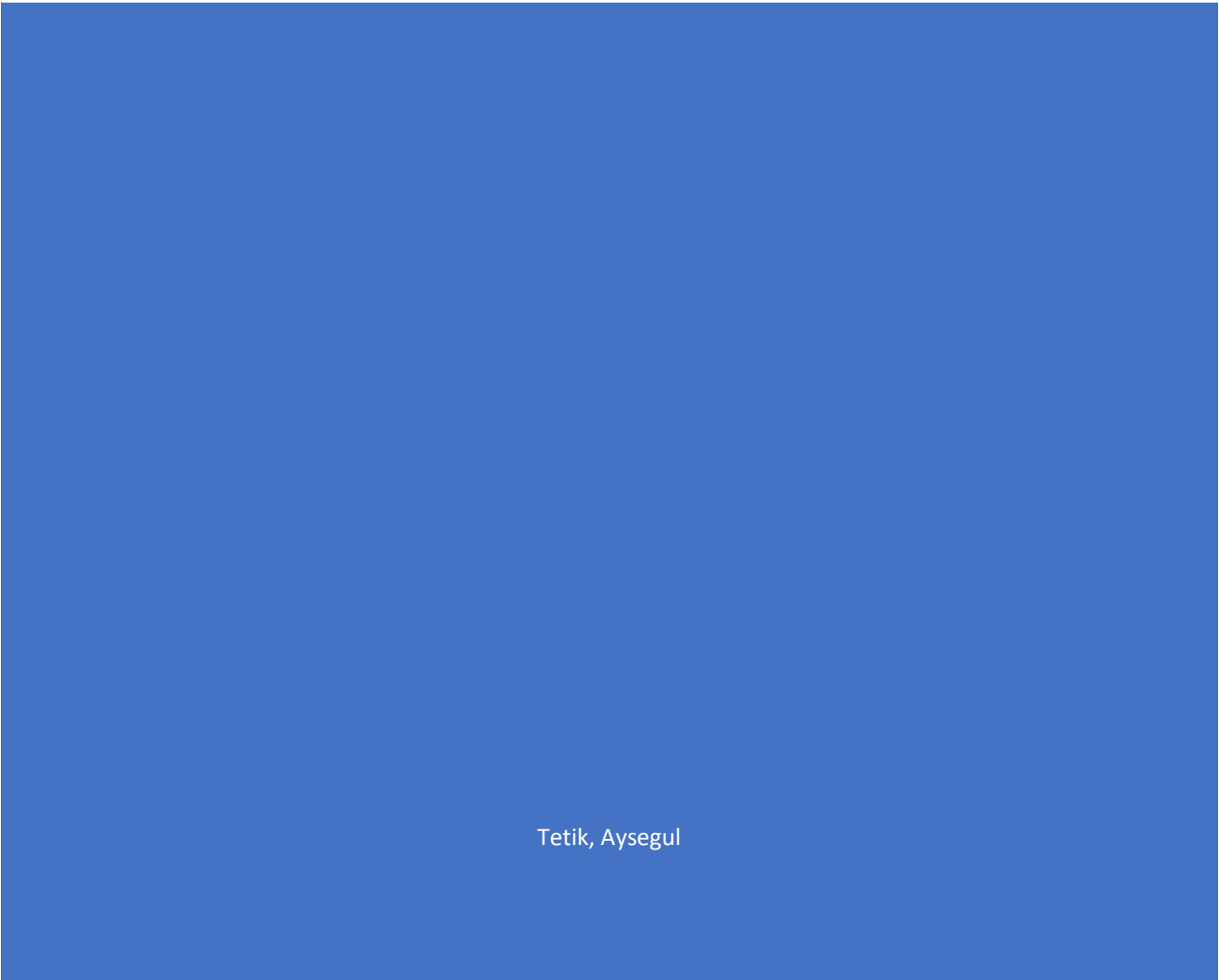


Het opzetten en valideren van een LC-MS-methode
voor de kwantificering van anuranen hormonen in water
gespot op Dried Blood Spot papier



Tetik, Aysegul

Het opzetten en valideren van een LC-MS methode voor de kwantificering van anuranen hormonen in water gespot op DBS-papier

Afstudeerverslag

Naam: Aysegul Tetik
Studentnummer: s1106431
Datum: 31-03-2022
Stageperiode: 01-5-2021 t/m 01-11-2021



Naam instituut: Leiden Centre for Applied Bioscience
Afdeling/laboratorium: Lectoraat Metabolomics
Adres: Darwinweg 24
2333 CR, Leiden
Contact: mostert.m@hsleiden.nl
Externe begeleiders: Dr. Sonja Kaal
Dr. Peter Lindenburg
Nanda Koopman



Opleidingsinstituut: Hogeschool Leiden
Adres: Zernikedreef 11
2333 CK, Leiden
Afdeling: Science & Technology
Opleiding: Chemie
Specialisatie: Analytische Chemie
Stagedocent: Dr. Natasja F.C. Carol-Visser

Samenvatting

Een grote oorzaak van het afsterven van soorten van kikkers komt door verstedelijking. Echter blijkt het dat de tungarakikkers geen last hebben van dit fenomeen. Door de fysiologische processen van deze kikkers te begrijpen kunnen bedreigde anuranen (kikkers) beschermd en behouden worden. Onderzoekers reisden af naar Panama om stedelijke en landelijke tungarakikkers te vangen en hun hormonen in water te bemonsteren op Dried Blood Spot papier. De kikkers werden ongedeerd vrijgelaten en de monsters werden meegenomen naar Nederland voor verdere analyse. Het doel van dit onderzoek is het ontwikkelen en valideren van een LC-MS analysemethode en een monstervoorbewerkingsmethode voor de kwantificering van kikkerhormonen uitgescheiden in water wat gespot wordt op Dried Blood Spot papier. Als voorbeeldstoffen zijn testosteron, corticosteron en serotonine gekozen. Tijdens de methodeontwikkeling werden de optimale gradiënt en optimale injectievolume getest van de LC-analyse en werd bij het ontwikkelen van de monstervoorbewerkingsmethode de optimale extractievloeistof en de optimale methanol/water verhouding voor het oplossen van de analieten getest. Na optimalisatie werd een LC-methode met een water/methanol gradiënt van 30 minuten wat begint met 10% methanol wat opliep naar 80% methanol en afliep naar 10% methanol gebruikt waarbij het optimale injectievolume 10µL was. Voor de extractie van de analieten uit het papier bleek de optimale extractievloeistof aceton te zijn gebruikmakende van drie extractiestappen en was de optimale water/methanolverhouding 50/50 methanol/water voor het heroplossen van de analieten. Omdat de retentie van serotonine op de kolom niet stabiel was werd ervoor gekozen om serotonine niet meer mee te nemen in de analyse en methodevalidatie. In onderstaande tabel is een samenvatting weergegeven van de methodevalidatie. Om de prestatiekenmerken te testen werden matrixmatchende mengstandaarden gemaakt. De matrixmatchende standaarden waren standaarden die de monstervoorbewerking hadden doorlopen. De LC-methode en de monstervoorbewerkingsmethode zijn niet geschikt voor het kwantificeren van hormonen gespot op DBS-papier. Beide methodes zouden geoptimaliseerd moeten worden.

Prestatiekenmerk	Eis	Testosteron	Corticosteron	Voldoet het aan de eis? (ja/nee)
Detectielimiet	<5 ng/mL	Onbewerkt = 0,02 µg/mL Bewerkt = niet bepaald	Onbewerkt = 0,04 µg/mL Bewerkt = niet bepaald	Nee
Meetbereik	Minstens 6 punten met $R^2 < 0,99$	Onbewerkt = 0,03 - 1 µg/mL $R^2 = 0,9993$, 6 punten Bewerkt = 0,3 - 1 µg/mL $R^2 =$ niet bepaald, 3 punten	Onbewerkt = 0,03 - 1 µg/mL $R^2 = 0,9988$, 6 punten Bewerkt = 0,3 - 1 µg/mL $R^2 =$ niet bepaald, 3 punten	Nee
Herhaalbaarheid injectie	RSD <5%	4,7%	4,8%	Ja
Herhaalbaarheid opwerking	RSD <5%	18,3 – 25,7%	17,4 – 24,4%	Nee
Reproduceerbaarheid opwerking	RSD <5%	20,2%	19,1%	Nee
Stabiliteit	<-20%	-14,5%	-4,8%	Ja
Geheugeneffect	Geen geheugen-effect	Geen geheugeneffect	Geen geheugeneffect	Ja
Matrixeffect	<-20%	-0,4%	-14,2%	Ja
Terugvinding	85-115%	31,9%	31,5%	Nee

Summary

A major cause of frog species die-off is due to urbanization. However, it appears that the tungar frogs are not affected by this phenomenon. By understanding the physiological processes of these frogs, endangered anurans (frogs) can be protected and conserved. Researchers traveled to Panama to capture urban and rural tungar frogs and sample their hormones in water on Dried Blood Spot paper. The frogs were released unharmed and the samples were taken to the Netherlands for further analysis. The aim of this research is to develop and validate an LC-MS analysis method and a sample preparation method for the quantification of frog hormones secreted in water spotted on Dried Blood Spot paper. Testosterone, corticosterone and serotonin have been chosen as example substances. During method development, the optimal gradient and optimal injection volume were tested from the LC analysis and when developing the sample preprocessing method, the optimal extraction liquid and the optimal methanol/water ratio for dissolving the analytes were tested. After optimization, an LC method with a water/methanol gradient of 30 minutes starting with 10% methanol increasing to 80% methanol and descending to 10% methanol was used with the optimal injection volume being 10 µL. For the extraction of the analytes from the paper, the optimal extraction liquid was found to be acetone using three extraction steps and the optimal water/methanol ratio was 50/50 methanol/water for redissolving the analytes. Because the retention of serotonin on the column was not stable, it was decided not to include serotonin in the analysis and method validation. The table below shows a summary of the method validation. To test the performance characteristics, matrix-matching mixing standards were created. The matrix-matching standards were standards that had gone through sample pre-processing. The LC method and the sample preprocessing method are not suitable for quantifying hormones spotted on DBS paper. Both methods should be optimized.

Performance characteristics	Requierment	Testosterone	Corticosterone	Does it meet the requierment? (yes/no)
Detection limit	<5 ng/mL	Raw = 0,02 µg/mL Edited = not determined	Raw = 0,04 µg/mL Edited = not determined	No
Measuring range	At least 6 points with $R^2 > 0,99$	Raw = 0,03 - 1 µg/mL $R^2 = 0,9993$, 6 points Edited = 0,3 - 1 µg/mL $R^2 =$ not determined, 3 points	Raw = 0,03 - 1 µg/mL $R^2 = 0,9988$, 6 points Edited = 0,3 - 1 µg/mL $R^2 =$ not determined, 3 points	No
Repeatability injection	RSD <5%	4,7%	4,8%	Yes
Reprocessing repeatability	RSD <5%	18,3 – 25,7%	17,4 – 24,4%	No
Reproducibility reprocessing	RSD <5%	20,2%	19,1%	No
Stability	<-20%	-14,5%	-4,8%	Yes
Memory effect	No memory effect	No memory effect	No memory effect	Yes
Matrix effect	<-20%	-0,4%	-14,2%	Yes
Recovery	85-115%	31,9%	31,5%	No

Inhoudsopgave

Samenvatting.....	2
Summary.....	3
Afkortingen	6
1. Inleiding.....	7
1.1 Probleemstelling	7
1.1.1 Verantwoording analieten.....	8
1.1.2 Verantwoording analysetechniek.....	8
1.2 Chemisch doel onderzoek	9
1.2.1 Methodevalidatie	9
1.3 Uitdagingen van het onderzoek	10
2. Theoretische hoofdstukken	11
2.1 Methode.....	11
2.2 DBS-papier	12
2.3 Validatie	12
2.3.1 Herhaalbaarheid.....	12
2.3.2 Reproduceerbaarheid	13
2.3.3 Stabiliteit	13
2.3.4 Aantoonbaarheidsgrens.....	13
2.3.5 Geheugeneffect.....	13
2.3.6 Matrixeffect.....	13
2.3.7 Terugvinding.....	13
3. Experimenteel	14
3.1 Chemicaliën	14
3.2 Apparatuur.....	14
3.3 Monsters	14
3.4 Testosteron, corticosteron en serotonine standaardoplossingen	14
3.5 Monstervoorbewerking	15
3.5.1 Spotmethode van de standaarden	15
3.5.2 Extractiemethode van de standaarden	15
3.6 Blanco.....	15
3.7 LC-MS methode	15
3.7.1 Data-opslag	16
3.8 Optimalisatie.....	16
3.8.1 Optimale gradiënt	16
3.8.2 De optimale extractievloeistof	16
3.8.3 Het optimale injectievolume	17
3.8.4 Optimale methanol/water verhouding	18
3.9 Validatie	19
3.9.1 Aantoonbaarheidsgrens	19

3.9.2	Meetbereik	20
3.9.3	Herhaalbaarheid	20
3.9.4	Reproduceerbaarheid	20
3.9.5	Stabiliteit in de autosampler	21
3.9.6	Geheugeneffect	21
3.9.7	Matrixeffect	21
3.9.8	Terugvinding	21
4	Resultaten en discussie	22
4.1	<i>Optimalisatie</i>	22
4.1.1	Gradiëntoptimalisatie	22
4.1.2	De optimale extractievloeistof	23
4.1.3	Het optimale injectievolume	25
4.1.4	De optimale methanol/waterverhouding	26
4.2	<i>Validatie</i>	27
4.2.1	Aantoonbaarheidsgrens en meetbereik	27
4.2.2	Herhaalbaarheid	30
4.2.3	Reproduceerbaarheid	31
4.2.4	Stabiliteit in de autosampler	32
4.2.5	Geheugeneffect	32
4.2.6	Matrixeffect	33
4.2.7	Terugvinding	33
4.2.8	Samenvatting validatie	34
5	Conclusie	35
6	Aanbevelingen	36
7	Referentie	38
8	Bijlagen	39
8.1	<i>Histogrammen van het injectievolume optimalisatie</i>	39
8.2	<i>Piekoppervlakken van het injectievolume optimalisatie</i>	42
8.3	<i>Piekoppervlakken methanol/water verhouding</i>	46
8.4	<i>Recovery's van de standaarden met verschillende methanol/water verhoudingen</i>	47
8.5	<i>Piekoppervlakken van de onbewerkte standaarden (validatie)</i>	48
8.6	<i>Piekoppervlakken van de bewerkte standaarden (validatie)</i>	49
8.7	<i>Validatie herhaalbaarheid opwerking TS</i>	50
8.8	<i>Validatie herhaalbaarheid opwerking CS</i>	51

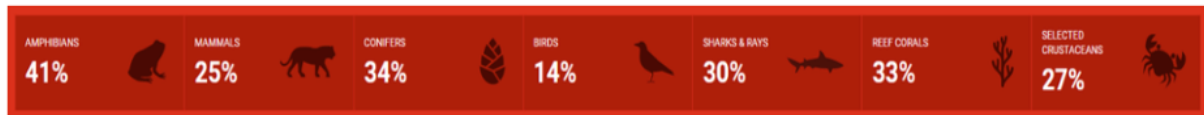
Afkortingen

IUCN	International Union for Conservation of Nature
LC	Least Concerning
DBS	Dried Blood Spot
TS	Testosteron
CS	Corticosteron
ST	Serotonine
LC	Vloeistofchromatografie
MS	Massaspectrometrie
MeOH	Methanol
Bewerkte	Standaard wat de matrixmatching heeft ondergaan
Onbewerkt	Standaard wat geen matrixmatching heeft ondergaan
Oplosmiddel	50/50 methanol/water oplossing
SPE	Solid Phase Extraction
H ₂ O	Water
FA	Formic acid
R ²	Richtingscoëfficiënt
RSD	Relatieve standaarddeviatie
PIS	Precursor Ion Scan
m/z	Massa/lading verhouding
Qq	Triple Quad
Q	MS
EIC	Extracted Ion Chromatogram

1. Inleiding

1.1 Probleemstelling

Een bedreigde diersoort is een soort organisme dat met uitsterven wordt bedreigd. Diersoorten worden bedreigd om twee belangrijke redenen: door het verlies van genetische variatie en door het verlies van leefgebied.¹ Uit cijfers van de International Union for Conservation of Nature (IUCN), zoals te zien is in Figuur 1, blijkt het dat amfibieën tot de meest bedreigde diersoorten op aarde behoren.² Kikkers en padden (Anura) vormen 88% van de amfibieën.³



Figuur 1 IUCN Red List van bedreigde soorten in percentages per klasse

In Panama leven er meer dan 180 soorten kikkers. Veel van deze kikkers worden met uitsterven bedreigd.³ Om de soorten kikkers te kunnen behouden is het van belang te begrijpen hoe mechanismen van reproductie werken. Uitwendige factoren zoals verstedelijking, die samenhangen met het verliezen van leefgebied, hebben een significante invloed op het bestaan van kikkers.⁴ Een studie heeft aangetoond dat stedelijke kikkers hun paringssysteem hebben aangepast als reactie op verandering in hun omgeving in vergelijking met landelijke kikkers.⁵ De studie toonde dat de stedelijke mannelijke tungarakikkers (*Engystomops pustulosus*) hun paringsoproepen opvallender hebben gemaakt door de afwezigheid van roofdieren maar ook door de grotere concurrentie van andere mannelijke kikkers.



Figuur 2 Tungarakikker (*Engystomops pustulosus*)³

Om de biologie van de mannelijke kikkers te begrijpen moet er op een kleiner niveau gekeken worden wat er fysiologisch gebeurt. Voor het paarproces van kikkers worden het hormoonstelsel, endocriene systeem, en het neuro-modulerend systeem, het reguleren van neurotransmitters en dus het gedrag van organismen, gestimuleerd. Een voorbeeld van het effect van het stimuleren van deze systemen is het vertonen van verhoogde paringshormonen, oestrogeen en progesteron, in vrouwelijke tungarakikkers, Figuur 2, als reactie op de paringsoproep van de mannelijke tungarakikkers.⁶ Volgens de IUCN wordt de tungarakikker geclassificeerd als LC, Least Concerning, in de lijst van bedreigde soorten.² Wellicht komt deze lage classificering van bedreiging van uitsterven door het aanpassingsvermogen van de tungarakikkers op verstedelijking.

Door meer informatie over het mechanisme van deze hormonale en neuro-modulerende systemen tussen stedelijke tungarakikkers en landelijke tungarakikkers te verkrijgen en te begrijpen, kunnen de bedreigde anuranen beschermd en behouden worden door deze informatie weer toe te passen op de anuranen in hun natuurlijke leefomgeving.

1.1.1 Verantwoording analieten

Bij het endocriene systeem voor het voortplanten spelen steroïde hormonen een grote rol.⁷ Voor dit onderzoek wordt er gekeken naar de uitscheiding van steroïde hormonen testosteron (TS) en corticosteron (CS) omdat deze hormonen een belangrijke rol spelen bij communicatie, seksueel gedrag regulatie en het aanpassingsvermogen bij een verandering van het leefgebied.⁸

Voor het neuro-modulerend systeem wordt er gekeken naar de uitscheiding van de neurotransmitter serotonine (ST). Het serotoninesysteem reguleert stemming, eetlust en slaap. Onder de cognitieve functies van ST vallen geheugen en leren.⁹

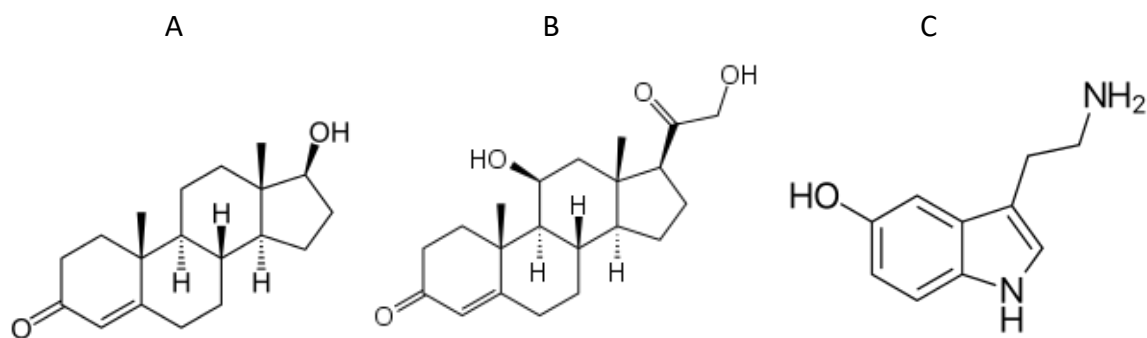
Er wordt verwacht door naar deze analieten te kijken er een verschil te zien zal zijn in concentraties tussen stedelijke en landelijke tungarakikkers. Hiervoor is een kwantitatieve bepaling nodig.

