

Projectnr.: 71.666.01

Titel project: Ontwikkelen en toepasbaar maken analysemethoden diervoeder

Projectleider: T.C. de Rijk

Rapport 2006.004

april 2006

Ontwikkeling van een LC-MSMS methode voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van cyclopiazonzuur in diervoeder en tarwemeel

T.C. de Rijk, P. Zomer, S. Moorhof, W.A. Traag

Business Unit: Analyse & Ontwikkeling
Cluster: Bestrijdingsmiddelen en Contaminanten

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Tel: 0317-475422
Fax: 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2006, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

VERZENDLIJST

EXTERN:

Voedsel en Waren Autoriteit, (Mr.drs. R.G. Herbes, Dr. M.J.B. Mengelers, Drs. P.G.M. Zweipfennig, Drs. E Decker, Dr. M. Spanjer)

Ministerie Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, Directie VD, (Dr. R.M.C. Theelen,

Drs. S. Brouwer, Mr. M. van den Broeke)

RIVM (Ir. H.P. van Egmond)

Algemene Inspectie Dienst (Drs. M.L. Zandvliet, I. Besse)

INHOUDSOPGAVE	blz
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 VERBETERING CHROMATOGRAFIE	6
2.1 Uitgevoerde experimenten	6
2.2 Resultaten kolomkeuze	6
2.3 Resultaten Analyse	7
3 LC-MSMS	9
3.1 Vaststelling MS-parameters	9
3.2 Resultaten LC-MSMS	9
4 VALIDATIE	11
4.1 Conclusie	12
LITERATUUR	13
BIJLAGE 1 Werkvoorschrift CPA	

SAMENVATTING

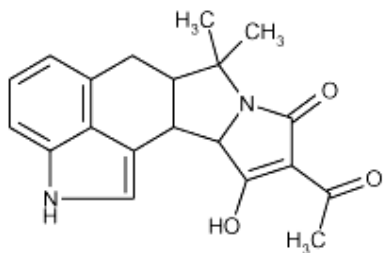
Cyclopiazonic acid (CPA) is een mycotoxine dat een potentieel risico kan betekenen voor welzijn en gezondheid van mens en dier. Tevens is van CPA uit onderzoek bekend dat CPA overgedragen kan worden naar dierlijke producten als melk en eieren. Voor de analyse van CPA in diervoeder is geen kwantitatieve, bevestigende analyse bekend. Dit rapport beschrijft de ontwikkeling, toepassing en validatie van een analysemethode voor CPA in diervoeder. De ontwikkelde methode voldoet aan eisen zoals gesteld in 2002/657/EC en kent een detectiegrens van 20 µg/kg. Met de ontwikkelde methode is het mogelijk om CPA op te nemen in het Controleprogramma diervoeder.

1 INLEIDING

Mycotoxines zijn secundaire metabolieten die geproduceerd worden door schimmels. Ze kunnen een sterk negatief effect hebben op de gezondheid van mens en dier. Een bekend voorbeeld is de dood van ca 100.000 kalkoenen in Engeland in 1960 die veroorzaakt werd door Aflatoxines, afkomstig uit beschimmeld pindameel. Er bestaat geen gewas dat niet in meer of mindere mate vatbaar is voor schimmelgroei, waarbij een grote afhankelijkheid bestaat van groei- en opslagcondities. In relatie tot het vóórkomen van mycotoxinen zijn granen, noten en fruit (met name gedroogd fruit) belangrijke gewasgroepen. De belangrijkste bron van mycotoxines in de humane en dierlijke voedselketen is de consumptie van gecontamineerde landbouw- en dierlijke producten (Losito et al, 2002). De monitoring van het gehalte aan mycotoxines is dus van groot belang voor dierwelzijn en volksgezondheid.

