

## Bepaling van glyfosaat en AMPA in water met LC-MS

## INHOUD

|           |                                                                                          |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>  | <b>Toepassingsgebied</b>                                                                 | <b>3</b>  |
| <b>2</b>  | <b>Principe</b>                                                                          | <b>3</b>  |
| <b>3</b>  | <b>Apparatuur en materiaal</b>                                                           | <b>3</b>  |
| <b>4</b>  | <b>Reagentia en standaarden</b>                                                          | <b>4</b>  |
| <b>5</b>  | <b>Monsterbeawring</b>                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>6</b>  | <b>Extractie</b>                                                                         | <b>5</b>  |
| 6.1       | <i>Werkwijze met vaste fase extractie</i>                                                | 5         |
| 6.2       | <i>Werkwijze met vloeistof-vloeistof extractie</i>                                       | 6         |
| <b>7</b>  | <b>LC-MS analyse</b>                                                                     | <b>6</b>  |
| 7.1       | <i>Meting</i>                                                                            | 6         |
| 7.2       | <i>Identificatie en integratie</i>                                                       | 7         |
| 7.3       | <i>Kalibratie</i>                                                                        | 7         |
| 7.4       | <i>Gehalte van de pesticiden in het watermonster</i>                                     | 8         |
| <b>8</b>  | <b>Kwaliteitscontrole</b>                                                                | <b>8</b>  |
| 8.1       | <i>Responslineariteit</i>                                                                | 8         |
| 8.2       | <i>Chromatografische scheiding</i>                                                       | 8         |
| 8.3       | <i>Instrumentele detectielimieten</i>                                                    | 8         |
| 8.4       | <i>Controle op de kalibratie</i>                                                         | 9         |
| 8.5       | <i>Procedureblanco</i>                                                                   | 9         |
| 8.6       | <i>Controlemonster</i>                                                                   | 9         |
| 8.7       | <i>Terugvinding van de isotoop gemerkte verbindingen</i>                                 | 9         |
| 8.8       | <i>Matrixadditie</i>                                                                     | 10        |
| <b>9</b>  | <b>Veiligheid</b>                                                                        | <b>10</b> |
| <b>10</b> | <b>Referenties</b>                                                                       | <b>11</b> |
|           | <b>BIJLAGE A : Voorbeeld van een kalibratiereeks</b>                                     | <b>12</b> |
|           | <b>BIJLAGE B : Typische LC-MS werkvoorwaarden voor de bepaling van glyfosaat en AMPA</b> | <b>13</b> |
|           | <b>BIJLAGE C : Typische instrumentele detectielimieten</b>                               | <b>15</b> |
|           | <b>BIJLAGE D : Chromatogrammen</b>                                                       | <b>16</b> |

## 1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure vervangt procedure WAC/IV/A/029 van november 2018 en beschrijft een methode voor de extractie, zuivering en analyse van glyfosaat (N-(fosfonomethyl)glycine) en AMPA (aminomethylfosfonzuur) in water. De methode is toepasbaar op grondwater, oppervlaktewater en drinkwater vanaf een concentratie van 25 ng/l.

## 2 PRINCIPE

Aan de waterstalen wordt een gekende hoeveelheid isotoop gemerkte AMPA- en glyfosaatverbinding toegevoegd. Vervolgens worden de verbindingen gederivatiseerd met FMOC-chloride (9-fluorenylmethyl chloroformaat) en geëxtraheerd met vaste fase extractie (SPE). De vaste fase wordt gewassen met dichloormethaan en vervolgens geëluëerd met methanol. Het methanolextract wordt ingedampt waarna het residu wordt opgenomen in een gekend volume mobiele fase. ~~en~~ In plaats van vaste fase extractie kan, afhankelijk van de toestelgevoeligheid, gekozen worden voor een opzuivering met vloeistof-vloeistof extractie (LLE) met dichloormethaan. De gederivatiseerde verbindingen worden geanalyseerd met vloeistofchromatografie met tandem massaspectrometrische detectie (LC-MS/MS). Het gehalte van de verschillende pesticiden wordt berekend met de interne standaard methode.