Met de analysetechniek ELISA werd in een ander onderzoek¹⁰ als laagste concentratie 5 ng/mL gemeten voor CS en TS en daarom is het doel bij dit onderzoek detectielimieten te behalen lager dan 5 ng/mL. ST was nog niet eerder gemeten en daarom wordt er in dit onderzoek gekeken of ST ook meegenomen kan worden. Er wordt verwacht dat ST aanwezig is in de monsters.

Er kan niet gezegd worden of stedelijke kikkers hogere of lagere hormoonwaarden hebben. Dat moet onderzocht worden met dit onderzoek. Er wordt verwacht dat door de afwezigheid van roofdieren en grotere concurrentie in de stad, de stedelijke kikkers hormonaal gezien andere waarden hebben dan landelijke kikkers. De verschillen moeten in kaart worden gebracht om deze hypothese te beantwoorden.

1.1.2 Verantwoording analysetechniek

Aan de hand van de chemische eigenschappen van TS, CS en ST is er gekozen voor de chromatografische scheidingstechniek Reversed Phase. Door te kijken naar de logP, oftewel de octanol-water partitie coëfficiënt, kan de elutievolgorde van de analieten op de kolom worden bepaald.¹⁰ Het principe berust erop dat waarden tussen -3 (goed oplosbaar in water) en 7 (slecht oplosbaar in water) te meten zijn via een vloeistofchromatografische scheiding. De verwachte elutievolgorde is op basis van afnemende polariteit namelijk ST ($\log P = 0,2$)¹¹ > CS ($\log P = 1,9$)¹² en TS ($\log P = 3,3$)¹³ op Reversed Phase Liquid Chromatography (RPLC). Het principe van RPLC berust erop dat de stationaire fase (C-18 kolom) apolair is en de mobiele fase (loopvloeistof) polair is. De polaire analieten zullen dan eerder elueren dan de minder polaire analieten omdat zij meer affiniteit hebben met de mobiele fase dan de stationaire fase.¹⁴ De keuze ging niet voor gaschromatografie omdat de analieten niet vluchtig zijn, niet sterk apolair zijn en niet thermisch stabiel zijn. In Figuur 3 zijn de structuurformules van TS, CS en ST weergegeven.



Figuur 3 A) Structuurformule van TS; B) Structuurformule CS; C) Structuurformule van ST

In dit onderzoek wordt een C18 kolom gebruikt met methanol/water eluens voor de scheiding van de analieten. De keuze voor methanol/water was omdat de analieten oplossen in methanol, methanol de meest gebruikte eluens is, het is goedkoper dan acetonitril, pentaan en di-ethylether, wat de alternatieven zijn voor methanol.

Door de aanwezigheid van proton-accepterende groepen, wat een H^+ kan opnemen, zorgt dit voor de mogelijkheid om de analieten te detecteren onder MS (Massa Spectrometrie). Het eluens zal gebufferd worden met 0,1% mierenzuur omdat dit helpt bij de ionisatie. 0,1% mierenzuur heeft een pH van 2,7.¹² De pKa-waarden van de analieten zijn voor TS 19,09¹³, CS 13,86 en voor ST 9,97¹¹. Omdat deze pKa waarden groter zijn dan de pH, betekent het dat de analieten geprotoneerd zijn. Met behulp van ESI (elektrospray ionisatie) raken moleculen in een vloeistof geïoniseerd door de hoge spanning die er ontstaat.¹⁵ Voor de analyse wordt er gebruikgemaakt van de Triple Quad (Qq). Er wordt fullscan gemeten met een m/z range van 50-1000. De m/z waarden voor de geprotoneerde analieten ($[M+H]$) zijn voor TS 289, voor CS 347 en voor ST 177. Bij dit onderzoek wordt dus gebruikgemaakt van LC-ESI-Qq-Q voor de kwantificering van TS, CS en ST.

1.2 Chemisch doel onderzoek

Het doel van dit onderzoek is het ontwikkelen en valideren van een LC-MS analysemethode en een monstervoorbewerkingsmethode voor de kwantificering van TS, CS en ST in monsters verkregen door kikkerhormonen in water te spotten op Dried Blood Spot (DBS-)papier. Om dit doel te kunnen behalen moet er een monstervoorbewerkingsmethode worden opgesteld, moet er een LC-analysemethode worden opgesteld en moeten deze methodes ook gevalideerd worden. Na het valideren kunnen de monsters gemeten en gekwantificeerd worden. De verkregen informatie levert uiteindelijk een bijdrage aan de strijd tegen het uitsterven van anuranen.

1.2.1 Methode optimalisatie

Er is veel vooronderzoek gedaan door Wouter Kan¹⁶. De resultaten van dat onderzoek vormden een beginpunt voor dit onderzoek. Voor het optimaliseren van de analysemethode en monstervoorbewerkingsmethode worden er verschillende onderdelen van de opwerking en LC-methode getest. Onder de LC-methode valt de optimale gradiënt waarbij de eis is dat de analieten voor 30 minuten elueren zonder overlapping van de pieken. De keuze is voor 30 minuten omdat er wordt verwacht dat er meer stoffen in de monsters zitten dan de gekozen analieten, en dat deze ook geëluëerd moeten worden van de kolom zodat er geen sprake is

van vervuilingen van de kolom en verstoringen van de metingen. Dit wordt getest door verschillende gradiënten op te stellen en een gradiënt te kiezen die voldoet aan de eisen.

Ook moest voor de LC-optimalisatie gekeken worden naar het injectievolume. Er wordt verwacht een afvlakking te zien bij het optimale injectievolume wanneer de piekoppervlakte op de y-as wordt gezet en injectievolume op de x-as. Er worden kalibratielijnen gemaakt van de injectievolumes 10, 20 en 40 µL. Hiervan is de eis dat het injectievolume met de laagste detectielimiet het optimale injectievolume is. Het doel was het verlagen van de LOD zonder verlies van performance.

Voor de optimalisatie van de monstervoorbewerking wordt er gekeken naar de optimale extractievloeistof. De stoffen die bekeken worden zijn aceton, dichloormethaan, diethylether en methanol. Deze stoffen zijn gekozen omdat de analieten hierin oplossen, de stoffen zijn beschikbaar op het lab en de stoffen zijn heel vluchtig. De vluchtigheid is belangrijk om in acht te nemen omdat de extractiestof snel moet kunnen verdampen. Omdat elke stof een ander soort interactie heeft met de analieten, is het moeilijk te voorspellen welke stof de beste extractie oplevert.

De optimalisatie van de monstervoorbewerking bestond ook uit het optimaliseren van de methanol/water verhouding van de oplosvloeistof na het verdampen van de extractievloeistof. Hierbij wordt verwacht dat de hoogste methanol aandeel de beste opbrengst levert omdat TS en CS beter oplossen in methanol dan in water.

1.2.3 Methodevalidatie

Na het ontwikkelen van de methode moet er op de volgende prestatiekenmerken gevalideerd worden: aantoonbaarheidsgrens (eis = LOD <5 ng/mL), meetbereik (eis = minstens zes punten met een $R^2 > 0,99$), herhaalbaarheid injectie (eis = RSD <5%), herhaalbaarheid opwerking (eis = RSD <5%), reproduceerbaarheid opwerking (eis = <5%), stabiliteit (eis = <20%), geheugeneffect, matrixeffect (eis = <15%) en terugvinding (eis = 85 – 115%). Om deze prestatiekenmerken te testen worden er matrixmatchende standaarden gemaakt. Dit zijn mengstandaarden die de monstervoorbewerking hebben doorlopen. Het belangrijkste prestatiekenmerk is de detectiegrens van de methode, omdat er wordt verwacht dat de concentraties van de monsters laag zullen zijn. De laagste concentratie die gemeten werd met ELISA was 5 ng/mL. De LOD in dit onderzoek zal lager moeten zitten dan deze gemeten waarde.

1.3 Uitdagingen van het onderzoek

Dit onderzoek werd eerder uitgevoerd door Wouter Kan¹⁶. De uitdagingen van dat onderzoek waren het verlagen van de detectielimieten en de analieten uit het DBS-papier krijgen. Om lagere detectielimieten te behalen en alle analieten uit het papier te krijgen moeten er aanpassingen in de methoden worden gemaakt. Hierbij zal er gekeken worden naar de mogelijkheid om het hele DBS-papier mee te nemen in de monstervoorbewerking, waar Wouter enkel een stuk van het DBS-papier nam omdat hij verwachtte dat hij alle analieten uit het papier kon krijgen. Hiervoor gebruikte Kan een stansset met een opzetstuk van 13 mm om een rondje uit het DBS-papier te stansen. Er wordt ook gemeten op de LC-QqQ, wat gevoeliger meet dan de LC-QToF om hiermee lagere detectielimieten te behalen.

2. Theoretische hoofdstukken

2.1 Methode

Om dit onderzoek uit te voeren zijn een groep onderzoekers afgereisd naar Panama. 82 tungarakikkers werden gevangen op twee verschillende locaties aan Pipeline Road bij Gamboa, een klein stadje in de Republiek Panama, zie Figuur 4. De ene locatie werd beschouwd als relatief verstedelijk en de andere locatie als relatief landelijk.



Figuur 4 Satellietfoto van Gamboa, een klein stadje in Republiek Panama in Midden-Amerika

Nadat de kikkers waren gevangen in hun natuurlijke leefomgeving werden ze in falcon buizen geplaatst, zie Figuur 5, waarna er 1,5 mL gezuiverd water werd toegevoegd aan de buizen. Na een wachttijd van vijf uur werd 20 tot 320 μ L van het water gespot op Dried Blood Spot (DBS) papier. Het opvangen van de analieten werd gedaan doordat de kikkers in de falcon buizen klimmen, waarna ze vervolgens zelf naar de bodem vielen en de analieten die uitgescheiden werden via urine en de huid, terecht kwamen in het water. Het exacte volume werd genoteerd en de kikkers werden vervolgens ongedeerd in het wild vrijgelaten.



Figuur 5 Gevangen tungarakikkers in 50 mL falcon buizen

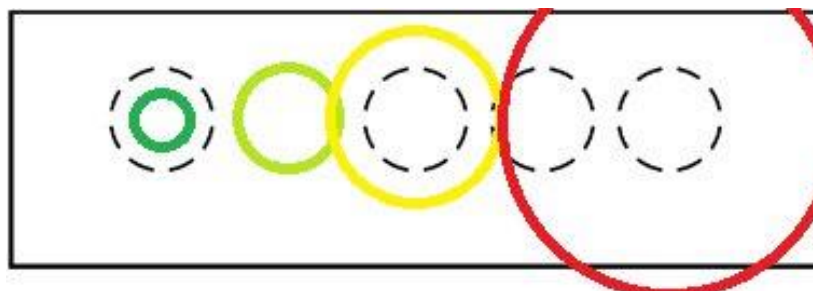
De gespotte DBS-papieren zijn bij kamertemperatuur in een plastic ziplock zakje bewaard en voor verdere analyse op het lab gebracht naar Nederland. Op deze manier hoefde er geen grote volumes aan watersamples worden bewaard en worden vervoerd, wat zou kunnen zorgen voor problemen als degradatie. DBS-papier is compact en makkelijk te vervoeren en hoeft niet gekoeld bewaard te worden. Een ander alternatief voor het opslaan van monsters is de kolomachtige opslag SPEM en SPE. Deze zijn minder gunstig dan het gebruik van DBS-papier omdat deze vorm van in-field bemonstering arbeidsintensief en duur is.

2.2 DBS-papier

DBS-papier wordt in het medisch werkveld gebruikt. Het is een manier van biosampling wat compact en makkelijk te vervoeren is. Het gebruik van DBS-papier in het (biologische) veld- en milieuonderzoek is op dit moment niet bekend maar zou ideaal zijn wanneer er gesampled moet worden op plekken als warme landen waar geen toegang is tot koelkasten.

Voor dit onderzoek werd gebruikgemaakt van een bemonsteringsmethode op DBS-papier omdat het makkelijk, non-invasief is voor de kikkers en het papier lang en droog bewaard kon worden. Het principe berust erop dat biologische materialen zich binden aan de matrix van het papier.^{16, 17} Na het drogen van het papier kon deze opgeslagen en getransporteerd worden. Voor de analyse in het laboratorium konden de analieten geëxtraheerd worden uit het papier.

De uitdaging van dit papier is dat er maar een beperkt volume in de markeringen van de spot gespot kunnen worden. In Figuur 6 is afgebeeld hoe verschillende volumes op het papier drogen. Er zal voor dit onderzoek een opwerkingsmethode bedacht moeten worden om alle analieten uit het papier te extraheren.



Figuur 6 Schematische tekening van verschillende gedroogde spot volumes van 10, 20, 100 en 320 μ l. De kleuren geven aan hoe de spots theoretisch gezien drogen op het papier

2.3 Validatie

Wanneer de analyse- en opwerkingsmethoden zijn opgezet moeten deze gevalideerd worden. De prestatiekenmerken worden in de onderstaande paragrafen uitgelegd. In het experimentele hoofdstuk wordt er uitgelegd welke eisen gebonden zijn aan deze prestatiekenmerken en hoe deze kenmerken getest werden.

2.3.1 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid van de methode vertelt iets over de spreiding van de resultaten die achter elkaar gemeten zijn onder identieke meetomstandigheden. De herhaalbaarheid kan worden bepaald voor zowel de analysemethode als de opwerkingsmethode. Bij de herhaalbaarheid van de injectie wordt een analysemonster meerdere malen geïnjecteerd en wordt vervolgens de spreiding van deze metingen bepaald. De herhaalbaarheid van de opwerking vertelt iets over de spreiding van de resultaten van analysemonsters die onder dezelfde meetomstandigheden individueel zijn opgewerkt door een analist in een korte tijdsopname.

2.3.2 Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid van de methode geeft de mate van gelijkenis tussen de meetresultaten van dezelfde meetgrootte, verkregen onder wisselende meetomstandigheden.

2.3.3 Stabiliteit

Onder stabiliteit wordt bij dit onderzoek de afname van het meetsignaal van het analysemonster in de autosampler op 15°C gedurende een paar dagen bedoeld. Deze afname is een maat van de stabiliteit van het analysemonster. Het is in de praktijk belangrijk om te weten wanneer het analysemonster niet stabiel meer is, omdat de meetresultaten na de periode van de stabiliteit niet representatief meer zijn.

2.3.4 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens van een methode zegt iets over de laagste meetbare concentratie die met een zekere betrouwbaarheid bepaald kan worden. Wanneer er verwacht wordt dat er analieten aanwezig zijn in het monster maar dit niet gedetecteerd kan worden, kan er alsnog een waarde gekoppeld worden aan dit monster. Er kan dan gezegd worden dat de concentratie lager ligt dan de detectielimiet.

2.3.5 Geheugeneffect

Het geheugeneffect van de methode geeft aan of er sprake is van contaminatie van voorgaande metingen op de nieuwe analysemeting. Aan de meting is dan een verhoogd signaal te zien, wat niet representatief is met de werkelijke waarde. Bij een methode zonder geheugeneffect is er geen verhoogd signaal te zien en is de meting niet beïnvloedt door de voorgaande meting.

2.3.6 Matrixeffect

Bij LC-MS analyses kan de matrix van het monster ervoor zorgen dat meetsignalen verhoogd worden wanneer de matrixcomponenten mee elueren met de analiet, of verlaagd worden doordat het ionisatieproces wordt verstoord in de massaspectrometer. Het is van belang te weten wat het matrixeffect is van de monsters zodat hiervoor gecorrigeerd kan worden. In de praktijk worden standaarden in de matrix gemaakt voor de kalibratielijn. Dit heet matrixmatching. De standaarden en het monster bevatten nu beiden de matrix, en wordt er op die manier gecorrigeerd. Wanneer er geen sprake is van een matrixeffect, hoeft hier ook niet op gecorrigeerd te worden. De standaarden hoeven dan geen matrix te bevatten.

2.3.7 Terugvinding

De terugvinding, ook wel recovery genoemd, vertelt iets over de fractie analieten die worden gemeten tijdens de analyse. Door te kijken naar het deel wat gemeten wordt en het totale deel wat er oorspronkelijk was, kan er een percentage gekoppeld worden aan het verlies wat er heeft plaatsgevonden. Wanneer het verlies bekend is kan er hierop gecorrigeerd worden op de resultaten en zijn de resultaten nauwkeuriger.

3. Experimenteel

3.1 Chemicaliën

Chemicaliën die gebruikt werden in dit onderzoek waren: Aceton voor gaschromatografie MS SupraSol, CAS-nr.: 67-64-1, Lot: I1039058 930, VWR Chemicals; Dichloormethaan, CAS-nr.: 75-09-2, Lot: 19B141916, VWR Chemicals; Diethylether AnalaR NORMAPUR, CAS-nr.: 60-29-7, Lot: 19B184125, CS, CAS-nr.: 50-22-6, Batch: 0553719-17, VWR Chemicals; Methanol $\geq 99.8\%$, HiPerSolv CHROMANORM®, CAS-nr.: 67-56-1, Lot: I1130535 104, VWR Chemicals; Mierenzuur $\geq 99\%$, CAS-nr.: 64-18-6, VWR Chemicals; ST 98%, CAS-nr.: 153-98-0, Lot: 10219080, Alfa Aesar; TS Eur.Pharm, CAS-nr.: 58-22-0, Lot: A0394329, Acros Organics; Water HPLC-grade, CAS-nr.: 7732-18-5, Merck LiChroSolv. De chemicaliën waarbij geen zuiverheid staat hebben een zuiverheid van 100%.

3.2 Apparatuur

Apparatuur wat gebruikt werd in dit onderzoek waren: Stuart SA8 vortex mixer, Zymark TurboVap™ LV Evaporator, Shimadzu vloeistofchromatograaf met Finnigan TSQ Quantum Ultra Triple Quadrupole MS met kolom Waters Acquity UPLC BEH C18 (2,1*50 mm kolom met een deeltjesgrootte van 1,7 μm) en Xcalibur software.

3.3 Monsters

Whatman 903™ Protein Saver Snap Apart Card werden gebruikt als DBS-papier waarbij 20 tot 320 μL van het water uit de falcon buizen werd gepipetteerd op de ronde markeringen van het papier, zie figuur 7, en werden gedroogd voordat ze in de plastic ziplock tasje op kamertemperatuur werden geplaatst voor verdere analyse in Nederland.



Figuur 7 Whatman 903™ DBS-papier

3.4 Testosteron, corticosteron en serotonine standaardoplossingen

Voor de kalibratielijnen werd er een stockstandaarden bereid van TS in MeOH (methanol), stockstandaard CS in MeOH en stockstandaard ST in H₂O (water). De concentratie van deze stockstandaarden waren 50 $\mu\text{g/mL}$.

Er werden twee soorten kalibratielijnen gemaakt: kalibratielijnen die matrixmatching hebben ondergaan, in dit verslag wordt dit aangeduid als 'bewerkte' standaarden, en zijn er kalibratielijnen gemaakt die vanuit de stockoplossing zijn doorverdund met 50/50 MeOH/water, aangeduid in dit verslag als 'oplosmiddel', tot mengstandaarden, in dit verslag wordt dit aangeduid als 'onbewerkte' standaarden.

Het verdunningsreeks van de onbewerkte standaarden werden bereid vanuit de stockstandaarden die doorverdund werden met methanol/water (50/50) op de dag van de analyse. De range van de verdunningsreeks was 0,01 tot 1 $\mu\text{g/mL}$ TS, CS en ST.

Het verdunningsreeks van de bewerkte standaarden werd opgewerkt op de dag van de analyse. Hierbij werd de gewenste concentratie van de stockoplossing op DBS-papier gespot en vervolgens gedroogd bij kamertemperatuur. De range na het hele matrixmatching proces

was ook 0,01 tot 1 µg/mL TS, CS en ST. In de volgende paragraaf wordt uitgelegd hoe de standaarden zijn opgewerkt.

3.5 Monstervoorbewerking

De bewerkte standaarden moest zodanig bereid worden dat het representatief was voor de bemonstering in Panama. Hiervoor is een monstervoorbewerkingsmethode opgesteld die de monsternamen nabootst en een extractiemethode om de analieten uit het DBS-papier te krijgen en dit op te lossen voor de analyse op de LC-MS.

3.5.1 Spotmethode van de standaarden

Er werden mengstandaarden gemaakt zoals de onbewerkte mengstandaarden. Deze reeks had een concentratie van 0,0025 tot 0,25 µg/mL in oplosmiddel met een eindvolume van 1 mL in 1 mL Eppendorf epjes. De reden hiervoor was omdat er een concentratiestap van vier keer plaatsvond tijdens de monstervoorbewerking waarbij de standaarden aan het einde van de voorbewerkingsmethode een range kregen van 0,01 tot 1 µg/mL TS, CS en ST.

Met behulp van 100 µL micropipet werd vervolgens vier maal 100 µL mengstandaard gepipetteerd op de ronde markeringen op het DBS-papier. Dit papier werd 20 minuten gedroogd in de zuurkast en vervolgens in 20 gelijke stukken geknipt en in een telpotje overgebracht. Het telpotje werd minstens 24 uur bewaard en de standaarden werden verder opgewerkt op de dag van de analyse.