RIKILT heeft een LC-MSMS multimethode ontwikkeld (RSV A0255) waarmee 17 mycotoxines (Aflatoxine B1/B2/G1/G2, Fumonisine B1/B2/B3, T2, HT2, Zearalenon, Ochratoxine, Deoxynivalenol (DON), 3-Acetyl-DON, Diacetoxyscirpenol (DAS), α/β -Zearalenol en Sterigmatocystine, RSV A0255) in diervoeder en meel kunnen worden aangetoond. Een aantal mycotoxines waarvoor binnen het RIKILT belangstelling bestaat, omdat deze een potentieel risico kunnen vormen voor de gezondheid van mens en dier, kunnen binnen deze methode niet bepaald worden. Een van deze mycotoxines is cyclopiazonzuur (CPA).

CPA is een indol tetramisch zuur (Figuur 1), dat wordt geproduceerd door diverse *Aspergillus* en *Penicillium* soorten die o.a. kunnen groeien op granen en kaas. Hoewel uit dierproeven is gebleken (EMAN < 2006) dat CPA pas in hogere concentraties (enkele mg/kg lichaamsgewicht) toxisch is, waarbij dan vooral schade ontstaat aan het zenuwstelsel, de bloedvaten, lever en nieren, zou er voor de mens een risico kunnen ontstaan omdat CPA in veel verschillende producten kan voorkomen. Er zijn hoeveelheden CPA tot 10 mg/kg en hoger gevonden in maïs, gierst, pinda's, peulvruchten, kaas, ham, worst, hooi, tomaten, melk en andere voedingsmiddelen (EMAN, 2006). Tevens is overdracht gevonden van CPA uit diervoer naar melk en eieren (Dorner et al, 1994). In melk en melkproducten lijkt CPA bovendien langdurig stabiel te blijven (Prasongsid et al, 1997).



Figuur 1. CPA

Het doel van dit onderzoek is een analysemethode voor CPA in diervoeder te ontwikkelen die voldoet aan kwalitatieve en kwantitatieve eisen zoals vastgelegd in richtlijn 2002/657/EC. Voor het gehalte CPA in diervoeder zijn geen MRL's of richtlijnen vastgelegd binnen Europa.

De ontwikkeling is in drie delen gesplitst: deel één richt zich op de verbetering van de chromatografie van CPA (uitgevoerd met HPLC met UV-detectie). Nadat dit met goed gevolg is afgesloten is de methode overgezet naar LC-MSMS (deel twee). Tenslotte (deel drie) is de analysemethode gevalideerd.

2 VERBETERING CHROMATOGRAFIE

De RIKILT multimethode voor bepaling van mycotoxines in diervoeder en meel (RSV A0255) maakt gebruik van een RP-C18 kolom en een lineaire eluensgradiënt van ca. 10 – 95% acetonitril in water, waarbij zowel de waterige als de organische oplossing 0,1% mierenzuur bevatten. Onder deze condities geeft CPA brede, sterk tailende pieken, terwijl er bovendien carry-over op kan treden tot max. 30% van de oorspronkelijke injectie. De oorzaak van de piekverbreding is vermoedelijk gelegen in het feit dat CPA zowel een tetramische zuurgroep als een secundaire aminegroep bevat. De aminegroep kan interacties aangaan met actieve silanolgroepen op het pakkingsmateriaal van de kolom. Dit veroorzaakt brede tailende pieken. De zuurgroep is een sterke metaalchelator en kan binden aan metaalionen die aanwezig kunnen zijn in onvoldoende gedemineraliseerde pakkingsmaterialen. Metaalverontreiniging in het pakkingsmateriaal kan ernstige piektiling veroorzaken en zelfs leiden tot totale absorptie van de component (Shephard et al, 1991), hetgeen kan leiden tot carry over.

Om te komen tot een werkbare methode voor de bepaling van CPA is eerst een beperkt literatuuronderzoek verricht naar bestaande HPLC-methodes voor CPA-analyse. In veel bestaande methodes wordt gebruik gemaakt van metaalcomplexering met zinksulfaat waardoor ze ongeschikt zijn voor LC-MS analyse. Door Monaci et al (2002) is een HPLC-DAD methode ontwikkeld die gebruik maakt van een aminopropyl-gebonden silicagel stationaire fase en een loopmiddel met acetonitril en een ammoniumacetaatbuffer. Zij deden uitvoerig onderzoek naar de optimale bufferconcentratie, pH en de verhouding acetonitril/buffer. Kort daarna publiceerde dezelfde onderzoeksgroep een LC-MSMS methode voor CPA (Losito et al, 2002) die gebaseerd is op de bovenstaande HPLC-methode. Omdat dit al een LC-MSMS methode voor CPA is, die bovendien goed lijkt te werken, is deze methode gebruikt als uitgangspunt. Naast deze methode zijn ook een aantal kolommen geselecteerd die getest zijn met als doel tot een goede chromatografie te komen.

