



Beschrijving analysemethoden voor zoetstoffen en MRI- contraststoffen en optimalisatie screeningsmethode

Februari 2013
BTO 2013.015

Beschrijving analysemethoden voor zoetstoffen en MRI- contraststoffen en optimalisatie screeningsmethode

Februari 2013
BTO 2013.015

© 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

Beschrijving analysemethoden voor zoetstoffen en MRI-contraststoffen en optimalisatie screeningsmethode

Opdrachtnummer

B111741

Rapportnummer

2013.015

Onderzoeksprogramma

PBC-chemie

Projectmanager

Merijn Schriks

Opdrachtgever

PBC chemie

Kwaliteitsborger(s)

Pim de Voogt

Auteur(s)

Ton van Leerdam, Annemieke Kolkman, Pascal Kooij, Piet Speksnijder en Dennis Vughs

Verzonden aan

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten.

Voorwoord

Het in dit rapport beschreven onderzoek is uitgevoerd binnen het BTO project 'Analysis of Emerging Compounds' in de periode 2010-2012. Na een samenvatting en inleiding (hoofdstuk 1) wordt in hoofdstuk 2 de methode ontwikkeling beschreven van een afgeronde methoden voor de analyse van zoetstoffen. In hoofdstuk 3 wordt de ontwikkeling beschreven van een methode voor het analyseren van MRI-contraststoffen. In hoofdstuk 4 wordt de optimalisatie van zowel hardware als software van de brede screening uitgevoerd met de Orbitrap massaspectrometer beschreven.

Onze dank gaat uit naar de medewerkers binnen het project die het vele experimentele werk hebben uitgevoerd en naar HWL dat een intern evaluatierapport over zoetstoffen ter beschikking heeft gesteld waaruit naar toestemming een klein deel is verwerkt in dit rapport (paragraaf 2.1).

Ton van Leerdam, Annemieke Kolkman, Pascal Kooij, Piet Speksnijder en Dennis Vughes
Nieuwegein, februari 2012

Samenvatting

Binnen het BTO-project 'Analysis of Emerging Compounds' zijn analysemethoden ontwikkeld om verschillende klassen van 'emerging compounds' te kunnen analyseren. In dit rapport wordt de ontwikkeling beschreven van een analysemethode voor twee categorieën van stoffen, namelijk kunstmatige zoetstoffen en MRI-contraststoffen.

Kunstmatige zoetstoffen zijn vervangers van suiker en worden veel toegepast in voedingsmiddelen en 'light' frisdranken. De stoffen worden in grote hoeveelheden geconsumeerd, en bepaalde zoetstoffen zoals acesulfaam-K, sacharine, cyclamaat en sucralose worden in het menselijk lichaam niet afgebroken, maar onveranderd uitgescheiden via de urine of feces. Door hun stabiliteit en persistentie worden de zoetstoffen niet volledig afgebroken in afvalwaterzuiveringsinstallaties en kunnen ze via het gezuiverde afvalwater in rivieren en stromen terechtkomen. In Europa komen de stoffen wijdverbreid in het oppervlaktewater voor en worden hoge concentraties gemeten. Een gevoelige en gevalideerde methode voor de analyse van een vijftal veel gebruikte kunstmatige zoetstoffen, namelijk acesulfaam-K, sacharine, cyclamaat-Na, sucralose en aspartaam is ontwikkeld. De methode is gebaseerd op een directe injectie van het watermonster na toevoeging van gelabelde interne standaarden, zonder verdere voorbereiding. Bij een eerste verkennende studie door KWR naar de aanwezigheid van kunstmatige zoetstoffen in watermonsters zijn er meerdere van deze stoffen in oppervlaktewater aangetoond, de stof acesulfaam-K zelfs tot enkele microgrammen per liter. Met de ontwikkelde gevalideerde methode kunnen de vijf meest voorkomende kunstmatige zoetstoffen geanalyseerd worden en de methode kan ingezet worden om deze stoffen in het aquatisch milieu en drinkwater te monitoren.

MRI-contraststoffen vallen in de categorie geneesmiddelen en worden voornamelijk gebruikt in ziekenhuizen voor het opnemen van MRI-scans. Sinds de introductie van gadolinium gebaseerde MRI-contraststoffen in de jaren '80 is het gebruik van deze stoffen sterk toegenomen. Door dit veelvuldige gebruik kunnen deze MRI-contraststoffen in het afvalwater van de ziekenhuizen terechtkomen, en vervolgens ook in het oppervlaktewater. Om meer zicht te krijgen op de aanwezigheid van de verschillende MRI-contraststoffen in afvalwater van ziekenhuizen en oppervlaktewater is een betrouwbare kwantitatieve analysemethode nodig waarbij de meest toegepaste middelen geanalyseerd kunnen worden. Voor het opzetten van een methode is er een unieke koppeling gemaakt tussen vloeistof chromatografie (LC) en ICP-MS. Op dit moment kunnen acht MRI-stoffen geanalyseerd worden tot op een concentratieniveau van circa 1,0 µg/l. Verdere optimalisatie van deze methode is nodig om de stoffen op een lager concentratieniveau te kunnen meten. Vervolgens dient een validatie van de methode uitgevoerd te worden.

Naast het meten van doelstoffen wordt in dit rapport ook aandacht besteed aan optimalisatie van de brede screening van organisch chemische stoffen met LC-Orbitrap-MS screening. Hierbij worden zowel bekende als onbekende stoffen geanalyseerd boven een vastgestelde concentratiegrens. Onderzoek is uitgevoerd om zowel de hardware als de software te optimaliseren. M.b.t. de hardware werd een betere signaal/ruis verhouding verkregen door gebruik te maken van een verwarmde MS-interface (HESI). De LC-pieksymmetrie werd aanzienlijk verbeterd door gebruik te maken van een andere LC-kolom.

M.b.t. de software is de dataverwerking verbeterd zodat veel meer gegevens uit de meetdata kunnen worden verkregen. Hiervoor zijn 2 nieuwe software pakketen getest en vervolgens toegepast in lopend onderzoek. Het software pakket Sieve is een zeer bruikbare tool voor efficiënte analyse van brede screeningsdata. Statistisch significante verschillen kunnen hiermee snel worden opgespoord. ExactFinder is een software tool om in retrospectief in screeningsdata te zoeken naar een lijst van componenten. Met deze twee softwarepakketen is het nu mogelijk om onderzoek uit te voeren naar de trends van organische microverontreinigingen over langere tijd, het onderling vergelijken van monsters, alsook het tegelijkertijd screenen van een aantal (bekende en/of onbekende) stoffen in een groot aantal monsters.

Inhoud

Voorwoord	1
Samenvatting	3
Inhoud	5
1 Inleiding	7
2 Kunstmatige zoetstoffen	9
2.1 Belang	9
2.2 Beschrijving analysemethode	10
2.3 Conclusies en aanbevelingen	13
3 MRI-contraststoffen	15
3.1 Belang	15
3.2 Beschrijving methodeontwikkeling	17
3.3 Conclusies en aanbevelingen	21
4 Optimalisatie brede screening	23
4.1 Inleiding	23
4.2 Hardware	23
4.2.1 Interface	23
4.2.2 LC-kolom	25
4.3 Software	28
4.3.1 Sieve	28
4.3.2 ExactFinder	32
4.4 Conclusies	34
5 Literatuur	35
Bijlage 1: analyseprotocol zoetstoffen	37
Bijlage 2: standaardinstellingen ICP-MS	41
Bijlage 3: totaallijst stoffen voor testen van screeningsmethode	43

1 Inleiding

De toenemende productie van allerlei bestaande en nieuwe stoffen zoals pesticiden, geneesmiddelen, kunstmatige zoetstoffen, drugs, hormonen, nanochemicaliën en fluorverbindingen heeft grote bezorgdheid gewekt bij wetenschappers over de hele wereld (Richardson *et al.*, 2008). De mogelijke risico's voor het milieu en voor de mens van deze zogenaamde 'emerging compounds' zijn onbekend. Voor een betrouwbare risicobeoordeling van deze stoffen is informatie nodig over hun verspreiding in het milieu. Om deze informatie te verkrijgen zijn betrouwbare analysemethoden nodig die deze stoffen op lage concentratieniveaus kwantitatief kunnen meten.

Binnen het BTO-project 'Analysis of Emerging Compounds' zijn analysemethoden ontwikkeld om verschillende klassen van 'emerging compounds' te kunnen analyseren. Voor de analyse van hormonen en hormoonverstorende stoffen is bij KWR al jaren een analysemethode beschikbaar (Van Leerdam *et al.*, 2006). Deze methode is toepasbaar voor de analyse van de stoffen estron, 17- α -estradiol, 17- β -estradiol, 17- α -ethinylestradiol en estriol op nanogram per liter niveau. In 2011 is een bestaande analysemethode voor het meten van bestrijdingsmiddelen uitgebreid met ca. 10 polaire metaboliëten (Vughs *et al.*, 2012).

De aanwezigheid van fluorverbindingen in het milieu wordt al jaren uitgebreid bestudeerd door middel van nationaal en Europees onderzoek. De laatste jaren wordt een steeds completer beeld verkregen van de aanwezigheid van deze stoffen in het milieu maar ook in de bronnen voor de drinkwaterbereiding. Voor het analyseren van organische poly- en perfluorverbindingen in water heeft KWR in nauwe samenwerking met de Universiteit van Amsterdam een gevalideerde methode ontwikkeld (Eschauzier *et al.*, 2010)

In 2010 is KWR gestart met het opzetten van analysemethoden voor het analyseren van verdovende middelen, partydrugs en barbituraten. In 2009 is een gezamenlijke studie van KWR, RIVM en enkele buitenlandse universiteiten is onderzoek uitgevoerd naar de aanwezigheid van deze stoffen in Nederlands rioolwater, oppervlaktewater en drinkwater (van der Aa *et al.*, 2011). In 2011 is een grootschalig Europees onderzoek uitgevoerd, waarbij het rioolwater van 19 grote steden in Europa is onderzocht (Thomas *et al.*, 2012). Voor dit onderzoek, dat in 2012 herhaald is (publicatie in voorbereiding) was in 2012 ook veel media aandacht.

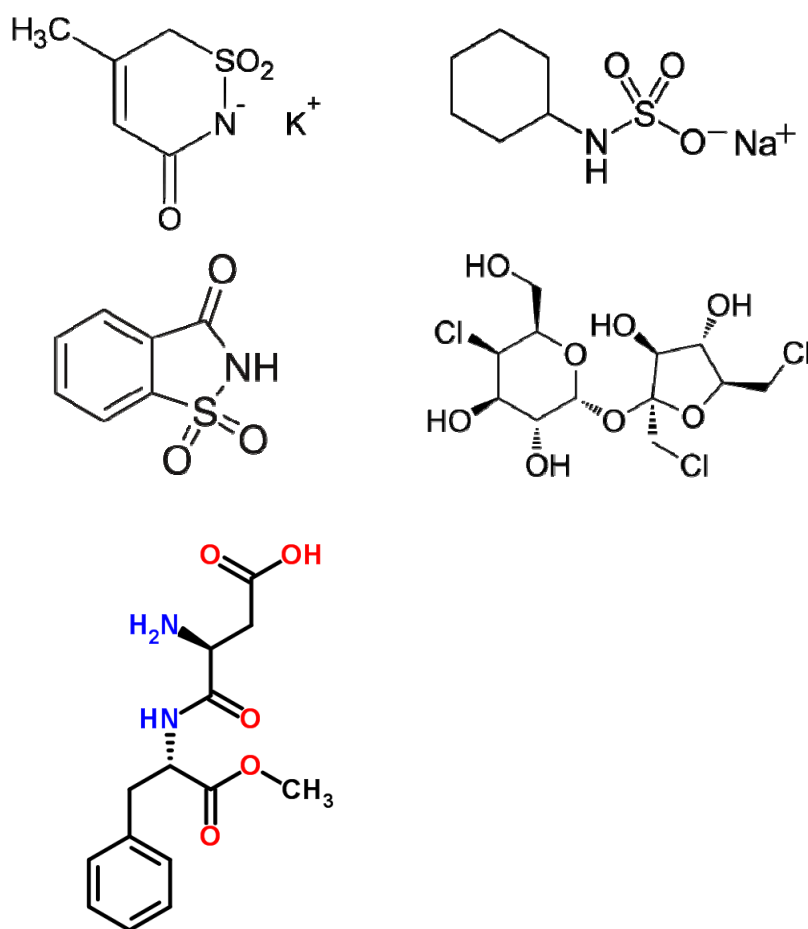
Binnen het BTO-project 'Analysis of Emerging Compounds' zijn analysemethoden ontwikkeld om ook andere klassen van 'emerging compounds' te kunnen analyseren, namelijk kunstmatige zoetstoffen en MRI-contraststoffen. De ontwikkeling van deze methoden worden in het voorliggende rapport beschreven.

Naast de doelstofanalyse van stoffen die voorkomen in (bronnen) van drinkwater, is er een brede screening ingezet met behulp van LC-Orbitrap-MS. De Orbitrap massaspectrometer is geïnstalleerd bij KWR in april 2006 en operationeel vanaf de herfst 2006. Dit instrument wordt ingezet voor zowel de analyse van doelstoffen als brede screening van onbekende stoffen. Bij deze brede screening worden de stoffen geïsoleerd met behulp van Solid Phase Extraction (SPE) bij pH 2,3. Na scheiding van de componenten op een C18 kolom worden deze gemeten op de Orbitrap-MS met een scangebied van 50-1300 Da. De analysetijd is ongeveer één uur. In dit rapport wordt ook aandacht besteed aan de optimalisatie van deze methode, aan zowel de hardware- als de softwarekant.

2 Kunstmatige zoetstoffen

2.1 Belang

Door de grotere behoefte aan producten met een laag caloriegehalte neemt het gebruik van zoetstoffen als alternatief voor suiker in voedsel en dranken toe (Whitehouse *et al.*, 2008). Ook worden zoetstoffen gebruikt in verzorgingsproducten en medicijnen. De stoffen worden in grote hoeveelheden geconsumeerd, en bepaalde zoetstoffen zoals acesulfaam-K, sacharine, cyclamaat en sucralose worden in het menselijk lichaam niet afgebroken, maar onveranderd uitgescheiden via de urine of feces (Renwick *et al.*, 1986). De structuurformules en eigenschappen van de 5 kunstmatige zoetstoffen die in deze studie zijn bestudeerd, worden gepresenteerd in respectievelijk Figuur 1 en Tabel 1.



Figuur 1. Structuurformules van kunstmatige zoetstoffen: acesulfaam (linksboven), cyclamaat (rechtsboven), sacharine (links midden), sucralose (rechts midden) en aspartaam (onder).

Door hun stabiliteit en persistentie worden de zoetstoffen niet volledig afgebroken in afvalwaterzuiveringsinstallaties en kunnen ze via het gezuiverde afvalwater in rivieren en stromen terechtkomen (Scheurer *et al.*, 2009). In Europa komen de zoetstoffen wijdverbreid in het oppervlaktewater voor en worden hoge concentraties gemeten. Acesulfaam is aangetroffen in concentraties tot 5 µg/L, sucralose in concentraties tot 1 µg/L en sacharine en cyclamaat in concentraties tussen de 50 en 150 ng/L (Buerge *et al.*, 2009; Loos *et al.*, 2009; Scheurer *et al.*, 2009). Zoetstoffen behoren daarom tot de groep van "emerging contaminants" (Houtman *et al.*, 2010).

