

Bepaling van microcystine-LR in drinkwater

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Materiaal	3
4	Reagentia en standaarden	3
5	Monsterbewaring	4
6	Voorbehandeling	4
7	Meting	5
7.1	<i>Meetcondities</i>	5
7.2	<i>Identificatie en integratie</i>	6
7.3	<i>Kalibratie en kwantificatie</i>	6
8	Kwaliteitscontrole	6
8.1	<i>Terugvinding van de interne standaarden</i>	6
8.2	<i>QC monster</i>	7
9	Veiligheid	7
10	Referentie	7

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure is nieuw en wordt gebruikt voor de analyse van microcystine-LR in drinkwater. De methode is gericht op de kwantificering van:

Naam	CAS-nr
Microcystine-LR	101043-37-2

2 PRINCIPE

Deze procedure is geschikt voor de bepaling van totaal (vrij en intracellulair) microcystine-LR in drinkwater met behulp van directe injectie vloeistof chromatografie en tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS) met electrospray ionisatie. De kwantificering gebeurt met de interne standaard methode met nodularin als interne standaard. Het waterstaal wordt gehomogeniseerd en aan een deelstaal wordt interne standaard toegevoegd. De eventueel aanwezige cellen worden gebroken door 3 opeenvolgende cycli van invriezen en ontdooien. De meting gebeurt met LC-MS/MS.

Opmerking:

- Voor de meting mag ook LC-HRMS toegepast worden.

3 MATERIAAL

- Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- Injectiespuiten of micropipetten
- Meetvials
- LC-MS/MS bestaande uit:
 - o een LC-systeem (hoge druk of ultra hoge druk) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid
 - o een tandem quadrupool massa spectrometer met electrospray en ev. APCI interface
Opm.: Alternatief kan gebruik gemaakt worden van een ion trap of een accurate massa (time-of-flight (TOF) of Fourier Transform) massaspectrometer
 - o een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- LC-kolom: bv. Aquity BEH C18, 1.7µm, 2.1 x 150 mm of gelijkwaardig
- Diepvries
- Warmwaterbad

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- Acetonitrile: gradiënt grade
- Water: ultrapuur
- Mierenzuur: p.a.

- Natriumthiosulfaat pentahydraat: p.a. (conserveringsmiddel)
- Stockoplossing nodularin (interne standaard): in de handel verkrijgbaar als een oplossing van bv. 10 µg/ml in methanol
- Stockstandaard microcystine-LR: in de handel verkrijgbaar als een oplossing van bv. 10 µg/ml in methanol:water 1:1
- Werkoplossing interne standaard: verdun de stockoplossing in water tot een concentratie van bv. 2 µg/l (= oplossing A)
- Werkoplossing microcystine-LR: verdun de stockoplossing in water tot een concentratie van bv. 10 µg/l (= oplossing B)
- Kalibratiereeks: microcystine-LR blijkt te adsorberen aan de tip van micropipetten, vooral bij kleinere volumes. Gebruik daarom bij de bereiding geen micropipetten maar werk met grotere volumes. Maak de kalibratiereeks bv. aan als volgt:

	Bereiding	Conc microcystine-LR (µg/l)	Conc nodularin IS (µg/l)
Kal 1	2 ml A + 2 ml B	5	1
Kal 2	2 ml A + 5 ml B + 3 ml water	2	1
Kal 3	2 ml L2 + 1 ml B + 1 ml water	1	1
Kal 4	2 ml L2 + 3 ml B + 3 ml water	0.5	1
Kal 5	2 ml L3 + 4 ml B + 4 ml water	0.2	1

5 MONSTERBEWARING

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

De stalen worden geconserveerd met natriumthiosulfaat 150 mg/l. Los 157 g natriumthiosulfaat pentahydraat op in 1 liter blanco water. Voeg 0.75 ml van deze oplossing toe aan 500 ml staal.

6 VOORBEHANDELING

Alle stalen, procedureblanco's, controlestalen en kalibratieoplossingen dienen conserveringsmiddel te bevatten (150 mg/l natrium thiosulfaat).

De drinkwaterstalen worden niet gefiltreerd. Homogeniseer het staal door te schudden en breng een deelstaal van 1 ml over in een geschikt recipiënt. Voeg 1 ml interne standaard werkoplossing (oplossing A) toe. Breng ook 1 ml procedureblanco en 1 ml controlestaal over in een geschikt recipiënt en voeg aan elk 1 ml interne standaard werkoplossing (oplossing A) toe.

Vrijstelling van intracellulair microcystine kan op verschillende manieren gebeuren:

- Zet alle oplossingen in de diepvries tot de oplossingen bevroren zijn. Haal de oplossingen vervolgens uit de vriezer en laat ze ontdooien in een warmwaterbad van ongeveer 40-50 °C. Herhaal de invries- en ontdooistap nog 2 keer. Breng de oplossingen daarna over in een meetvial.
- Soniceer de oplossingen gedurende 10 min. Breng de oplossingen daarna over in een meetvial.
- Verhit de oplossingen tot 60 °C gedurende 10 min. Breng de oplossingen daarna over in een meetvial.