2.1 Uitgevoerde experimenten

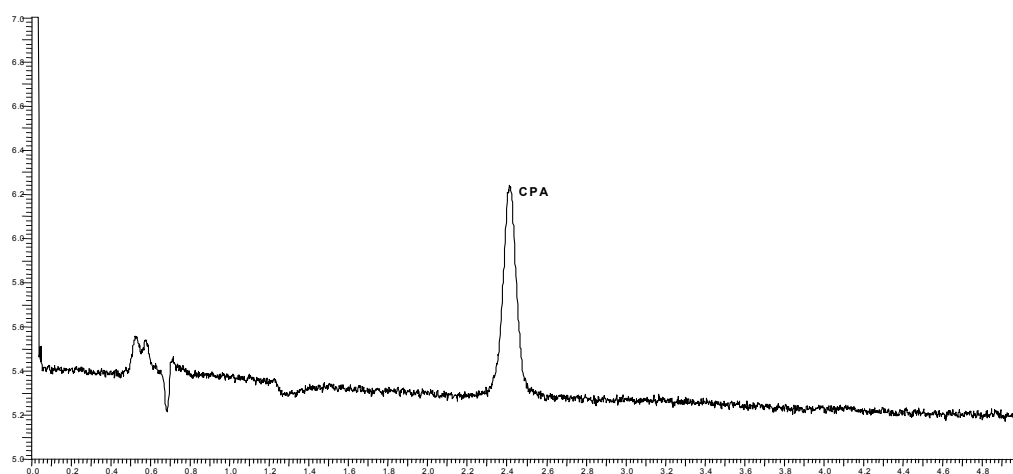
Voor het eerste deel van het project (verbetering van de chromatografie) is gebruik gemaakt van een Merck Hitachi HPLC-systeem voorzien van een on-line degasser, autosampler, kolomoven (32.5 °C) en UV-detector (285 nm). Dataverwerking heeft plaatsgevonden m.b.v. Turbochrom (Perkin Elmer). De analyses zijn uitgevoerd op een aantal verschillende kolommen (Tabel 1. Kolommen). Voor elke kolom is gebruik gemaakt van hetzelfde eluens (ACN/0.05 M NH₄Ac pH 5.0 80/20 v/v) zodat een onderlinge vergelijking eenvoudig te maken is.

2.2 Resultaten kolomkeuze

De NH₂ kolom geeft de beste resultaten, zoals ook uit literatuur te verwachten was. Een voorbeeld hiervan is te zien in Figuur 2. Hierin is bij 2.44 minuten ($k' = 2.6$) een symmetrische piek zichtbaar, afkomstig van CPA.

Tabel 1. Kolommen

Kolomtype	Testresultaat
Alltech Rocket Platinum™ C18, 53 x 7mm	Slechte piekvorm, carry-over
Alltech Rocket Platinum™ EPS C18, 53 x 7mm	Slechte piekvorm, carry-over
Alltech Rocket Platinum™ C8, 53 x 7mm	Slechte piekvorm, carry-over
Alltech Rocket Platinum™ EPS C8, 53 x 7mm	Slechte piekvorm, carry-over
Alltech Rocket Platinum™ NH ₂ , 53 x 7mm	Goede piekvorm, geen carry-over
Alltech Rocket Platinum™ Cyano, 53 x 7mm	Geen retentie
Alltech Alltima™ HP C18 Amide, 100 x 2.1 mm	Geen retentie



Figuur 2. Chromatogram van een standaardoplossing CPA (250 ng/ml).