Tientallen tot honderden toxiciteitstudies zijn doorgevoerd met de verschillende zoetstoffen om eventuele effecten te achterhalen. De meeste studies tonen aan dat zoetstoffen veilig gebruikt kunnen worden, maar in een paar testen zijn negatieve effecten gevonden: zo blijkt dat acesulfaam DNA schade kan veroorzaken in muizen als het in hoge concentraties (vanaf 60 mg/kg/d) wordt toegediend (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Uit oudere onderzoeken zijn aanwijzingen naar voren gekomen dat hoge concentraties cyclamaat en sacharine misschien een rol zouden kunnen spelen bij blaaskanker (Oser *et al.*, 1975; review door Arnold *et al.*, 1983), maar latere onderzoeken spreken dit tegen (Weihrauch en Diehl *et al.*, 2004; Whitehouse *et al.*, 2008). Doordat sacharine niet met DNA reageert en niet gemetaboliseerd wordt in het lichaam mist het twee belangrijke eigenschappen van een carcinogene stof. Dit is nogmaals bevestigd in 14 één-generatie dierstudies met verschillende organismen waarin na blootstelling aan hoge doses in geen enkel orgaan kanker werd geïnduceerd (Weihrauch en Diehl *et al.*, 2004). Hoge doses sucralose resulteerden in een verkleinde schildklier bij ratten, maar dit was waarschijnlijk een gevolg van een tekort aan nutriënten door een verminderde voedselopname (Grice en Goldsmith *et al.*, 2000). Een mogelijk effect dat toegewezen is aan sucralose is het veroorzaken van migraine (Bigal en Krymchantowski *et al.*, 2006). Ook mogelijke effecten op de glucose regulatie een oorzaak van toenemende aandacht voor zoetstoffen (Whitehouse *et al.*, 2008).

De langetermijneffecten van chronische blootstelling aan lage concentraties van deze stoffen zijn onbekend en vormen daarom een reden tot zorg. Vooral voor gevoelige populaties zoals diabetici, kinderen (Whitehouse *et al.*, 2008). Ook milieurisico's zijn nog onvoldoende belicht. De aanwezigheid van zoetstoffen kan mogelijk leiden tot veranderingen in het eetgedrag van organismen of de fotosynthese van planten verstoren (Lubick *et al.*, 2008).

Tabel 1. Eigenschappen kunstmatige zoetstoffen

	Molecuulformule	CAS nummer	MW	E-nummer ^b	Log K _{ow} ^a	Oplosbaarheid (g/L) ^a	Zoetheid tov sacharose ^b
Acesulfaam-K	C ₄ H ₄ KNO ₄ S	55589-62-3	200,9	E950	-1,3*	910*	200
Cyclamaat-Na	C ₇ H ₅ NO ₃ S	139-05-9	183,0	E952	-1,6*	1000*	30
Sacharine	C ₆ H ₁₂ NNaO ₃ S	139-05-9	201,0	E954	0,9	4	550
Sucralose	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₃ O ₈	56038-13-2	396,0	E955	-1,0*	23*	650
Aspartaam	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	22839-47-0	294,1	E951	0,1*	10*	200

^a EPIWEB 4.1. Geschatte waarden zijn aangegeven met een *

^b <http://www.food-info.net/nl/sweet>

De zoetstoffen zijn goedgekeurd voor gebruik als voedseladditief. Aanvaardbare dagelijkse innames (ADI) zijn door Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) vastgesteld op 5 mg/kg lichaamsgewicht voor sacharine, 11 mg/kg voor cyclamaat, en 15 mg/kg voor acesulfaam en sucralose. Het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid in Brussel (ISP WIW) geeft hiervoor op (ADI): 5 mg/kg voor sacharine, 7 mg/kg voor cyclamaat, 9 mg/kg voor acesulfaam, 15 mg/kg voor sucralose en 40mg/kg voor aspartaam.

2.2 Beschrijving analysemethode

Voor het opzetten van een analysemethode zijn 5 kunstmatige zoetstoffen geselecteerd (zie tabel 1) die veel worden gebruikt voor menselijke consumptie. De methode is opgezet voor 3 verschillende matrices, namelijk ultrazuiver water, drinkwater en oppervlaktewater. Voor het ontwikkelen van een analysemethode is zoveel mogelijk aangesloten bij de methodieken die in de literatuur beschreven zijn (Scheurer *et al.*, 2009).

Om de monstervoorbewerking zo eenvoudig mogelijk te houden is gekozen voor een directe injectie van het watermonster. Het watermonster wordt hierbij alleen gefiltreerd, zonder isolatiestap. Aan het watermonster worden eerst gelabelde interne standaarden toegevoegd met een concentratie van 1 µg/L,

vervolgens wordt het monster gefiltreerd over een 0,20 µm filter. Van het gefiltreerde water wordt 100 µl rechtstreeks met behulp van een injectieloop op de UPLC-kolom geïnjecteerd. De analyse wordt uitgevoerd met ultra performance vloeistof chromatografie in combinatie met electrospray tandem massaspectrometrie (UPLC-ESI-MS/MS). Met deze aanpak konden in het traject van de methode-ontwikkeling al snel alle vijf de stoffen geanalyseerd worden tot op een laag concentratieniveau (tot 0,1 µg/L). Vervolgens is de methode gevalideerd.

Het gehalte van de zoetstoffen wordt berekend aan de hand van een externe kalibratiecurve, waarbij voor elke stof gecorrigeerd wordt voor de specifieke interne standaard (dit is een deuterium gelabelde stof; zie bijlage 1). In tabel 2 staan de validatiegegevens van de analysemethode voor de verschillende kunstmatige zoetstoffen in de verschillende matrices.

Tabel 2: Vastgestelde herhaalbaarheid, recovery en aantoonbaarheidsgrens voor zoetstoffen in ultrazuiver water, drinkwater en oppervlaktewater (n=8)

Ultrazuiver water				
Component	Herhaalbaarheid 0,05 µg/L (%)	Herhaalbaarheid 0,7 µg/L (%)	Recovery 0,7 µg/L (%)	Aantoonbaarheidsgrens (µg/L)
Acesulfaam-K	2	2	100	0,004
Sacharine	NA	4	92	0,08
Cyclamaat-Na	3	2	101	0,005
Sucralose	12	3	108	0,02
Aspartaam	2	1	98	0,003
Drinkwater				
Component	Herhaalbaarheid 0,05 µg/L (%)	Herhaalbaarheid 0,7 µg/L (%)	Recovery 0,7 µg/L (%)	Aantoonbaarheidsgrens (µg/L)
Acesulfaam-K	6	1	99	0,01
Sacharine	NA	5	96	0,11
Cyclamaat-Na	5	2	134	0,007
Sucralose	13	5	106	0,03
Aspartaam	17	3	72	0,03
Oppervlaktewater				
Component	Herhaalbaarheid 0,1 µg/L (%)	Herhaalbaarheid 0,7 µg/L (%)	Recovery 0,7 µg/L (%)	Aantoonbaarheidsgrens (µg/L)
Acesulfaam-K	31	8	112	0,10
Sacharine	17	4	106	0,06
Cyclamaat-Na	3	1	137	0,01
Sucralose	29	3	106	0,07
Aspartaam	4	1	90	0,02

NA = niet te bepalen

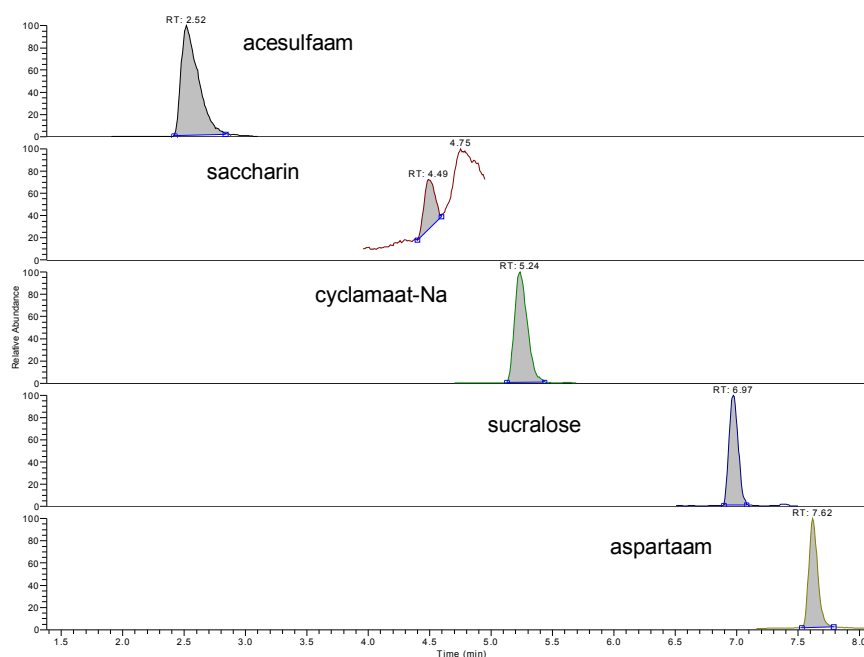
Uit tabel 2 blijkt dat de ontwikkelde analysemethode goed bruikbaar is voor het gewenste meetniveau van 0,1 µg/L. Met uitzondering van de zoetstof sacharine zijn alle zoetstoffen zelfs goed meetbaar op het niveau van 0,05 µg/L of lager.

De recovery of terugvindbaarheid geeft voor cyclamaat-Na een verhoogde opbrengst en voor aspartaam een lagere opbrengst in drinkwater en oppervlaktewater. Ondanks het gebruik van specifieke interne standaarden per zoetstof heeft de matrix een effect op de recovery van zowel cyclamaat-Na en aspartaam. Dit effect is waargenomen op het concentratieniveau van 0,1 en 0,7 µg/L.

In de blanco opwerking van drinkwater zijn in het LC-chromatogram op de plaats waar cyclamaat-Na en aspartaam elueren op een laag niveau stoortpieken waargenomen (voldoen niet aan de identificatie criteria voor deze stoffen) waardoor de recovery mogelijk wordt beïnvloed. Bij het volgen van de controlemetingen (controlekaarten) zal hier nog aandacht aan worden besteed.

In het oppervlaktewater (Lekkanaal-Nieuwegein) is de zoetstof acesulfaam-K in concentraties van enkele $\mu\text{g/L}$ aangetroffen. De zoetstoffen sacharin en cyclamaat-Na zijn met enkele tientallen ng/L aangetroffen. Sucralose en aspartaam werden vooralsnog niet kwantificeerbaar in het oppervlaktewater aangetroffen. Door de aanwezigheid van deze zoetstoffen in het oppervlaktewater was de herhaalbaarheid van deze stoffen op een laag additieniveau ($0,1 \mu\text{g/L}$) moeilijk vast te stellen. De vrij hoge spreiding van de verkregen resultaten is hierdoor op het lage additieniveau te verklaren. De spreiding van de resultaten op het additieniveau van $0,7 \mu\text{g/L}$ is dan ook teruggebracht tot een spreiding van normale properties.

In figuur 2a is het UPLC-MS/MS chromatogram van ultrazuiver water waaraan de vijf zoetstoffen zijn toegevoegd met een concentratie van $0,1 \mu\text{g/L}$ weergegeven en in figuur 2b is het UPLC-MS/MS chromatogram van oppervlaktewater (Lekkanaal) zonder additie weergegeven.



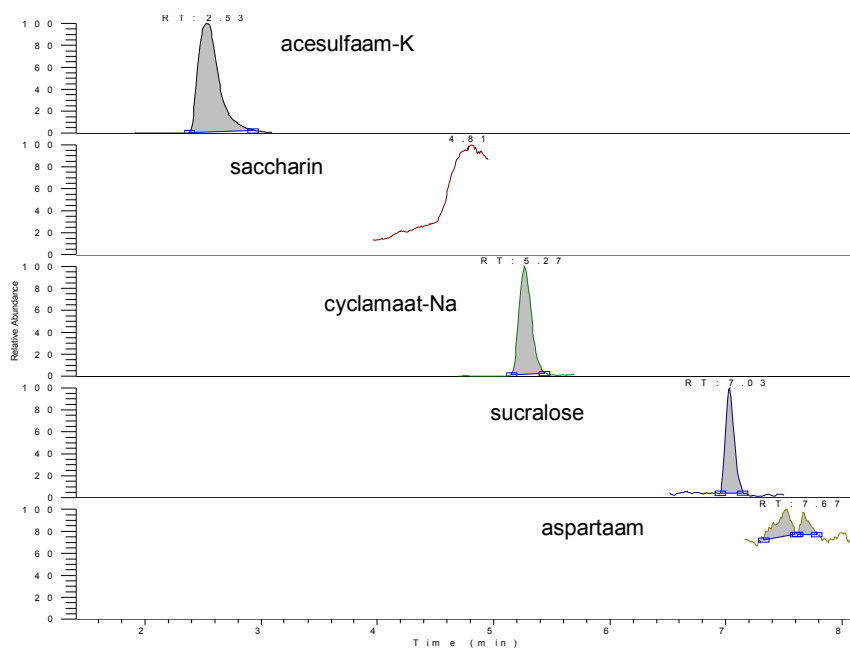
Figuur 2a: UPLC-MS/MS chromatogram van vijf zoetstoffen op een concentratieniveau van $0,1 \mu\text{g/L}$ in ultrapuur water.

Opvallend is de hoge achtergrond voor de stof sacharin (Figuur 2a). De som van de twee specifieke MRM overgangen ($181,8 \rightarrow 42,0$ en $181,8 \rightarrow 106,0$) zijn minder selectief. Andere overgangen waren echter alleen met lagere intensiteit beschikbaar en daardoor niet bruikbaar.

In het oppervlaktewater van het Lekkanaal (Nieuwegein, dd. 29 februari 2012) is de zoetstof acesulfaam met een concentratie van $2,1 \mu\text{g/L}$ aangetroffen. Sacharine werd met een concentratie van $0,20 \mu\text{g/L}$ en cyclamaat-Na met een concentratie van $0,16 \mu\text{g/L}$ aangetroffen in dit watermonster. Sucralose en aspartaam zijn in dit monster niet aangetoond.

Ook in de Maas (monsternamen 22 augustus 2012, locatie Brakel) zijn zoetstoffen aangetoond. Acesulfaam met een concentratie van $3,1 \mu\text{g/L}$, sucralose $0,71 \mu\text{g/L}$ en cyclamaat-Na met een concentratie van $0,09 \mu\text{g/L}$. Sacharine en aspartaam zijn in dit monster niet aangetoond.

In figuur 2b is het UPLC-MS/MS chromatogram van het Maasmonster weergegeven.



Figuur 2b: UHPLC-MS/MS chromatogram van vijf zoetstoffen in Maaswater (locatie Brakel) van 22 augustus 2012.

2.3 Conclusies en aanbevelingen

Een gevoelige en gevalideerde methode voor de analyse van een vijftal veel gebruikte kunstmatige zoetstoffen is ontwikkeld. De methode is gebaseerd op een directe injectie van het watermonster na toevoeging van vijf gelabelde interne standaarden, zonder verdere voorbereiding. Deze methode kan ingezet worden om deze stoffen in het aquatisch milieu te monitoren.