### Opmerking:

- In de methode is een offline SPE methode beschreven. De vaste fase extractie kan evenwel ook aan de hand van een online SPE module gebeuren.
- De meting gebeurt in positieve ionisatiemodus (ES+); de verbindingen kunnen evenwel ook in negatieve modus (ES-) gemeten worden indien de toestelgevoeligheid dit toelaat.

## 3 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Gebruikelijk laboratoriumglaswerk  
*Opm.:* het gebruik van HDPE of PP materiaal is toegestaan
- Injectiespuiten van 25 µl en 100µl voor het doperen van isotoop gemerkte verbindingen
- Pipetpomp en wegwerppipetten voor het overbrengen van extracten en het afspoelen van de recipiëntwand gedurende het indampen.
- Centrifugeerbuisjes
- Monsterflesjes (bv. 1.5 ml)
- Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- **Vortex**
- **Oven of incubatiekast bij 37°C**
- Centrifuge
- pH-meter
- SPE extractietoestel
- SPE patronen: bv. OASIS HLB 6 cc, 200mg  
*Opm.:*

- Andere SPE fasen zijn mogelijk; validatie-experimenten dienen aan te tonen dat voldoende terugvinding en reproduceerbaarheid wordt bekomen
- Ook online SPE kan toegepast worden; hierbij gelden specifieke fasen geschikt voor de SPE module
- Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet, instelbaar op 40°C.
- LC-MS bestaande uit:
  - een LC-systeem (hoge druk of ultra hoge druk) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid
  - een tandem quadrupool massa spectrometer met electrospray interface  
*Opm.:* Alternatief kan gebruik gemaakt worden van een ion trap of een accurate massa (time-of-flight (TOF) of orbitrap) massaspectrometer
  - een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- LC-kolom: een reversed phase kolom, bv. Waters Acquity UPLC BEH Phenyl, 1.7 µm, 2.1 x 100 mm voor UPLC-meting of gelijkwaardig

#### 4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- Methanol: LC-grade
- **Dichloormethaan: LC-grade**
- Acetonitrile: LC-grade
- Water: LC-grade
- Ammoniumacetaat p.a.
- NH<sub>3</sub>, bv. 25% in water, p.a.
- **Mierenzuur, p.a.**
- Boraatbuffer, 0.25M: los 5 g natriumtetraboraat op en leng aan tot 100 ml met ultrapuur water; plaats de oplossing in een ultrasoonbad om de het tetraboraat volledig op te lossen.
- Fmoc-Cl oplossing, **1,68 g/l (6.5 mM)**: los 336 mg Fmoc-Cl op in acetonitrile en leng aan tot 200 ml; deze oplossing dient dagelijks vers bereid te worden.
- **Fmoc-Cl oplossing, 0.25 g/l in acetonitrile; deze oplossing dient dagelijks vers bereid te worden**
- EDTA-oplossing, **416 g/l (1 M)**: los 41.6 g tetrasodium-EDTA op in ultrapuur water en leng aan tot 100 ml.
- **EDTA-oplossing, 2g/l in ultrapuur water.**
- Mierenzuuroplossing, 0.1 %: verdun 0.2 ml mierenzuur tot 200 ml met ultrapuur water.
- **Fosforzuur 85%.**
- NH<sub>4</sub>-acetaatoplossing, 1 M: los 7.71 g NH<sub>4</sub>-acetaat op in ultrapuur water en lang aan tot 100 ml.
- NH<sub>4</sub>-acetaat, 5 mM in water, pH 9: leng 5 ml 1 M NH<sub>4</sub>-acetaatoplossing aan met ultrapuur water tot 1 liter; voeg 300 µl NH<sub>3</sub>-oplossing toe.
- NH<sub>4</sub>-acetaat, 5 mM in methanol, pH 9: leng 5 ml 1 M NH<sub>4</sub>-acetaatoplossing aan met methanol tot 1 liter; voeg 300 µl NH<sub>3</sub>-oplossing toe.
- Stockstandaarden van zuivere AMPA en glyfosaat.
- Individuele stockstandaardoplossingen van natieve AMPA en glyfosaat : deze zijn aangemaakt in water in een concentratie van bv. 100 mg/l
- Stockstandaardoplossingen van isotoop gemerkte verbindingen, 2 mg/l in water:
  - Glyfosaat-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-<sup>15</sup>N
  - AMPA-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N
- Doperingsoplossing van de natieve verbindingen AMPA en glyfosaat in water van circa 300 µg/l, voor de aanmaak van controlemonsters of voor matrixadditie.
- Kalibratiestandaardoplossingen van natieve verbindingen: maak uitgaande van de individuele stockstandaardoplossingen van de natieve verbindingen een mengoplossing aan en hieruit een