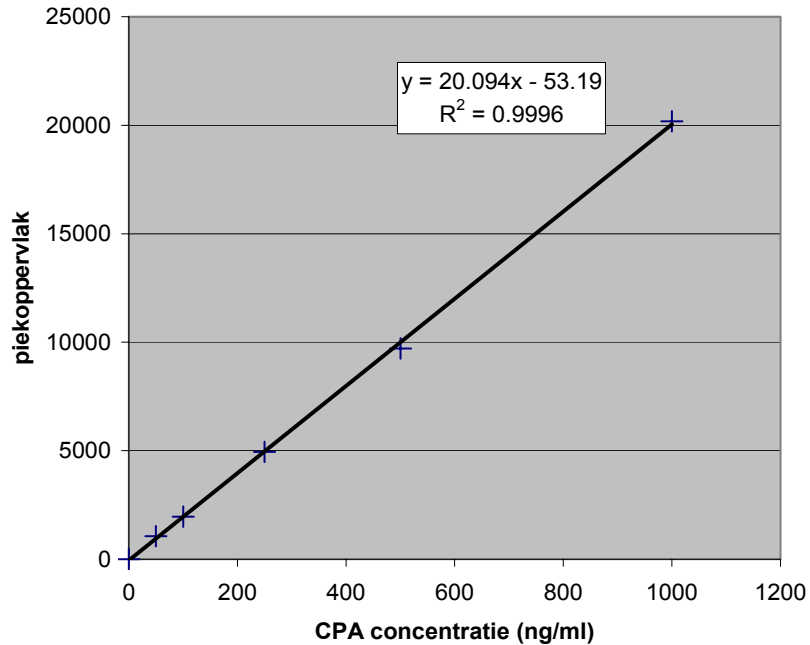
2.3 Resultaten Analyse

Voor het vaststellen van mogelijke carry-over en het vaststellen van het lineaire bereik van de methode is een ijklijn geïnjecteerd (50-1000 ng/ml, driemaal uitgevoerd op drie verschillende dagen) en is tussen de monsters door een injectie met oplosmiddel uitgevoerd om carry-over waar te kunnen nemen.

Wanneer het piekoppervlak wordt uitgezet tegen de CPA-concentratie ontstaat een lineaire ijklijn ($y = ax + b$) met als correlatiecoëfficiënt $r^2 = 0.9996-0.9999$ (Tabel 2. Lineariteits parameters CPA). In figuur 3 (Ijklijn CPA) is een voorbeeld van de ijklijn weergegeven. Dit geeft aan dat de analysemethode over een groot concentratiegebied lineair is. Tevens is er geen carry-over waarneembaar, ook niet na de hoogste standaard (1000 ng/ml).

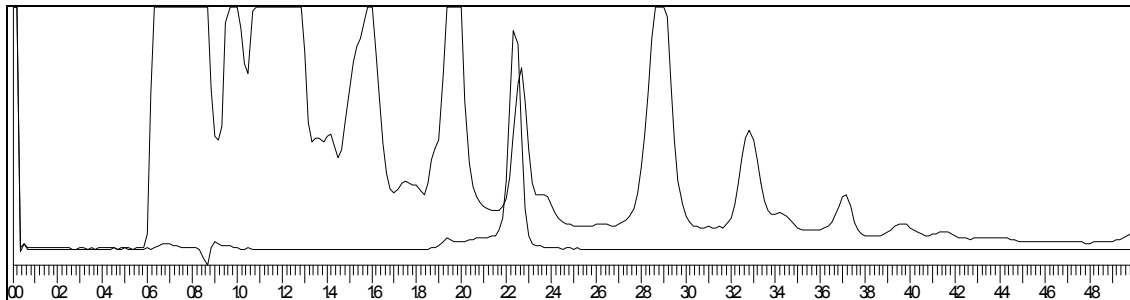
Tabel 2. Lineariteits parameters CPA

IJklijn	a	b	r ²
Dag 1, A	20.09	-53.2	0.9996
Dag 1, B	19.39	+45.8	0.9999
Dag 4, A	20.01	+7.4	0.9996
Dag 4, B	18.06	+151	0.9998
Dag 60	27.51	+64.1	0.9998



