

Indholdsfortegnelse

1.	Anvendelsesområde	2
2.	Referencer.....	3
3.	Definitioner	4
4.	Princip	5
5	Reagenser og standarder	6
	Fremstilling af mobilfaser	6
	Fremstilling af intern standardopløsning.....	6
	Fremstilling af kalibreringsstandarder	6
	Fremstilling af kontrolprøver	7
	Fremstilling af blindprøver.....	8
6.	Apparatur	9
7.	Fremgangsmåde.....	11
	Opsætning af sekvens.....	11
8.	Resultatberegning.....	12
9.	Analysekvalitet.....	13
	Kromatogrameksempler	14

1. Anvendelsesområde

Ved metoden bestemmes indholdet af N-methylsaccharin (CAS-nr 15448-99-4) og propylene urea (CAS-nr 1852-17-1). Metoden anvendes til drikkevand, grundvand, overfladevand og fersk recipientvand.

Metoden er valideret i området fra 0,01 – 0,4 µg/l. Prøver med indhold over 0,4 µg/l fortyndes i hanevand med dokumenteret renhed.

Analysen udføres ved hjælp af LC-MS/MS med positiv elektrospray ionisering (ESI+). Ved valideringen er der ikke fundet problemer med interferens.

Der udtages minimum 10 ml prøve.

2. Referencer

Metoden er baseret på Eurofins interne metode M0336 (bestemmelse af pesticider i vand ved direkte injektion på LC-MS/MS) , se under princip. I litteraturen kan findes mange referncer vedrørende bestemmelse af pesticider, der anvender direkte injektion af prøven, eksempelvis. Referencen omhandler både direkte injektion og onlibe spe. Nærværende metode er baseret på direkte injektion.

http://www.ingenieria-analitica.com/downloads/dl/file/id/2716/product/110/comparison_of_direct_injection_and_online_spe_for_quantification_by_lc_ms_of_trace_level_herbicides_in_water.pdf

3. Definitioner

Metoden indeholder ikke ord og begreber, som ikke kan forstås af laboratorieuddannet personale.

4. Princip

Prøven tilsettes intern standard og analytterne bestemmes ved direkte injektion af vandprøven på LC-MS/MS. Prøven kan filtreres ved behov, hvis det dokumenteres, at filtreringen ikke fører til falsk positive eller falsk negative resultater.

Der måles ved LC-MS/MS. For hvert stof måles på 2 ionovergange. Der kvantificeres vha intern standardmetode.

5 Reagenser og standarder

- 5.1 N-methylsaccharin CAS-nr 15448-99-4
- 5.2 Propylene urea CAS-nr 1852-17-1
- 5.3 Atrazin-d5 CAS -nr 163165-75-1
- 5.4 Ammoniumfluorid CAS-nr 12125-01-8
- 5.5 HPLC-vand. LiChrosolv 4L, 1.15333.4000 Merck
- 5.6 Methanol, Honeywell produktnummer 34860-2,5L, CAS-nr 67-56-1. Renhed > 99,9%
- 5.7 Hanevand

Fremstilling af mobilfaser

Mobil fase A: Afvej 0,092 g ammoniumfluorid (5.4) til 500 ml HPLC-vand (5.5)

Mobil fase B: Afvej 0,092 g ammoniumfluorid (5.4) til 500 ml methanol (5.6)

Fremstilling af intern standardopløsning

Afvej 20 mg Atrazin-d5 (5.3) i 10 ml kolbe og fyld op med methanol → 2000 mg/l

Udtag 100 µl af 2000 mg/l til 10 ml målekolbe med methanol → 20 mg/l

Udtag 100 µl af 20 mg/l til 10 ml målekolbe med methanol → 0,2 mg/l

Udtag 500 µl af 0,2 mg/l til 10 ml målekolbe med methanol → 0,01 mg/l

0,01 mg/l er brugsopløsningen.

Fremstilling af kalibreringsstandarder

Stamopløsning 1

Afvej 20 mg methylsaccharin (5.1) til 10 ml målekolbe, der fyldes op med methanol (5.6) → 2000 mg/l

Stamopløsning 2

Afvej 20 mg propylene urea (5.2) til 10 ml målekolbe, der fyldes op med methanol (5.6) → 2000 mg/l

Der udtages 50 µl af både stamopløsning 1 og stamopløsning 2 til 10 ml målekolbe, der fyldes op med methanol (5.6). Dette giver en fortynding indeholdende begge analytter med koncentrationen 10 mg/l (fortynding 1).