3.5.2 Extractiemethode van de standaarden

Op de dag van de analyse werden de bewerkte standaarden opgewerkt. Dit werd gedaan door in het telpotje waar de stukken DBS-papier in zaten 2,5 mL aceton te pipetteren en dit te laten extraheren voor 20 minuten. Het extract werd vervolgens overgebracht in een glazen buisje. In het telpotje werd daarna weer 2,5 mL aceton toegevoegd en zo werd dit driemaal uitgevoerd tot het volume in het SPE-buisje ongeveer 6 mL werd. Er werd gedurende extractie niet geschud. Het buisje werd in de stikstof evaporator geplaatst op 40°C onder een druk van 5 bar tot alle volume was weggedampt. Het buisje werd uit de evaporator gehaald en 100 µL oplosmiddel werd voorzichtig gepipetteerd op de bodem van het buisje en dit werd gedurende 10 seconden gevortex op een lage stand. Het totale volume werd met een pasteurse pipet met een lange punt uit het buisje gepipetteerd en overgebracht in een gemarkeerde vial met insert. De vial werd tot slotte in de autosampler geplaatst.

3.6 Blanco

De blanco bij dit onderzoek was voor de standaardreeks onbewerkt oplosmiddel en bij de standaardreeks bewerkt was het een DBS-papier waar oplosmiddel was gepipetteerd wat de monstervoorbewerking had doorgelopen.

3.7 LC-MS methode

De analysemethode staat hieronder beschreven. In Tabel 1 staan de instellingen van de methode.

Tabel 1: De instellingen van de LC-MS methode

Naam meetmethode	20210420_AYT_optimalegradient_20min
Scan Type	Full scan
Kolomoven	40 °C
Flow	0,2 mL/min
Injectievolume	10 µL

De twee loopmiddelen welke werden gebruikt waren:

Loopmiddel A: 95% H₂O, 5% MeOH, 0,1% FA

Loopmiddel B: 95% MeOH, 5% H₂O, 0,1% FA

De gradiëntinstellingen staan beschreven in hoofdstuk **4.1.1 Gradiëntoptimalisatie**.

3.7.1 Data-opslag

Alle data zijn terug te vinden op Sharepoint > HL-Lectoraat Metabolomics > Documenten > Filterpaperomics > Aysegul. Ook is de data terug te vinden op de computer van de LC-MS in het mapje AYT te vinden bij Computer > Data.

3.8 Optimalisatie

Voor de meting van TS, CS en ST waren er onderdelen die optimalisatie vereisten. Hierbij werd er gekeken naar de optimale gradiënt, de bepaling van de beste extractievloeistof, het optimale injectievolume en de optimale methanol/water verhouding om TS, CS en ST op te lossen in de LC-vial voor de meting van de analieten op de LC-MS-QqQ. De eisen staan beschreven in de inleiding.

3.8.1 Optimale gradiënt

Voor de bepaling van de optimale gradiënt werden er standaarden eerst afzonderlijk gemeten en werd er vervolgens een mengstandaard gemaakt waarin TS, CS en ST goed in waren opgelost. Door verschillende gradiënten op te stellen en de mengstandaarden te meten op deze gradiënten, kon de optimale gradiënt gekozen worden.

3.8.2 De optimale extractievloeistof

Om te bepalen wat de optimale extractievloeistof was werden er vier vloeistoffen getest die aanwezig waren op het lab. Deze vier vloeistoffen waren aceton, methanol, diethylether en dichloormethaan. Hierbij werd er gekeken naar de vloeistof met de hoogste extractie-efficiëntie van TS, CS en ST. Aan de hand van een recovery bepaling, geformuleerd in **(1)** kon er een waarde gekoppeld worden aan elk van de vloeistoffen. De vloeistof met de hoogste recovery was de optimale extractievloeistof.

$$\text{Recovery} = (\text{Voorbewerkt}/\text{Onvoorbewerkt}) * 100 \quad (1)$$

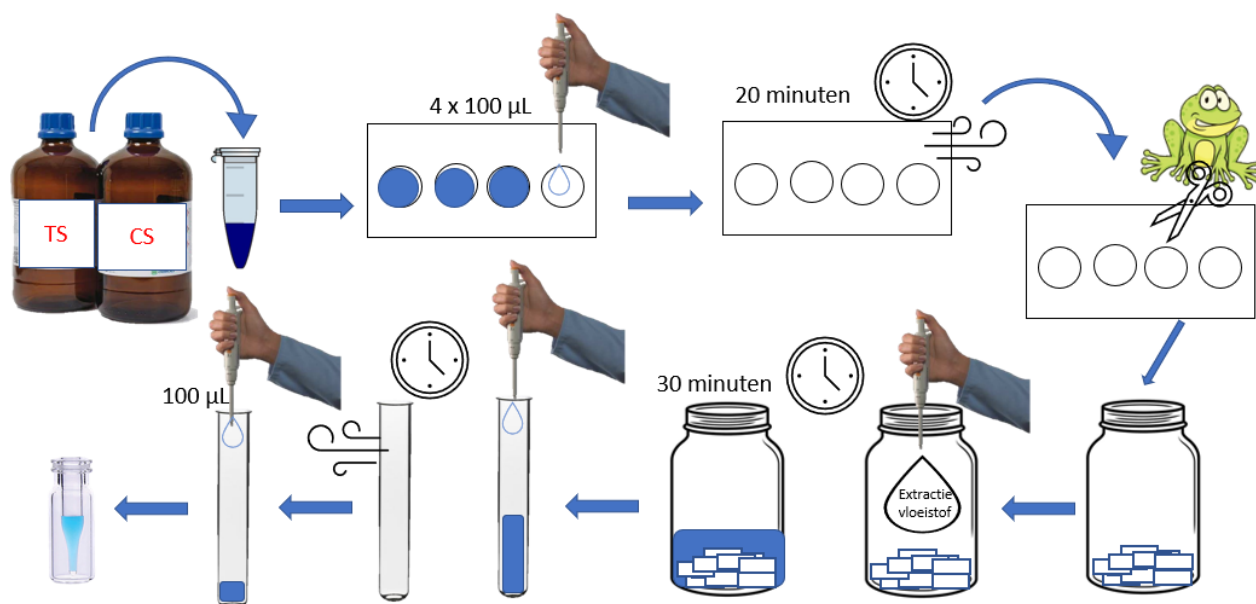
Waarbij:

Recovery = Terugvinding

Voorbewerkt = Piekoppervlak van de voorbewerkte standaard

Onvoorbewerkt = Piekoppervlak van de onvoorbewerkte standaard

In het flowschema weergegeven in Figuur 8 is te zien wanneer de verschillende vloeistoffen werden toegevoegd in het monstervoorbewerkingsproces.



Figuur 8 Flowschema van het monstervoorbewerkingsproces

Om de recovery te bepalen werd er een onbewerkte mengstandaard gemaakt van 4 µg/mL TS, CS en ST in water en werd dit vervolgens overgebracht in een LC-vial. Omdat er bij het extractieproces een concentratiestap van vier keer plaatsvindt, werd er bij het recovery experiment een onbewerkte standaard gemaakt die vier keer geconcentreerder was dan de standaard die door het extractieproces ging. In dit geval had de bewerkte mengstandaard een beginconcentratie van 1 µg/mL TS, CS en ST in water en als eindconcentratie 4 µg/mL TS, CS en ST in water. De losse standaarden van TS en CS werden eerst opgelost in methanol en toen door verdund met Milli-Q (dit i.v.m. de slechte oplosbaarheid van de CS en TS in water).

3.8.3 Het optimale injectievolumen

Het optimale injectievolumen was een optimalisatie-onderdeel wat een belangrijk deel uitmaakt van de analysemethode. In stappen van 5 µL werden de injectievolumes van 5 tot 40 µL in duplo gemeten van de concentraties 0,1, 0,5 en 1 µg/mL om erachter te komen wat het maximale injectievolumen was.

De formule van de detectielimiet is geformuleerd in (2):

$$LOD = (3 * Sr)/b \quad (2)$$

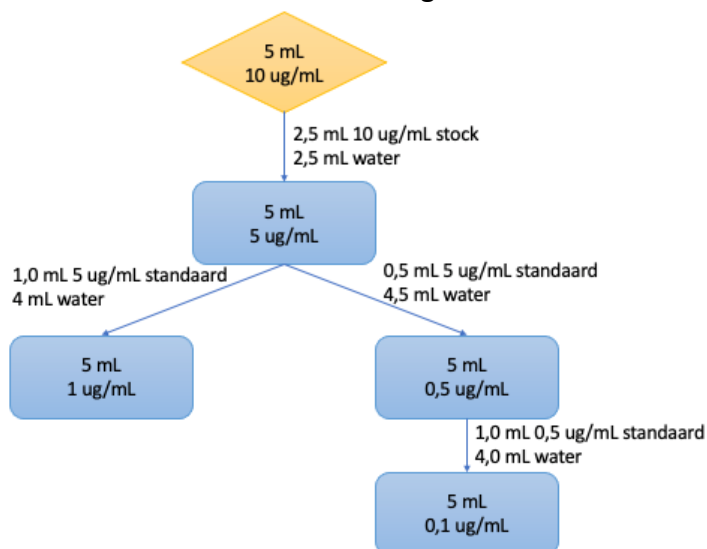
Waarbij:

LOD = Detectielimiet, laagst meetbare concentratie (met 95% betrouwbaarheid) in analysemonsters in (µg/mL)
 Sr = Standaardafwijking van monsters met een lage concentratie (in g/mL)

b

= Hellingscoëfficiënt van de kalibratielij

Om dit te testen werd een mengstandaardstockoplossing bereid van 10 µg/mL. Vanuit deze mengstandaardstockoplossing werden verdunningen gemaakt van de concentraties 1, 0,5 en 0,1 µg/mL. In Figuur 9 is een flowschema van de bereiding te zien van deze concentraties.



Figuur 9 Flowschema van de bereiding van de verdunningen met als eindconcentratie 1, 0,5 en 0,1 µg/mL TS, CS en ST

3.8.4 Optimale methanol/water verhouding

De grootste uitdaging was het oplossen van TS in water en het oplossen van ST in methanol. Omdat TS niet oplost in water, maar wel in methanol, was er een toevoeging van methanol nodig om TS te kunnen oplossen. ST lost niet goed op in methanol, maar wel in water. De toevoeging van oplosmiddel na het droogdampen moest de juiste methanol/water verhouding hebben omdat de analieten anders niet goed gemeten konden worden.

Bij dit experiment werden er zes verschillende manieren toegepast bij het bereiden van de bewerkte standaarden vlak voor de meting, waarbij de droge buizen na het indampen heropgelost moesten worden. Hierbij werden de volgende standaarden gemaakt:

- O: Standaard onbewerkt met een concentratie van 1 µg/mL
- A: Standaard waarbij alleen 100 µL water werd toegevoegd
- B: Standaard waarbij een 95:5 oplossing van water en methanol werd toegevoegd
- C: Standaard waarbij eerst 25 µL methanol werd toegevoegd en daarna vortexen, aangevuld met 75 µL water
- D: Standaard waarbij een 75:25 oplossing van water en methanol werd toegevoegd
- E: Standaard waarbij eerst 50 µL methanol werd toegevoegd en daarna vortexen, aanvullen met 50 µL water
- F: Standaard waarbij een 50:50 oplossing van water en methanol werd toegevoegd
- G: Standaard waarbij een 75:25 oplossing van methanol en water werd toegevoegd
- H: Standaard waarbij een 95:5 oplossing van methanol en water werd toegevoegd

In onderstaande flowschema (Figuur 10) is de werkwijze beschreven.



Figuur 10: Flowschema van de werkwijze om erachter te komen welke methanol/water verhouding de hoogste recovery gaf

Zoals te zien in Figuur 10 werd aceton in dit experiment meegenomen om het eindstadium van het extraheren na te bootsen wat deel uitmaakt van de monstervoorbewerkingsmethode.

Bij dit experiment werden de piekoppervlakken van de bewerkte standaarden vergeleken met de onbewerkte standaard. Dit werd gedaan met de onderstaande formule (3). Het oplosmiddel met de grootste recovery had de beste methanol/water verhouding.

$$Recovery = \frac{X}{O} * 100\% \quad (3)$$

Waarbij:

Recovery	= Terugvinding
X	= Piekoppervlak oplosmiddel A, B, C, D, E of F
O	= Piekoppervlak van onbewerkte standaard

3.9 Validatie

Nadat alle onderdelen van de optimalisatie waren afgerond kon de methode worden gevalideerd. De eisen van de prestatiekenmerken, experimenten en de berekeningen worden in deze paragraaf uitgelegd.

3.9.1 Aantoonbaarheidsgrens

Bij dit onderzoek was het van belang om een laag aantoonbaarheidsgrens te behalen met de opgestelde meetmethode op de LC-MS. De aantoonbaarheidsgrens werd bepaald met zowel bewerkte als onbewerkte standaarden voor de kalibratielijnen met formule (4).

$$Aantoonbaarheidsgrens = (3 * Sr)/b \quad (4)$$

Waarbij:

Aantoonbaarheidsgrens	= Laagst meetbare concentratie (met 95% betrouwbaarheid) in analysemonsters (in $\mu\text{g/mL}$)
Sr	= Standaardafwijking van monsters met een lage concentratie (in g/mL)

b = Hellingscoëfficiënt van de kalibratielij

3.9.2 Meetbereik

Onder meetbereik werd de range van de kalibratielij verstaan waarbij de R^2 (correlatiecoëfficiënt) bij een kalibratielij met minstens zes punten $> 0,99$ was. Hierbij werden zowel bewerkte als onbewerkte standaarden gemeten met een range tussen de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ en 1 $\mu\text{g/mL}$. Omdat het doel het behalen van lage detectielimieten is, werd er gekozen voor deze range.

3.9.3 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid van twee onderdelen van de methodes werden bepaald: herhaalbaarheid van de injectie en herhaalbaarheid van de opwerking. De herhaalbaarheid van de injectie werd bepaald door een analysemonster achtmaal te injecteren en hier de RSD van te berekenen. In formule (5) is de formule te zien voor de herhaalbaarheid. Ook werd de herhaalbaarheid van het opwerken bepaald. Hiervoor werd achtereenvolgens in een korte tijdsopname achtmaal een analysemonster opgewerkt en gemeten. Een herhaalbaarheid van $<5\%$ werd aanvaard.

$$RSD(H) = s / \bar{x} * 100\% \quad (5)$$

Waarbij:

RSD(H)	= Relatieve standaarddeviatie van de herhaalbaarheid van de injectie of opwerking
s	= Standaarddeviatie van de meetreeks van de herhaalbaarheid
$\bar{x}$	= Gemiddelde waarde van de meetreeks van de herhaalbaarheid

3.9.4 Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid van de methode lijkt op de herhaalbaarheid van de methode. Onder reproduceerbaarheid wordt in dit verslag de reproduceerbaarheid van de opwerking bedoeld. Hierbij werd de RSD van de opwerking op verschillende dagen genomen. Vijf verschillende opwerkingen gedurende drie dagen gaven vijftien waarden waarmee de RSD(R) bepaald kon worden. In formule (6) is de formule van de reproduceerbaarheid te zien. Een reproduceerbaarheid van $<5\%$ werd aanvaard.

$$RSD(R) = s / \bar{x} * 100\% \quad (6)$$

Waarbij:

RSD(R)	= Relatieve standaarddeviatie van de reproduceerbaarheid van de opwerking
s	= Standaarddeviatie van de meetreeks van de reproduceerbaarheid
$\bar{x}$	= Gemiddelde waarde van de meetreeks van de reproduceerbaarheid

3.9.5 Stabiliteit in de autosampler

De stabiliteit van het analysemonster in het apparaat werd bepaald. Hiervoor werd gedurende drie dagen in vijfvoud een analysemonster gemeten wat eenmaal was opgewerkt. Bij elke nieuwe dag werd er een nieuw dopje geplaatst op de vial. De stabiliteit werd berekend door het gemiddelde van vijf metingen van de eerste dag te vergelijken met het gemiddelde van de andere dagen. Een afname kleiner dan 20% werd geassocieerd als stabiel. De formule hiervoor is weergegeven in formule (7).

$$\text{Stabiliteit (\%)} = 100 - (\bar{x}_{\text{nieuw}} / \bar{x}_{\text{oud}} * 100\%) \quad (7)$$

Waarbij:

Stabiliteit	= Percentage wat het verlies in piekoppervlak aanduidt (<20%)
$\bar{x}_{\text{nieuw}}$	= Gemiddelde piekoppervlak van een meetreeks wat niet op dag 1 is gemeten
$\bar{x}_{\text{oud}}$	= Gemiddelde piekoppervlak van een meetreeks wat op dag 1 is gemeten

3.9.6 Geheugeneffect

Het geheugeneffect geeft aan of er sprake was van contaminatie van voorgaande metingen op de nieuwe analysemeting. Dit werd bepaald door een blanco-standaard negenmaal te meten, een standaard te meten met een hoge concentratie, 1 en tot slotte weer een blanco te meten. Als de laatste blanco-meting een piek gaf, betekent het dat er sprake was van een geheugeneffect.

3.9.7 Matrixeffect

Er kan gesproken worden van een matrixeffect wanneer de matrix een verhogend of verlagend effect levert op het meetsignaal. Dit effect werd bepaald door het vergelijken van een standaard wat gespiked werd na de monstervoorbewerking en een standaard wat onbewerkt was. Deze gespikede standaard werd in achtvoud gemeten en werd vergeleken met een onbewerkte standaard met dezelfde concentratie, welke ook in achtvoud werd gemeten. De formule voor het berekenen van het matrixeffect is weergegeven in formule (8). Een matrixeffect <20% werd aanvaard.

$$\text{Matrixeffect} = (\bar{x}_{\text{spike na}} / \bar{x}_{\text{onbewerkte standaard}}) * 100\% \quad (8)$$

Waarbij:

Matrixeffect	= Percentage wat een bijdrage levert aan signaalverhoging of signaalverlaging door matrix
$\bar{x}_{\text{spike na}}$	= Gemiddelde piekoppervlak van een standaard wat gespiked werd na het droogdampen
$\bar{x}_{\text{onbewerkte standaard}}$	= Gemiddelde piekoppervlak van een onbewerkte standaard

3.9.8 Terugvinding

Voor de terugvinding van de optimale methode werd een bewerkte standaard vergeleken met een standaard die gespiked werd na het droogdampen. Hierbij werd een bewerkte

standaard opgewerkt met een eindconcentratie van 1 µg/mL en werd dit in achtvoud gemeten. Dit werd vergeleken met een standaard wat gespiked werd na het droogdampen, een concentratie had van 1 µg/mL en ook in achtvoud werd gemeten. De formule die werd toegepast is te zien in (9). De eis van de terugvinding was dat het tussen de 85 en 115% moest liggen.

$$\text{Terugvinding} = (\bar{x} \text{ spike voor} / \bar{x} \text{ spike na}) * 100\% \quad (9)$$

Waarbij:

Terugvinding = Gemiddelde terugvinding van de analieten (%)

$\bar{x}$ spike voor = Gemiddelde piekoppervlak van een standaard wat gespiked werd voor het droogdampen

$\bar{x}$ spike na = Gemiddelde piekoppervlak van een standaard wat gespiked werd na het droogdampen

4 Resultaten en discussie

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de gradiëntoptimalisatie, het optimale injectievolume, de optimale extractievloeistof, de optimale methanol/waterverhouding en de validatie behandeld en bediscussieerd.