reeks verdunningen met wisselende concentraties, lopende van ca 20 tot 20000 ng/l. De oplossingen worden aangemaakt in water (zie voorbeeld in bijlage) en doorlopen de volledige derivatiserings- en extractie procedure ~~(er wordt vertrokken van 80 ml monster)~~. Deze kalibratie-oplossingen zijn 2 weken houdbaar bij -18°C.

## 5 MONSTERBEAWRING

Voor de monsterconservering en –bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

## 6 EXTRACTIE

Het watermonster wordt gehomogeniseerd door opschudden en hiervan wordt een deelmonster genomen. Aan dit deelmonster worden isotoop gemerkte verbindingen en EDTA toegevoegd. EDTA dient om de verbindingen vrij te stellen uit de complexen met meerladige metaalionen zoals ijzer, koper, calcium,... Vervolgens wordt het derivatiseringsreagens toegevoegd. De gederivatiseerde verbindingen worden daarna geëxtraheerd met vaste fase extractie **of met vloeistof-vloeistofextractie**.

### 6.1 WERKWIJZE MET VASTE FASE EXTRACTIE

*Derivatisering:*

- Breng 80 ml staal in een erlenmeyer van 250 ml
- Voeg 20 µl IS-oplossing toe
- Voeg 4 ml **1M** EDTA-oplossing-toe
- Voeg 10 ml boraatbuffer toe
- Voeg vervolgens 10 ml **1.68 g/l** Fmoc-Cl oplossing toe en schud
- Laat 30 minuten reageren
- Stop de derivatisatiereactie door de oplossing op pH 3 te brengen m.b.v. 1 ml mierenzuur (A)
- Verdun met 100 ml water (om de acetonitrileconcentratie van de oplossing te verlagen voorafgaand aan de vaste fase extractie)

*Opm:* Afhankelijk van het gewenste concentratiebereik en de toestelgevoeligheid zijn kleinere monsterinnames mogelijk.

*Vaste fase extractie:*

- Conditioneer de SPE patroon met 5 ml MeOH en 5 ml 0.1 % mierenzuur in water
- Extraheer de stalen, met een doorloopsnelheid van ongeveer 2.5 ml/min
- Spoel de patroon na met 10 ml 0.1 % mierenzuuroplossing
- Droog de patroon door 30 minuten lucht aan te zuigen onder vacuüm en/of door centrifugatie
- Spoel met 5 ml dichloormethaan om reactieevenproducten te verwijderen
- Droog de patroon door 30 minuten lucht aan te zuigen onder vacuüm en/of door centrifugatie
- Elueer met 9 ml MeOH, vang op in glazen centrifugebuisjes van 12 ml
- Damp in onder N<sub>2</sub> bij 40°C tot een volume van 100 µl methanol
- Leng aan tot 1 ml met 5 mM NH<sub>4</sub>-acetaat, pH 9
- Breng over in een meetvial (1.5 ml)

De houdbaarheid van preparaten, bij bewaring in de diepvriezer, bedraagt 2 weken.