Af fortynding 1 udtages 100 µl til 10 ml målekolbe, der fyldes op med methanol. Dette giver en fortynding indeholdende begge analytter med koncentrationen 0,1 mg/l (fortynding 2).

Af fortynding 2 udtages 50 µl til 500 ml målekolbe, der fyldes med hanevand (5.7) → kal std 0,01 µg/l

Af fortynding 2 udtages 100 µl til 500 ml målekolbe, der fyldes med hanevand (5.7) → kal std 0,02 µg/l

Af fortynding 2 udtages 250 µl til 500 ml målekolbe, der fyldes med hanevand (5.7) → kal std 0,05 µg/l

Af fortynding 2 udtages 100 µl til 50 ml målekolbe, der fyldes med hanevand (5.7) → kal std 0,2 µg/l

Af fortynding 2 udtages 200 µl til 50 ml målekolbe, der fyldes med hanevand (5.7) → kal std 0,4 µg/l

Fremstilling af kontrolprøver

Stamopløsning 3

Afvej 20 mg methylsaccharin (5.1) til 10 ml målekolbe, der fyldes op med methanol (5.6) → 2000 mg/l

Stamopløsning 4

Afvej 20 mg propylene urea (5.2) til 10 ml målekolbe, der fyldes op med methanol (5.6) → 2000 mg/l

Til stamopløsning 3 og 4 skal anvendes udgangsstoffer af andet fabrikat end, der er blevet anvendt til stamopløsning 1 og 2.

Der udtages 50 µl af både stamopløsning 3 og stamopløsning 4 til 10 ml målekolbe, der fyldes op med methanol (5.6). Dette giver en fortynding indeholdende begge analytter med koncentrationen 10 mg/l (fortynding 3).

Af fortynding 3 udtages 100 µl til 10 ml målekolbe, der fyldes op med methanol. Dette giver en fortynding indeholdende begge analytter med koncentrationen 0,1 mg/l (fortynding 4).

Af fortynding 4 udtages 150 µl til 500 ml målekolbe, der fyldes med hanevand (5.7) → kontrol 0,03 µg/l

Af fortynding 4 udtages 150 µl til 50 ml målekolbe, der fyldes med hanevand (5.7) → kal std 0,3 µg/l

Kontrolprøverne udføres som ægte dobbeltbestemmelse.

Fremstilling af blindprøver

Hanevand anvendes som blindprøve. Blindprøverne behandles som øvrige prøver.

6. Apparatur

Der analyseres på væskekromatograf med MS/MS-detektion.

Den anvendte HPLC er udstyret med:

- Autosampler Agilent 1290 multisampler G7167B
- Kolonneovn G7116B 1290MCT
- Pumpe 7120A 1290 high speed pump

Den anvendte triple quad er:

- Agilent 6495B

Anvendt kolonne:

- Phenomenex Luna Omega 3 µm Polar C18 100 Å. Partnummer PRD-441672

Der anvendes gradient HPLC. Gradient er som vist i tabel 1:

Tid minutter	% mobil A	% mobil B	Flow ml/min
0	100	0	0,4
0,5	100	0	0,4
7	5	95	0,4
8	5	95	0,4
8,1	100	0	0,4
11	100	0	0,4

Tabel 1

Injektionsvolumen 100 µl

MS/MS-indstillinger:

Til analysen er anvendt Agilent 6495B. Der anvendes positiv elektrospray. Stofspecifikke indstillinger fremgår af tabel 2:

Stof	Precursor ion [M+H] ⁺	Produkt ion 1	Kollisionsenergi 1	Produkt ion 2	Kollisionsenergi 2
Methylsaccharin	198	133,9	25	120,9	25
Propylene urea	101	58,2	25	56,1	25

Tabel 2

Overordnede indstillinger for instrumentet fremgår af tabel 3:

Gas temp. °C	Gas flow l/min	Nebulizer tryk psi	Sheath gas temp °C	Sheath gas flow l/min	Capillary voltage	Nozzle voltage
250	11	40	400	12	4000	1000

Tabel 3

7. Fremgangsmåde

Prøven udtages i glasflasker. Renheden af disse skal være dokumenteret ved emballagekontrol.