4.1 Optimalisatie

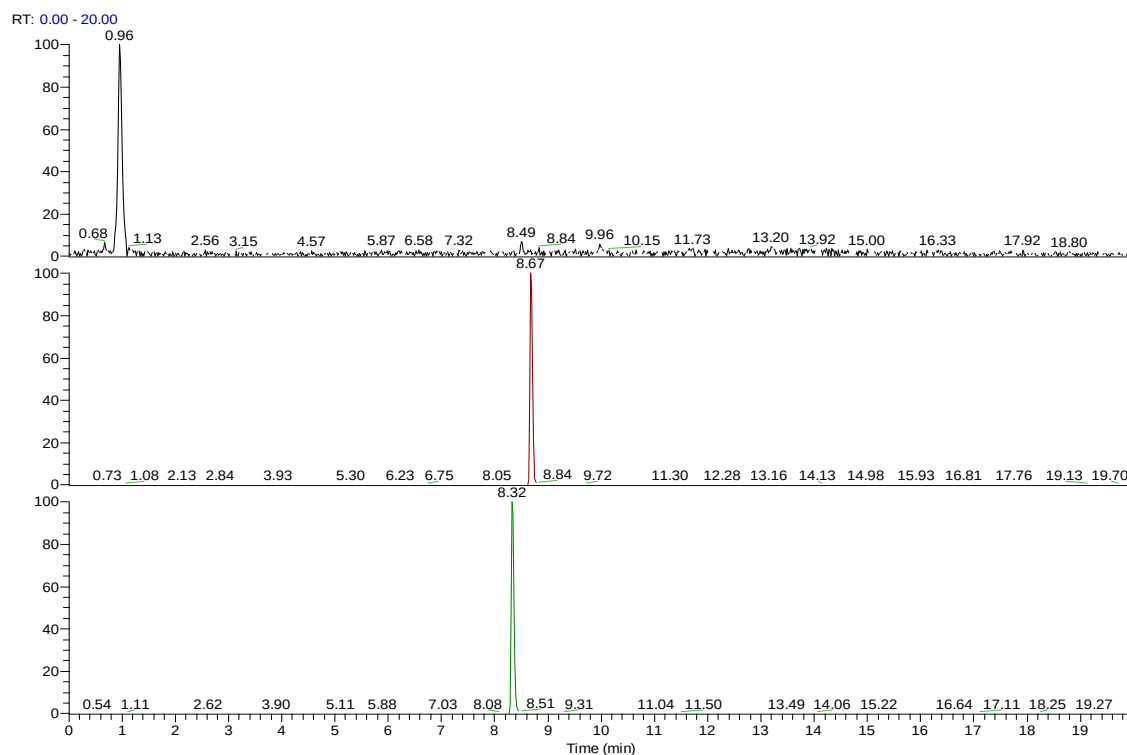
4.1.1 Gradiëntoptimalisatie

Om erachter te komen op welke gradiënt analieten elueerden zonder overlapping van de pieken en de analysetijd onder de 30 minuten bleef, werden er verschillende startcondities van methanol (%B) getest. De optimale gradiënt wat hieruit volgde is weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2: Optimale gradiënt weergegeven in percentage loopmiddel B over tijd

Tijd (min)	%B
0.01	Start
0.01	10
3.00	20
5.50	50
7.00	80
12.00	80
12.50	10
20.00	Stop

In Figuur 11 zijn de 'extracted ion chromatograms' (EIC) te zien van ST (bovenste chromatogram), CS (middelste chromatogram) en TS (onderste chromatogram) in de mengstandaard van 4 µg/mL.



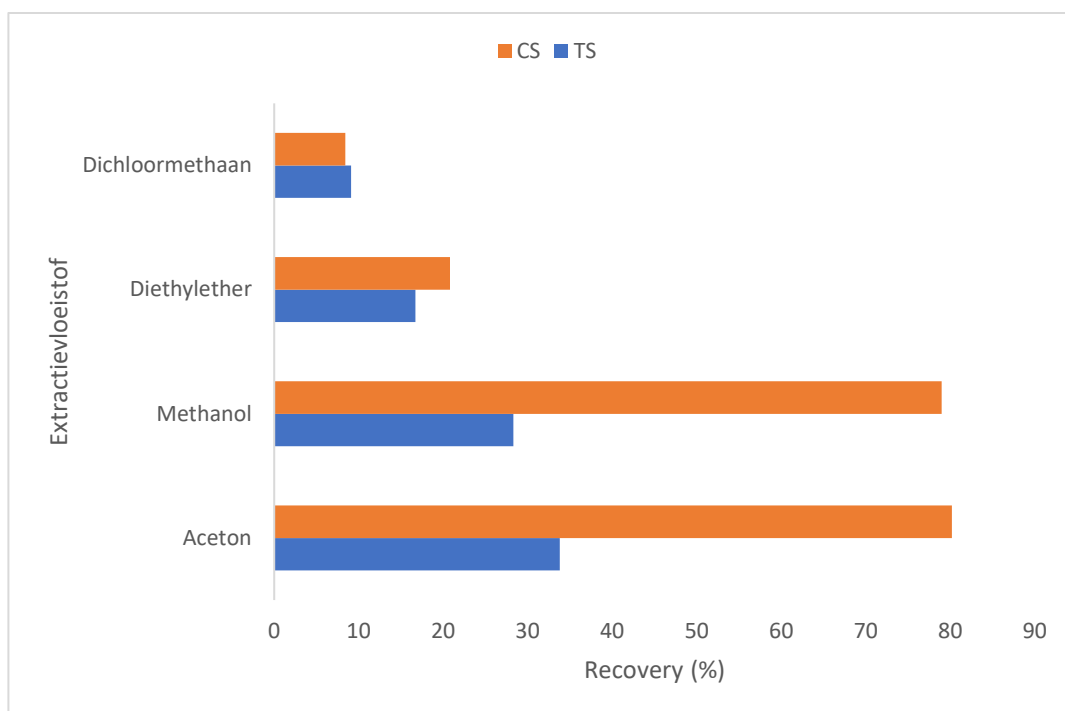
Figuur 11 Chromatogram van de onbewerkte mengstandaard van 4 µg/mL waarbij ST een retentietijd heeft van 0,96 minuten, TS 8,32 minuten en CS 8,67 minuten.

De volgorde van elutie was voorspeld, namelijk ST > TS > CS. Dit had te maken met de afnemende polariteit van de analieten. De keuze om met een laag percentage B te beginnen kwam omdat ST heel polair is t.o.v. TS en CS en onder hogere %B startconditie niet goed van de kolom elueerde. De reden dat er een grote leegte is tussen de piek van ST en TS komt omdat er wordt verwacht dat in de monsters stoffen zitten die leegte zullen elueren, en het was daarom van belang om dat stuk in de gradiënt er wel in te laten.

De blanco's die gemeten waren gaven geen pieken.

4.1.2 De optimale extractievloeistof

De verschillende extractievloeistoffen zijn getest op extractie-efficiëntie door middel van een recovery bepaling om te achterhalen welk extractievloeistof de beste recovery leverde. In Figuur 12 is weergegeven wat de recovery was van de analieten die het extractieproces hadden doorlopen met de verschillende extractievloeistoffen.



Figuur 12: Extractie-efficiëntie resultaten van de verschillende extractievloeistoffen

Omdat ST geen piek gaf bij de metingen was er geen recovery bepaald. Dit zou kunnen komen omdat ST was gedegradieerd, omdat de standaarden al een lange tijd geleden waren gemaakt en in de koelkast werden bewaard. Dit zou misschien voorkomen kunnen worden als ST in de vriezer werd bewaard. De verwachting was dat een polair extractievloeistof goed in staat zou zijn om ST te extraheren vanuit de matrix.

Verder was te zien dat aceton de beste extractie opleverde met een recovery van 80,2% voor CS en 33,8% voor TS. De lage recovery van TS zou kunnen komen omdat na het indampen van de extractievloeistof er 100 μ L water werd toegevoegd in het buisje om alle stof op te nemen voor de meting. TS lost niet goed op in water, en loste dus ook niet goed op in de vloeistof van de LC-vial, wat ook water was. In de optimalisatie van de methanol/water verhouding werd er hiernaar gekeken, waar verder over wordt gesproken in hoofdstuk **4.1.4 De optimale methanol/water verhouding**. Dit zou dus herhaald moeten worden met de optimale verhouding methanol/water om zeker te weten wat de echte recovery's zijn.

Diethylether en dichloormethaan geven hele lage recovery resultaten voor zowel TS als CS. Deze vloeistoffen waren dus niet geschikt voor de extractie van de analieten.

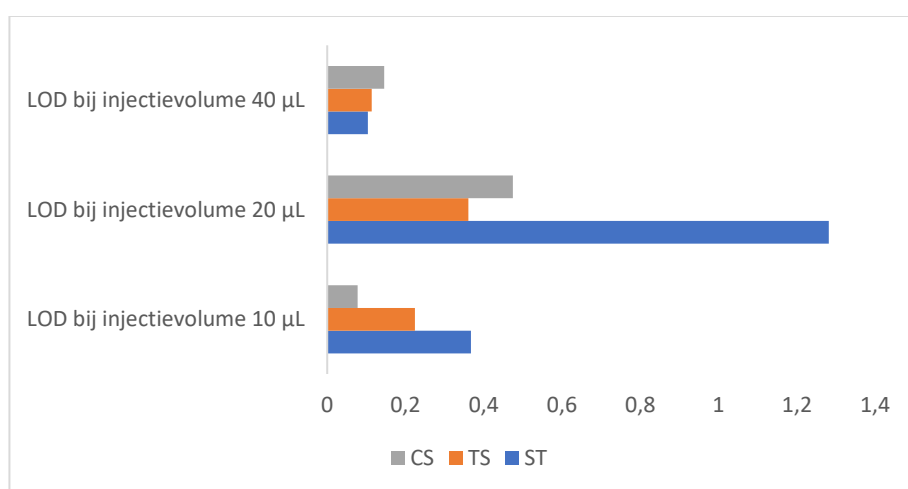
De recovery resultaten voor methanol waren vergelijkbaar met die van aceton. Extractie met methanol zou ook kunnen plaatsvinden als er geen aceton aanwezig zou zijn op het lab. Omdat aceton heel snel verdampt in de stikstof-evaporator, en hierdoor de monstervoorbewerkingstijd kort(er) was, ging de voorkeur uit naar aceton in plaats van methanol.

Voor de optimalisatie van de extractievloeistof was ervan uitgegaan dat er geen matrix-effecten plaatsvonden. Tijdens het valideren van de methoden werd het matrixeffect

bepaald. In hoofdstuk **4.7.8 Matrixeffect** wordt hierover gesproken. Achteraf gezien was het geen reële aanname dat er geen matrixeffecten zouden zijn. Elk extractievloeistof kan een ander soort interactie hebben met het papier, en zo zou het kunnen zijn dat de ene extractievloeistof meer interacties heeft met het papier dan een ander extractievloeistof. Als het matrixeffect van alle extractievloeistof bepaald zou worden, dan had er gezegd kunnen worden dat de matrix de wel of niet de extractieopbrengst beïnvloedt. Nu kan er geen uitspraak worden gemaakt. Het matrixeffect van elk van de extractievloeistoffen zou bepaald moeten worden.

4.1.3 Het optimale injectievolume

Het optimale injectievolume werd bepaald door te kijken naar de histogrammen van ST, TS en CS in **Bijlage 8.1 Histogrammen van het injectievolume optimalisatie** zoals besproken werd in het experimentele hoofdstuk. Er kon gezegd worden dat er een evenredige trend aanwezig is, en geen afvlakking te zien is. Dit betekent dat er geen optimaal injectievolume was wat hieruit zichtbaar is. Er werd vervolgens gekeken naar de kalibratielijnen van de analieten. In tabellen 15, 16 en 17 in **Bijlage 8.2 Piekoppervlakken van het injectievolume optimalisatie en kalibratielijnen** de piekoppervlakken weergegeven die gebruikt zijn voor het maken van de kalibratielijnen en de kalibratielijnen. De detectielimieten zijn berekend met formule (2). In figuur 13 zijn de detectielimieten bij verschillende injectievolumes weergegeven. Zoals te zien is in Figuur 13 hadden ST en TS de laagste LOD bij injectievolume 40 μL , namelijk een LOD van 0,104 $\mu\text{g/mL}$ bij ST en een LOD van 0,114 $\mu\text{g/mL}$ bij TS. CS had bij injectievolume 10 μL de laagste LOD, namelijk een LOD van 0,078 $\mu\text{g/mL}$.



Figuur 13: Weergave van de detectielimieten bij verschillende injectievolumes met op de x-as de LOD in $\mu\text{g/mL}$ en op de y-as de analieten bij verschillende injectievolumes

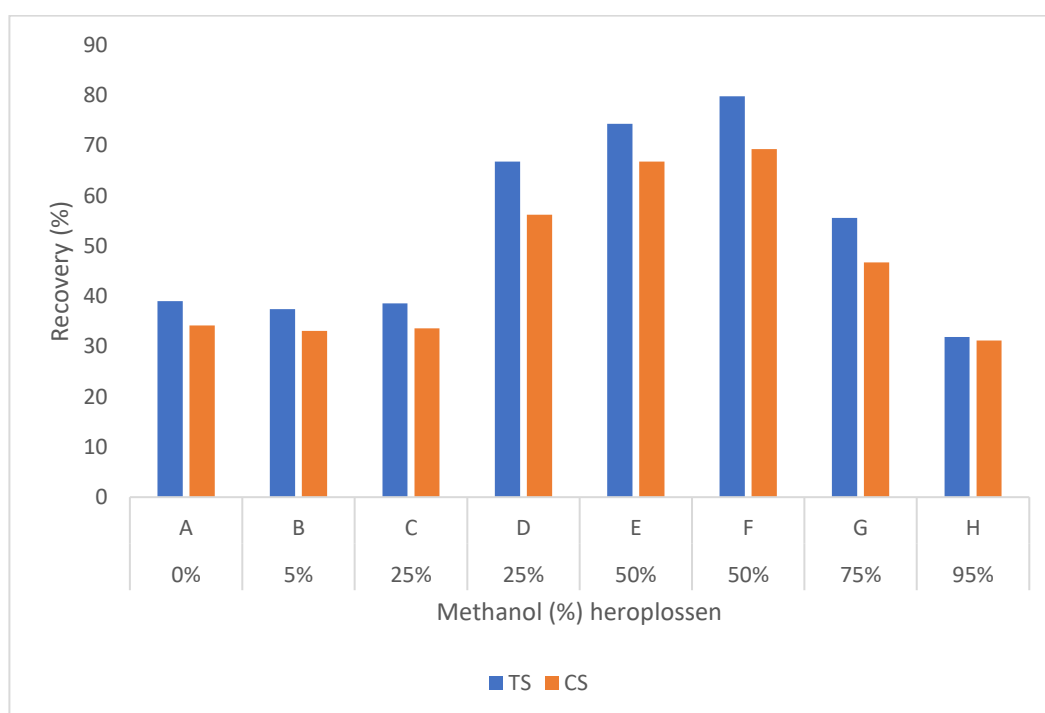
Het totale kolomvolume is 140 μL . Bij het injecteren met 40 μL , wordt er een groot volume geïnjecteerd in de kolom, wat als startconditie 10% B is, en kan mogelijk zorgen voor een verstoring van de condities in de kolom op lange duur. Er werd daarom gekozen om als injectievolume voor 10 μL te gaan om shiften in retentietijden van de analieten te voorkomen.

4.1.4 De optimale methanol/waterverhouding

In dit hoofdstuk worden de resultaten van het methanol/waterverhouding experiment behandeld. In **Bijlage 8.3 Piekoppervlakken methanol/water verhouding** zijn de piekoppervlakken van CS en TS terug te vinden maar niet van ST. Dit komt omdat ST alleen oploste in standaard A, en in de andere methanol/water verhoudingen niet. Om deze reden was ervoor gekozen om ST niet meer mee te nemen in dit onderzoek, en betekent het ook dat ST niet gevalideerd werd.

Omdat ST weinig retentie had op de kolom, was ST meten niet herhaalbaar. Dit komt omdat ST te polair is voor deze analysemethode. Om ervoor te zorgen om ST wel te kunnen meten zou er gederivatiseerd kunnen worden. Door een apolaire groep aan ST te koppelen, kan ST meer retentie op de kolom krijgen omdat ST dan apolairder is. Het nadeel van derivatiseren in een mengstandaard is dat de andere analieten die niet gederivatiseerd moeten zijn dan ook derivatiseren. Ook brengt derivatiseren meer stappen met zich mee in de monstervoorbewerking, waarbij de terugvinding nog lager kan uitkomen.

Met behulp van formule (3) was er berekend wat de recovery's van de standaarden A-F waren. In **Bijlage 8.4 Recovery's van de standaarden met verschillende methanol/water verhoudingen** zijn de absolute waarden weergegeven van de recovery's. In Figuur 21 zijn de recovery's van de verschillende methanol/water verhoudingen te zien met bijbehorende methanol percentages. Elke bar op de x-as (genoemd A t/m H) staat voor een bepaalde methanol/water verhouding met een oplopende hoeveelheid methanol.



Figuur 14: Recovery's van de verschillende methanol/waterverhoudingen met op de x-as de methanol% en op de y-as de recovery in %

Standaard F gaf bij zowel CS als TS de grootste piekoppervlakken. De recovery was voor TS 80% en 70% voor CS (**Bijlage 8.4 Recovery's van de standaarden met verschillende methanol/water verhoudingen**). Om deze reden was er gekozen om na het indampen van de standaarden, de standaarden weer op te lossen in 50/50 methanol/water (F) omdat de recovery daar het hoogst was voor TS en CS. Ondanks dat deze methanol/water verhouding niet gelijk staat aan de startcondities van de methode, waarbij er werd gestart met 10% B, zorgde dit niet voor verschuivingen en verhogingen van de pieken, wat ook verwacht werd.

Bij C is te zien dat de staven even hoog zijn als bij B terwijl de methanol percentage daar hetzelfde is als bij D, waarbij de recovery bij D bijna gelijk is als E, wat een percentage had van 50%. De reden hiervoor is omdat bij C en E er eerst methanol werd toegevoegd (voor C 25 µL en voor E 50 µL) en vervolgens werd aangevuld met water tot 100 µL. Wat er gebeurd kan zijn bij C is dat 25 µL een te klein volume was om de analieten op te lossen. Het kan ook zijn dat methanol niet alle analieten heeft geraakt omdat het zo'n klein volume is. Omdat bij D zeker is dat 25% methanol de analieten heeft geraakt, omdat dit een homogene oplossing was, kan er gezegd worden dat het beter is om 100 µL gelijk te pipetteren in het buisje en niet eerst een kleine volume methanol te pipetteren.

4.2 Validatie

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de verschillende prestatiekenmerken behandeld en bediscussieerd.

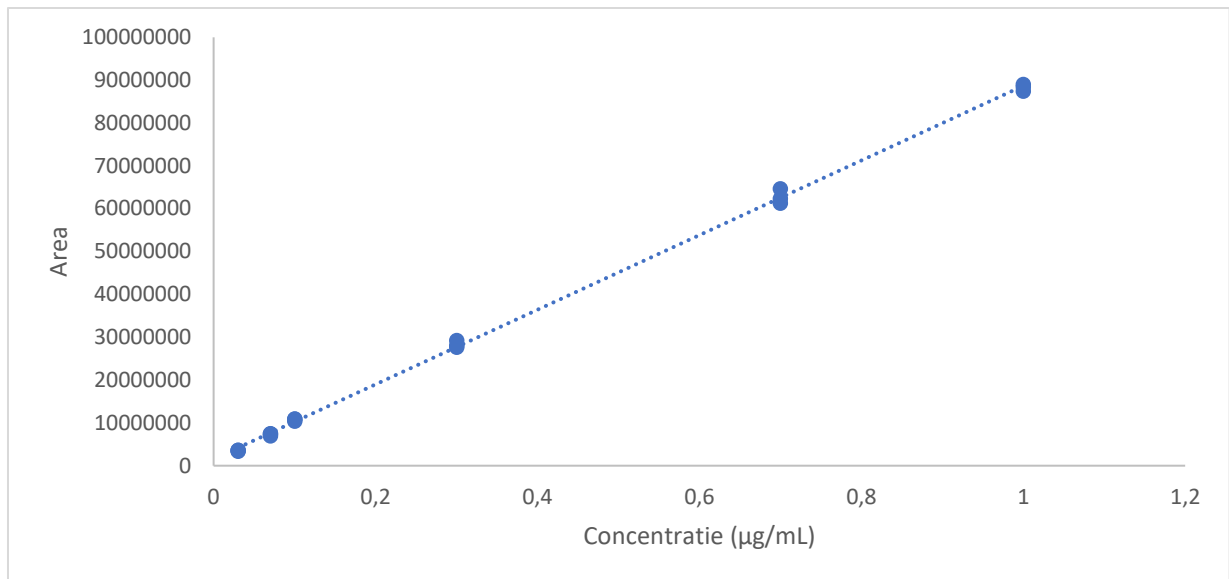
4.2.1 Aantoonbaarheidsgrens en meetbereik

De standaardreeksen van zowel bewerkte als onbewerkte standaarden werden gemaakt en gemeten en de kalibratielijnen volgden hieruit.

4.2.1.1 Onbewerkte TS standaarden

In **Bijlage 8.5 Piekoppervlakken van de onbewerkte standaarden (validatie)** staan de piekoppervlakken voor TS van elke standaard wat in triplo was gemeten met de bijbehorende concentratie.

Opvallend was dat bij standaard 1 geen piek geïntegreerd kon worden terwijl voordat de validatie van de methode plaatsvond, al eens was getest wat de laagst meetbare concentratie was. Met behulp van een kalibratielij, wat weergegeven staat in Figuur 15, kon de aantoonbaarheidsgrens worden berekend van deze lijn. Deze aantoonbaarheidsgrens (LOD) was 0,0198 µg/mL voor TS onbewerkt. Dit betekent dat er theoretisch voor standaard 1 een piek geïntegreerd had moeten kunnen worden. De theoretische bepaling van de LOD vanuit de kalibratielij heeft zijn beperkingen. De LOD was lager dan wat er gemeten kon worden. De reden dat het niet gemeten kon worden is vanwege de hoge ruis/piek verhouding die er is bij het fullscan meten. Bij MRM wordt het achtergrondsignaal verlaagd en is de ruis/piek verhouding vele malen kleiner omdat er daar heel specifiek gemeten wordt. Voor het verlagen van de detectielimiet is het beter om MRM te meten in plaats van fullscan.