7 METING

7.1 MEETCONDITIES

Een voorbeeld van een geschikte kolom voor de UPLC bepaling van microcystine is Aquity BEH C18, 1.7µm, 2.1 x 150 mm of gelijkwaardig.

Typische UPLC-instellingen zijn:

- mobiele fase A = water + 0.02% mierenzuur
- mobiele fase B = acetonitrile
- debiet: 0.45 ml/min
- kolomtemperatuur: 50°C
- injectievolume: 100 µl
- gradiënt:

Tijd (min)	%A	% B
0	100	0
2	100	0
13	0	100
15	0	100
17	100	0
20	100	0

Hieronder zijn typische instellingen voor de MS-acquisitie gegeven:

MS parameter	HPLC-MS/MS
Polariteit	ESI+
Capillary Voltage (kV)	1.0
Brontemperatuur	150
N2 desolvation temperatuur (°C)	600
N2 desolvation gas flow, (L/Hr)	1000
Cone gas flow (L/hr)	150
Cone voltage (V)	50
Collision energy (V)	45

De onderstaande typische ionentransities worden geregistreerd:

component	Moederion (m/z)	Dochterion (m/z)
Microcystine-LR	995.4	135
	995.4	127
Nodularin (IS)	825.4	135.4
	825.4	227

7.2 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De dataverwerking gebeurt met de software van het apparaat. Extraheer voor elke verbinding uit bovenstaande tabel de overeenstemmende ionenchromatogrammen en bepaal van elke geïdentificeerde piek de oppervlakte. De identificatie en kwantificatie van de pieken gebeurt op basis van de retentietijden en de ionenratio's van de transitie's in bovenstaande tabel, op basis van de criteria vermeld in WAC/VI/A/003.

7.3 KALIBRATIE EN KWANTIFICATIE

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar WAC/VI/A/003) :

- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval worden aan het begin van de analysereeks minimaal 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan 0 en verspreid over het lineair gebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van microcystine-LR en de overeenkomstige interne standaard nodularin. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. De afwijking van elk punt tot de rechte mag maximum 20% bedragen.
- aan de hand van kwadratische curven. Indien bij de lineariteitstest gebleken is dat er geen lineair maar een kwadratisch verband is tussen concentratie en respons, dan kunnen kwadratische curven gebruikt worden voor de kalibratie. Daartoe worden aan het begin van de analysereeks minimaal 5 kalibratie-oplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van microcystine-LR en nodularin. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend. De afwijking van elk punt tot de curve mag maximum 15% bedragen.

De berekening van de kalibratiecurve gebeurt bij elke analysereeks. Om de 10 monsterinjecties wordt de geldigheid van de kalibratierechte gecontroleerd door injectie van een kalibratiestandaard uit het midden van de kalibratiereeks. De berekende concentratie mag maximum 30% afwijken van de werkelijke concentratie.

De concentratie van microcystine-LR in het monster worden vervolgens berekend met behulp van de kalibratierechte of curve.

Opmerking: bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied het staal verdund te worden

8 KWALITEITSCONTROLE

Voor de kwaliteitseisen ivm procedureblanco en controle op gevoeligheid wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

8.1 TERUGVINDING VAN DE INTERNE STANDAARDEN

Voor elk monster wordt de terugvinding van de interne standaard bepaald, dit is de experimenteel teruggevonden hoeveelheid van de bij het begin van de analyse toegevoegde interne standaard. Dit

gebeurt door vergelijking van de piekoppervlakte van de interne standaard bekomen voor het monster ($A_{is(monster)}$) t.o.v. de gemiddelde piekoppervlakte bekomen voor een kalibratiestandaarden ($A_{is(standaard)}$).

De terugvinding wordt gegeven door:

$$\text{Terugvinding \%} = A_{is(monster)} / A_{is(standaard)} * 100$$

Voor een verantwoorde kwantificering dient het terugvindingsrendement van de interne standaard minimaal 50 % en maximaal 200% te bedragen.

8.2 QC MONSTER

Om de terugvinding en de reproduceerbaarheid te controleren wordt bij elke meetreeks een controlestaal geanalyseerd. Het controlestaal wordt aangemaakt door additie van microcystine-LR aan kraanwater met conserveringsmiddel. De terugvinding van microcystine-LR moet gelegen zijn tussen 70% en 130%. Het gehalte wordt opgetekend in een controlekaart en de opgetekende waarden worden getoetst aan de voor controlekaarten geldende criteria.

9 VEILIGHEID

De scheikundige producten die bij deze analysemethode gebruikt worden, zijn potentieel giftig en/of kankerverwekkend. 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 REFERENTIE

NBN ISO 22104 (2021): Water quality - Determination of microcystins – Method using liquid chromatography and tandem mass spectrometry (MC-MS/MS).