Prøverne transporteres nedkølet til laboratoriet og opbevares herefter på køl ($<4^{\circ}\text{C}$) indtil analyse. Prøverne skal tages i arbejde senest 14 dage efter modtagelse på laboratoriet.

Præcis 1000 μl prøve afpipetteres til vial. Der tilsættes 50 μl intern standardbrugsopløsning. Låget sættes på, prøven rystes og er nu klar til analyse.

De 5 kalibreringsstandarder, de 4 kontrolprøver samt 2 blindprøver (hanevand) behandles på tilsvarende vis.

Opsætning af sekvens

Sekvensen sættes op på følgende måde:

- 3 indkøringer til at stabilisere instrumentet, anvend mellemste standard
- Standardkurve
- Blindprøver
- Kontrolprøver
- Kundeprøver
- Blindprøve
- Kontrolprøver

For at en sekvens kan godkendes skal start- og slutkontrollerne ligge indenfor de foruddefinerede grænser.

8. Resultatberegning

$$C = F * \left(\left(\frac{A_a}{A_{is}} \right) - \left(\frac{A_{blind}}{A_{is\ blind}} \right) \right) / h$$

C: Beregnet koncentration

F: Fortyndingsfaktor

A_a: Areal for analyt

A_{is}: Areal intern standard i prøven

A_{blind}: Areal for analyt i blind

A_{is, blind}: Areal intern standard i blind

h: Hældning af kalibreringskurve

9. Analysekvalitet

Ved valideringen er følgende parametre fastlagt.

Komponent	Detektionsgrænse µg/l	Uabs µg/l	Urel %	Måleområde µg/l	Genfinding lavt niveau %	Genfinding højt niveau %
N-methylsaccharin	0,01	0,03	30	0,01 – 0,4	88	111
Propylene urea	0,01	0,03	30	0,01 – 0,4	94	95

Tabel 4

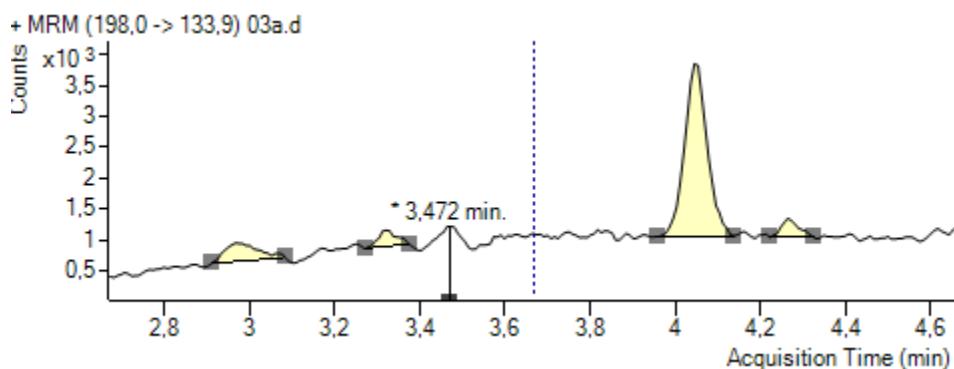
Komponent	CV (%) på lavt niveau	CV (%) på højt niveau
N-methylsaccharin	5,0	6,0
Propylene urea	8,0	11

Tabel 5

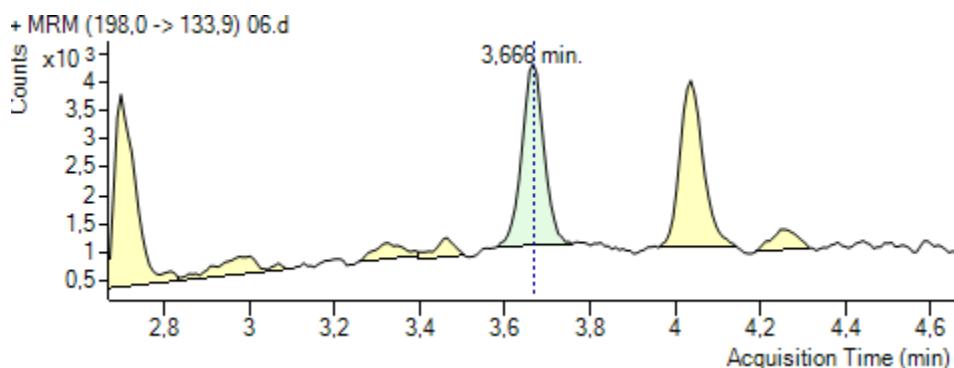
Detektionsgrænsen er fastlagt som $3 * S_w$, hvor S_w er spredningen indenfor dagen på 8 bestemmelser af en kontrolprøve med koncentration $3 * \text{den ønskede detektionsgrænse}$.