*Opmerkingen:*

- De houdbaarheid van preparaten, bij bewaring in de diepvriezer, bedraagt 2 weken
- Bij het toevoegen van het FMOC-reagens vormt zich een witte neerslag (FMOC-OH).
- Bij het aanlengen van het ingedampte methanolextract met de NH<sub>4</sub>-acetaatoplossing vormt er zich een weinig witte neerslag. Dit is residueel FMOC-OH dat onvolledig verwijderd werd bij de opzuivering en nu neerslaat door de toevoeging van water. De buisjes worden gecentrifugeerd en de bovenstaande oplossing wordt overgebracht in de meetvials.
- Optioneel kan voorafgaand aan de vaste fase extractie voor een alternatieve zuivering gekozen worden m.b.v. vloeistof-vloeistofextractie:
  - Voeg aan het gederivatiseerde monster (A) van hierboven ~~4 ml EDTA-oplossing toe~~ 30 ml diethylether toe en schud
  - ~~— Voeg 30 ml diethylether toe en schud~~
  - Breng de oplossing over in een scheitrechter van 250 ml
  - Laat de fasen 1 uur scheiden
  - Scheid de waterfractie af en verwijder de diethyletherfractie
  - Verdun de waterfractie met 100 ml water en ga verder met vaste fase extractie. De spoeling van het SPE-patroon met dichloormethaan vervalt echter in dit geval.

## 6.2 WERKWIJZE MET VLOEISTOF-VLOEISTOF EXTRACTIE

*Derivatisering:*

- Breng 4 ml staal in een PP centrifugebuis van 50 ml
- Voeg 20 µl IS-oplossing toe
- Voeg 50 µl 2g/l EDTA-oplossing toe en vortex
- Voeg 800 µl boraatbuffer toe
- Voeg vervolgens 860 µl 0.25 g/l FMOC-Cl oplossing toe en vortex
- Incubeer 2 uur bij 37°C
- Stop de derivatisatiereactie door 3 druppels fosforzuur 85% toe te voegen en te vortexen

*Vloeistof/vloeistof extractie:*

- Breng 2 ml van het gederivatiseerde staal over in een PP centrifugebuis van 15 ml en voeg 2 ml dichloormethaan toe en vortex
- Laat 10 min rusten en breng vervolgens 1 ml van de bovenste laag over in een meetvial

*Opm.:* De houdbaarheid van preparaten, bij bewaring in de diepvriezer, bedraagt 2 weken.

## 7 LC-MS ANALYSE

### 7.1 METING

Van de standaardoplossingen en monsterextracten wordt typisch 10 µl in de LC-MS geïnjecteerd. De LC-analyse gebeurt bv. op een Phenyl kolom met gradiëntelutie.

Alle opnames worden met Multiple Reaction Monitoring (MRM) uitgevoerd, met ionisatie via electrospray in positieve (ES+) modus (indien gewenst en indien de toestelgevoeligheid dit toelaat kan dit evenwel ook in negatieve modus).

Typische LC-MS instellingen zijn gegeven in bijlage 2. Tegelijk zijn de te registreren ionentransities aangegeven en de met de gekozen LC-MS instellingen bekomen retentietijden.

*Opmerking:* Voor de optimalisatie van de LC en MS-meetcondities en voor de controle op de terugvinding na derivatisering en extractie kan gebruik gemaakt worden van oplossingen van commercieel beschikbare AMPA-FMOC en glyfosaat-FMOC. Bemerk evenwel dat de oplossingen van deze verbindingen beperkt houdbaar zijn.