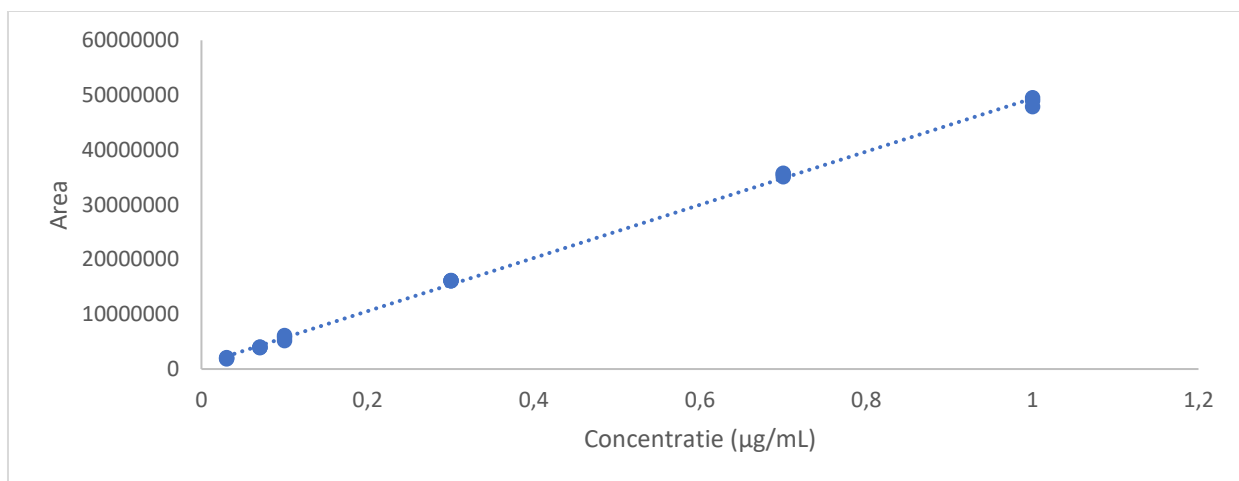
Figuur 15 Kalibratielij van onbewerkte TS standaardreeks $y = 1557963 (\pm 928814) + 87105386 (\pm 1801007)x$; $n = 18$; $S_r = 576237$; $R^2 = 0,9993$

Aan de formule van de lijn is te zien dat de R^2 van de lijn groter is dan 0,99, namelijk 0,9993, wat de gestelde eis was voor een goed meetbereik mits er minstens zes kalibratiepunten aanwezig waren.

4.2.1.2 Onbewerkte CS standaarden

In **Bijlage 8.5 Piekoppervlakken van de onbewerkte standaarden (validatie)** staan de piekoppervlakken voor CS van elke standaard wat in triplo was gemeten met de bijbehorende concentratie.

Ook bij CS kon er geen piek geïntegreerd worden bij standaard 1. Er waren ondanks dat standaard 1 niet meegenomen kon worden, wel genoeg punten om een kalibratielij te maken. Deze kalibratielij staat weergegeven in Figuur 16. Vanuit deze lijn kon de aantoonbaarheidsgrens worden berekend. De LOD was 0,0373 µg/mL, wat theoretisch gezien niet mogelijk is omdat standaard 2, wat een concentratie had van 0,03 µg/mL, geen piek gaf wat geïntegreerd kon worden. De reden hiervoor is hetzelfde als bij TS.



Figuur 16 Kalibratielij van een onbewerkte CS standaardreeks $y = 863510 (\pm 972472) + 48521946 (\pm 1885660)x$; $n = 18$; $S_r = 603322$; $R^2 = 0,9988$

De kalibratielijn van CS had ook een $R^2 > 0,99$, namelijk 0,9988. Ook hier waren er genoeg punten om te voldoen aan de voorwaarde van minstens zes kalibratiepunten.

4.2.1.3 Bewerkte TS en CS standaarden

Voor zowel de verdunningsreeksen van TS als CS werden er soortgelijke resultaten verkregen. In Tabel 3 voor TS en in Tabel 4 voor CS zijn de resultaten weergegeven. In **Bijlage 8.6 Piekoppervlakken van de bewerkte standaarden (validatie)** staan de afzonderlijke waarden van de standaarden weergegeven.

Tabel 3: Bewerkte TS verdunningsreeks resultaten van een triplo-meting waarbij in kolom een de standaarden staan benoemd, kolom twee de concentraties van de standaarden in $\mu\text{g/mL}$ en in kolom drie de gemiddelde piekoppervlakken staan weergegeven

Standaard	Concentratie ($\mu\text{g/mL}$)	Piekoppervlak
1	0,01	X
2	0,03	X
3	0,07	X
4	0,1	X
5	0,3	10292217
6	0,7	26171387
7	1	34600006

Tabel 4: Bewerkte CS verdunningsreeks resultaten van een triplo-meting waarbij in kolom een de standaarden staan benoemd, kolom twee de concentraties van de standaarden in $\mu\text{g/mL}$ en in kolom drie de gemiddelde piekoppervlakken staan weergegeven

Standaard	Concentratie ($\mu\text{g/mL}$)	Piekoppervlak
1	0,01	X
2	0,03	X
3	0,07	X
4	0,1	X
5	0,3	5221885
6	0,7	12392395
7	1	15754186

De standaarden die matrixmatching hadden ondergaan, gaven geen pieken bij concentraties lager dan 0,3 $\mu\text{g/mL}$. De standaarden die in dit verslag werden verstaan als 'onbewerkt' waren wel meetbaar bij concentraties vanaf 0,03 $\mu\text{g/mL}$. Het piekoppervlak van standaard 5 bewerkte TS (10292217) komt bijna overeen met het piekoppervlak van standaard 4 onbewerkte TS (10748490). Zo was dat ook voor CS standaard 5 bewerkt (5221885) vergeleken met CS standaard 4 onbewerkt (5674575). Er zou aan de hand hiervan verwacht kunnen worden dat standaarden 3 en 4 van de bewerkte standaarden ook pieken moesten geven die geïntegreerd konden worden. Dit was niet het geval. In hoofdstuk **4.7.8 Matrixeffect** en hoofdstuk **4.7.9 Terugvinding** zal er meer gesproken worden over de correcties van de waarden van de analysemonsters.

Omdat er niet genoeg punten waren om een kalibratielijn te maken kon er geen LOD worden bepaald van de bewerkte standaarden. Om deze reden kon ook het meetbereik niet bepaald worden.

Omdat het doel van dit experiment het behalen van detectielimieten lager dan 5 ng/mL was, moet dit experiment opnieuw uitgevoerd worden. Hierbij moet er niet meer fullscan gemeten worden, maar moet er MRM of SRM gemeten worden. Het grote voordeel van tandem-MS is dat er specifiek en heel gevoelig gemeten kan worden. Eerder is al uitgelegd dat specifieke fragmenten geselecteerd kunnen worden met MRM/SRM, waarbij de intensiteiten van de pieken van de analieten veel hoger zullen liggen dan het achtergrondsignaal. Door op deze manier te meten zullen er lagere detectielimieten behaald kunnen worden.

4.2.2 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid van de injectie en opwerking werden berekend aan de hand van formule (5). In Tabel 5 zijn de resultaten van de herhaalbaarheid van de injectie weergegeven van een bewerkte analysemonsters wat een concentratie had van 1 µg/mL en in achttvoud werd gemeten.

Tabel 5: Herhaalbaarheid van de injectie van een bewerkte analysemonster

TS		CS	
Meting	Piekoppervlak	Meting	Piekoppervlak
1	20452990	1	7368607
2	19242558	2	7741943
3	20383034	3	8079745
4	19819606	4	7957003
5	21332445	5	7607749
6	20933049	6	8234541
7	20962713	7	8265422
8	22423992	8	8540958
RSD(H)%	4,7	RSD(H)%	4,8

De herhaalbaarheid van de injectie voldeed aan de eis van <5% voor beide analieten.

De herhaalbaarheid van de opwerking werd driemaal bepaald omdat voor de reproduceerbaarheid van de opwerking meerdere data nodig was over verschillende dagen. In **Bijlage 8.8 Validatie herhaalbaarheid opwerking TS** en **Bijlage 8.9 Validatie herhaalbaarheid opwerking CS** zijn alle data weergegeven voor de bepaling van de herhaalbaarheid van de opwerking. In tabel 6 is er samengevat wat de RSD(H) van de opwerkingen waren.

Tabel 6: Samenvatting van de RSD(H)% bepaling van de opwerking

TS	RSD(H)%	CS	RSD(H)%
Dag 1	20,3	Dag 1	19,3
Dag 2	18,3	Dag 2	17,4
Dag 3	25,7	Dag 3	24,4

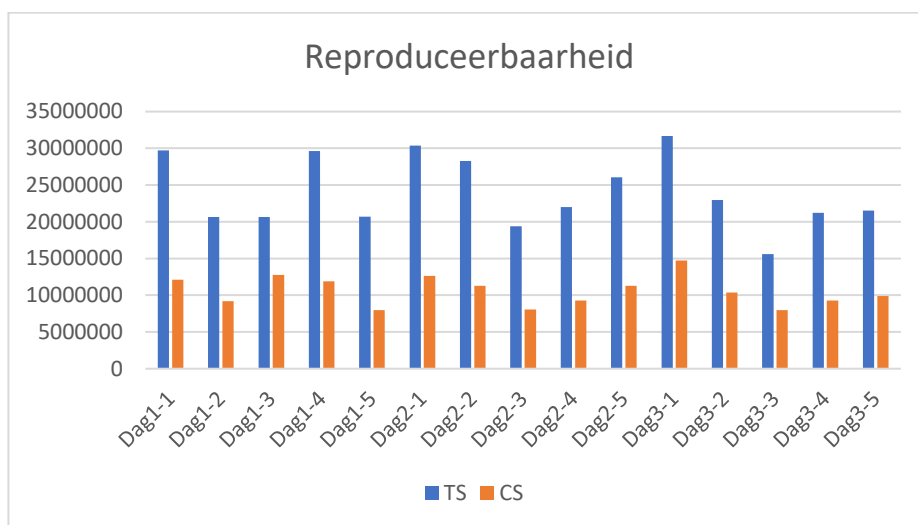
De herhaalbaarheid van de opwerking voldeed niet aan de eis van <5% voor beide analieten. Dat betekent dat de variatie tussen de opwerking heel groot was. Om deze variatie te verkleinen zou getest moeten worden in welke stap(pen) van de opwerking de grote variatie veroorzaakt werd. Wanneer bekend is welke stap dit is kan er nagedacht worden over wat er

gedaan kan worden om deze variatie te verkleinen. Met resultaten als deze wordt er geadviseerd om de RSD(H)% te verlagen voordat er verder gekeken wordt naar de andere prestatiekenmerken. Hiervoor moet er gekeken worden in welke stappen van de opwerking zoveel verlies wordt gemaakt en moet dit aangepast worden. Omdat de percentages van de twee stoffen gelijk zijn kan er gezegd worden dat er iets mis is met de opwerking.

Omdat het van belang is om herhaalbare resultaten te verkrijgen moet er meer gefocust worden om de monstervoorbewerkingsmethode en de analysemethode te optimaliseren. Zoals eerder werd behandeld kan de analysemethode geoptimaliseerd worden door MRM/SRM te meten. Wanneer er geen herhaalbare resultaten verkregen kunnen worden, zijn de resultaten niet betrouwbaar. Voor de bepaling van de herhaalbaarheid moet er geëxperimenteerd worden met het toevoegen van de analieten bij elk van de stappen van de monstervoorbewerking. Er wordt verwacht dat wanneer de analieten bij verschillende stappen worden gespiked, er duidelijk kan zijn in welke stap het grootste verlies plaatsvindt. Door deze stap te optimaliseren, gaat niet alleen de terugvinding omhoog, maar wordt er verwacht dat de herhaalbaarheid ook verbeterd zal worden.

4.2.3 Reproduceerbaarheid

Uit **Bijlage 8.7 Validatie herhaalbaarheid opwerking TS** en **Bijlage 8.8 Validatie herhaalbaarheid opwerking CS** zijn de gemiddelde waarden over verschillende dagen, die uitgedrukt zijn in gele cellen, gebruikt voor de berekening van de reproduceerbaarheid.



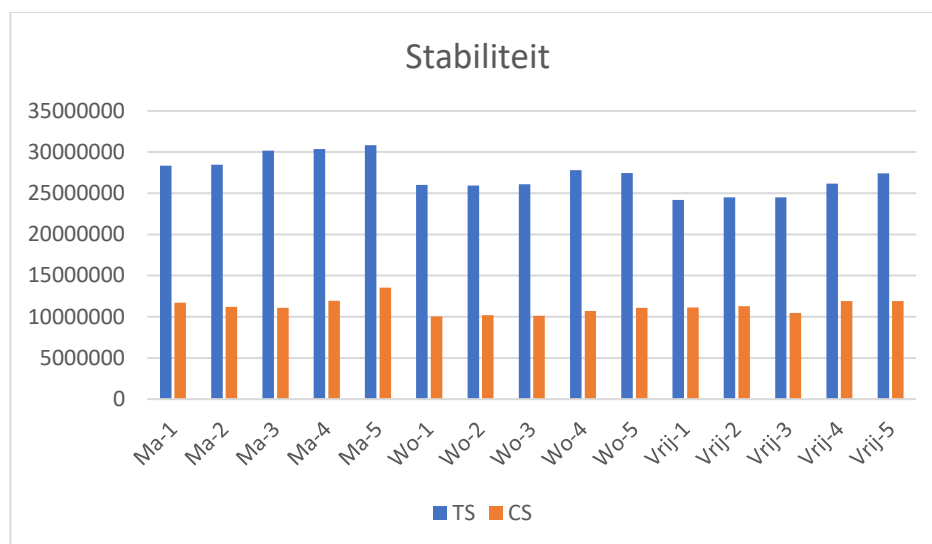
Figuur 17: Reproduceerbaarheid van de opwerking van bewerkte analysemonsters met een concentratie van 1 µg/mL met op de x-as de verschillende dagen en de y-as de piekoppervlakken

In Figuur 17 is een weergave van de reproduceerbaarheid van TS en CS. Aan de RSD(R)%, wat voor TS 20,2% is en voor CS 19,1%, is te zien dat de reproduceerbaarheid >5%. Dit betekent dat dit niet voldoet aan de eis van de reproduceerbaarheid. Dit betekent dat de variatie tussen de opwerkingen gedurende meerdere dagen te groot is. De grote variatie komt door het verlies wat bij het opwerken plaatsvindt. Het verlies is heel onregelmatig. Zoals besproken werd bij de herhaalbaarheid van de methode, is het van belang om reproduceerbare resultaten te verkrijgen omdat de methode anders niet betrouwbaar is. Er wordt verwacht dat wanneer de monstervoorbewerking wordt geoptimaliseerd, dus door

elke stap van de opwerking te testen, de reproduceerbaarheid (RSD(R)%) verbeterd zal worden. Ook zal de RSD(R)% omlaag gaan wanneer er MRM/SRM wordt gemeten.

4.2.4 Stabiliteit in de autosampler

De stabiliteit van het analysemonster in het apparaat werd bepaald door het gemiddelde van de metingen van dag vijf te vergelijken met de gemiddelde van de metingen van dag één maar ook van dag drie om een tussentijdse waarde te verkrijgen. In Figuur 18 zijn de piekoppervlakken te zien van deze metingen.



Figuur 18: Piekoppervlakken voor de berekening van de stabiliteit van een analysemonster in het apparaat gedurende vijf dagen

Met de formule (7) werd berekend wat de afname van de piekoppervlakken was. Dit was voor dag één op dag drie een afname van 10,1% voor TS en een afname van 12,4% voor CS. De afname was voor dag één op dag vijf had een afname van 14,5% voor TS en een afname van 4,7% voor CS, wat opmerkelijk was omdat dit zou betekenen dat er een toename in piekoppervlak heeft plaatsgevonden van dag drie op dag vijf. Uit de RSD(H) van de injectie was al berekend dat er een afwijking mogelijk zou kunnen zijn van maximaal 5%. Door dat in acht te nemen en het feit dat andere condities van het meetsysteem (elke nieuwe dag nieuw eluens gebruiken) gevarieerd werden, kon er gezegd worden dat de toename in piekoppervlak niet heel raar was. Er heeft geen echte toename in concentratie plaatsgevonden, maar verschillende onderdelen van het systeem hebben bijgedragen aan deze verhoging in piekoppervlak. De samples in de autosampler zijn stabiel gedurende vijf dagen want ze voldoen aan de eis voor de stabiliteit (<20%).

4.2.5 Geheugeneffect

Het geheugeneffect werd bepaald door te kijken naar het chromatogram van een blanco-meting waarvoor eerst een hoge concentratie standaard van 1 µg/mL werd gemeten. Er was geen sprake van een geheugeneffect. In het chromatogram werd er gekeken naar de retentietijden waar de analieten elueren in de laatste blanco.

4.2.6 Matrixeffect

Het matrixeffect werd bepaald met de gegevens die weergegeven zijn in Tabel 7. Hierbij werd het gemiddelde piekoppervlak van de onbewerkte standaard vergeleken met het gemiddelde piekoppervlak van de standaard wat gespiked werd na het indampen met formule (8).

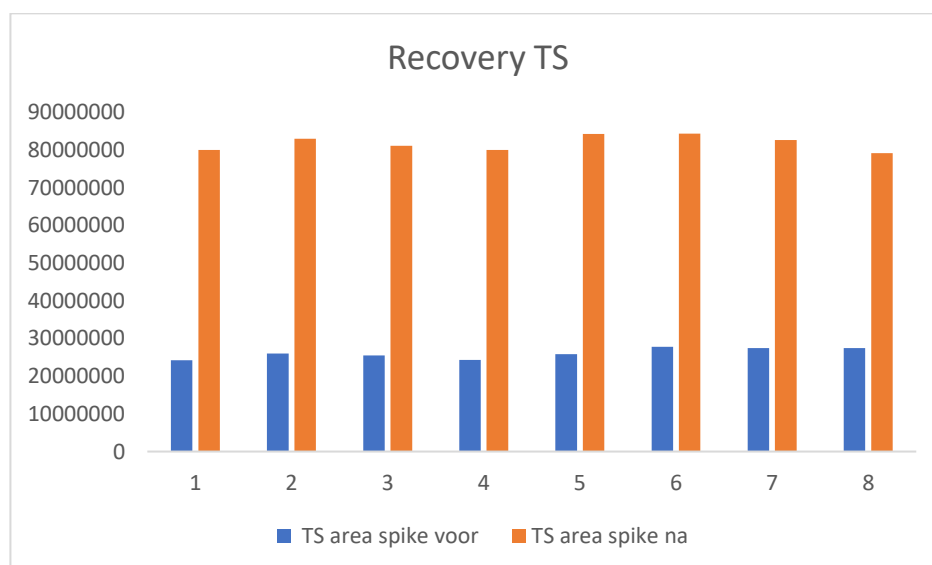
Tabel 7: De resultaten die gebruikt werden voor de bepaling van het matrixeffect

TS				CS			
Spike na	Area	Onbewerkt	Area	Spike na	Area	Onbewerkt	Area
1	80045910	1	81322090	1	32780189	1	41640514
2	82963380	2	81672813	2	35706269	2	42206266
3	81130040	3	82167476	3	35109511	3	40463628
4	80031174	4	82088558	4	35446770	4	40542213
5	84261515	5	80068027	5	38429536	5	41723449
6	84334946	6	81132211	6	37066349	6	41746803
7	82647614	7	82370902	7	36407533	7	43794040
8	79183278	8	86592099	8	36561087	8	42935223
gemiddelde	81824732	gemiddelde	82176772	gemiddelde	35938406	gemiddelde	41881517

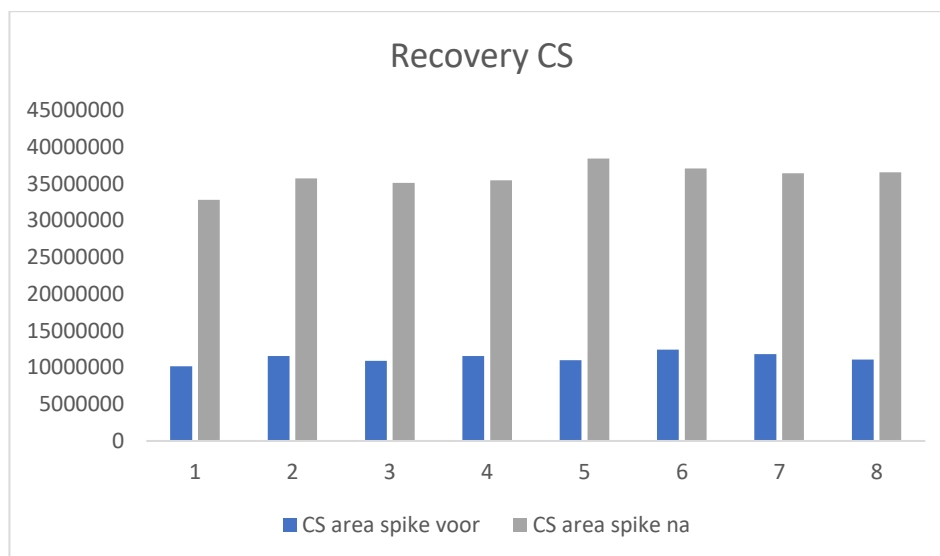
Het matrixeffect was voor TS 0,4% en voor CS 14,2%. Beide analieten voldeden aan de eis van een matrixeffect <20%. Het matrixeffect zorgde voor een afname van het signaal. De matrix verstoortte het ionisatieproces en zorgde ervoor dat het meetsignaal werd verlaagd. Echter moet er wel rekening gehouden worden met het feit dat er ook een variatie van ongeveer 5% bij de herhaalbaarheid van de injectie en de variatie in herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de opwerking.