Figuur 3. IJklijn CPA

De retentietijd van CPA is niet stabiel (>10% verschil) tussen meerdere meetdagen. Binnen een meetserie is de retentietijd wél stabiel ($\pm 1\%$). Een mogelijke verklaring ligt in een ontmenging van de HPLC-loopvloeistof. Na terugbrengen van het percentage acetonitril van 80% naar 50% vindt geen ontmenging meer plaats en werd een stabiele retentietijd over meerdere dagen verkregen. De analysemethode wordt toegepast op twee tarwemeelmonsters. Hiervoor worden blanco meelmonsters gespiked met CPA-standaardoplossing, overnacht geïncubeerd waarna ze worden geëxtraheerd (volgens RSV A0255) en gemeten. De chromatogrammen van de extracten laten een grote, interfererende piek zien op 2.2 minuten (Figuur 4. Blanco meel + standaard 100 ng/ml) waardoor het onmogelijk is om een tot kwantificering te komen. Besloten wordt om op dit punt de ontwikkelingsfase te stoppen en de analysemethode over te zetten naar LC-MSMS.



Figuur 4. Blanco meel + standaard 100 ng/ml

3 LC-MSMS

Zoals in de inleiding van dit rapport is beschreven is er voor de analyse van CPA in diervoeder met LC-MSMS geen analysevoorschrift bekend. In dit rapport wordt de koppeling van een algemene mycotoxine extractie methode (RSV A0255) aan een aangepaste vorm van een uit literatuur bekende LC-MSMS methode (Losito et al, 2002) beschreven.

3.1 Vaststelling MS-parameters

Voor het uitvoeren van een LC-MSMS experiment moeten de MS-parameters van CPA vastgesteld worden. Door middel van infusie van zuiver CPA zijn deze parameters vastgesteld (Tabel 3. Parameters MS overgangen). Deze parameters komen overeen met wat uit literatuur bekend is (Losito et al, 2002). Alle gegevens zijn beschreven in RSV A1027, Diervoer en Meel - Cyclopiazonic Acid - LC-MSMS (bijlage 1).

Tabel 3. Parameters MS overgangen

	Parent ion] (m/z)	Daughter ion (m/z)	Dwell Time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
Quantifier	337.0	181.8	1	30	22
Qualifier	337.0	195.9	1	30	22

3.2 Resultaten LC-MSMS

Het experiment zoals beschreven onder 1.3 wordt herhaald. In tegenstelling tot de eerste meting wordt de detectie nu mbv LC-MSMS uitgevoerd. Vanwege de hoge specificiteit van de MSMS meting is de sterk interfererende component niet meer zichtbaar en kan een goede kwantificering worden uitgevoerd. Hierbij is gebruik gemaakt van een Agilent 1100 HPLC systeem, gekoppeld aan een Waters Micromass Micro LC-MSMS systeem. De instellingen van de apparatuur zijn beschreven in RSV A1027 Diervoer en meel – Cyclopiazonic acid – LC-MSMS. De dataverwerking heeft plaatsgevonden mbv QuanLynx en Excel. De analyses zijn uitgevoerd op een Alltech Platinum NH₂ HPLC-kolom. Het eluens is ACN/0.05 M NH₄Ac pH 5.0 50/50 v/v. De kwaliteitsparameters van de analyse zijn uitstekend. De lineariteit is hoog ($r^2 = 0.9998$) over een concentratiebereik van 25 tot 1000 ng/ml en de ionratio tussen beide MSMS-overgangen (337→182 en 337→196) is stabiel ($1.15 \pm 2.9\%$). De recovery van de gespikete monsters (op 1.0 en 3.0 mg/kg blanco meel, in duplo ingezet) komt uit op resp. 71.4, 70.0, 72.0 en 79.6%. Dit experiment is herhaald met 10 verschillende blanco diervoeren. De resultaten van de terugvinding van deze monsters staan vermeld in Tabel 4 (Recovery waarden diervoeder).