## 7.2 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De natieve componenten en de interne standaarden worden geïdentificeerd aan de hand van de criteria voor retentietijden en ionenverhoudingen zoals vastgelegd in procedure WAC/VI/A/003. De geïdentificeerde pieken worden geïntegreerd met de software van het apparaat en manueel geverifieerd.

## 7.3 KALIBRATIE

De kalibratie omvat de injectie van minstens 5 standaardoplossingen die de te bepalen natieve verbindingen bevatten in oplopende concentraties (zie bijlage 1) en de gemerkte verbindingen in een constante concentratie. De kalibratievergelijking heeft gewoonlijk een lineair verloop:

$$\frac{A_i}{A_{IS}} = a \frac{C_i}{C_{IS}} + b$$

met

$A_i$  = de gemeten piekoppervlakte voor de pesticide  $i$  in de resp. standaardoplossing

$A_{IS}$  = de gemeten piekoppervlakte voor de overeenkomstige interne standaard in de resp. standaardoplossing

$C_i$  = de concentratie van de pesticide  $i$  in de resp. standaardoplossing in ng/L

$C_{IS}$  = de concentratie van de overeenkomstige interne standaard in de resp. standaardoplossing in ng/L

De gemeten piekoppervlakten(verhouding) worden voor elke te bepalen pesticide uitgezet i.f.v. van de concentratie(verhouding). De coëfficiënten  $a$  (helling of reponsfactor) en  $b$  (afgesneden stuk) worden bepaald door lineaire regressie met inbegrip van het punt (0,0) en met  $1/X$  weging (dit gebeurt al dan niet automatisch met de software van het apparaat).

De correlatiecoëfficiënt dient  $> 0.995$ . Het werkgebied wordt bepaald door de concentraties waarvoor de residuele afwijking tot de rechte  $< 25\%$ .

De berekening van de kalibratiecurve gebeurt bij elke analysereeks.

*Opmerking:*

In sommige gevallen kan het gebruik van een kwadratische functie meer aangewezen zijn.

## 7.4 GEHALTE VAN DE PESTICIDEN IN HET WATERMONSTER

De concentraties in het monster worden vervolgens berekend als volgt:

$$C_i(\text{monster}) = \left( \frac{\frac{A_i}{A_{IS}} - b}{a} \right) \times C_{IS}$$

met

$C_i(\text{monster})$  = de concentratie van de pesticideverbinding  $i$  in het monster in ng/L

$A_i$  = de gemeten piekoppervlakte voor de pesticideverbinding  $i$  in het monsterextract

$C_i(\text{monster})$  = de geaddieerde concentratie van de overeenkomstige interne standaard in het monster in ng/L

$A_{IS}$  = de gemeten piekoppervlakte voor de overeenkomstige interne standaard in het monsterextract

$a$  en  $b$  = de coëfficiënten van de kalibratievergelijking

*Opmerkingen:*

- Bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied dient voor de bepaling van de betrokken pesticideverbinding het extract verdund te worden met mobiele fase en opnieuw gemeten.

## 8 KWALITEITSCONTROLE

### 8.1 RESPONSLINEARITEIT

Voor de werkwijze voor de bepaling van de lineariteit wordt verwezen naar de validatieprocedure van het Compendium voor Monsterneming en Analyse (CMA/6/A). Een controle van de lineariteit wordt uitgevoerd bij elke ernstige instrumentele ingreep. Indien niet aan lineariteit is voldaan mag overgeschakeld worden op een andere (bv. kwadratische) functie.

### 8.2 CHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING

De kolomkwaliteit kan opgevolgd worden aan de hand van een voor een analietenpaar berekend scheidingsgetal.