3 MRI-contraststoffen

3.1 Belang

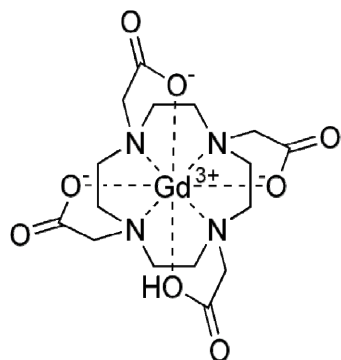
Magnetic Resonance Imaging (MRI) is een vorm van medische beeldvorming met behulp van kernspinresonantie die hoofdzakelijk wordt uitgevoerd in ziekenhuizen. Hierbij wordt gebruikgemaakt van een MRI-scanner (Idee et al. 2006). Bovendien is het nodig dat er contrast is te zien op de foto. Men wil immers de organen en hun structuren kunnen onderscheiden om zo een oordeel over de conditie van het orgaan te kunnen uitspreken. Dit contrast (zwartingsverschil) ontstaat doordat röntgenstraling in verschillende mate wordt geabsorbeerd door het lichaam. Delen van het lichaam die veel röntgenstraling doorlaten, zullen zwarter op de foto worden afgebeeld dan delen die weinig straling doorlaten. Sommige weefsels echter, laten röntgenstraling ongeveer in gelijke mate door. Om deze weefsels dan toch nog duidelijk van elkaar te kunnen onderscheiden, wordt gebruik gemaakt van contrastmiddelen. Deze contrastmiddelen kunnen ingedeeld worden in negatieve en positieve contrastmiddelen. Negatieve contrastmiddelen zoals lucht of koolstofdioxide absorberen weinig röntgenstraling, positieve contrastmiddelen absorberen röntgenstraling juist heel sterk (www.wikipedia.nl).

Veel toegepaste contrastmiddelen voor MRI-diagnostiek zijn organische stoffen waarin gadolinium aanwezig is. Gadolinium is een scheikundig element met symbool Gd, atoomnummer 64 en komt in zes stabiele isotopen voor in de natuur (de isotoop met massa 158 in de grootste hoeveelheid). Gadolinium is een zilverwit buigzaam en makkelijk te vervormen metaal met een metallieke glans. In de natuur komt gadolinium niet voor als vrij element, maar als bestanddeel van diverse mineralen waarin ook andere Lanthaniden worden aangetroffen.

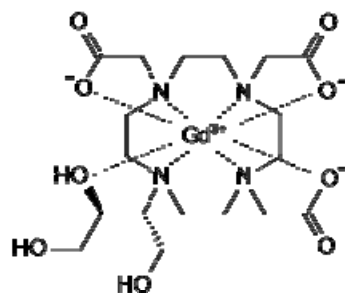
Sinds de introductie van gadolinium gebaseerde MRI-contraststoffen in de jaren '80 is het gebruik van deze stoffen sterk toegenomen (Idee et al., 2006). Door dit veelvuldige gebruik komen de stoffen in het afvalwater van de ziekenhuizen terecht en kunnen ze uiteindelijk ook in de rivier terecht komen. Bij metingen van gadolinium in afvalwater van ziekenhuizen in Duitsland werden concentraties tot enkele tientallen $\mu\text{g}/\text{l}$ gemeten (Kümmerer et al., 2000). Bij deze studie is steeds het totaalgehalte gadolinium bepaald en is geen onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van specifieke gadolinium gebaseerde MRI-contraststoffen.

Om meer zicht te krijgen op de aanwezigheid van de verschillende MRI-contraststoffen in afvalwater van ziekenhuizen en rivierwater is een betrouwbare kwantitatieve analysemethode nodig waarbij de meest toegepaste middelen afzonderlijk geïdentificeerd en geanalyseerd kunnen worden.

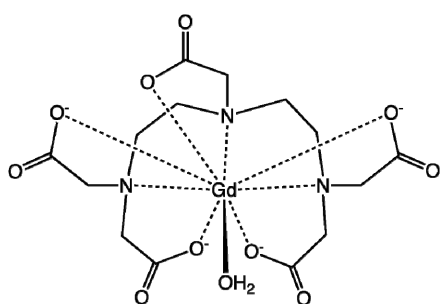
In Figuur 3 staan de structuurformules van acht veel toegepaste MRI-contraststoffen weergegeven.



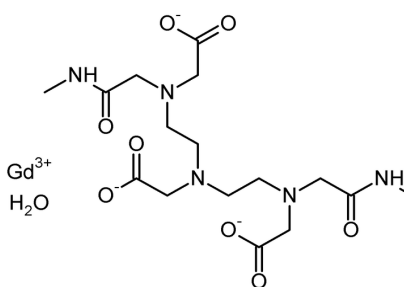
Dotarem



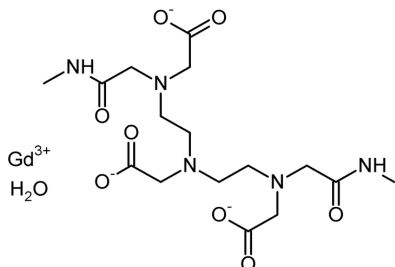
Gadovist



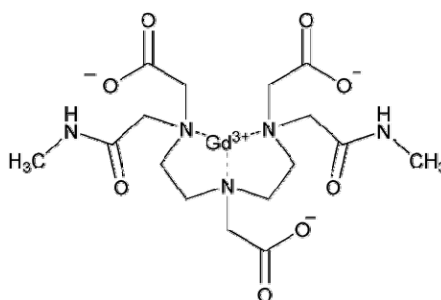
Magnevist



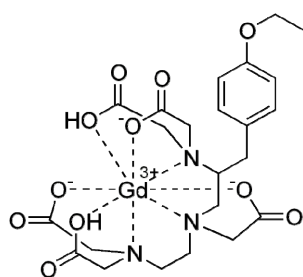
Multihance



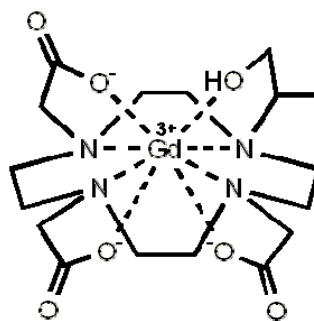
Omniscan



Optimark



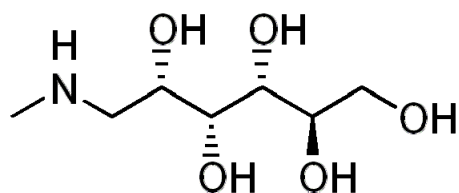
Primovist



Prohance

Figuur 3. Structuurformules van acht veel toegepaste MRI-contraststoffen.

Als tegenion voor het positief geladen gadolinium wordt meestal meglumine (Figuur 4) gebruikt.



Figuur 4: Structuurformule van meglumine

3.2 Beschrijving methodeontwikkeling

In Tabel 3 zijn de acht MRI-contraststoffen weergegeven die bij het opzetten van een analysemethode zijn geselecteerd, samen met synoniem, brutoformule, molecuulgewicht, CAS-nummer en producent.

Tabel 3: Karakteristieken van de MRI-contraststoffen die geselecteerd zijn voor de ontwikkeling van de analysemethode

Stofnaam	Synoniem	Brutoformule	Molecuulgewicht (amu)	CAS-nummer	Producent
Dotarem	gadoteric acid	C ₁₆ H ₂₅ GdN ₄ O ₈	559	72573-82-1	Geurbet
Gadovist	gadobutrol	C ₁₈ H ₃₁ GdN ₄ O ₉	605	138071-82-6	Bayer Healthcare
Magnevist	gadopentetic acid	C ₁₄ H ₂₀ GdN ₃ O ₁₀	548	86050-77-3	Bayer Healthcare
Multihance	gadobenic acid	C ₂₂ H ₂₈ GdN ₃ O ₁₁	668	113662-23-0	Bracco
Omniscan	gadodiamide	C ₁₆ H ₂₈ GdN ₅ O ₉	574	122795-43-1	GE Healthcare
Optimark	gadoversetamide	C ₂₀ H ₃₄ GdN ₅ O ₁₀	662	131069-91-5	Covidien
Primovist	gadoxetic acid	C ₂₃ H ₃₀ GdN ₃ O ₁₁	682	135326-11-3	Bayer Healthcare
Prohance	gadoteridol	C ₁₇ H ₂₉ GdN ₄ O ₇	559	120066-54-8	Bracco

In de literatuur zijn vooral studies beschikbaar waarbij de totaalconcentratie van gadolinium wordt gemeten in lichaamsvloeistoffen zoals plasma, serum, urine en feces. Deze metingen worden uitgevoerd door element selectieve methoden zoals ‘inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy’ (ICP-OES), ‘inductively coupled plasma-mass spectrometry’ (ICP-MS) of ‘atomic absorption spectroscopy’ (AAS) (Normann *et al.*, 2000, Saussereau *et al.*, 2008). Om meer gedetailleerde informatie te verzamelen over de aanwezigheid van de verschillende MRI-contraststoffen in het milieu zijn scheidingstechnieken nodig waarmee deze stoffen separaat gedetecteerd kunnen worden.

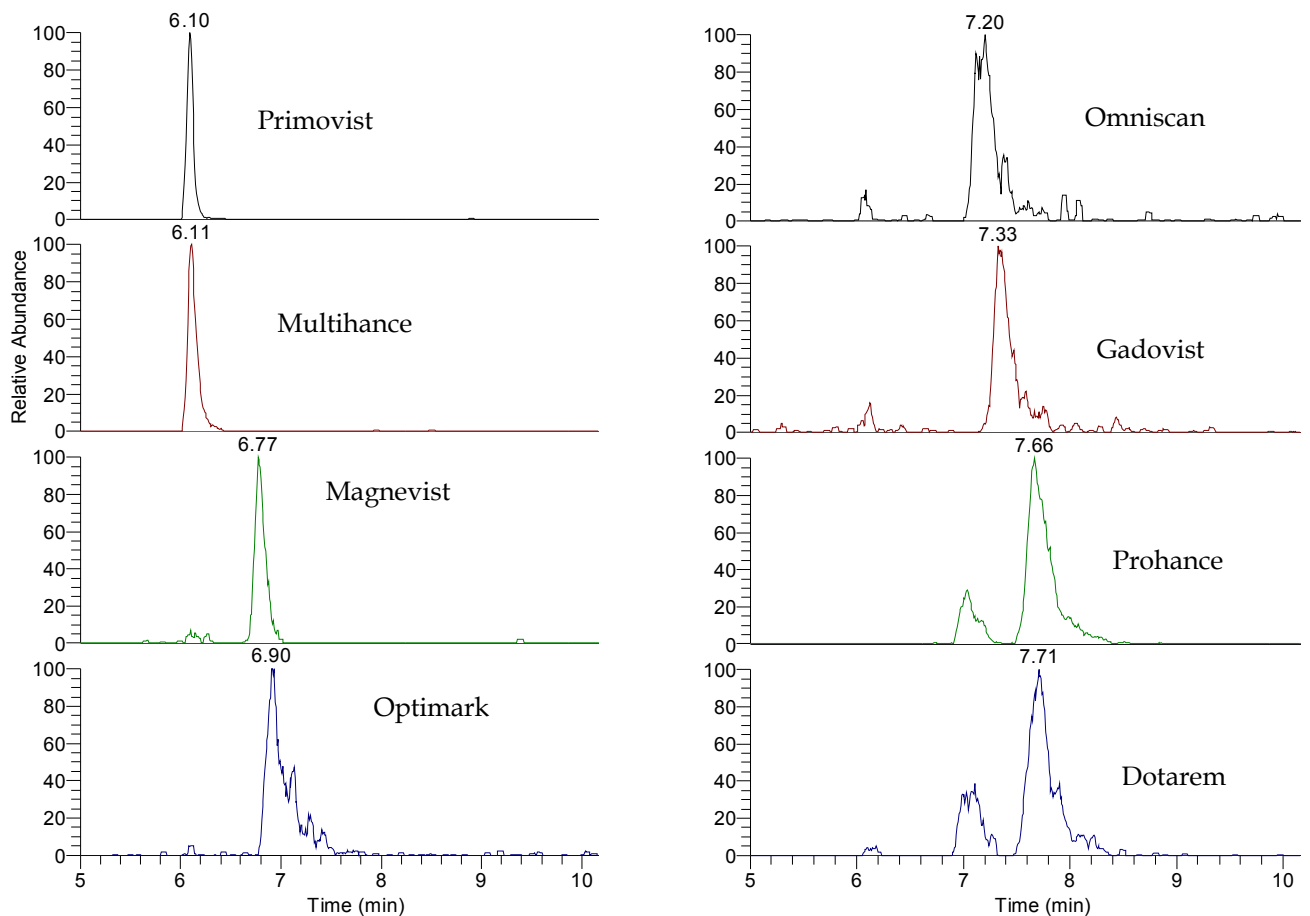
Bij het opzetten van een analysemethode is gestart met experimenten met vloeistofchromatografie in combinatie met electrospray tandem massaspectrometrie (LC-ESI-MS/MS). In Tabel 4 staan de instellingen van de massaspectrometer weergegeven. Voor de LC-scheiding is een C18-kolom gebruikt (Hypercarb, Thermo Scientific). In de literatuur zijn geen relevante publicaties beschikbaar over de analyse van afzonderlijke MRI-contraststoffen met LC-MS/MS.

Verschiedende samenstellingen van het LC-eluens zijn getest, waaronder het gebruik van methanol vs. acetonitril, waarbij acetonitril het beste resultaat gaf. Ook is gevarieerd met verschillende buffers in verschillende concentraties. Uiteindelijk bleek een buffer van 20 mM ammoniumformiaat het beste resultaat op te leveren.

Tabel 4: MS-instellingen voor de MRI-contraststoffen (positieve ionisatie)

Stofnaam	Parent ion	Product ion 1	Collision energy	Product ion 2	Collision energy	Product ion 3	Collision energy	Product ion 4	Coll. energy
Dotarem	560,17	384,2	26	428,2	37				
Gadovist	606,1	414,2	31	456,2	31	588,3	20	588,3	20
Magnevist	549,1	329,1	35	373,1	28				
Multihance	669,1	385,16	34	561,1	21	639,13	22		
Omniscan	575,1	370,1	33	469,1	27	513,2	22	513,2	22
Optimark	663,1	359,0	44	557,3	27	575,2	23	601,2	26
Primovist	683,1	463,2	31						
Prohance	560,1	359,1	39	428,2	29	384,2	45	384,2	45

De retentie van de MRI-contraststoffen op de Hypercarb kolom bleek slecht. Vervolgens is een hydrophilic interaction chromatography (HILIC) kolom gebruikt in combinatie met Normal Phase vloeistofchromatografie (NP-LC). HILIC wordt vooral ingezet bij de scheiding van polaire en ionogene stoffen (Alpert et al. 1990). Op deze kolom werd een significante verbetering van de retentie van de verschillende MRI-contraststoffen waargenomen (zie figuur 5). Uiteindelijk gaf een zogenaamde ZIC-HILIC kolom (afm. 150x2,1 mm, 3,5 µm deeltjes, 200Å metal free) met een ZIC-HILIC guard kolom (afm. 14x1,0 mm., 5µm, 200Å metal free) de beste resultaten met een LC-flow van ongeveer 100 µl/min. De gevoeligheid van de triple quadrupole massaspectrometer (Vantage, Thermo Scientific) bleek echter onvoldoende om de MRI-contraststoffen op het gewenste laag (µg/L) niveau te kunnen meten.