Kromatogrammeksempler

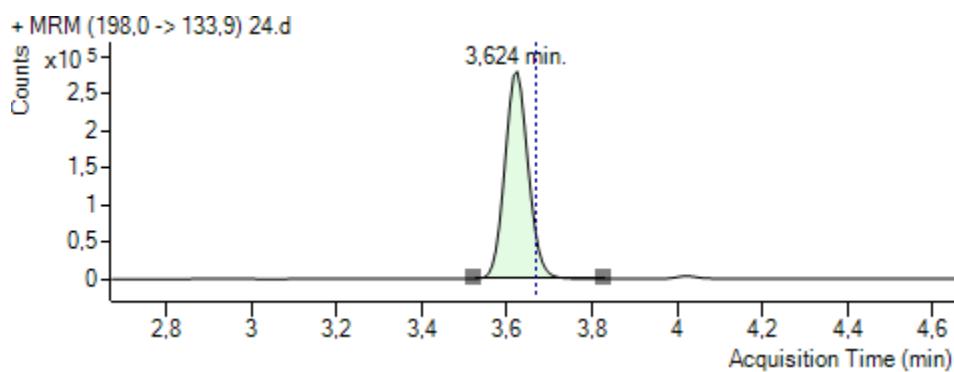
N-methylsaccharin, blind:



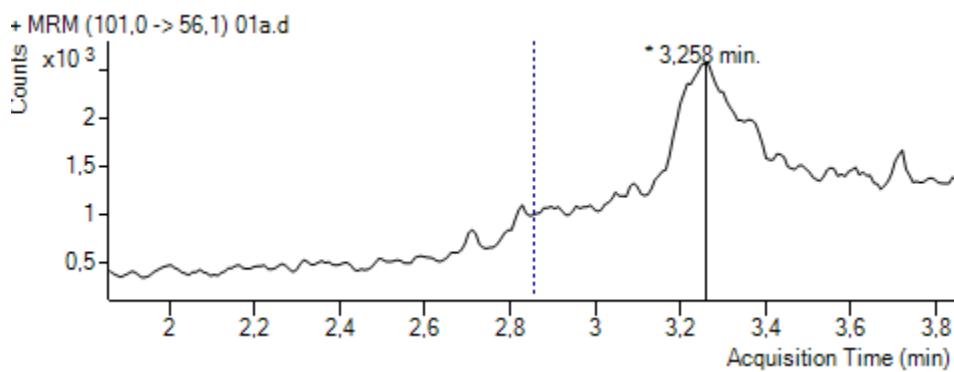
N-methylsaccharin, niveau 0,01 µg/l:



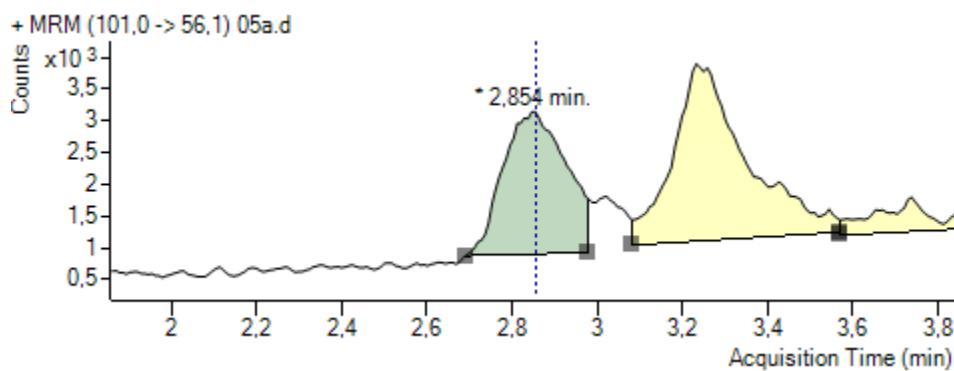
N-methylsaccharin, niveau 0,4 µg/l:



Propylene urea, blind:



Propylene urea, niveau 0,01 µg/l:



Propylene urea, niveau 0,4 µg/l:

