

Bepaling van 17-beta-estradiol in drinkwater

INHOUD

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

1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Deze procedure is nieuw en wordt gebruikt voor de analyse van 17-beta-estradiol in drinkwater. De methode is gericht op de kwantificering van:

Naam	CAS-nr
17-beta-estradiol	50-28-2

2 PRINCIPE

Aan waterstalen worden gekende hoeveelheden isotoop gemerkte verbindingen toegevoegd. De waterstalen worden vervolgens geëxtraheerd met vaste fase extractie. De vaste fase wordt geëluëerd met methanol en het methanolextract wordt ingedampt. Het residu wordt opgenomen in een gekend volume mobiele fase en geanalyseerd met vloeistofchromatografie met massaspectrometrische detectie. Het gehalte van 17-beta-estradiol wordt berekend met de interne standaard methode.

Opmerkingen:

- In deze methode is een offline vaste fase extractie beschreven. De vaste fase extractie kan alternatief ook met een online SPE module uitgevoerd 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 voor de additie van isotoopgemerkte hormonen of van natieve hormonen (matrixaddities)
- Meetvials
- SPE-opstelling voor elutie van de SPE disks
- SPE disks, bv. Supelco Empore C18 (47 mm)

Opmerkingen:

- o Andere SPE fasen zijn mogelijk; validatie-experimenten dienen aan te tonen dat voldoende terugvinding en reproduceerbaarheid wordt bekomen.
- o Ook online SPE is toegelaten
- o In plaats van SPE-disks kunnen ook SPE-kolommetjes toegepast worden.
- Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- LC-MS/MS bestaande uit:
 - o een LC-systeem (hoge druk of ultra hoge druk) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid

- 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
- 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 C18, 1.7 µm, 2.1 x 100 mm voor UPLC-meting

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- Methanol: bv. Merck 'gradiënt grade, for liquid chromatography'
- Acetonitrile: bv. Merck 'gradiënt grade, for liquid chromatography'
- Water: ultrapuur
- Ascorbinezuur: p.a. (conserveringsmiddel)
- Ammoniumhydroxyde 29% p.a.
- Stockstandaard 17-beta-estradiol: uitgaande van zuiver vast product of van een aangekochte oplossing wordt een stockoplossing van bv. 1000 µg/ml in methanol bereid.
- Interne standaard: isotoop gelabeld 17-beta-estradiol, bv. ¹³C₃-17-beta-estradiol
- Stockstandaard interne standaard: uitgaande van zuiver vast product of van een aangekochte oplossing wordt een stockoplossing van bv. 500 µg/ml in methanol bereid.
- Werkoplossing interne standaard: uitgaande van de stockstandaard van de interne standaard wordt een werkoplossing gemaakt in methanol die bv. 100 µg/l bevat.
- Kalibratiewerkstandaarden: maak uitgaande van de stockstandaarden een reeks van minstens 4 verdunningen (bij kwadratische kalibratie: 5 verdunningen) in 50% methanol in water. De concentraties van 17-beta-estradiol variëren van bv. 0.05 tot 10 µg/l en de concentraties van de interne standaarden zijn constant, bv. 2 µg/l.
- QC-controlestaal: maak een controlestaal aan door additie van 17-beta-estradiol aan een blanco waterstaal. De concentratie van 17-beta-estradiol ligt bij voorkeur in het midden van het meetbereik.

5 MONSTERBEWARING

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

6 VOORBEHANDELING

Alle stalen, inclusief procedureblanco's en controlestalen, dienen conserveringsmiddel te bevatten (150 mg/l ascorbinezuur). De stalen worden niet gefiltreerd.

7 EXTRACTIE

Voeg aan het volledige waterstaal (1 liter) een gekende hoeveelheid interne standaard werkoplossing toe zodat de concentratie van de interne standaard in het staaextract ongeveer gelijk is aan de concentratie van de IS in de kalibratiewerkoplossingen. Het watermonster wordt vervolgens gehomogeniseerd door opschudden.

Een voorbeeld van extractiewijze met C18 SPE disk patronen is hieronder opgenomen.

De procedure omvat volgende stappen:

- Reinig de SPE-disk met achtereenvolgens 10 ml en 5 ml methanol
- conditioneer de SPE-disk met 10 ml MeOH, laat onder vacuüm intrekken tot er nog 1 ml over blijft (de disk mag niet droog komen)
- conditioneer de SPE-disk vervolgens met 10 ml water, laat onder vacuüm intrekken tot er nog 1 ml over blijft (de disk mag niet droog komen)
- breng het waterstaal (1 liter) op de disk, laat onder vacuüm intrekken tot er nog 1 ml overblijft (de disk mag niet droog komen)
- spoel de monsterfles na met 10 ml MeOH 15% in water
- trek de disk droog gedurende 10 tot 15 min
- plaats een collecteervial onder de disk
- breng 5 ml MeOH op de disk en laat 1 minuut inwerken, zet daarna het vacuüm aan en vang het eluaat op (traag elueren)
- herhaal nog 2 keer met telkens 5 ml MeOH
- damp het extract in onder een N₂ stroom tot 0.5 ml
- voeg 0.5 ml water:methanol (1:1) toe

8 METING

8.1 MEETCONDITIES

Een voorbeeld van een geschikte kolom voor UPLC bepaling is de Acquity UPLC BEH C18, 1.7 µm, 2.1 x 100 mm.

Typische UPLC-instellingen zijn:

- mobiele fase: A= Water + 0.02% NH₄OH
- mobiele fase B= MeOH + 0.02% NH₄OH
- debiet: 0.3 ml/min
- kolomtemperatuur: 50 °C
- injectievolume: 100 µl
- gradiënt:

Tijd (min)	%A	% B
0	70	30
1.00	70	30
2.50	5	95
4.00	5	95
4.20	70	30
6.00	70	30

Hieronder zijn typische instellingen voor de MS-acquisitie gegeven:

MS parameter	HPLC-MS/MS
Polariteit	ESI-
Capillary Voltage (kV)	2.5
Brontemperatuur	150
N2 desolvation temperatuur (°C)	650
N2 desolvation gas flow, (L/Hr)	1200
Cone gas flow (L/hr)	150
Cone voltage (V)	40
Collision gas flow (ml/min)	0.2
Collision cell pressure (bar)	7

De onderstaande ionentransities worden typisch geregistreerd.

component	ESI mode	Parent (m/z)	daughter (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)	Interne standaard
17-beta-estradiol	ESI+	271.2	145.1	50	40	13C6-estradiol
		271.2	183.0	50	40	
13C3-estradiol	ESI+	274.2	148.1	50	40	
		274.2	186.1	50	40	

8.2 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De dataverwerking gebeurt met de software van het apparaat. Extraheer voor elke verbinding uit bovenstaande tabel de overeenstemmende ionen chromatogrammen en bepaal van elke geïdentificeerde piek de oppervlakte. De identificatie en kwantificatie van 17-beta-estradiol gebeurt op basis van de retentietijden en van de ionenratio's van de transities in bovenstaande tabel, op basis van de criteria vermeld in WAC/VI/A/003.

8.3 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 de natieve hormonen en de overeenkomstige interne standaard. 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 de native hormonen en de overeenkomstige interne standaard. 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 concentraties van 17-beta-estradiol in het monster wordt vervolgens berekend met behulp van de kalibratierechte of curve.

Opmerking: bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied het staal verdund te worden met 50% methanol. Er mag maximum 10 keer verdund worden. Indien omwille van lineariteit meer verdund moet worden dan wordt verse interne standaard aan het meetextract toegevoegd; dit dient op het analyseverslag vermeld te worden.

9 KWALITEITSCONTROLE

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

9.1 TERUGVINDING VAN DE INTERNE STANDAARD

Voor elk monster wordt de terugvinding van de isotoopgemerkte 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 isotoop gemerkte verbinding 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 ^{13}C -gemerkte interne standaard minimaal 50 % en maximaal 200% te bedragen.

Opmerking: bij waterstalen die veel ijzer bevatten kan door reactie met ascorbinezuur een neerslag ontstaan dat de extractie hindert. In dat geval kan de terugvinding van de interne standaard lager liggen dan 50%. Als de terugvinding tussen 10% en 50% ligt mag een kwantitatief resultaat gerapporteerd worden mits toevoeging van een opmerking op het analyseverslag. Bij een terugvinding van minder dan 10% mag geen kwantitatief resultaat gerapporteerd worden.

9.2 QC MONSTER

Om de terugvinding en de reproduceerbaarheid te controleren wordt bij elke meetreeks het QC-controlestaal geanalyseerd (zie punt 4: Reagentia en standaarden). De terugvindingen van 17-beta-

estradiol 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.

10 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.

11 REFERENTIE

EPA method 539: Determination of hormones in drinking water by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)