Tabel 4. Recovery waarden diervoeder

Monster	Spike	Rec %
Meel	1 mg/kg	60.6
Meel	3 mg/kg	64.5
voedermiddel maïs	1 mg/kg	71.5
Jongveebrok	1 mg/kg	48.5
Gerst	1 mg/kg	91.9
volledig diervoeder voor varkens	1 mg/kg	61.3
voedermiddel EU tarwe	1 mg/kg	112.2
volledig mengvoeder voor leghennen	1 mg/kg	68.0
voedermiddel droog plantaardig	1 mg/kg	104.5
aanvullend diervoeder voor herkauwers	1 mg/kg	62.2
aanvullend diervoeder voor herkauwers	1 mg/kg	59.3
aanvullend diervoeder voor herkauwers	1 mg/kg	54.3

Hieruit blijkt dat er grote verschillen worden gevonden in recovery's tussen de verschillende matrices. Dit komt overeen met bevindingen bij de brede screenings analyse van mycotoxinen mbv LC-MSMS volgens RSV A0255. Ook hierbij worden grote verschillen in recovery waargenomen. De oorzaak voor de wisselende recovery's ligt vermoedelijk in combinatie van een wisselende extractie-efficiëntie en een variabele ionisatiesuppressie. Omdat op voorhand moeilijk te zeggen is welk soort diervoer onderzocht wordt is bij deze analyse gekozen voor een standaard additie analysemethode waarmee de bovengenoemde effecten worden ondervangen. Toepassing van de standaard additie techniek op de CPA-analyse leidt tot de volgende resultaten (Tabel 5. Recovery waarden diervoeder m.b.v. standaard additie).

Tabel 5. Recovery waarden diervoeder m.b.v. standaard additie

Monster	Recovery berekend op ijklijn	Recovery berekend m.b.v. standaard additie
Meel	71.4 %	111 %
Meel	72.0 %	92 %
Meel	60.6 %	98 %

Hieruit blijkt dat de standaard additie methode zoals voorgeschreven voor de brede screenings analyse in RSV A0255 ook goed werkt voor CPA. Hiermee is de ontwikkelingsfase afgerond, wordt de methode vastgelegd in een RSV (RSV A1027) en wordt de validatie uitgevoerd.

4 VALIDATIE

De analyse van CPA is uitgevoerd volgens RSV A1027. De methode is gevalideerd in graan omdat dit de meest voorkomende (deel)matrix is binnen de matrix diervoeders en diervoedergrondstoffen. Vanwege het ontbreken van een richtlijn is voor vaststelling van het validatieniveau (een MRL ontbreekt) voor 100 µg/kg gekozen. De methode is gevalideerd als een kwantitatieve, bevestigende methode volgens richtlijnen zoals weergegeven in 2002/657/EC. Hierbij worden 21 monsters gedurende drie dagen op drie niveaus geanalyseerd en worden een groot aantal prestatiekenmerken vastgesteld. Een samenvatting van de resultaten is weergegeven in Tabel 6 (Samenvatting Validatie Resultaten CPA in tarwe). Hierbij is de juistheid van de methode gelijk aan de terugvinding omdat het een standaard additiemethode is.

Tabel 6. Samenvatting Validatie Resultaten CPA in tarwe

PERFORMANCE PARAMETERS					
Omschrijving	eenheid	werkgebied	niveau 1	niveau 2	niveau 3
<i>JUISTHEID</i>					
Gehanteerd model voor bepaling juistheid	*	met behulp van (gecertificeerd) ref. mat. met behulp van ref. methode * met behulp van spikes			
Het gehanteerde hoge resp. lage conc.niveau	µg/kg	NVT	50	100	150
Niveau van de richtwaarde			NVT	NVT	NVT
Berekende juistheid	J	%	107	98	104
Berekende relatieve standaardafwijking van de juistheid	RSD _J	%	12	14	10
Berekende terugvinding	%		107	98	104
Berekende systematische afwijking	%		+7	-2	+4
<i>PRECISIE</i>					
Standaardafwijking herhaalbaarheid op geselecteerd niveau	s _r		5.2	13	15
Herhaalbaarheid (2.8* s _r)	R		14	36	42
Standaardafwijking binnen lab reproduceerbaarheid op geselecteerd niveau	s _{RL}		6.7	14	16
Binnen lab. Reproduceerbaarheid	R _L		19	38	45
Geëxpandeerde meetonzekerheid (2* s _{RL})	U			27	
Reproduceerbaarheid	R				
AANTOONBAARHEID / CC α	µg/kg	7.1/122			
BEPAAALBAARHEID / CC β	µg/kg	14.3/145			