4.2.7 Terugvinding

De terugvinding werd bepaald met de gegevens die weergegeven zijn in Figuur 19 en in Figuur 20. Hierbij werd het gemiddelde piekoppervlak van de bewerkte standaard vergeleken met het gemiddelde piekoppervlak van de standaard wat gespiked werd na het indampen met formule (9).



Figuur 19: De resultaten die gebruikt werden voor de bepaling van de terugvinding van TS



Figuur 20: De resultaten die gebruikt werden voor de bepaling van de terugvinding van CS

De terugvinding was voor TS 31,9% en voor CS 31,5%. Deze terugvindingen voldeden niet aan de eis van 85% - 115%. Dit betekent dat er veel verlies van analiet plaatsvond tijdens het opwerken van de bewerkte analysemonsters. Het DBS-papier werd volledig meegenomen door het papier in 20 gelijke stukken te knippen. Ook werd dit papier meerdere malen geëxtraheerd om er zeker van te zijn dat alle analieten van het DBS-papier uit kwamen en terecht kwamen in de extractievloeistof. Om verlies tijdens het heroplossen te voorkomen werd er op een zachte stand gevortext zodat het oplosmiddel niet tegen de wand zou plakken en daar zou blijven. Het volume oplosmiddel tijdens het heroplossen werd zorgvuldig in het buisje gepipetteerd zodat het niet langs de wand zou druppelen en daardoor de bodem niet zou bereiken. Er wordt verwacht dat het verlies zou kunnen gebeuren in de stap van het indampen waarbij er met behulp van een stikstofstroom in een waterbad van 40 °C bij een druk van 5 bar de extractievloeistof werd afgedampt. Het kan zijn dat de analieten door het hele buisje werd geschud en ging kleven aan de wand van het buisje. Omdat alleen aan de bodem van het buisje nat werd gemaakt met oplosmiddel, kan het zijn dat de analieten die zich aan de wand bevonden niet loskwamen en in het oplosmiddel terecht kwamen. Dit was visueel niet te zien, maar om dit te kunnen testen zou na het indampen een mL dichloormethaan aan de wand gepipetteerd kunnen worden om er zeker van te zijn dat de analieten naar de bodem zijn gezakt. Dan kan er weer drooggedampt worden en na het drogen heroplossen. Er wordt verwacht dat op deze manier alle analieten die nog aanwezig waren in het buisje, zich dan zullen bevinden onder in het buisje.

4.2.8 Samenvatting validatie

In Tabel 8 staat een samenvatting van de validatie.

Tabel 8: Samenvatting van de validatie

Prestatiekenmerk	Eis	Testosteron	Corticosteron	Voldoet het aan de eis? (ja/nee)
Detectielimiet	<5 ng/mL	Onbewerkt = 0,02 µg/mL Bewerkt = niet bepaald	Onbewerkt = 0,04 µg/mL Bewerkt = niet bepaald	Nee
Meetbereik	Minstens 6 punten met $R^2 < 0,99$	Onbewerkt = 0,03 - 1 µg/mL $R^2 = 0,9993$, 6 punten Bewerkt = 0,3 - 1 µg/mL $R^2 =$ niet bepaald, 3 punten	Onbewerkt = 0,03 - 1 µg/mL $R^2 = 0,9988$, 6 punten Bewerkt = 0,3 - 1 µg/mL $R^2 =$ niet bepaald, 3 punten	Nee
Herhaalbaarheid injectie	RSD <5%	4,7%	4,8%	Ja
Herhaalbaarheid opwerking	RSD <5%	18,3 – 25,7%	17,4 – 24,4%	Nee
Reproduceerbaarheid opwerking	RSD <5%	20,2%	19,1%	Nee
Stabiliteit	<-20%	-14,5%	-4,8%	Ja
Geheugeneffect	Geen geheugen-effect	Geen geheugeneffect	Geen geheugeneffect	Ja
Matrixeffect	<-20%	-0,4%	-14,2%	Ja
Terugvinding	85-115%	31,9%	31,5%	Nee

De monstervoorbewerkingsmethode en de analysemethode zijn nog niet optimaal. Er wordt verwacht dat wanneer elk optimalisatiepunt opnieuw getest wordt, wat besproken werd in de voorgaande hoofdstukken, de monstervoorbewerkingsmethode en de analysemethode betere prestatie resultaten zullen geven. Wanneer de monstervoorbewerkingsmethode en de analysemethode zijn geoptimaliseerd, kan er opnieuw gevalideerd worden. Wanneer beide methode valide zijn kunnen de monsters gemeten worden.

ST werd niet meegenomen voor de validatie. In het vervolg zou ST ook niet meegenomen hoeven te worden. Dit komt vanwege de retentie van ST op de kolom. Derivatiseren zou een oplossing kunnen zijn, maar dan derivatiseren ook de analieten die niet gederiviseerd moeten worden. Ook is er geen referentie van de verwachte concentratie op het papier bekend van ST, dus zorgt dit voor een extra uitdaging. ST zou afzonderlijk op een polairdere kolom gemeten kunnen worden. Er wordt verwacht dat ST op een polairdere kolom meer retentie zal hebben.

Het is nog niet zeker of DBS-papier in het (biologische) veld- en milieuonderzoek gebruikt kan worden.

5 Conclusie

Een LC-methode en een monstervoorbewerkingsmethode werden ontwikkeld maar slaagde de validatie niet voor het kwantificeren van CS en TS van kikkerwater samples op DBS-papier. ST was een analiet wat ook getest zou worden, maar niet werd meegenomen omdat het niet lukte om de meting van ST geoptimaliseerd te krijgen in de methode. Een monstervoorbewerkingsmethode werd opgezet om TS en CS uit het DBS-papier te extraheren en een analysemethode werd opgezet voor de meting van de analieten. De optimale instellingen waren een methanol/water gradiënt van 30 minuten wat begon met

10% methanol, opliep naar 80% methanol en afliep naar 10% methanol, een injectievolume van 10 µL, aceton als optimale extractievloeistof en 50/50 methanol/water als optimale methanol/water verhouding voor het heroplossen van de analieten. De prestatiekenmerken die getest waren zijn aantoonbaarheidsgrens, meetbereik (eis = minstens zes punten met een $R^2 < 0,99$), herhaalbaarheid injectie (eis = RSD <5%), herhaalbaarheid opwerking (eis = RSD <5%), reproduceerbaarheid opwerking (eis = <5%), stabiliteit (eis = <20%), geheugeneffect, matrixeffect (eis = <15%) en terugvinding (eis = 85 – 115%). Om deze prestatiekenmerken te testen werden er matrixmatchende mengstandaarden gemaakt. De aantoonbaarheidsgrens was niet bepaald voor de matrixmatchende mengstandaarden maar wel voor de onbewerkte mengstandaarden. Voor TS was de LOD 0,02 µg/mL waarbij de lijn een R^2 had van 0,9993. Voor CS was de LOD 0,04 µg/mL met een R^2 van 0,9988. De herhaalbaarheid van de injectie was voor TS 4,7% en voor CS 4,8%. De herhaalbaarheid van de opwerking was voor TS 18,3 – 25,7% en voor CS 17,4 – 24,4%. De reproduceerbaarheid van de opwerking was voor TS 20,2% en voor CS 19,1%. De stabiliteit was voor TS -14,5% en voor CS -4,8%. Er was geen sprake van een geheugeneffect voor zowel TS als CS. Het matrixeffect was -0,4% voor TS en -14,2% voor CS dus er was geen sprake van een matrixeffect. De terugvinding was voor TS 31,9% en voor CS 31,5%. De prestatiekenmerken herhaalbaarheid injectie, stabiliteit, geheugeneffect en matrixeffect voldeden aan de eisen, de andere prestatiekenmerken niet. De methode is niet geschikt voor de kwantificering van TS en CS en kan daarom geen informatie geven om de strijd tegen het uitsterven van anuranen tegen te gaan. Ook is nog niet zeker of DBS-papier in het (biologische) veld- en milieuonderzoek gebruikt kan worden.

6 Aanbevelingen

6.1 Analysemethode

Voor het behalen van lagere detectielimieten zou er SRM/MRM gemeten moeten worden. Dit is veel gevoeliger en specifiekier omdat parent en daughter fragmenten geselecteerd kunnen worden en wordt het achtergrondsignaal ook verlaagd.

Er kan opnieuw geïnfuseerd worden om te kijken of er een verbetering te zien is wanneer de settings van de MS worden bewerkt.

De standaarden moeten aangezuurd worden omdat het eluens ook aangezuurd is. Wanneer dit gedaan wordt kunnen de intensiteiten van de [M+H] pieken verhoogd worden, wat kan helpen met het behalen van lagere detectielimieten.

6.2 Monstervoorbewerkingsmethode

Voor de monstervoorbewerkingsmethode werd het DBS-papier volledig meegenomen in de monstervoorbewerking, wat al een verbetering was ten opzichte van het uitstansen van een gedeelte van het papier. Ook vond er een concentratiestap van viermaal plaats. Toch blijkt het dat er veel verlies heeft plaatsgevonden tijdens de opwerking van de bewerkte standaarden. Er zou gekeken moeten worden naar elke stap van de monstervoorbewerking om erachter te komen waar de variatie het grootst begint te worden.

Bij het indampen schudt de vloeistof in het buisje heel erg en het zou kunnen zijn dat er hier ook verlies plaatsvindt. De evaporator instellingen zouden aangepast moeten worden om te testen of een druk bij 5 bar bij een temperatuur van 40 °C een bijdrage leverde bij het verlies

van analieten. Omdat de analieten niet thermisch stabiel zijn zou het kunnen zijn dat er tijdens het indampen het degradatieproces werd bevorderd. Omdat 6 mL aan aceton verdampt moest worden zat dit gedurende 30 minuten in de evaporator, en kan het zijn dat dat te lang was voor de stabiliteit van de analieten.

Rotatiefilmverdamping is ook een techniek om vloeistoffen te verdampen en daar zou ernaar gekeken kunnen worden. Ook kan er gekeken worden naar de mogelijkheid om de buisjes te drogen aan de lucht. Het nadeel hiervan is dat aan de lucht drogen lang duurt en er tijdens het drogen vervuilingen in de vloeistof kunnen komen.

Ook moet er getest worden of analieten wel goed uit het DBS-papier geëxtraheerd kunnen worden. Om dit te kunnen testen zou een andere soort extractiemethode vergeleken kunnen worden met de extractiemethode die nu is opgesteld. Hierbij zou Solid Phase Extraction gebruikt kunnen worden. Als het blijkt dat de terugvinding niet verandert dan kan er gezegd worden dat het niet aan het DBS-papier ligt maar aan de handelingen tijdens het opwerken.

Het gebruikmaken van een interne standaard zou voor het achterhalen van het verlies wat er plaatsvindt tijdens de monstervoorbewerking makkelijker maken omdat er dan bij elk onderdeel van de monstervoorbewerking een analyse gedaan kan worden met een interne standaard. Na de optimalisatie van de monstervoorbewerking zou de terugvinding verbeterd kunnen worden. Dit zou ook de reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid van de opwerking kunnen verbeteren.

6.3 Validatie

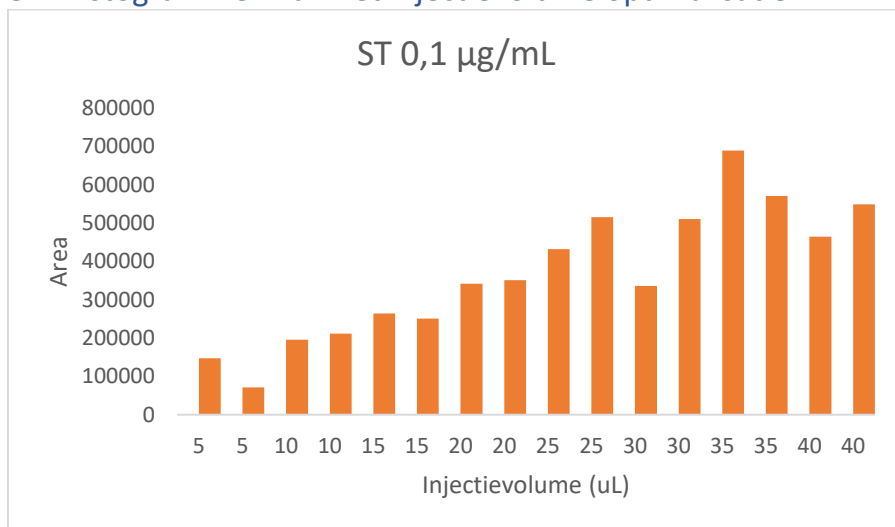
Wanneer de analysemethode en de monstervoorbewerkingsmethode beter worden geoptimaliseerd zou er opnieuw gevalideerd moeten worden.

7 Referentie

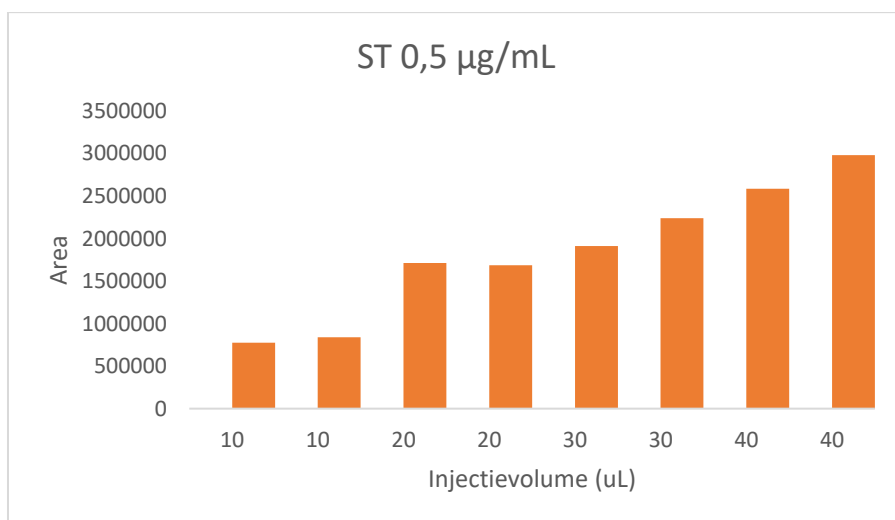
1. <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/endangered-species/>
Geraadpleegd: 13-07-2021
2. <https://www.iucnredlist.org/> Geraadpleegd: 13-07-2021
3. <https://amphibiaweb.org/> Geraadpleegd: 13-11-2021
4. Kruger, D. J. D., Hamer, A. J., & Du Prees, L. H. (2015). *Urbanization affects frog communities at multiple scales in a rapidly developing African city. Urban Ecosystems*, 18(4), 1333–1352. doi:10.1007/s11252-015-0443-y Geraadpleegd: 13-07-2021
5. Halfwerk, W., Blaas, M., Kramer, L. *et al.* Adaptive changes in sexual signaling in response to urbanization. *Nat Ecol Evol* 3, 374–380 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0751-8> Geraadpleegd: 15-08-2021
6. Arch VS, Narins PM (2009) Sexual hearing: The influence of sex hormones on acoustic communication in frogs. *Hearing Research* 252:15–20
7. Rajchard J (2005) Sex pheromones in amphibians: a review. *Vet. Med. – Czech*, 50:385–389
8. Denver RJ, Hopkins PM, McCormick SD, Propper CR, Riddiford L, Sower SA, Wingfield JC (2009) Comparative endocrinology in the 21st century. *Integrative and Comparative Biology* 49(4):339–348
9. https://stringfixer.com/nl/Volume_transmission Geraadpleegd: 13-07-2021
10. Cheng, Tiejun; Zhao, Yuan; Li, Xun; Lin, Fu; Xu, Yong; Zhang, Xinglong; Li, Yan; Wang, Renxiao; Lai, Luhua (2007). *Computation of Octanol–Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. Journal of Chemical Information and Modeling*, 47(6), 2140–2148.
11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Serotonin#section=Computed-Properties> Geraadpleegd: 13-11-2021
12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6013#section=Computed-Properties>
Geraadpleegd: 13-11-2021
13. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5753#section=Computed-Properties>
Geraadpleegd: 13-11-2021
14. Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Francis Rouessac and Annick Rouessac ISBN 978-0-470-85903-2
15. [16764hic cover new1 \(hplc.eu\)](https://www.hplc.eu/cover_new1) Geraadpleegd 29-03-2022
16. <https://www.umcg.nl/-/dried-blood-spot> Geraadpleegd: 14-07-2021
17. Konermann, Lars; Ahadi, Elias; Rodriguez, Antony D.; Vahidi, Siavash (2013). *Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. Analytical Chemistry*, 85(1), 2–9. doi:10.1021/ac302789c
18. Parker SP, Cubitt WD (September 1999). ["The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies"](#). *J. Clin. Pathol.* 52

8 Bijlagen

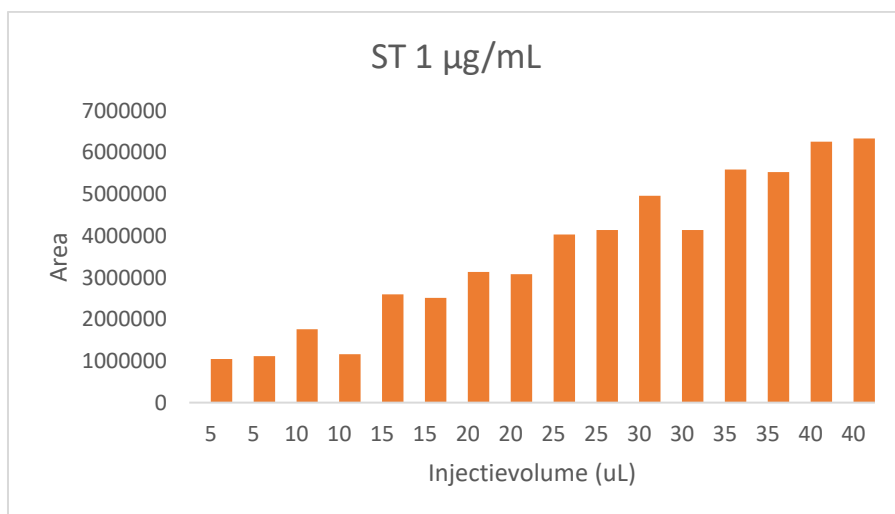
8.1 Histogrammen van het injectievolumen optimalisatie



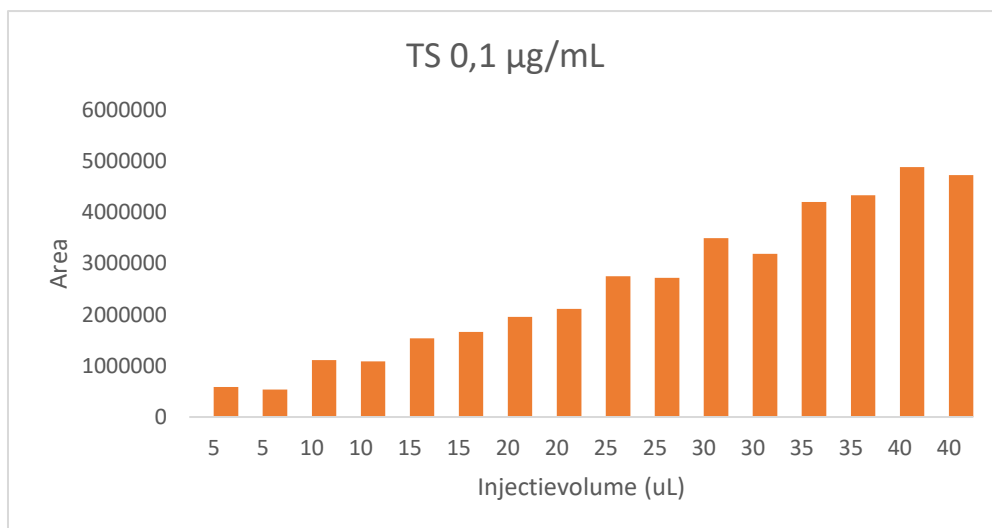
Figuur 21 Histogram van ST 0,1 µg/mL met op de x-as injectievolumen (in µL) en y-as piekoppervlak