Figuur 5: LC-MS chromatogram van 8 MRI-contraststoffen bij een concentratie van 30 µg/L in ultrazuiver water gescheiden op een HILIC kolom, en gedetecteerd met een triple quadrupole massaspectrometer.

Om meer gevoeligheid te verkrijgen is overgestapt naar ICP-MS als detectietechniek (XSeries2, ThermoFisher), hierbij wordt gadolinium gemeten (specifiek ion 158). Om de individuele MRI-contraststoffen te kunnen meten is een voorscheidingstechniek nodig. Hiervoor is met hulp van ThermoFisher een koppeling gemaakt tussen vloeistof chromatografie (LC) en ICP-MS. In de literatuur zijn slechts enkele studies beschikbaar waarbij deze techniek wordt gebruikt (Chinthalapati *et al.*, 2009, Künnemeyer *et al.*, 2009).

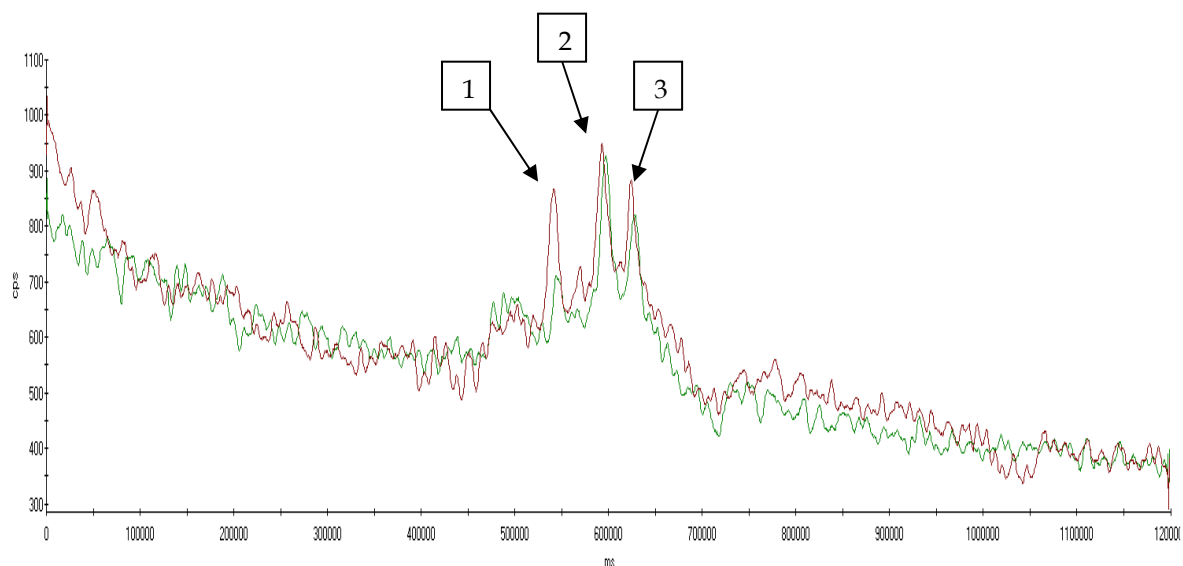
De instellingen van de ICP-MS verschillen niet zoveel van de standaardinstellingen (voor standaardinstellingen zie bijlage 2). De afwijkende instellingen zijn: RF Power 1400W, nebulizer flow 0.39L/min, auxiliary 0.80 L/min, cool flow 14 L/min, zuurstof bijmenging om roetvorming tegen te gaan, 30 mL/min, Peltier koeling ingesteld op -5°C en een 1.0 mm Quartz injector. Voor de LC-scheiding is dezelfde kolom gebruikt als bij de experimenten met de triple-quadrupool massaspectrometer.

In eerste instantie is geprobeerd om isocratisch een goede scheiding te krijgen met verschillende LC-flow snelheden. Hieruit kwam naar voren dat een lage flowsnelheid van 100 µl/min de beste scheiding geeft. Omdat de gebruikte LC-pomp ongeschikt was voor LC-flows lager dan 300 µl/min is gekozen voor een LC-flow van 300 µl/min.

Omdat de gevoeligheid bij een isocratische elutie onvoldoende blijkt te zijn is geprobeerd om de gevoeligheid te verbeteren door het optimaliseren van de LC-gradient. De beste scheiding en

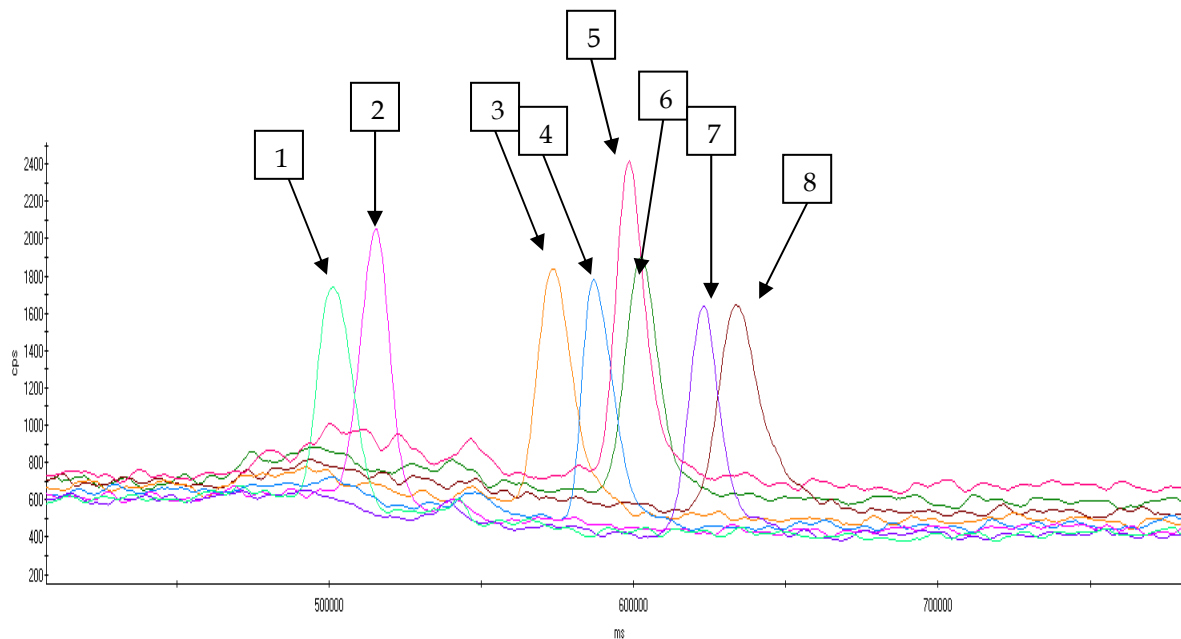
gevoeligheid werden bereikt met een combinatie van acetonitril en water met 20 mM mierenzuur (totale tijd gradiënt: 16 minuten).

Voor het testen van de methode op een praktijkmonster is rioolwater afkomstig van de RWZI Amsterdam-West gebruikt. In Figuur 6 zijn LC-ICP-MS chromatogrammen weergegeven met specifieke detectie van gadolinium (specifiek ion 158)



Figuur 6: LC-ICP-MS chromatogram van rioolwater Amsterdam-West (groene lijn) en hetzelfde monster met additie van 3 µg/L primovist (rode lijn). Op de y-as is de respons uitgezet, op de x-as de retentietijd in ms. De pieken 1,2 en 3 bevinden zich in het gebied 500.000-650.000 ms (8,3-10,8 min)

Door de additie van primovist aan het monster wordt de respons van piek 1 significant hoger. Dit is een sterke aanwijzing voor de aanwezigheid van primovist in het rioolwater. De identiteit van piek 2 en 3 is niet onderzocht, in ieder geval zijn het verbindingen die gadolinium bevatten.



Figuur 7: LC-ICP-MS chromatogram van alle acht MRI-contraststoffen in ultrazuiver water (concentratie 3 µg/L, afzonderlijk geïnjecteerd). Stoffen 1: primovist, 2: multihance, 3: optimark, 4: magnevist, 5: dotarem, 6: omniscan, 7: gadovist, 8: prohance.

In figuur 7 is het LC-ICP-MS chromatogram van alle acht MRI-contraststoffen weergegeven. De concentratie van deze stoffen is circa 3,0 µg/L in ultrazuiver water. Bij een concentratie van 3,0 µg/L MRI-contrast stoffen ligt de gadolinium concentratie ongeveer op 0,80 µg/L. De retentietijd van primovist in ultrazuiver water wijkt af van de retentietijd in het rioolwatermonster. Waarschijnlijk wordt deze verschuiving veroorzaakt door de aanwezige matrix in het rioolwatermonster.

De geschatte aantoonbaarheidsgrens ligt in de orde grootte van 0,5-1,0 µg/L MRI-contraststof. Dit resultaat komt dicht in de buurt van de gewenste aantoonbaarheidsgrens van 0,1 µg/L.

3.3 Conclusies en aanbevelingen

Een methode is ontwikkeld voor de analyse van 8 MRI-contraststoffen in water. Deze methode maakt gebruik van een unieke koppeling tussen LC en ICP-MS. Deze koppeling kan in de toekomst ook voor andere specifieke analyses gebruikt worden waarbij voorscheiding van de componenten nodig is (bijvoorbeeld de analyse van chroom-III en chroom-VI).

Om de ontwikkelde methode op basis van LC-ICP-MS verder te optimaliseren kan het volgende worden getest.

- gebruik van een LC-pomp die geschikt is voor het verpompen van kleine flows tot 100 µL/min.
- gebruik van een geschikte interne standaard om de variatie in retentietijd te kunnen corrigeren. Zonder interne standaard blijft het moeilijk om met zekerheid vast te stellen om welke component het gaat.
- Mogelijkheid om aan rhodium (Rh), een veel gebruikte interne standaard bij ICP-MS, de stof diethylenetriaminepentaactic acid (DTPA) te koppelen. Hierdoor zal er een Rh-DTPA complex ontstaan dat waarschijnlijk voldoende retentie zal hebben op de ZIC-HILIC kolom.
- Watermonster indampen (met bijv. rotatiefilmverdamer) om de aantoonbaarheidsgrens te verlagen.
- Optimalisatie van de LC-scheiding door verlaging van de kolom- en eluenttemperatuur.

4 Optimalisatie brede screening

4.1 Inleiding

De Orbitrap massaspectrometer is geïnstalleerd bij KWR in april 2006 en operationeel vanaf de herfst 2006. Dit instrument wordt ingezet voor de analyse van doelstoffen (oa. Benzotriazolonen, geneesmiddelen en verdovende middelen) en brede screening van onbekende stoffen. Bij deze brede screening worden de stoffen geïsoleerd met behulp van Solid Phase Extraction (SPE) bij pH 2,3. Na scheiding van de componenten op een C18 kolom worden deze gemeten de op Orbitrap MS met een scangebied van 50-1300 Da. De analysetijd is ongeveer één uur.

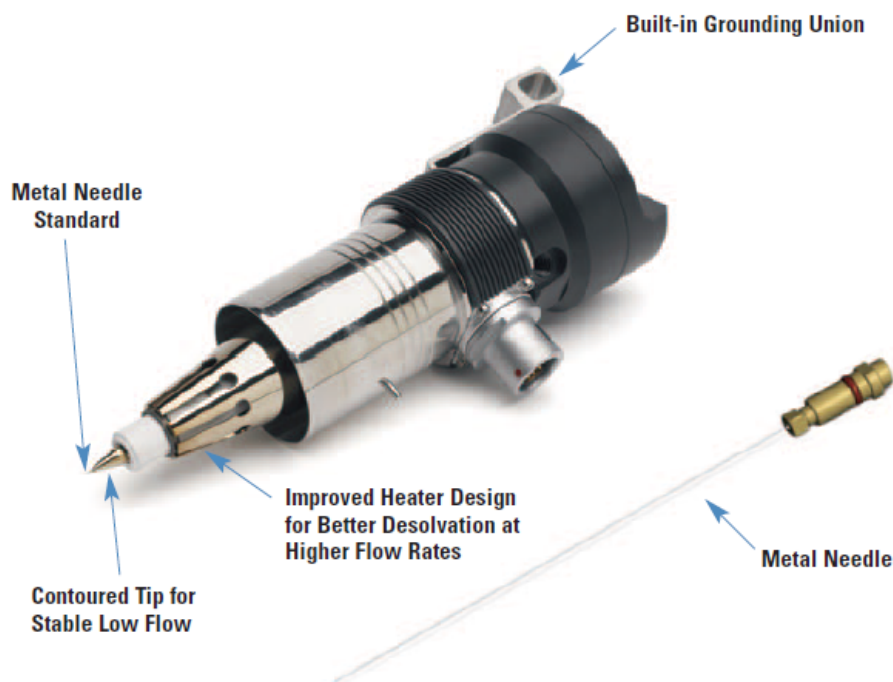
Deze brede screeningsmethode op basis van accurate massa metingen is sinds 2006 nauwelijks geoptimaliseerd. De belangrijkste reden om geen wijzigingen door te voeren is het voorkomen van een trendbreuk in de analyseresultaten. De opgeslagen massaspectra met retentie-index kunnen nu over een langere periode met elkaar vergeleken worden. In de vermelde periode van ruim 5 jaar zijn er in zowel hardware als software (dataverwerking) diverse ontwikkelingen geweest die mogelijk de bestaande methode voor brede screening verder kan optimaliseren.

In dit hoofdstuk wordt het testen van diverse nieuwe ontwikkelingen beschreven. Voor de hardware is een nieuwe ionisatie-interface en HPLC-kolom onderzocht. Met betrekking tot de software zijn er twee pakketten getest: Sieve voor het vergelijken van monsters op basis van accurate massa en ExactFinder voor het geautomatiseerd screenen van een groot aantal stoffen in een set monsters (beide pakketten van ThermoFisher Scientific).

4.2 Hardware

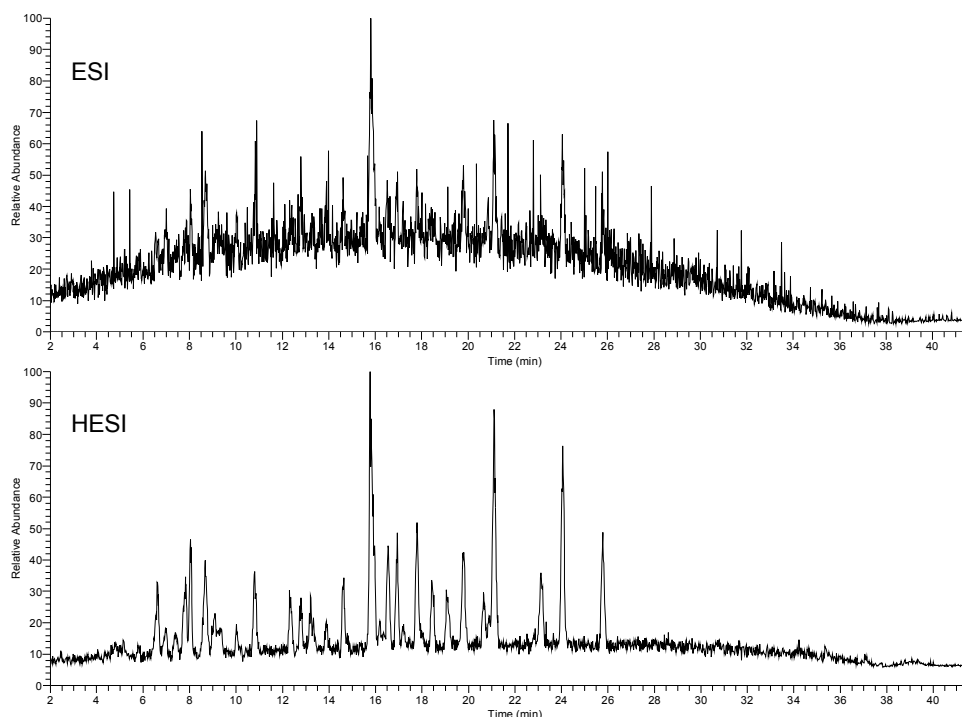
4.2.1 Interface

Om de ionisatie te verbeteren en daarmee ook de gevoeligheid is een verwarmde ElectroSpray interface geïnstalleerd (Heated Electro Spray Ionization, HESI). Figuur 8 toont deze interface.