4.1 Conclusie

De analyse van CPA in diervoeder met de ontwikkelde methode is mogelijk tot een ondergrens van 20 µg/kg. De analyse is betrouwbaar mits de analyse wordt uitgevoerd als standaard additie methode zoals beschreven in RSV A1027. Met de ontwikkelde methode is het mogelijk om CPA op te nemen in het Controleprogramma diervoeder.

Gezien de (uit literatuur bekende) overdracht van CPA van diervoer naar melk en eieren verdient het aanbeveling om de toepasbaarheid van de ontwikkelde methode te onderzoeken op de matrices melk en eieren zodat ook deze matrices in een monitoringsprogramma kunnen worden opgenomen.

LITERATUUR

Alltech (2002) Transferring HPLC Methods to High-Speed Rocket™ Columns, Technical Notes T09.

Dorner, J.W., Cole, R.J., Erlington, D.J., Sucheep Suksupath, McDowell, G.H., and Bryden, W.L. (1994) Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1516-1518.

EG-Commissie beschikking 2002/657/EC.

EMAN, European Mycotoxin Awareness Network (2003) www.lfra.co.uk/eman2/fsheet10.asp.

Lansden, J.A. (1984) Liquid Chromatographic Analysis System for Cyclopiazonic Acid in Peanuts. *JAOAC* 67 (4), 728-731.

Losito, I., Monaci, L., Aresta, A. & Zambonin, C.G. (2002) LC-ion trap electrospray MS-MS for the determination of cyclopiazonic acid in milk samples, *Analyst* 127, 499-502.

Monaci, L., Aresta, A., Palmisano, F., Visconti, A. & Zambonin, C.G. (2002) Amino-bonded silica as stationary phase for liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in fungal extracts. *J. Chromatogr. A.* 955, 79-86.

Motta, S. da & Valente Soares, L.M. (2000) Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. *Food Chem.* 71, 111-116.

Motta, S. da & Valente Soares, L.M. (2001) Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Addit. and Contam.* 18 (7), 630-634.

Prasongsidh B.C., Kailasapathy, K., Skurray, G.R. & Bryden W.L. (1997) *Food Res. Int.* 30 10, 793-798.

Rijk, T.C. de & Zomer P., RSV A0255, Diervoeder en meel – multimethode mycotoxinen – LC-MSMS.

Shephard, G.S., Thiel P.G., & Sydenham E.W. (1991) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tenuazonic acid and related tetramic acids. *J.Chromatogr-biomed*, 566 (1), 195-205.

Urano, T., Trucksess, M.W. & Matusik, J. (1992) Liquid Chromatographic Determination of Cyclopiazonic Acid in Corn and Peanuts. *JAOAC* 75 (2), 319-322.

Zambonin, C.G., Monaci L. & Aresta A. (2001) Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 75, 249-254.

BIJLAGE 1 Werkvoorschrift CPA

BEGINSEL

Dit voorschrift beschrijft een kwantitatieve, bevestigende methode voor de bepaling van Cyclopiazonic Acid in diervoer.

CPA wordt uit diervoer geëxtraheerd met behulp van een mengsel van acetonitril en water. Scheiding en detectie van CPA vinden plaats met behulp van LC-MSMS. Kwantificering van het gehalte CPA in de onderzochte monsters gebeurt door middel van standaard-additie. De methode heeft een rapportage grens van 100 µg CPA per kilogram diervoer.