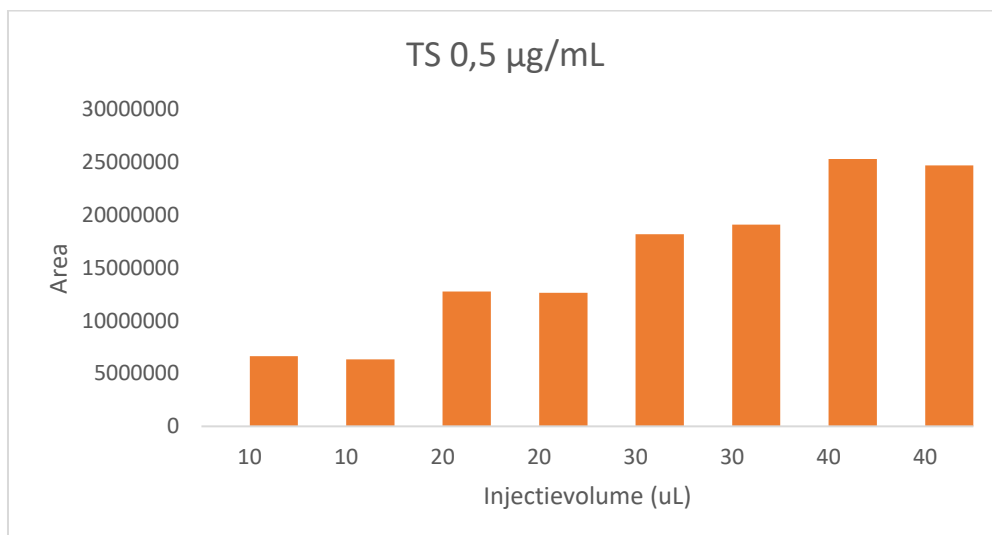
Figuur 22 Histogram van ST 0,5 µg/mL met op de x-as injectievolumen (in µL) en y-as piekoppervlak



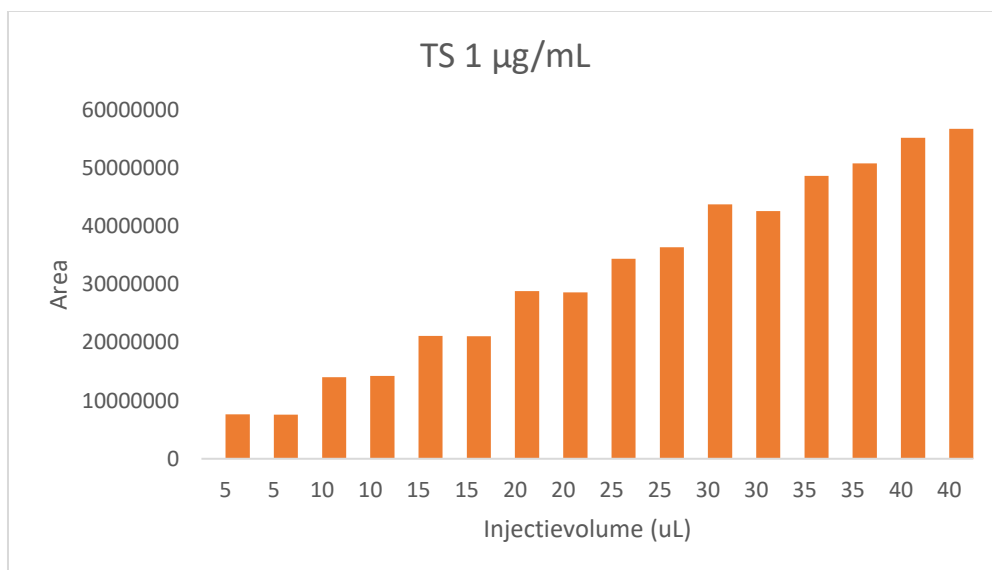
Figuur 23 Histogram van ST 1 µg/mL met op de x-as injectievolumen (in µL) en y-as piekoppervlak



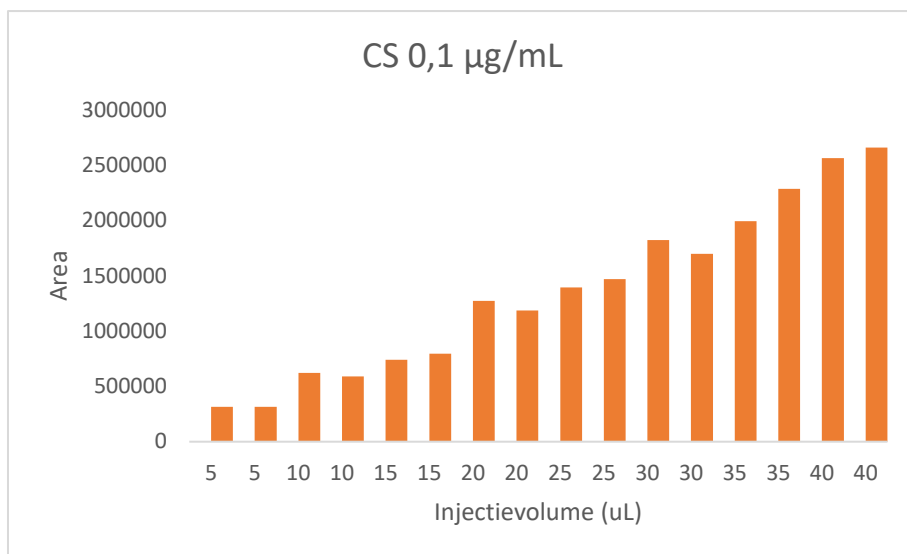
Figuur 24 Histogram van TS 0,1 µg/mL met op de x-as injectievolume (in µL) en y-as piekoppervlak



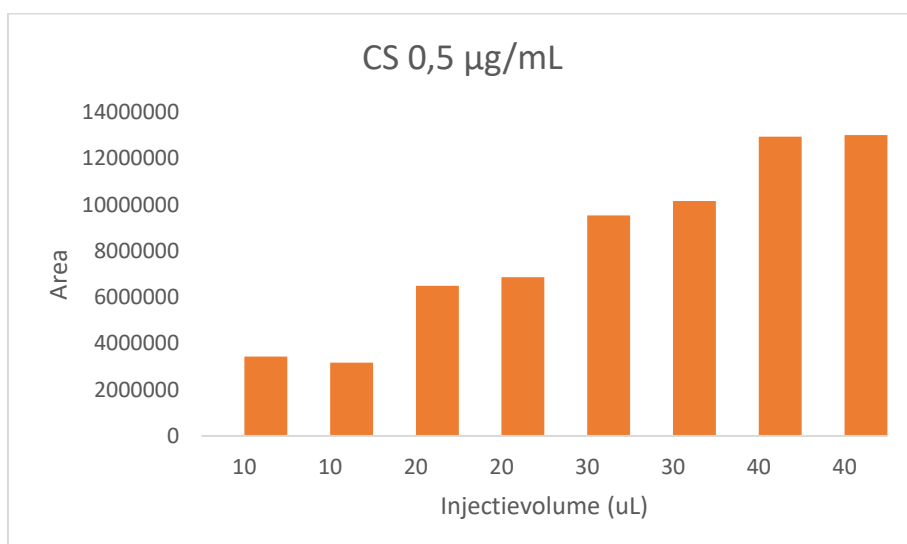
Figuur 25 Histogram van TS 0,5 µg/mL met op de x-as injectievolume (in µL) en y-as piekoppervlak



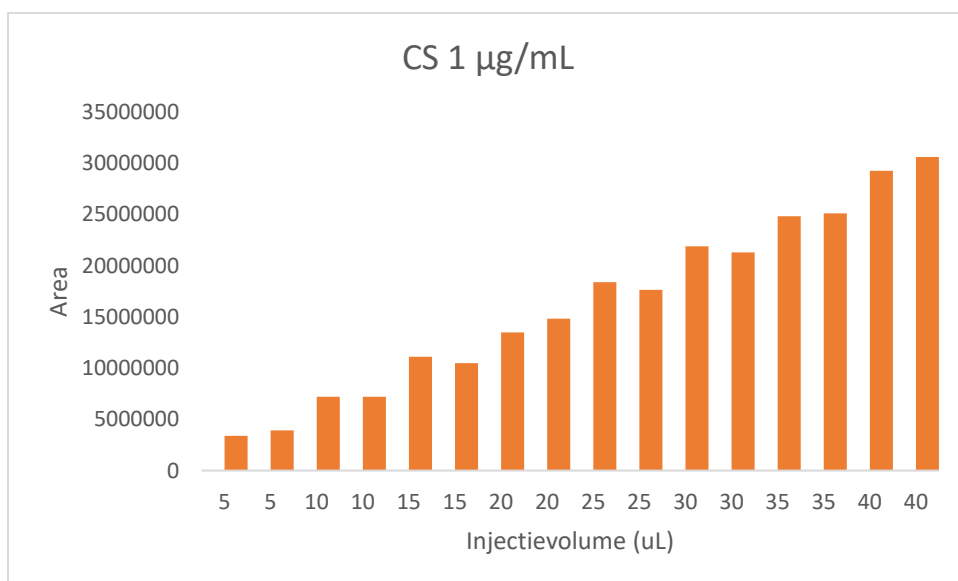
Figuur 26 Histogram van TS 1 µg/mL met op de x-as injectievolume (in µL) en y-as piekoppervlak



Figuur 27 Histogram van CS 0,1 µg/mL met op de x-as injectievolumen (in µL) en y-as piekoppervlak



Figuur 28 Histogram van CS 0,5 µg/mL met op de x-as injectievolumen (in µL) en y-as piekoppervlak



Figuur 29 Histogram van CS 1 µg/mL met op de x-as injectievolumen (in µL) en y-as piekoppervlak

8.2 Piekoppervlakken van het injectievolume optimalisatie en kalibratielijnen

Tabel 9: Piekoppervlakken van ST voor de kalibratielijnen met injectievolumes 10, 20 en 40µL

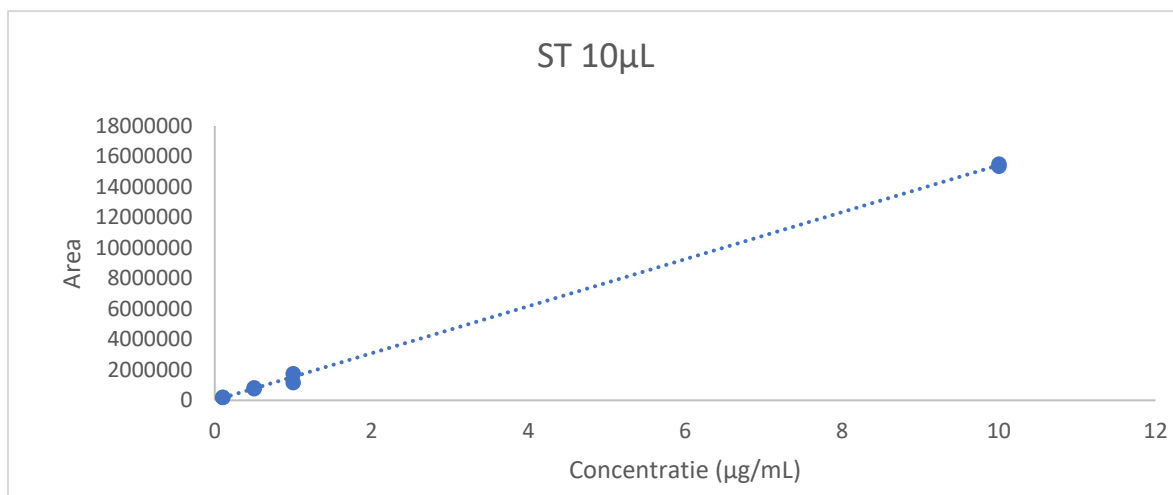
10µL		20µL		40µL	
Concentratie	Area	Concentratie	Area	Concentratie	Area
0,1	195851	0,1	342128	0,1	465033
0,1	211920	0,1	351532	0,1	548936
0,5	776190	0,5	1712101	0,5	2587935
0,5	837612	0,5	1686018	0,5	2981801
1	1762958	1	3136077	1	6261044
1	1161422	1	3080335	1	6334370
10	15508347	5	12291251	5	24097685
10	15361528	5	12382729	5	23731854
		10	30756910		
		10	29286882		

Tabel 10: Piekoppervlakken van TS voor de kalibratielijnen met injectievolumes 10, 20 en 40µL

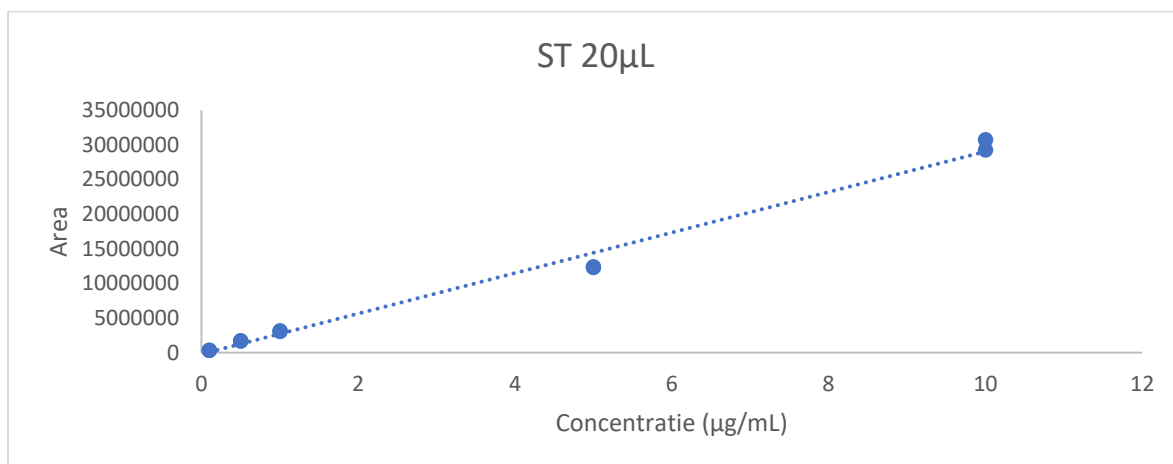
10µL		20µL		40µL	
Concentratie	Area	Concentratie	Area	Concentratie	Area
0,1	1114195	0,1	1954479	0,1	4884930
0,1	1084875	0,1	2112385	0,1	4729481
0,5	6655768	0,5	12750867	0,5	25324377
0,5	6347450	0,5	12658040	0,5	24698738
1	14013509	1	28848393	1	55177184
1	14258838	1	28629104	1	56749218
10	1,43E+08	5	1,49E+08	5	2,64E+08
10	1,47E+08	5	1,52E+08	5	2,65E+08
		10	2,84E+08		
		10	2,9E+08		

Tabel 11: Piekoppervlakken van CS voor de kalibratielijnen met injectievolumes 10, 20 en 40µL

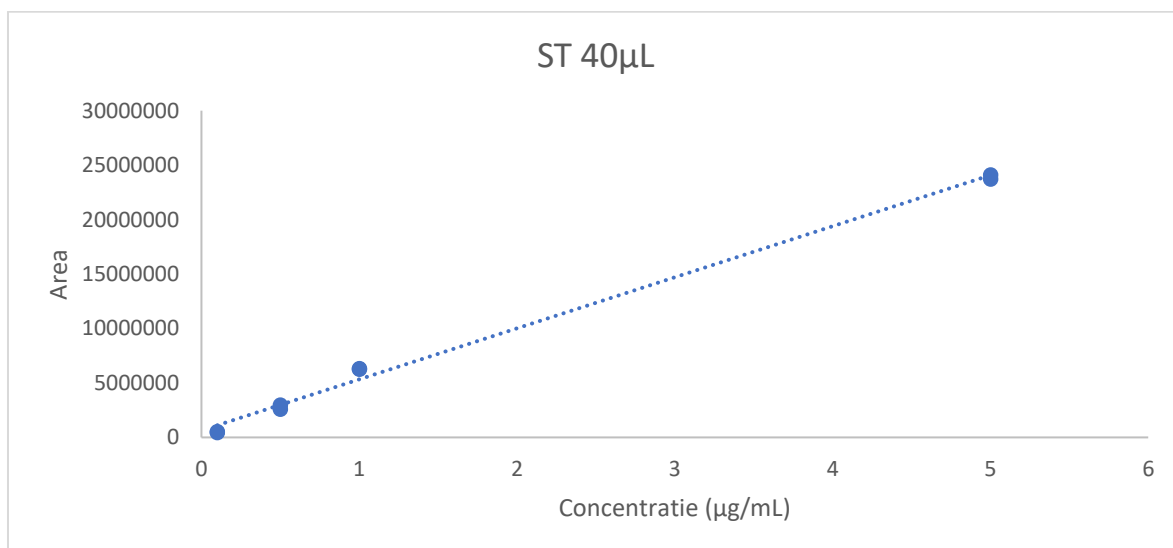
10µL		20µL		40µL	
Concentratie	Area	Concentratie	Area	Concentratie	Area
0,1	622360	0,1	1272917	0,1	2565379
0,1	590793	0,1	1187877	0,1	2660455
0,5	3440930	0,5	6500177	0,5	12953484
0,5	3177678	0,5	6876626	0,5	13011907
1	7196111	1	13489167	1	29255187
1	7216513	1	14831950	1	30589100
10	74726225	5	76072487	5	1,4E+08
10	74264945	5	71921266	5	1,41E+08
		10	1,4E+08		
		10	1,39E+08		



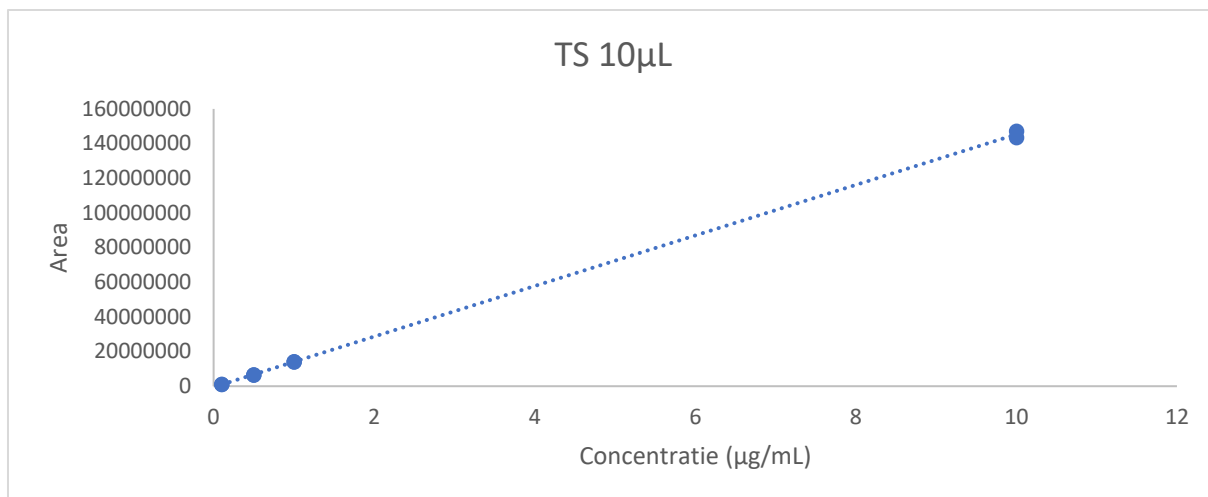
Figuur 30 Kalibratielij van onbewerkte ST met een injectievolumen van 10µL en met een range van 0,1 tot 10 µg/mL $y = 3788 (\pm 200013) + 1542479 (\pm 39753)x$; $n = 8$; $S_r = 188932$; $R^2 = 0,9993$; $LOD = 0,3675 \mu\text{g/mL}$