Figuur 8: Weergave van HESI-interface

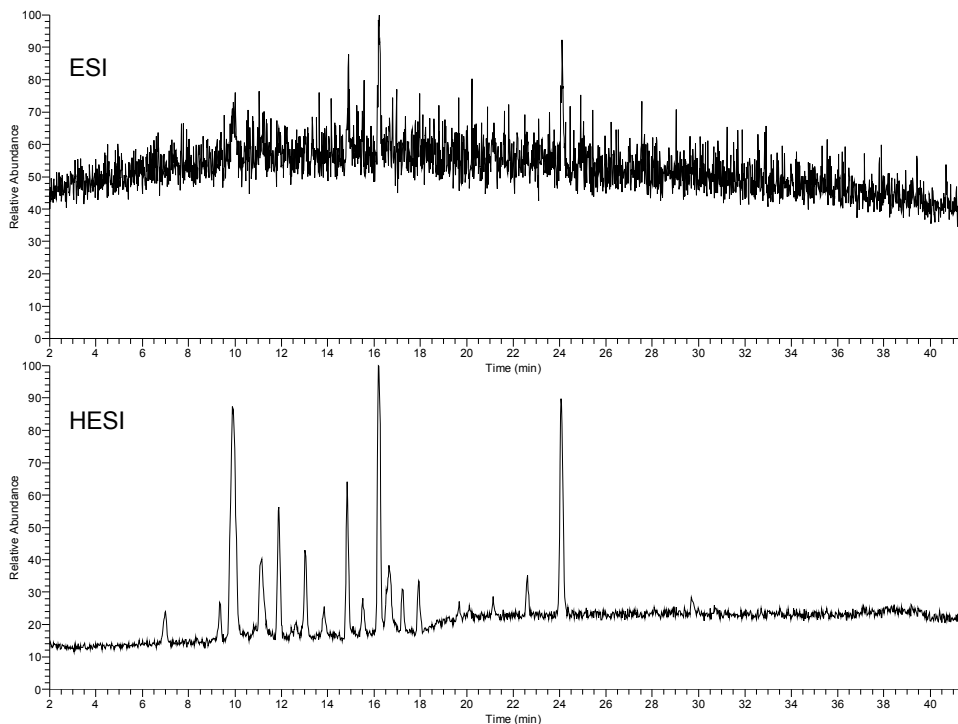
Om de verwachte gevoeligheidswinst van deze HESI interface te onderzoeken zijn de verkregen resultaten steeds vergeleken met de 'oude' (niet verwarmde) Electrospray (ESI) interface. Voor het vergelijk is een additie van een vijftigtal stoffen aan ultra-zuiver uitgevoerd (zie bijlage 3 voor de totale lijst met stoffen). In figuur 9 is het LC-MS chromatogram weergegeven van zowel de HESI als de ESI-interface, bij positieve ionisatie.



Figuur 9: LC-MS chromatogram van ultrazuiver water met additie van een set doelstoffen. Boven ESI, onder HESI (positieve ionen meting)

Uit de chromatogrammen is duidelijk te zien dat met HESI de signaal/ruis verhouding toeneemt. In het HESI-chromatogram zijn duidelijk veel pieken van de verschillende stoffen aanwezig. In het ESI-chromatogram zijn deze pieken niet zichtbaar door de aanwezige achtergrond.

In figuur 10 is hetzelfde vergelijk gemaakt, maar nu met negatieve ionen meting.

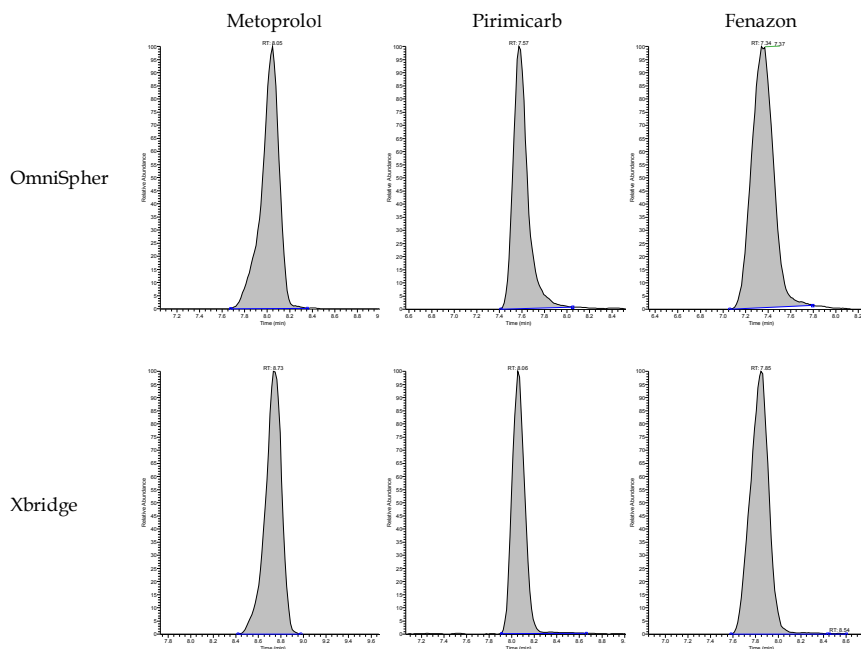


Figuur 10: LC-MS chromatogram van ultrazuiver water met additie van een set doelstoffen. Boven ESI, onder HESI (negatieve ionen meting)

Ook bij de negatieve ionen meting is een sterke verbetering van de signaal/ruis verhouding zichtbaar bij gebruik van de HESI interface. Deze HESI interface is vanaf de herfst 2012 in gebruik genomen en wordt nu standaard toegepast bij de brede screening met de Orbitrap.

4.2.2 LC-kolom

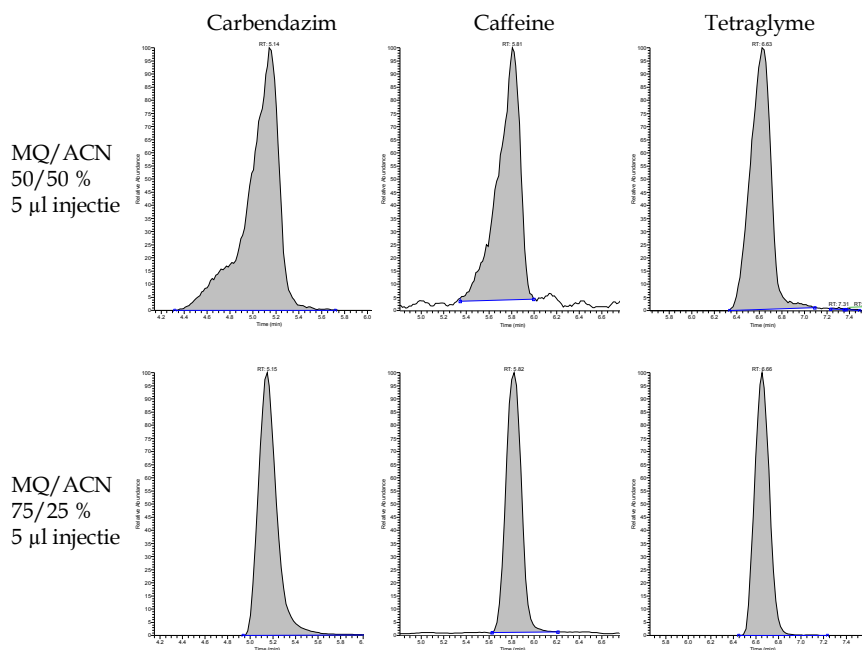
Naast het testen van een andere LC-MS interface zijn ook experimenten uitgevoerd om de HPLC-scheiding te verbeteren. Tot 2012 is een OmniSpher C18 kolom gebruikt (Varian OmniSpher C₁₈ 100 x 2,1 mm, 3,0 µm). Gekozen is voor de Xbridge C18 kolom (Waters Xbridge C₁₈ 150 x 2,1 mm, 3,5 µm). Voor de testen is hetzelfde geaddeerde monster gebruikt als voor de testen met de MS-interface. In figuur 11 zijn de ionchromatogrammen van drie stoffen (metoprolol, pirimicarb en fenazon) weergegeven bij analyse met zowel de OmniSpher als de Xbridge kolom. Deze drie stoffen zijn willekeurig gekozen uit de additiemix van 50 stoffen, maar geven een representatief beeld.



Figuur 11: Ionchromatogrammen van enkele doelstoffen op OmniSpher en Xbridge LC-kolom (positieve ionen meting).

Voor alle drie de stoffen wordt bij gebruik van de Xbridge LC-kolom een meer symmetrische piek verkregen. Dit experiment is ook gedaan bij negatieve ionen meting. Ook hier werd een duidelijke verbetering van de pieksymmetrie verkregen.

Om de pieksymmetrie nog verder te verbeteren is het percentage water in het monsterextract verhoogd van 50 naar 75%. Het injectievolume is gelijk gehouden (5 μ l). In figuur 12 is de invloed van de samenstelling van de injectievloeistof op de scheiding van enkele doelstoffen weergegeven. Vooral bij de meer polaire stoffen (kleine retentietijd) wordt de pieksymmetrie beter.



Figuur 12: Invloed van de samenstelling van de injectievloeistof op de scheiding van enkele doelstoffen op de X-bridge kolom (positieve ionen meting)

Door gebruik te maken van een andere LC-kolom en een andere samenstelling van de injectievloeistof kunnen de retentietijden (Kreti) van stoffen wijzigen. Om een beeld te vormen van de mogelijke wijzigingen zijn de relatieve retentietijden bij gebruik van de twee LC-kolommen met elkaar vergeleken. Het resultaat is opgenomen in tabel 5.

Tabel 5: Relatieve retentietijden van verschillende stoffen bij gebruik van een OmniSphere en Xbridge LC-kolom.

Stofnaam	OmniSpher Rt (min)	Xbridge Rt (min)	Verschil Rt (min)	Omnisphere Kreti	Xbridge Kreti	Verschil Kreti
Carbendazim	4,67	5,14	0,47	16,23	16,19	-0,04
Caffeïne	5,48	5,81	0,33	17,36	17,12	-0,24
Tetraglyme	6,24	6,64	0,40	18,42	18,28	-0,14
Sulfadimidine	6,85	7,44	0,60	19,26	19,39	0,12
Fenazon	7,34	7,86	0,52	19,95	19,97	0,02
Pirimicarb	7,57	8,04	0,47	20,28	20,22	-0,06
Metoprolol	8,05	8,75	0,70	20,94	21,20	0,26
Pentoxifylline	8,65	9,10	0,44	21,78	21,68	-0,10
Desethylatrazin	8,61	9,18	0,58	21,72	21,81	0,09
Chloridazon	8,80	9,33	0,53	21,99	22,01	0,03
Bentazon	9,26	10,01	0,75	22,62	22,95	0,33
Sulfamethoxazool	10,26	10,84	0,58	24,02	24,10	0,08
2,4-dinitrofenol	10,31	11,14	0,83	24,09	24,52	0,43
Metoxuron	11,84	12,34	0,50	26,23	26,18	-0,04
Simazin	12,26	12,79	0,53	26,81	26,81	0,00
Bromacil	12,45	13,03	0,58	27,08	27,14	0,06
Metribuzin	13,39	13,90	0,51	28,39	28,35	-0,03
Carbamazepin	13,97	14,63	0,65	29,20	29,36	0,16
Dichlorprop (2,4-DP)	14,95	15,52	0,58	30,56	30,61	0,05
Atrazin	15,38	15,92	0,54	31,16	31,16	0,00
Chloortoluron	15,38	15,94	0,56	31,16	31,18	0,02
Mecoprop (MCP)	15,99	16,57	0,58	32,01	32,05	0,05
Diuron	16,70	17,21	0,51	33,00	32,95	-0,05
Metobromuron	17,54	18,01	0,47	34,17	34,06	-0,11
Metazachloor	17,97	18,45	0,48	34,78	34,67	-0,11
2,4-dichloorfenol	18,03	18,65	0,62	34,85	34,94	0,09
Dimethomorf (E,Z)	19,07	19,76	0,68	36,31	36,48	0,18
Terbutylazin	19,28	19,80	0,52	36,59	36,54	-0,05
2,4-dichlooraniline	19,34	19,87	0,54	36,68	36,65	-0,03
Dimethenamide-P	20,17	20,65	0,48	37,84	37,72	-0,11
Linuron	20,23	20,73	0,50	37,92	37,83	-0,09
Tris-(2-chloor-isopropyl)-fosfaat	20,39	20,94	0,55	38,15	38,12	-0,02
Metolachloor	22,67	23,12	0,45	41,33	41,16	-0,17
Chloorpyrifos	30,47	30,79	0,31	52,20	51,79	-0,41

Uit de tabel blijkt voor de meeste stoffen dat de afwijking in de relatieve retentietijd zeer gering is. De grootste afwijking in de set met ruim 50 stoffen is 2,4-dinitrofenol met een afwijking in de Kreti van +0,43 min, en chloorpyrifos met een afwijking van -0,41 min. Omdat met de Xbridge LC-kolom een verbetering van de LC-scheiding wordt verkregen en de verschillen in relatieve retentietijden tussen de OmniSphere en Xbridge LC-kolom gering zijn wordt in het vervolg de Xbridge kolom gebruikt bij het screeningsonderzoek.

4.3 Software

Brede screening met LC-accurate MS levert veel bruikbare gegevens op over bekende en onbekende stoffen in een watermonster. Idealiter kan uit de meetgegevens de volgende informatie worden verkregen:

1. Bestuderen van trends bij gelijksoortige monsters zowel in tijd als ruimte (bijv. wat zijn de verschillen in de maandmonsters van de Rijn in 2012, en wat zijn de verschillen/overeenkomsten tussen Rijn en Maas monsters)
2. Screenen van bekende en onbekende stoffen in een groot aantal monsters (bijv. zoeken naar atrazine in maandmonsters rivierwater over de periode 2008-2012)
3. Identificatie van onbekende stoffen met behulp van de accurate massa.

