines in environmental water. *Journal of chromatography. A* 1217, 1799-1805.

Scheurer, M., Sacher, F., Brauch, H.-J., 2009. Occurrence of the antidiabetic drug metformin in sewage and surface waters in Germany. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 1608-1613.

Spagou, K., Wilson, I.D., Masson, P., Theodoridis, G., Raikos, N., Coen, M., Holmes, E., Lindon, J.C., Plumb, R.S., Nicholson, J.K., Want, E.J., 2011. HILIC-UPLC-MS for exploratory urinary metabolic profiling in toxicological studies. *Analytical Chemistry* 83, 382-390.

van Nuijs, A., Tarcomnicu, I., Simons, W., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P., Neels, H., Covaci, A., 2010. Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398, 2211-2222.

van Nuijs, A.L.N., Tarcomnicu, I., Covaci, A., 2011. Application of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1218, 5964-5974.

Vink, J.P.M., november 2003. Gevolgen van de brand bij Vredenstein, Deel 4 Samenvatting en advies voor herstel. RIZA, Lelystad.

Whitehead jr, R.D., Montesano, M.A., Jayatilaka, N.K., Buckley, B., Winnik, B., Needham, L.L., Barr, D.B., 2010. Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 878, 2548-2553.

# I Afkortingen

## **ESI**

Electrospray ionisatie

## **GC**

Gas chromatografie

## **HILIC**

Hydrophilic interaction liquid chromatography (hydrofiele interactie-vloeistofchromatografie), meestal afgekort tot HILIC, is een vorm van normale fase-vloeistofchromatografie. Andere namen die worden gebruikt voor HILIC zijn “omgekeerde RP” chromatografie of “waterige normale fase” chromatografie.

## **HPLC**

High-performance vloeistof chromatografie

## **IC**

Ion chromatografie

## **LLE**

Vloeistof vloeistof extractie, liquid liquid extraction

## **MS**

massaspectrometrie

## **RP**

Reversed phase chromatografie, omgekeerde fase chromatografie

## **SPE**

Solid phase extraction , vaste fase extractie

## **UPLC**

Ultra high performance vloeistof chromatografie