### 8.3 INSTRUMENTELE DETECTIELIMIETEN

De instrumentele detectielimiet, voor de gekozen LC-MS instellingen en injectievolume, is een maat voor de gevoeligheid van het apparaat. Aan de hand van het chromatogram van de laagste kalibratie-oplossing wordt voor elke verbinding de kleinst meetbare concentratie bepaald, gedefinieerd als:

$$DL(\text{instr}) = 3 * RG \times \text{conc}/PH$$

met

DL(instr) = de instrumentele detectielimiet in ng/ml

RG = de "peak-to-peak" ruishoogte aan de voet van de chromatogrampiek van de pesticideverbinding

PH = de piekhoogte van de pesticideverbinding

conc = concentratie van de pesticideverbinding in de kalibratie-oplossing in ng/ml

De instrumentele detectielimieten moeten van die aard zijn dat zonder problemen de gevraagde rapporteergrenzen kunnen gehaald worden. In bijlage 3 zijn bij wijze van voorbeeld instrumentele detectielimieten gegeven bekomen met de LC-MS condities van bijlage 2.

#### 8.4 CONTROLE OP DE KALIBRATIE

Om een welbepaald aantal monsters wordt de geldigheid van de kalibratievergelijking gecontroleerd. Hiertoe wordt één van de standaardoplossingen uit de kalibratiereeks opnieuw geïnjecteerd. De concentraties in de oplossing worden berekend met de kalibratievergelijking en mogen niet meer dan 20 % afwijken van de werkelijke concentraties.

#### 8.5 PROCEDUREBLANCO

Bij elke analysereeks wordt tenminste één procedureblanco bepaald. Hierbij wordt de volledige analyseprocedure gevolgd, doch zonder inname van monster.

M.b.t. de blancobijdrage worden volgende regels gehanteerd:

- voor monsterwaarden groter dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan 10%
- voor monsterwaarden kleiner dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan de helft van de rapporteergrens.

#### 8.6 CONTROLEMONSTER

Om de terugvinding en de reproduceerbaarheid te controleren wordt op regelmatige basis een controlemonster geanalyseerd. Dit is bij voorkeur een gecertificeerd materiaal (indien beschikbaar), maar er mag ook gebruik gemaakt worden van een gedopeerd monster. De terugvindingen moeten gelegen zijn tussen 70 % en 130 %. De gehalten worden opgetekend in controlekaarten. De opgetekende waarden moeten voldoen aan de voor controlekaarten geldende criteria.

#### 8.7 TERUGVINDING VAN DE ISOTOOP GEMERKTE VERBINDINGEN

Vergelijk het interne standaard signaal bekomen voor de kalibratie-oplossing met dat voor het monster. Voor een verantwoorde kwantificatie bedraagt het signaal voor het monster minstens 30 % van dat van de kalibratie-oplossing.

*Opmerking:*

- De afwijkende terugvindingen, bv. in oppervlaktewater, zijn mogelijk een gevolg zijn van coëlutie met matrixcomponenten waardoor ionisatiesuppressie en soms ook ionisatieversterking optreedt.

## 8.8 MATRIXADDITIE

Op regelmatige basis wordt aan een deel van een watermonster een gekende hoeveelheid van de te bepalen verbindingen toegevoegd. De monsters worden opgewerkt en de terugvindingen worden bepaald, rekening houdend met de oorspronkelijk aanwezige gehalten. De terugvindingen dienen gelegen te zijn tussen 70 en 130 %.

## 9 VEILIGHEID

De scheikundige producten die bij deze analysemethode gebruikt worden, zijn ondergebracht bij de potentieel giftige en kankerverwekkende stoffen. Dit maakt het noodzakelijk de voorziene maatregelen in het laboratorium toe te passen om blootstelling aan of contact met deze producten tot een minimum te herleiden.

## 10 REFERENTIES

ISO 16308:2014 Water quality — Determination of glyphosate and AMPA — Method using high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometric detection

Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey Organic Geochemistry Research Group – Determination of Glyfosaat, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinaat in Water Using Online Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry.

Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. I. Hanke, H. Singer, J. Hollender, Anal Bioanal Chem (2008) 391:2265-2276

**BIJLAGE A: VOORBEELD VAN EEN KALIBRATIEREEKS**

|                                                        | <i>concentraties in ng/l</i> |      |      |      |      |     |     |      |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|------|------|------|------|-----|-----|------|
| <b>AMPA</b>                                            | 4,35                         | 8,66 | 22,4 | 44,8 | 87,1 | 228 | 506 | 1400 |
| <b>Glyfosaat</b>                                       | 5,43                         | 10,8 | 28   | 55,9 | 109  | 284 | 633 | 1750 |
| <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N-AMPA                   | 500                          |      |      |      |      |     |     |      |
| <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N-glyfosaat | 500                          |      |      |      |      |     |     |      |

*Opmerking:* de overeenkomstige concentratie van de gederivatiseerde verbindingen in het finale extract (theoretisch, op basis van een concentreringsfactor van 80 en met aanname van 100% terugvinding) bedraagt:

|                       | <i>concentraties in µg/l</i> |      |      |      |      |      |     |     |
|-----------------------|------------------------------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| <b>AMPA-FMOC</b>      | 1,04                         | 2,08 | 5,37 | 10,7 | 20,9 | 54,6 | 122 | 335 |
| <b>Glyfosaat-FMOC</b> | 1,00                         | 2,00 | 5,18 | 10,3 | 20,1 | 52,5 | 117 | 323 |

De concentraties van de gederivatiseerde verbindingen werden berekend uitgaande van de onderstaande conversiefactoren:

|                                              | <b>AMPA</b> | <b>Glyfosaat</b> |
|----------------------------------------------|-------------|------------------|
| MM (g/mol ) niet-gederivatiseerde verbinding | 111         | 169              |
| MM (g/mol ) gederivatiseerde verbinding      | 333         | 391              |
| conversiefactor                              | 0,333       | 0,432            |

## BIJLAGE B: TYPISCHE LC-MS WERKVOORWAARDEN VOOR DE BEPALING VAN GLYFOSAAT EN AMPA

### UPLC-condities:

Kolom: Waters Acquity BEH Phenyl, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm

Kolomtemperatuur: 40°C

Injectievolume: 10  $\mu\text{l}$ .

Mobiele fase:

Samenstelling: A= water + 5 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + 0.03%  $\text{NH}_3$ -oplossing (pH 9)

B= methanol + 5 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + 0.03%  $\text{NH}_3$ -oplossing (pH 9)

Debiet: 0.40 ml/min.

Gradiënt:

| <b>Time<br/>(min)</b> | <b>Flow<br/>(ml/min)</b> | <b>%A</b> | <b>%B</b> |
|-----------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| 0                     | 0.3                      | 90        | 10        |
| 1.5                   | 0.3                      | 75        | 25        |
| 3                     | 0.3                      | 75        | 25        |
| 6                     | 0.3                      | 10        | 90        |
| 7                     | 0.3                      | 10        | 90        |
| 7.1                   | 0.3                      | 90        | 10        |
| 9                     | 0.3                      | 90        | 10        |

### MS-condities:

|                              |                   |
|------------------------------|-------------------|
| Polarity                     | ES+               |
| Capillary (kV)               | 4.00              |
| Cone (V)                     | Afhv de component |
| Extractor (V)                | 3.00              |
| RF Lens (V)                  | 0.1               |
| Source Temperature (°C)      | 120               |
| Desolvation Temperature (°C) | 350               |
| Desolvation Gas Flow (L/Hr)  | 800               |
| Cone Gas Flow (L/Hr)         | 50                |
| LM 1 Resolution              | 12.0              |
| HM 1 Resolution              | 12.0              |
| Ion Energy 1                 | 0.3               |
| Entrance                     | 15                |
| Exit                         | 14                |
| LM 2 Resolution              | 14.0              |
| HM 2 Resolution              | 14.0              |
| Ion Energy 2                 | 3.0               |
| Multiplier (V)               | 650               |