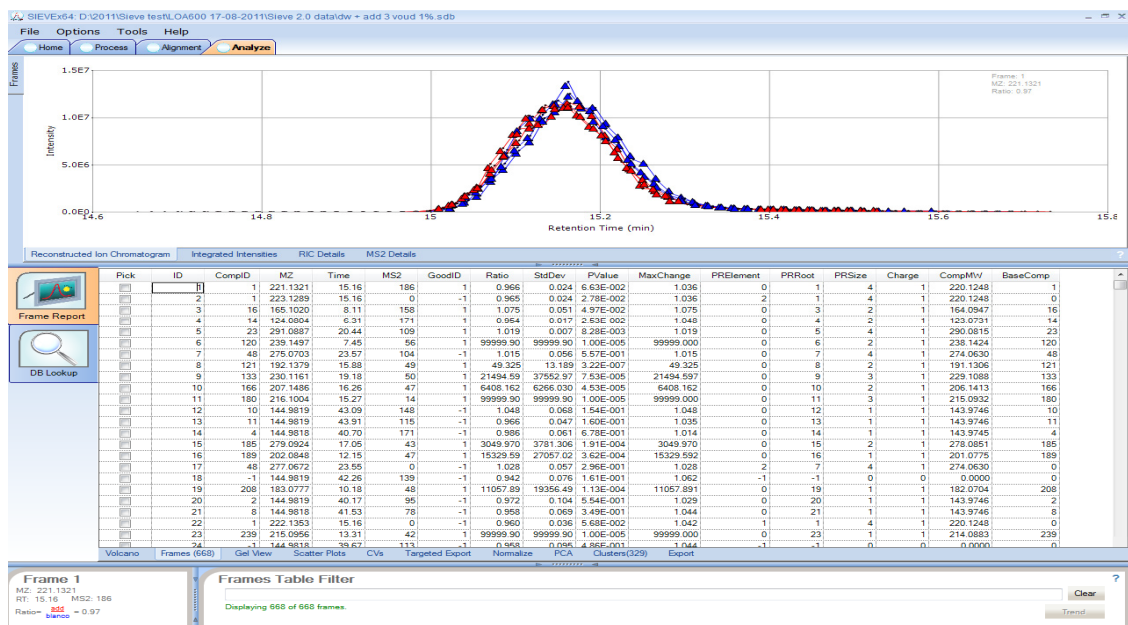
Tot heden was er echter weinig bruikbare software beschikbaar voor dataverwerking. In de periode 2007-2011 is ervaring is opgedaan met gratis te downloaden software 'Formulator' (zie www.thermofisher.com). Met dit software pakket kunnen alle stoffen die een respons hebben die ligt boven een vastgestelde grens worden opgespoord. De gebruikte instellingen waren: piekrespons minimaal 4% van de respons van de interne standaard (additieniveau 0,5 µg/l), maximale afwijking van de accurate massa voor dezelfde stof: 5 ppm en maximale afwijking van de retentietijd voor dezelfde stof: 2,5 min. De correctie voor de blanco waarden (ultrapuur water) werd handmatig uitgevoerd, wat een tijdrovend karwei is.

De laatste jaren is nieuwe software beschikbaar gekomen en door KWR getest. Het betreft het pakket Sieve voor het vergelijken van patronen en het volgen van trends (zie 5.3.1), ExactFinder voor het screenen van bekende en onbekende stoffen in een groot aantal monsters (zie 5.3.2) en MassFrontier als hulpmiddel voor het identificeren van onbekende stoffen (zie 5.3.3). Alle drie de pakketten zijn ontwikkeld door Thermofisher.

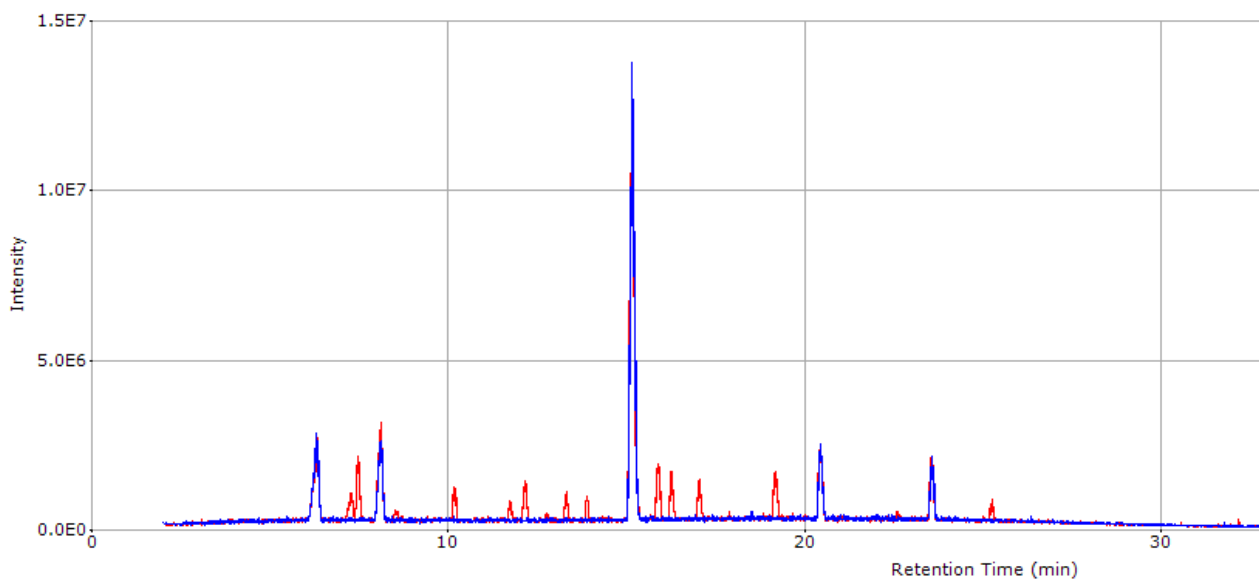
4.3.1 Sieve

Om de mogelijkheden van de het pakket Sieve versie 2.0 te onderzoeken is een test dataset aangemaakt. Hiervoor is zowel drinkwater met additie van circa 50 stoffen (50 ng/l) als blanco drinkwater (zonder additie) geanalyseerd in triplo. Dit experiment is in triplo uitgevoerd waardoor het mogelijk is om goed gebruik te maken van de statistische functies van Sieve. Om deze statistische functies van Sieve te gebruiken is minimaal een duplo meting nodig. De opwerking is uitgevoerd volgens het standaard screeningsprotocol. Om een goede inschatting te kunnen maken van de meerwaarde van Sieve ten opzichte van het 'oude' programma Formulator is de verwerking met beide pakketten uitgevoerd.

In figuur 13 is het ionchromatogram van ion 221,1321 (interne standaard atrazin-d5) voor de drie geaddeerde monsters (rode lijnen) samen met de blanco monsters weergegeven (blauwe lijnen). Atrazin-d5 is ook aan de blanco monsters toegevoegd, wat duidelijk te zien is in de figuur.



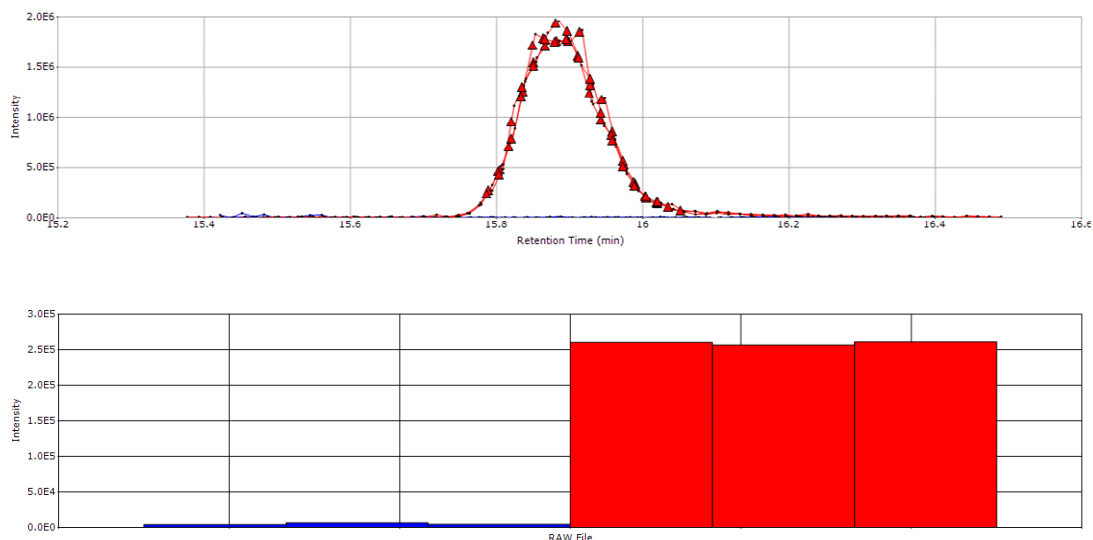
Figuur 13: Extracted ionchromatogram van de interne standaard atrazin-d5 in monsters en blanco in drievoud.



Figuur 14: LC-MS chromatogrammen van monsters (rood) en blanco's (blauw) in drievoud geanalyseerd

De pieken van de drie monsters vallen precies over elkaar (Figuur 14). Eventuele onderlinge afwijkingen in de retentietijd worden 'automatisch' met het programma gecorrigeerd op basis van overeenkomsten in de chromatogrammen (alignment functie in Sieve).

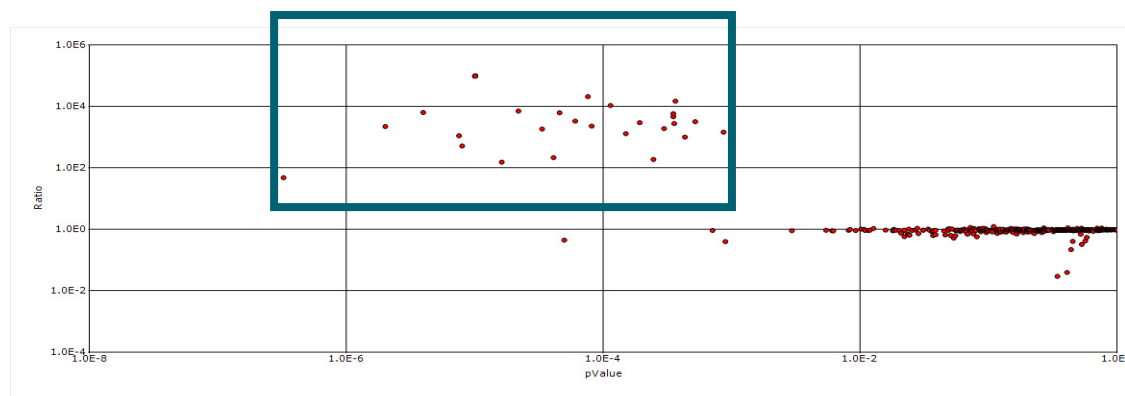
In het chromatogram zijn duidelijke verschillen zichtbaar tussen de drie monsters en de drie blanco's (Figuur 14). Vervolgens kan per gedetecteerde piek het ionchromatogram worden weergegeven. In onderstaande figuur is dat gedaan voor de stof DEET met een retentietijd van 15,9 min. Tegelijkertijd worden de verschillen in respons tussen de drie monsters en de drie blanco's grafisch weergegeven in een staafdiagram.



Figuur 15: Detectie van de stof DEET in drinkwater na additie (50 ng/l, n=3), rood is additie, blauw is blanco. boven: ionchromatogram, onder: grafische weergave van de respons van DEET in additie en blanco.

In figuur 15 is duidelijk te zien dat DEET in de drie monsters aanwezig is met een signaalintensiteit van ongeveer $2.5E5$. In de drie blanco's is nauwelijks een signaal zichtbaar (achtergrondruis).

Om een grafisch overzicht te krijgen van de verschillen tussen de monsters en de blanco's kan een zogenaamde Vulcanoplot worden gemaakt in de Sieve software. In figuur 16 is een voorbeeld gegeven.

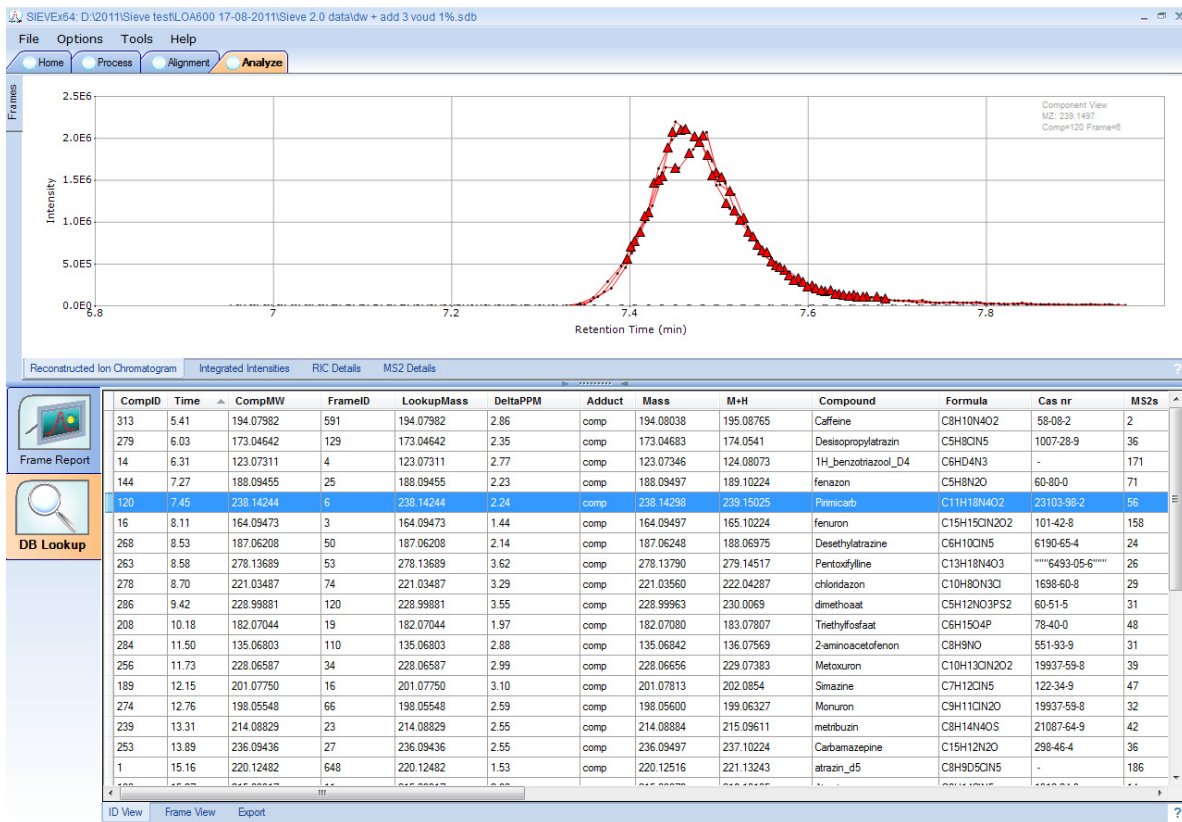


Figuur 16: Grafische weergave van alle aangetoonde stoffen in monster en blanco (n=3), de ratio van stoffen in drinkwater met additie t.o.v. blanco drinkwater staat op de y-as, en op de x-as is de p-waarde uitgezet (betrouwbaarheid).

Op de y-as wordt de verhouding tussen monster en blanco weergegeven, op de x-as de p-waarde als maat voor de betrouwbaarheid. Alle rode stippen geven een gedetecteerde accurate massa weer. De stippen binnen het groene kader zijn de accurate massa's van stoffen met een significante respons in het monster en nauwelijks of geen respons in de blanco, en deze hebben daarbij een hoge betrouwbaarheid (p-waarde). Bij dit experiment zijn enkel bekende doelstoffen gebruikt. Bij een praktijkmonster zullen binnen het groene kader zowel bekende als onbekende stoffen aanwezig zijn.