WERKWIJZE

Algemeen

Per serie worden maximaal 20 monsters in bewerking genomen. Vanwege te verwachten matrixinvloeden en het ontbreken van isotoop gelabeld CPA worden de CPA gehalten gekwantificeerd met behulp van de standaardadditie methode. Hierbij worden de monsters met en zonder toevoeging van CPA op rapportagegrens niveau (100 µg/kg) gemeten. Daarnaast wordt er in elke serie ook een blanco monster en een blanco monster gespiked op rapportagegrens niveau geanalyseerd als kwaliteitscontrole voor de serie.

Voorzorgsmaatregelen

CPA is een acuut toxische en carcinogene stof. Ieder huidcontact met de zuivere stof of oplossingen daarvan moet daarom vermeden worden (handschoenen, labjas).

Neem voorzorgsmaatregelen om inhalatie van organische oplosmiddelen te voorkomen, werk bij voorkeur in een afzuigkast. Draag handschoenen bij het omgaan met de gerubriceerde organische oplosmiddelen.

Omschrijving procedure

Opwerking

- Weeg (5.3) in 50 ml polypropyleen buizen (5.4) driemaal 2.5 (+/- 0.1) gram van een blanco monster af.
 - Buis I is blanco controle monster.
 - Buis II is blanco + monster, voeg aan deze buis 25 µl van de spike oplossing (1.2.2) toe.
 - Buis III is blanco ++ monster, voeg aan deze buis 50 µl van de spike oplossing (1.2.2) toe.
- Weeg van elk te analyseren monster tweemaal 2.5 (+/- 0.1) gram monster af in 50 ml PP buizen (5.4).
 - Voeg aan één van de twee buizen (monster +) 25 µl van spike oplossing (1.2.2) toe .
- Laat de buizen minimaal 15 minuten open staan om het toegevoegde oplosmiddel te laten verdampen.
- Voeg met behulp van een dispenser (5.5) aan alle buizen 10,0 ml extractiemiddel toe (1.2.3).
- Schud de buizen krachtig zodat al het monster materiaal in contact komt met de extractievloeistof.
- Plaats de buizen horizontaal in de schudmachine (5.6) en schud de buizen gedurende twee uur met een snelheid van 190 bewegingen per minuut.
- Plaats de buizen in de centrifuge (5.7) en centrifugeer gedurende 10 minuten met 3000 rpm.
- Pipeteer 0,5 ml van de bovenstaande vloeistof in een “filter-vial” (5.8)
- Duw het filter door de vloeistof in de vial.

LC-MSMS Analyse

De chromatografie vindt isocratisch plaats op een Alltech Platinum Amino kolom (5.9) met een flow van 0.4 ml/min van het LC-Eluens (1.2.6). Het injectie volume is 25 µl. De duur van een run is 16 minuten. De meting op de MS vindt plaats in postieve electrospray mode.

Zie voor de instellingen van de MS tune file Tabel 1

Tabel 1:MS tune file parameters

	ESi+
Capillary Voltage	3.5 kV
Cone voltage	30 V
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	350 °C
Cone gas flow	120 l/h
Desolvation gas flow	400 l/h
LM + HM 1 Resolution	15
Ion Energy 1	1
LM + HM 2 Resolution	13
Ion Energy 2	1
Multiplier Voltage	750 V

Er worden twee massa-overgangen gemeten, zie voor deze parameters Tabel 2.

Tabel 2 Parameters MS overgangen

	Parent ion]	Daughter ion	Dwell Time	Cone Voltage	Collision Energy
	m/z	m\z	s	V	eV
Quantifier	337.0	181.8	1	30	22
Qualifier	337.0	195.9	1	30	22

Ter voorkoming van vervuiling van de MS wordt het LC-eluaat alleen vanaf 1 minuut voor tot 1 minuut na de CPA piek naar de MS gestuurd, deze schakeling vindt plaats met behulp van de zgn. ‘divert valve’ van het MS systeem. Afhankelijk van factoren zoals verschillen tussen kolommen onderling en vervuiling van kolom kan er een kleine variatie in de retentietijd van CPA optreden van serie tot serie. De schakeltijden van de divert valve dienen daarom voor de meting van elke serie gecontroleerd en, indien nodig, aangepast te worden.