Ionentransities:

|                                                               | mode | Parent ion | Daughter ion | rt   | dwell time | span | cone V | Collision E |
|---------------------------------------------------------------|------|------------|--------------|------|------------|------|--------|-------------|
| glyfosaat-FMOC                                                | ES+  | 392        | 88           | 4.53 | 0.03       | 0.2  | 23     | 20          |
|                                                               | ES+  | 392        | 170          | 4.53 | 0.03       | 0.2  | 23     | 26          |
| <sup>13</sup> C <sub>2</sub> - <sup>15</sup> N-glyfosaat-FMOC | ES+  | 395        | 91           | 4.53 | 0.03       | 0.2  | 23     | 20          |
|                                                               | ES+  | 395        | 172          | 4.53 | 0.03       | 0.2  | 23     | 26          |
| AMPA-FMOC                                                     | ES+  | 334        | 156          | 5.55 | 0.03       | 0.2  | 23     | 8           |
|                                                               | ES+  | 334        | 179          | 5.55 | 0.03       | 0.2  | 23     | 23          |
| <sup>13</sup> C- <sup>15</sup> N-AMPA--FMOC                   | ES+  | 336        | 158          | 5.55 | 0.03       | 0.2  | 23     | 8           |
|                                                               | ES+  | 336        | 181          | 5.55 | 0.03       | 0.2  | 23     | 23          |

*Opmerking:* in ES- modus gelden voor de natieve verbindingen volgende MRM transities:

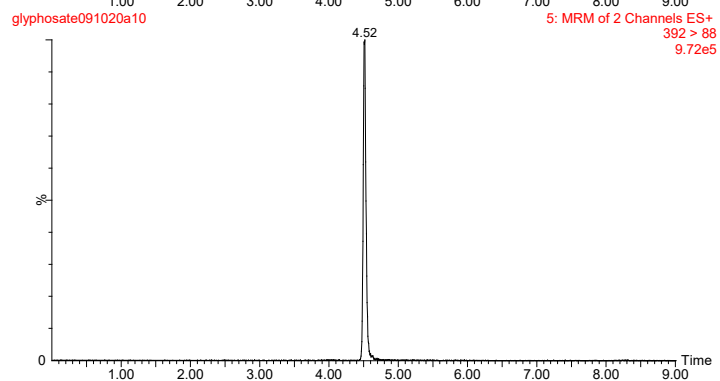
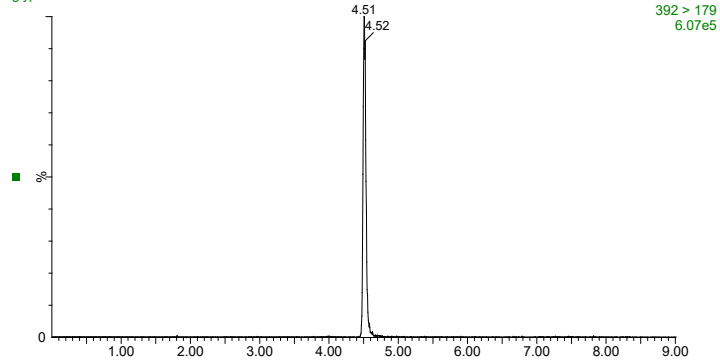
Glyfosaat-FMOC: 390>168, 390>150  
 AMPA-FMOC: 332>110, 332>136

**BIJLAGE C: TYPISCHE INSTRUMENTELE DETECTIELIMIETEN**

UPLC-MS bepaling:

|                | <b><i>LOD in ng/ml</i></b> |
|----------------|----------------------------|
| glyfosaat-FMOC | 0.06                       |
| AMPA-FMOC      | 0.04                       |

## BIJLAGE D: CHROMATOGRAMMEN

Glyphosate-FMOC:glyphosate091020a10  
glyphosate091020a10AMPA-FMOC:glyphosate091020a10  
glyphosate091020a10