In het geval van onbekende stoffen kan een zoekactie in een database worden uitgevoerd; dit kan ook een externe database op Internet zijn (bijv. database op www.chemspider.com). Op basis van de accurate massa wordt eerst een meest waarschijnlijke brutoformule berekend. Vervolgens wordt met deze

brutoformule gezocht in de opgegeven databases. Hierbij is het ook mogelijk om te zoeken in een eigen gemaakte database met bekende stoffen die in watermonsters zijn aangetoond, waarvan in figuur 16 is een voorbeeld is opgenomen.



Figuur 17: Resultaat van zoekactie in de database

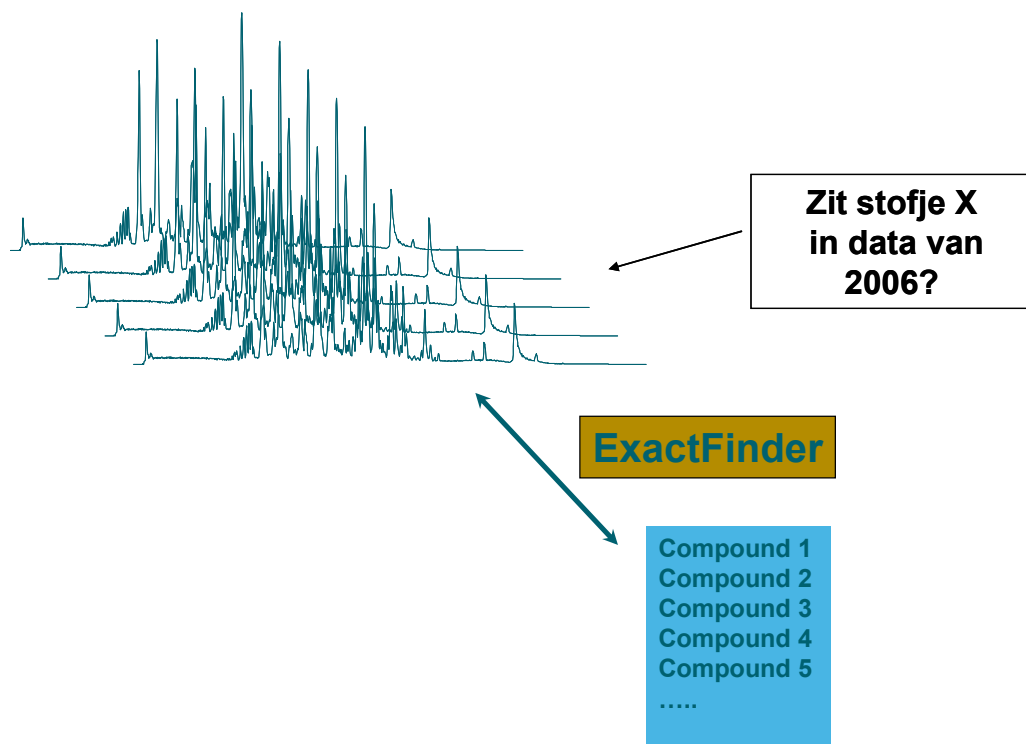
De stof waarnaar wordt gezocht in dit voorbeeld heeft een accurate massa van 239,1497 amu ($[M+H]^+$ -ion). Sieve zoekt binnen de zelfontwikkelde database naar een match van de accurate massa binnen de bandbreedte van 5 ppm. In dit voorbeeld wordt pirimicarb gevonden met de brutoformule van $C_{11}H_{18}N_4O_2$.

De beperking van het pakket is dat het alleen goed toepasbaar is voor het analyseren van data die in dezelfde meetserie zijn gemeten. Daarbij zijn minimaal duplo metingen nodig om betrouwbare statistische gegevens te verkrijgen. De software is alleen toepasbaar voor MS-data files die zijn verkregen door Thermo software zoals Xcalibur. Datafiles die gegenereerd zijn door andere software (bijvoorbeeld van een andere massaspectrometrie fabrikanten) kunnen met Sieve 2.0 niet verwerkt worden.

Concluderend kan gesteld worden dat de dataverwerking met Sieve ongeveer een factor twee sneller is, dan met het Formulator pakket. De Sieve software is verder robuust, daardoor wordt het maken van fouten door handmatige acties voorkomen. Door de gebruikte statistiek worden goed onderbouwde resultaten verkregen. Heel handig is de visualisering van de data, met één oogopslag wordt een indruk verkregen van de hoeveelheid stoffen in een monster. Sieve is inmiddels succesvol ingezet bij lopende projecten zoals Quality of the Water Cycle II.

4.3.2 ExactFinder

ExactFinder kan ingezet worden voor het screenen van bekende en onbekende stoffen in een groot aantal monsters. In figuur 18 is dit schematisch weergegeven.

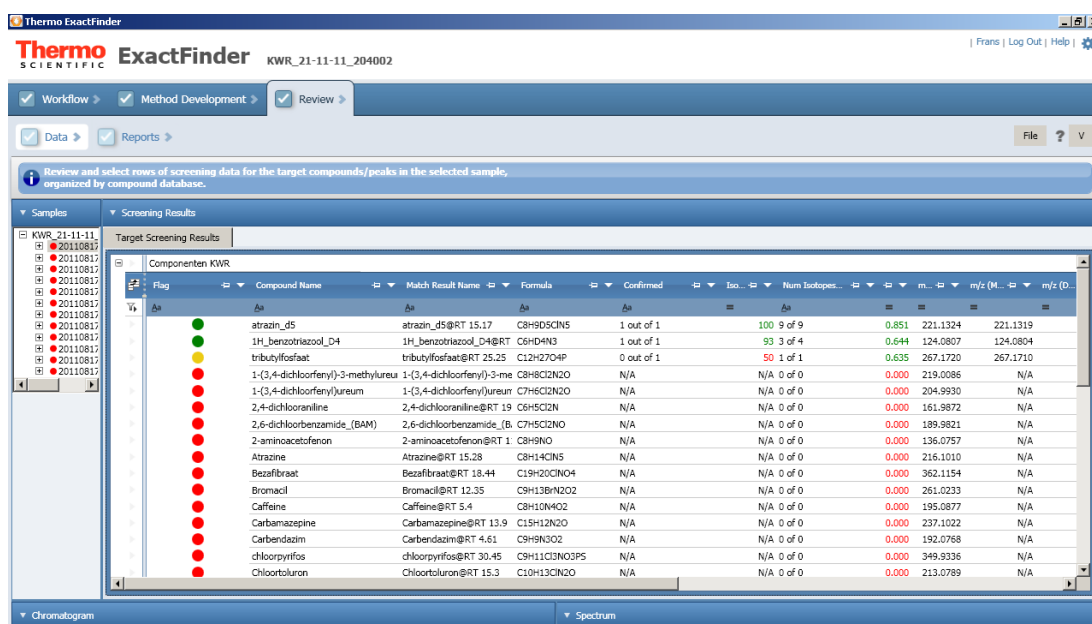


Figuur 18: Schematische weergave voor de inzet van ExactFinder.

In een lijst kunnen alle doelstoffen worden opgegeven (dit kunnen zowel bekende als onbekende stoffen zijn) met behulp van brutoformule. Het programma berekent automatisch de accurate massa van het $[M+H]^+$ -ion en eventuele adductionen (bijvoorbeeld $[M+NH_4]^+$). Met behulp van de berekende accurate massa's zal ExactFinder zoeken in een opgegeven set van datafiles. De zoekcriteria zijn o.a. accurate massa, retentietijd, isotooppatroon en eventuele fragmentionen. Het theoretische isotooppatroon wordt daarbij vergeleken met het gemeten isotooppatroon en de mate van overeenkomst wordt uitgedrukt in een cijfer.

Als een stof is aangetoond (in Exactfinder 'confirmed') dan zal deze stof met een groene stip worden gemerkt in de gegenereerde outputfile. Bij deze stoffen valt de afwijking van de accurate massa, retentietijd en isotooppatroon binnen het criterium dat gesteld is aan het verschil tussen de gemeten en theoretische waarde. Als aan enkele maar niet alle criteria wordt voldaan zal dit worden weergegeven met een oranje stip. Als niet aan de criteria wordt voldaan zal dit worden weergegeven met een rode stip.

In figuur 19 is een voorbeeld opgenomen van een outputfile van ExactFinder.



Figuur 19: Resultaat van zoekactie in ExactFinder

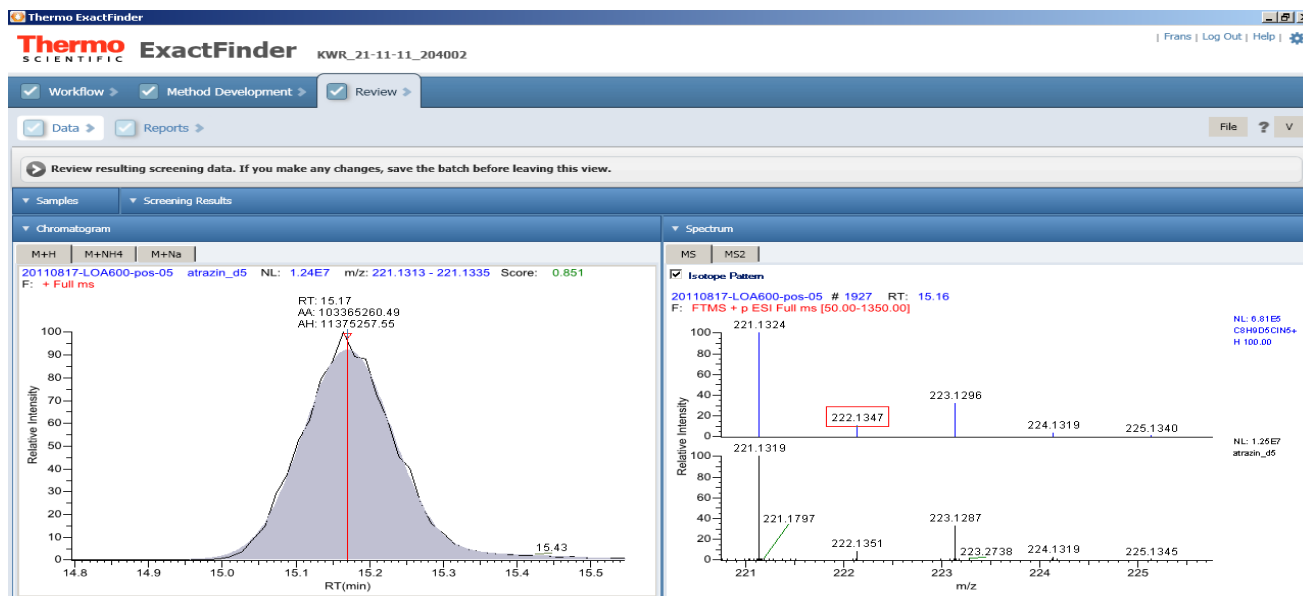
In het resultaat is te zien dat de interne standaard atrazin-d5 groen is gemarkeerd. Deze stof voldoet aan alle opgegeven criteria. De stof tributylfosfaat is geel en voldoet aan een deel van de criteria. De stoffen met de rode stip voldoen niet aan de vastgestelde criteria. In figuur 20 is een deel van het resultaat weergegeven.

Formu...	Confirmed	Iso	Num Isotopes...	m...	m/z (M...	m/z (D...
C8H9D5ClN5	1 out of 1	100	9 of 9	0.851	221.1324	221.1319
C6H4N3	1 out of 1	93	3 of 4	0.644	124.0807	124.0804
C12H27O4P	0 out of 1	50	1 of 1	0.635	267.1720	267.1710
C8H8Cl2N2O	N/A	N/A	0 of 0	0.000	219.0086	N/A
C7H6Cl2N2O	N/A	N/A	0 of 0	0.000	204.9930	N/A

Figuur 20: Resultaat van zoekactie in ExactFinder (deelscherm)

In figuur 19 is te zien dat bij atrazin-d5 (bovenste regel) de overeenkomst voor het isotoppatroon 100% is, voor 1H-benzotriazol-d4 (tweede regel) 93% en voor tributylfosfaat (derde regel) 50%. Het verschil tussen de theoretische en gemeten massa voor deze drie stoffen is resp. 0,851; 0,644 en 0,635.

Door op de stof te klikken wordt het LC-chromatogram en het massaspectrum van de stof weergegeven (zie figuur 21).



Figuur 21: Bevestiging van atrazine-d5. Aan de linkerkant is het extracted ion chromatogram te zien. De accurate massa van atrazine-d5 is uitgezet (ion 221.1324 amu met een bandbreedte van 5 ppm). In het rechter deel is het theoretische (boven) en gemeten (onder) isotop patroon van atrazine-d5 weergegeven.

4.4 Conclusies

De brede screeningsmethode op basis van accurate massa metingen is geoptimaliseerd zonder dat er een trendbreuk in de gegevensopbouw optreedt. Door hardwarematige aanpassingen is zowel de LC-scheiding alsook de meetgevoeligheid verbeterd. Het pakket Sieve is een zeer bruikbare tool voor efficiënte analyse van brede screeningsdata. Statistisch significante verschillen tussen verschillende datafiles kunnen snel worden opgespoord. ExactFinder is een software tool om retrospectief in screeningsdata te onderzoeken of bepaalde stoffen aanwezig zijn.

5 Literatuur

NEN 7777: Milieu – Prestatiekenmerken van meetmethoden. Nederlands Normalisatie-instituut, ICS 03.120.30; 13.020.01; 17.020; juli 2003

NEN-EN-ISO 5667-3 Water Quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples.

2002/657/EC European Commission Decision: Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.

Van der Aa NGFM, Dijkman E, Bijlsma L, Emke E, van de Ven BM, van Nuijs ALN, de Voogt P (2011) Drugs of abuse and tranquilizers in Dutch surface waters, drinking water and wastewater. RIVM 703719064/KWR BTO2011.023, Bilthoven/Nieuwegein, pp. 1-90

Alpert, A.J.(1990) J. Chromatogr. 499, 177-196.

Arnold DL (1983) Two-generation saccharin bioassays. Environ Health Perspect. 50: 27-36

Bandyopadhyay A, Ghoshal S, Mukherjee A (2008) Genotoxicity Testing of Low Calorie Sweeteners: Aspartame, Acesulfame-K and Saccharin. Drug Chem Toxicol 31: 447-457

Bigal ME, Krymchantowski AV (2006) Migraine triggered by sucralose: A case report. Headache 46: 515-517

Buerge IJ, Buser HR, Kahle M, Muller MD, Poiger T (2009) Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: an ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater. Environ Sci Technol 43: 4381-4385

Chinthalapati S.K.R., Cossmer, A., Scharf, H., Panne, U., Lüch, D.(2012) Speciation of gadolinium based MRI contrast agents in environmental water samples using hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Anal. Atom. Spectrom., 25, 55-61.

Eschauzier C, Haftka, Stuyfzand PJ, De Voogt P (2010) Perfluorinated compounds in infiltrated river Rhine water and infiltrated rainwater in coastal dunes. Environ. Sci. Technol. 44 , 7450-7455

Houtman CJ (2010) Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. J Integr Environ Sci 7: 271 - 295

Idee, J.M., Port, M., Raynal, I., Schaefer, M., Greneur, S., Corot, C.(2006) Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. Fundam. Clin. Pharmacol. 20, 563-576.

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

Kümmerer, K. and Helmers, E., (2000) Hospital effluents as a source of Gadolinium in the aquatic environment. Environ. Sci. Technol. 34, 573-577.

Leerdam van J.A., Lazarov, B. and Hogenboom, Ariadne C. (2006). Determination of steroid hormones in water at low ng/L level by on-line SPE combined with HPLC-MS/MS and post column addition. Posterpresentatie op 23^{ste} LC-MS symposium in Montreux (CH)

Loos R, Gawlik BM, Boettcher K, Locoro G, Contini S, Bidoglio G (2009) Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. *J. Chromatogr. A* 1216:1126-31.

Lubick N (2008) Artificial sweetener persists in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 42:3125-3125

Normann, P.T., Joffe, P., Martinsen, I. Thomsen, H.S.(2000) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22:939-947.

Oser BL, Carson S, Cox GE, Vogin EE, Sternberg SS (1975) Chronic toxicity study of cyclamate: saccharin (10:1) in rat. *Toxicology* 4: 315-330

Renwick AG (1986) The metabolism of intense sweeteners. *Xenobiotica* 16: 1057-1071

Richardson, S.D. (2008) Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues *Anal. Chem.*, 80: 4373-4402

Saussereau, E., Lacroix, C., Cattaneo, A., Mahieu, L., Gouille, J.P.(2008), *Forensic Sci. Int.* 176: 54-57.

Studie van de tafelzoetstoffen en de schatting van de totale inname van de geselecteerde zoetstoffen voor de volwassen Belgische bevolking. ISP WIV Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid. December 2010, Brussel België.

Scheurer M, Brauch H-J, Lange FT (2009) , Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal. Bioanal. Chem.* 394: 1585-1594

Scheurer M, Storck FR, Brauch H-J, Lange FT (2010) Performance of conventional multi-barrier drinking water treatment plants for the removal of four artificial sweeteners. *Water Res.* 44: 3573-3584

Thomas K. et al. (2012) Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis, *Sci. Total Environ.* 432, 432-439

Vughes, D. Kolkman, A. Analyse van polaire bestrijdingsmiddelen en transformatieproducten in drinkwater. BTO 2012.213(s)

Weihrauch MR, Diehl V (2004). Artificial sweeteners: Do they bear a carcinogenic risk? *Ann Oncol* 15: 1460-1465

Whitehouse CR, Boullata J, McCauley LA (2008). The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *AAOHN J* 56 (6): 251-259

Zygler, A., Wasik, A., Namieśnik, J.. (2010) Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents *Talanta* 82:1742-1748

www.wikipedia.nl

Bijlage 1: analyseprotocol zoetstoffen

Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft een methode voor de analyse van een vijftal synthetische zoetstoffen in water met behulp van directe injectie en ultra performance vloeistofchromatografie (UPLC) in combinatie met een triple quadrupole massaspectrometer (MS).

Toepasbaarheid

De beschreven methode is toepasbaar voor de meting van de synthetische zoetstoffen, acesulfaam, aspartaam, cyclamaat, saccharin en sucralose in gefiltreerd drink- grond- en oppervlaktewater.

Component:	Molecuulformule:	CAS nummer:	MW
Acesulfaam-K	C ₄ H ₄ KNO ₄ S	55589-62-3	200,9
Saccharin	C ₇ H ₅ NO ₃ S	81-07-2	183,0
Cyclamaat-Na	C ₆ H ₁₂ NNaO ₃ S	139-05-9	201,0
Sucralose	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₃ O ₈	56038-13-2	396,0
Aspartaam	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	22839-47-0	294,1
Interne standaard			
Acesulfaam-K-d ₄	C ₄ D ₄ KNO ₄ S	-	204,9
Saccharin-d ₄	C ₇ HD ₄ NO ₃ S	-	187,0
Cyclamaat-Na-d ₁₁	C ₆ HD ₁₁ NNaO ₃ S	-	212,0
Sucralose-d ₆	C ₁₂ H ₁₃ D ₆ Cl ₃ O ₈	-	402,0
Aspartaam-d ₃	C ₁₄ H ₁₅ D ₃ N ₂ O ₅	-	297,1

Kwantitatieve rapportage is component en matrix afhankelijk.

Beginsel

De methode is gebaseerd op een directe injectie van het watermonster.

Aan het watermonster worden eerst interne standaarden toegevoegd met een concentratie van 1 µg/l, vervolgens wordt het monster gefiltreerd over een 0,20 µm filter. Hierna wordt er 100 µl van het monster geanalyseerd met behulp van een UPLC-MS/MS.

Het gehalte van de zoetstoffen wordt berekend aan de hand van een externe kalibratiecurve, waarbij gecorrigeerd wordt voor de specifieke interne standaard.

Controles

Recovery experimenten

Er wordt een recovery-experiment uitgevoerd voor drink- en oppervlaktewater of eventueel een ander soort water. Dit hangt af van het type watermonster. De recoveries van de zoetstoffen worden bijgehouden in Controlekaarten. De opbrengsten worden gecorrigeerd voor de "blanco-recovery" van hetzelfde watertype indien het gehalte in de blanco de aantoonbaarheidsgrens overschrijdt. Wanneer er niet voldaan wordt aan de criteria voor de recovery dient men in overleg met de onderzoeksmedewerker van LMC of het labhoofd actie te ondernemen: overmeten, opnieuw bepalen of corrigeren voor de dagwaarde.

Controle standaard

De juistheid van de periodiek bereide werkstandaarden en periodiek bereide stockoplossingen wordt gecontroleerd door vergelijking van de kalibratiecurve met de controlestandaard. De waarden van de controlestandaard worden bijgehouden in een Shewhartkaart. In geval van een overschrijding dient men in overleg met de verantwoordelijke onderzoeksmedewerker van LMC of het labhoofd actie te ondernemen: overmeten, opnieuw bepalen of corrigeren voor de dagwaarde.

Identificatie

Piekidentificatie vindt plaats op basis van de retentietijd en twee specifieke overgangen (productionen) per component. De kolomkwaliteit wordt visueel beoordeeld op basis van scheidend vermogen en pieksymmetrie.

Kwantificering

Voor de kwantificering wordt gebruik gemaakt van een externe kalibratiecurve. Wanneer er niet voldaan wordt aan de eis voor de correlatiecoëfficiënt, dient de meetserie herhaald te worden.

Bemonstering

Monsterflessen dienen voorzien te zijn van een teflon inlage en 3 maal voorgespoeld met het te nemen monsterwater.

Drinkwater: na doorstromen van de leiding wanneer de temperatuur van het water constant is, wordt de monsterfles onder het tappunt geheel gevuld met het te bemonsteren water.

Grondwater: voor de bemonstering van grondwater kan gebruik gemaakt worden van een vacuümpomp in combinatie met teflonslang en een monsterfles voorzien van een dubbeldoorboorde teflonstop waardoorheen een lang en een kort buisje zijn aangebracht. De monsterfles wordt geplaatst tussen het te bemonsteren water en een buffervat, waarop de vacuümpomp is aangesloten.

Oppervlaktewater: de monsterfles kan direct op de te bemonsteren plaats en diepte gehouden en gevuld worden.

De monsters worden in het donker en bij een temperatuur tussen 1 - 8 °C bewaard. De monsters dienen binnen 1 week te worden geanalyseerd.

Werkwijze

Maak gebruik van zorgvuldig schoongemaakt laboratorium glaswerk.

Neem bij iedere meetserie een procedure blanco mee, gebruik hiervoor ultrazuiver water.

Bepaal, indien een van de te meten monsters in de analyseserie een oppervlaktewater betreft, het rendement in oppervlaktewater. Addeer met behulp van de kalibratie standaard 0,7 µg/l aan oppervlakte water. Bij afwezigheid van oppervlaktewater monsters, gebruik drinkwater voor het vaststellen van de recovery.

Monster voorbereiding

Voeg aan 50 ml monster, 1 µg/l per interne standaard toe. Filtreer het monster over een 0,20 µm filter (en vul het monster uit in een vial)

LC Instellingen

HPLC-pomp	Accela
Monsterwisselaar	Accela
Analytische kolom	Hypersil Gold 1,9 µm 100 x 2,1 mm
Guardkolom	Krudkatcher Ultra HPLC in-line Filter 0,5 µm
Kolomthermostaat	Accela 20° C
Autosampler vials	1,8 ml 12 x 32 mm
Filtratie watermonster	Spartan 0,20 µm filter
Autosampler spoelvloeistof	70% acetonitril, 15% methanol, 15% milliQ
Injectieloop	100 µl
Divert valve (heart-cutting)	0,25 - 12,60 min

LC-gradient

Stap	Tijd in minuten	A%	B%	Flow (µl/min)
0	0,00	95	5	300
1	1,00	95	5	300
2	12,00	10	90	300
3	12,50	0	100	300
4	14,00	0	100	300
5	14,50	95	5	300
6	17,50	95	5	300

Eluens A: MilliQ + 0,05% acetic acid, eluens B: Methanol

Instellingen Massaspectrometer

Massaspectrometer	TSQ Vantage
Scanmethode	SRM
Druk botsingscel (Ar)	1,5 mTorr
LC/MS interface	ESI
Ionisatie mode	Positief & negatief
Cycle time	0,50 s
Spray voltage	3,0 kV (neg. 2,5 kV)
Capillary temperatuur	275 °C
Vaporizer temperatuur	350 °C
Sheath gas (N ₂)	30 (Arb)
Auxilliary gas (N ₂)	10 (Arb)
Ion sweep gas (N ₂)	10 (Arb)
Resolutie Q1	0,7 (FWHM)
Resolutie Q3	0,7 (FWHM)

Kalibratie

Er wordt gebruik gemaakt van een kalibratiecurve, waarbij er gecorrigeerd is voor de respons van de interne standaard. De kalibratiecurve is gebaseerd op 7 meetpunten. Er mogen 2 punten weggelaten worden en de correlatiecoëfficiënt (r) moet $\geq 0,99$ zijn. De kalibratiecurve wordt berekend als de gehele meetserie geanalyseerd is.

Identificatie

Met een LC-MS/MS wordt met Selected Reaction Monitoring (SRM) de analyse uitgevoerd. Selected Reaction Monitoring is een scantechniek waarbij in quadrupool 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.

SRM overgangen

Component	Parent mass m/z	Product ion m/z	Collision Energy [eV]	S-lens	Mode
Acesulfaam-K	161,80	78,04	38	60	Neg
	161,80	82,10*	15	60	Neg
Acesulfaam-K-d4	166,00	86,10	16	60	Neg
Sacharin	181,80	42,05	24	85	Neg
	181,80	105,9*	20	85	Neg

Sacharin-d4	186,00	106,00	19	85	Neg
Cyclamaat-Na	177,90 177,90	80,01* 96,01	27 19	83 83	Neg Neg
Cyclamaat-Na-d11	189,10	80,00	28	83	Neg
Sucralose	394,70 396,80	359,16* 361,16	14 14	98 98	Neg Neg
Sucralose-d6	401,00	365,2	14	98	Neg
Aspartaam	295,0 295,0	120,08* 235,10	31 13	71 71	Pos Pos
Aspartaam-d3	298,10	120,09	30	71	Pos

* kwantificatie ion

Een component wordt als positief geïdentificeerd beschouwd wanneer twee product ionen 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 ion ratio van de betreffende component overeenkomen met die van de meest recent geïnjecteerde standaard.

Maximaal toelaatbare toleranties voor de ion ratio.

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

Kwantificering

De kwantificering vindt vervolgens plaats aan de hand van de piekoppervlakte van één enkel product ion ten opzichte van een kalibratiecurve.

Lineariteit

Het lineariteitsgebied voor de zoetstoffen loopt van 0,05 tot 6 µg/l. Gemeten gehalten mogen deze waarde 10% overschrijden, daarboven dient het monster verdund overgemeten te worden.

Afronding

meetwaarde	afronden op (µg/L)	aantal decimalen
0,000 ≤ meetwaarde ≤ 1,000	0,01	(2 decimalen)
1,001 ≤ meetwaarde ≤ 10,00	0,1	(1 decimaal)
10,01 ≤ meetwaarde ≤ 100,0	1	(0 decimalen)
meetwaarde >100	5	(eindcijfer 5)

Bijlage 2: standaardinstellingen ICP-MS

Parameter	Instelling
Extraction (V)	-263,0
Lens 1 (V)	-1440
Lens 2 (V)	-89,4
Lens 3 (V)	-122,4
Focus (V)	-12,0
D1 (V)	-58,8
D2 (V)	-173
DA (V)	-28,2
Pole Bias (V)	0
Hexapole Bias (V)	-3,0
Nebuliser flow (L/min)	0,39
Cool (L/min)	14,0
Auxiliary (L/min)	0,80
Oxygen flow (mL/min)	30
Forward Power (W)	1400
Sampling Depth (mm)	140
Horizontal (mm)	85
Vertical (mm)	412
Standard Resolution (V)	115
High Resolution (V)	125
Analogue Detector (V)	2300
PC detector (V)	4075

Bijlage 3: totaallijst stoffen voor testen van screeningsmethode

Stofnaam	Cas nr	Stofnaam	Cas nr
1-(3,4-dichloorfenyl)-3-methylureum	3567-62-2	Dimethomorf	110488-70-5
1-(3,4-dichloorfenyl)ureum	2327-02-8	Diuron	330-54-1
2,4,6-trichloorfenol	88-06-2	Ethofumesaat	26225-79-6
2,4-dichlooraniline	554-00-7	Fenazon	60-80-0
2,4-dichloorfenol	120-83-2	Isoproturon	34123-59-6
2,4-dichloorfenoxyazijnzuur (2,4-D)	94-75-7	Linuron	330-55-2
2,4-dinitrofenol	51-28-5	Mecoprop (MCP)	7085-19-0
2,6-dichloorbenzamide (BAM)	2008-58-4	Metazachloor	67129-08-2
2-aminoacetofenon	551-93-9	Metobromuron	3060-89-7
2-methyl-4-chloor-fenoxyazijnzuur (MCPA)	94-74-6	Metolachloor	51218-45-2
2-methyl-4,6-dinitrofenol (DNOC)	534-52-1	Metoprolol	37350-58-6
Atrazin	1912-24-9	Metoxuron	19937-59-8
Azinfos methyl*	86-50-0	Metribuzin	21087-64-9
Bentazon	25057-89-0	Monuron	150-68-5
Bezafibraat	41859-67-0	Micosulfuron	111991-09-4
Bromacil	314-40-9	N,N,-diethyl-3-methylbenzamide (DEET)	134-62-3
Caffeïne	58-08-2	Mentoxifylline	6493-05-6
Carbamazepin	298-46-4	Pirimicarb	23103-98-2
Carbendazim	10605-21-7	Simazin	122-34-9
Chloorpyrifos	2921-88-2	Sulfadimidine	2921-88-2
Chloridazon	1698-60-8	Sulfamethoxazool	723-46-6
Chloortoluron	15545-48-9	Terbutylazin	5915-41-3
Desethylatrazin	6190-65-4	Tetraglyme	143-24-8
Desisopropylatrazin	1007-28-9	Tributylfosfaat	126-73-8
Dichlobenil	1194-65-6	Tri(2-chloorethyl)fosfaat (TCEP)	115-96-8
Dichlorprop (2,4-DP)	120-36-5	Triethylfosfaat	78-40-0
Diclofenac	15307-86-5	Trifenyfosfineoxide (TPPO)	791-28-6
Dimethenamide-P	87674-68-8	Tris-(2-chloor-isopropyl)-fosfaat	13674-84-5
Dimethoaat	60-51-5		