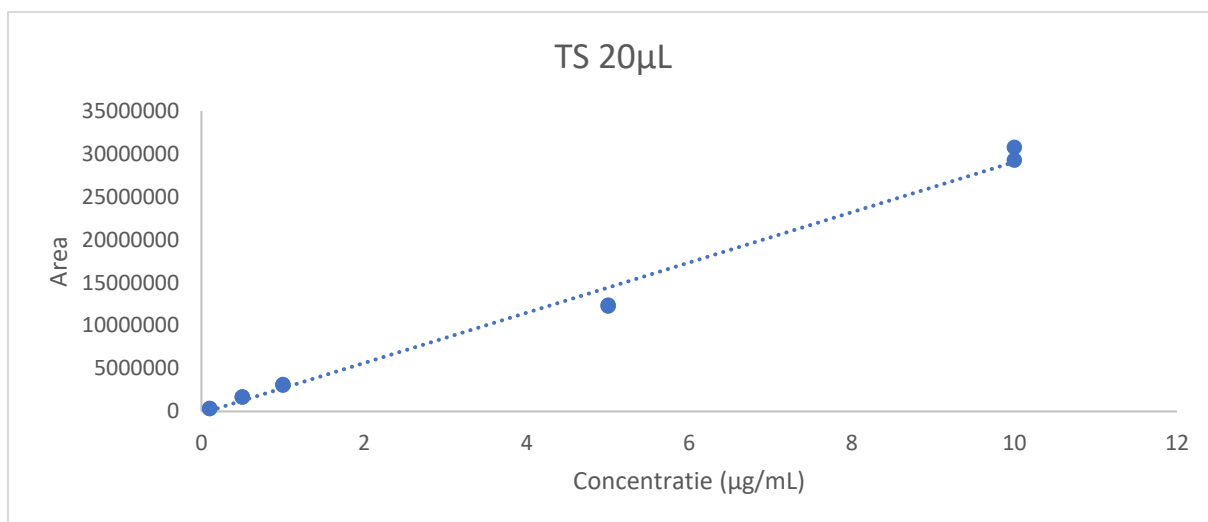
Figuur 31 Kalibratielij van onbewerkte ST met een injectievolumen van 20µL en met een range van 0,1 tot 10 µg/mL $y = -210519 (\pm 1214230) + 2925637 (\pm 241631)x$; $n = 10$; $S_r = 1249941$; $R^2 = 0,9898$; $LOD = 1,2817 \mu\text{g/mL}$



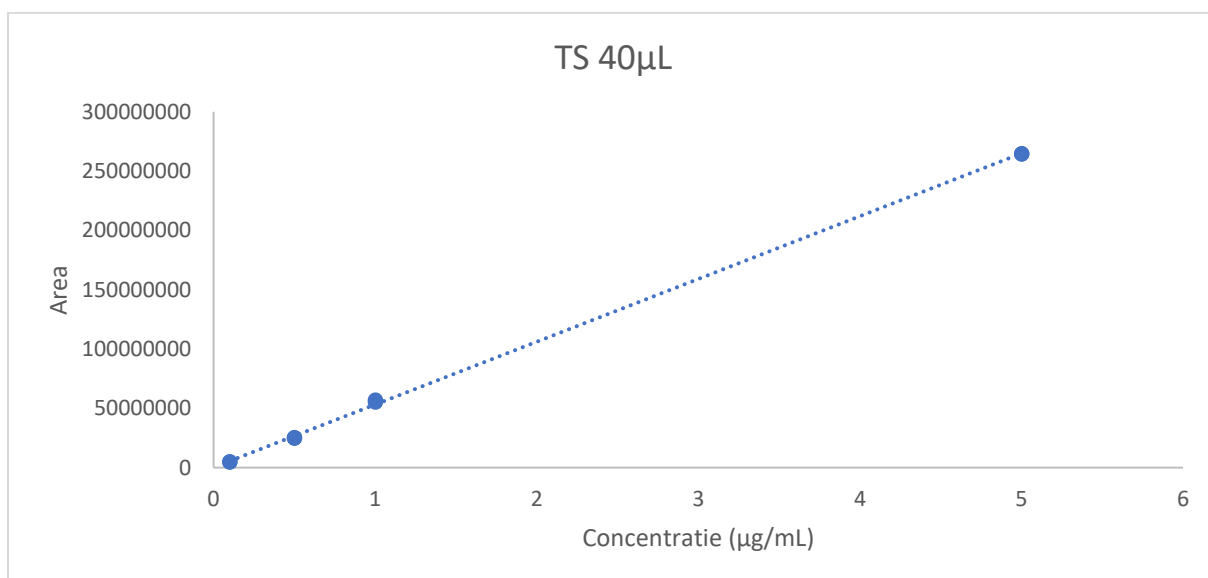
Figuur 32 Kalibratielij van onbewerkte ST met een injectievolumen van 40µL en met een range van 0,1 tot 5 µg/mL $y = 643246 (\pm 784736) + 4686568 (\pm 306271)x$; $n = 8$; $S_r = 693969$; $R^2 = 0,9957$; $LOD = 0,1039 \mu\text{g/mL}$



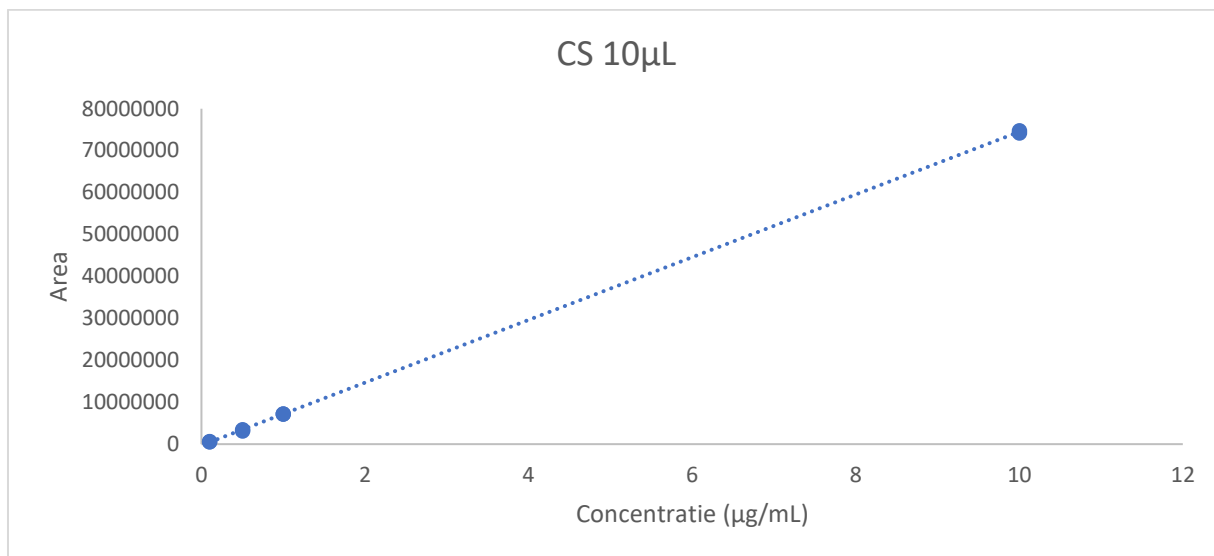
Figuur 33 Kalibratielijn van onbewerkte TS met een injectievolume van 10µL en met een range van 0,1 tot 10 µg/mL $y = -532792 (\pm 1151832) + 14586671 (\pm 228929)x$; $n = 8$; $S_r = 1088014$; $R^2 = 0,9998$; $LOD = 0,2238 \mu\text{g/mL}$



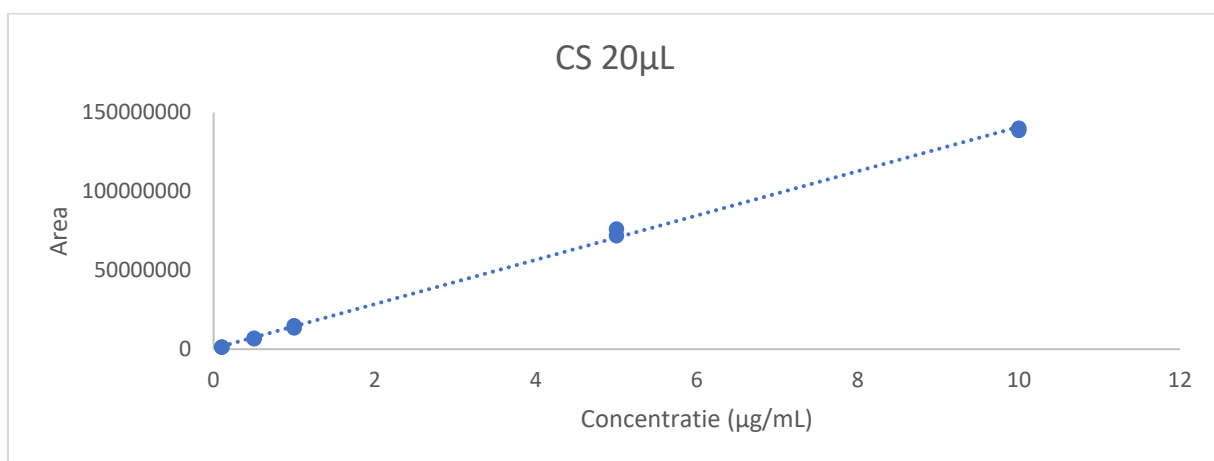
Figuur 34 Kalibratielijn van onbewerkte TS met een injectievolume van 20µL en met een range van 0,1 tot 10 µg/mL $y = -10011 (\pm 3385204) + 28953556 (\pm 673654)x$; $n = 10$; $S_r = 3484763$; $R^2 = 0,9898$; $LOD = 0,3611 \mu\text{g/mL}$



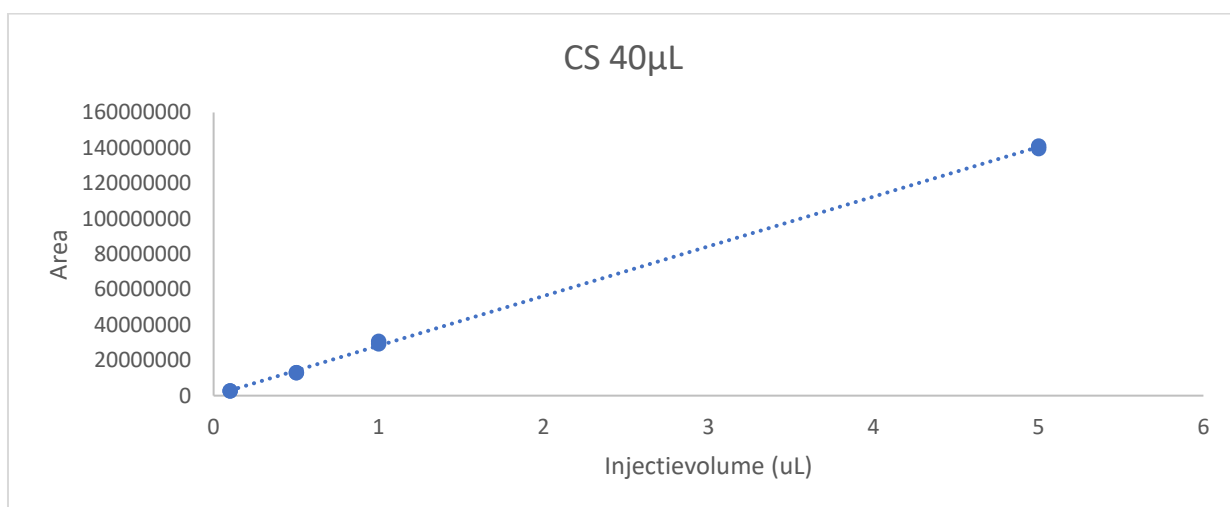
Figuur 35 Kalibratielijn van onbewerkte TS met een injectievolume van 40µL en met een range van 0,1 tot 5 µg/mL. $y = 236534 (\pm 2266948) + 52936285 (\pm 884758)x$; $n = 8$; $S_r = 2004739$; $R^2 = 0,9997$; $LOD = 0,1136 \mu\text{g/mL}$



Figuur 36 Kalibratielij van onbewerkte CS met een injectievolumen van 10µL en met een range van 0,1 tot 10 µg/mL $y = -278477 (\pm 205036) + 7476870 (\pm 40751)x$; $n = 8$; $S_r = 193676$; $R^2 = 1,000$; $LOD = 0,0777 \mu\text{g/mL}$



Figuur 37 Kalibratielij van onbewerkte CS met een injectievolumen van 20µL en met een range van 0,1 tot 10 µg/mL $y = 445342 (\pm 2159875) + 14048207 (\pm 429814)x$; $n = 10$; $S_r = 2223397$; $R^2 = 0,9986$; $LOD = 0,4748 \mu\text{g/mL}$



Figuur 38 Kalibratielij van onbewerkte CS met een injectievolumen van 40µL en met een range van 0,1 tot 5 µg/mL $y = 124500 (\pm 1537407) + 28077997 (\pm 600028)x$; $n = 8$; $S_r = 1359581$; $R^2 = 0,9995$; $LOD = 0,1453 \mu\text{g/mL}$

8.3 Piekoppervlakken methanol/water verhouding

Tabel 12: Piekoppervlakken van het methanol/water verhouding experiment

TS		CS	
Mengstandaard 1 µg/mL	Area	Mengstandaard 1 µg/mL	Area
M1	55177184	M1	29255187
M2	56749218	M2	30589100
gem	55963201	gem	29922143,5
Sample	Area	Sample	Area
A1	8262785	A1	4023073
A2	26530884	A2	12375093
A3	30757711	A3	14332917
gem	21850460	gem	10243694,33
B1	14597898	B1	7511052
B2	22683863	B2	10861360
B3	25472495	B3	11327228
gem	20918085,33	gem	9899880
C1	17829780	C1	8407740
C2	18451192	C2	8783472
C3	28557332	C3	12949181
gem	21612768	gem	10046797,67
D1	37328308	D1	16096018
D2	35927345	D2	16650877
D3	38963515	D3	17741674
gem	37406389,33	gem	16829523
E1	37563439	E1	18381103
E2	39578832	E2	20097476
E3	47522256	E3	21513817
gem	41554842,33	gem	19997465,33
F1	43061458	F1	20479408
F2	43308790	F2	19936811
F3	47592855	F3	21779192
gem	44654367,67	gem	20731803,67
G1	34626770	G1	13283111
G2	27558122	G2	14671168
G3		G3	
gem	31092446	gem	13977139,5
H1	16173239	H1	8873482
H2	19486831	H2	9788024
H3		H3	
gem	17830035	gem	9330753

8.4 Recovery's van de standaarden met verschillende methanol/water verhoudingen

Tabel 13: Recovery's van de standaarden met verschillende methanol/water verhoudingen

TS	Recovery	CS	Recovery
A	39,0	A	34,2
B	37,4	B	33,1
C	38,6	C	33,6
D	66,8	D	56,2
E	74,3	E	66,8
F	79,8	F	69,3
G	55,6	G	46,7
H	31,9	H	31,2

8.5 Piekoppervlakken van de onbewerkte standaarden (validatie)

Tabel 14: Resultaten van de onbewerkte standaarden voor validatie

TS		CS	
Standaard	Piekoppervlak	Standaard	Piekoppervlak
1-1	x	1-1	x
1-2	x	1-2	x
1-3	x	1-3	x
gemiddelde	x	gemiddelde	x
2-1	3401227	2-1	2088416
2-2	3645885	2-2	1976889
2-3	3595707	2-3	1865860
gemiddelde	3547606	gemiddelde	1977055
3-1	7464242	3-1	3924570
3-2	7402422	3-2	3871109
3-3	7007904	3-3	4021928
gemiddelde	7291523	gemiddelde	3939202
4-1	10444129	4-1	5759497
4-2	10859756	4-2	5168686
4-3	10941585	4-3	6095542
gemiddelde	10748490	gemiddelde	5674575
5-1	27671593	5-1	16105240
5-2	28034994	5-2	16071655
5-3	29260375	5-3	16133430
gemiddelde	28322320	gemiddelde	16103442
6-1	64667864	6-1	35744865
6-2	62327463	6-2	35530411
6-3	61282422	6-3	35100443
gemiddelde	62759250	gemiddelde	35458573
7-1	89033569	7-1	49479107
7-2	88412433	7-2	48980889
7-3	87485315	7-3	47869496
gemiddelde	88310439	gemiddelde	48776498

8.6 Piekoppervlakken van de bewerkte standaarden (validatie)

Tabel 15: Resultaten van de bewerkte standaarden voor validatie

TS		CS	
Standaard	Piekoppervlak	Standaard	Piekoppervlak
1-1	x	1-1	x
1-2	x	1-2	x
1-3	x	1-3	x
gemiddelde	x	gemiddelde	x
2-1	x	2-1	x
2-2	x	2-2	x
2-3	x	2-3	x
gemiddelde	x	gemiddelde	x
3-1	x	3-1	x
3-2	x	3-2	x
3-3	x	3-3	x
gemiddelde	xx	gemiddelde	xx
4-1		4-1	
4-2	x	4-2	x
4-3	x	4-3	x
gemiddelde	x	gemiddelde	x
5-1	9818339	5-1	5212908
5-2	10300921	5-2	5325290
5-3	10757392	5-3	5127458
gemiddelde	10292217	gemiddelde	5221885
6-1	24764287	6-1	12106835
6-2	27394173	6-2	12490505
6-3	26355702	6-3	12579844
gemiddelde	26171388	gemiddelde	12392395
7-1	34032626	7-1	15342039
7-2	35268418	7-2	16654898
7-3	34498977	7-3	15265620
gemiddelde	34600007	gemiddelde	15754186

8.7 Validatie herhaalbaarheid opwerking TS

Tabel 16: Resultaten van de herhaalbaarheid van de opwerking van TS

TS			TS			TS		
Dag	Sample	Area	Dag	Sample	Area	Dag	Sample	Area
Ma	Reproduceerbaarheid1-1	29770879	Ma-2	Reproduceerbaarheid1-1	30542972	Vrij	Reproduceerbaarheid1-1	31150548
Ma	Reproduceerbaarheid1-2	29493659	Ma-2	Reproduceerbaarheid1-2	30683552	Vrij	Reproduceerbaarheid1-2	31473231
Ma	Reproduceerbaarheid1-3	29879424	Ma-2	Reproduceerbaarheid1-3	29913968	Vrij	Reproduceerbaarheid1-3	32433268
	Gemiddelde	29714654		Gemiddelde	30380164		Gemiddelde	31685682
Ma	Reproduceerbaarheid2-1	20541924	Ma-2	Reproduceerbaarheid2-1	28363702	Vrij	Reproduceerbaarheid2-1	23030144
Ma	Reproduceerbaarheid2-2	20781402	Ma-2	Reproduceerbaarheid2-2	27911971	Vrij	Reproduceerbaarheid2-2	23646385
Ma	Reproduceerbaarheid2-3	20681850	Ma-2	Reproduceerbaarheid2-3	28594444	Vrij	Reproduceerbaarheid2-3	22191757
	Gemiddelde	20668392		Gemiddelde	28290039		Gemiddelde	22956095
Ma	Reproduceerbaarheid3-1	20541924	Ma-2	Reproduceerbaarheid3-1	11230077	Vrij	Reproduceerbaarheid3-1	15870921
Ma	Reproduceerbaarheid3-2	20781402	Ma-2	Reproduceerbaarheid3-2	23015114	Vrij	Reproduceerbaarheid3-2	14793438
Ma	Reproduceerbaarheid3-3	20681850	Ma-2	Reproduceerbaarheid3-3	23904172	Vrij	Reproduceerbaarheid3-3	16157465
	Gemiddelde	20668392		Gemiddelde	19383121		Gemiddelde	15607275
Ma	Stabiliteit1	28347340	Ma-2	Reproduceerbaarheid4-1	20385757	Vrij	Reproduceerbaarheid4-1	20578196
Ma	Stabiliteit2	28478361	Ma-2	Reproduceerbaarheid4-2	21848505	Vrij	Reproduceerbaarheid4-2	21734891
Ma	Stabiliteit3	30191283	Ma-2	Reproduceerbaarheid4-3	23774319	Vrij	Reproduceerbaarheid4-3	21388730
Ma	Stabiliteit4	30349311		Gemiddelde	22002860		Gemiddelde	21233939
Ma	Stabiliteit5	30852213	Ma-2	Bewerkt1	24256126	Vrij	Reproduceerbaarheid5-1	21292523
	Gemiddelde	29643702	Ma-2	Bewerkt2	25983395	Vrij	Reproduceerbaarheid5-2	22012352
Ma	Herhaalbaarheid1	20452990	Ma-2	Bewerkt3	25508813	Vrij	Reproduceerbaarheid5-3	21288161
Ma	Herhaalbaarheid2	19242558	Ma-2	Bewerkt4	24282709		Gemiddelde	21531012
Ma	Herhaalbaarheid3	20383034	Ma-2	Bewerkt5	25848539			
Ma	Herhaalbaarheid4	19819606	Ma-2	Bewerkt6	27808782			
Ma	Herhaalbaarheid5	21332445	Ma-2	Bewerkt7	27416125			
Ma	Herhaalbaarheid6	20933049	Ma-2	Bewerkt8	27405510			
Ma	Herhaalbaarheid7	20962713		Gemiddelde	26063750			
Ma	Herhaalbaarheid8	22423992						
	Gemiddelde	20693798						
	Herhaalbaarheid maandag			Herhaalbaarheid woensdag			Herhaalbaarheid vrijdag	
	Gemiddelde	24277788		Gemiddelde	26029268		Gemiddelde	22602801
	Stdev	4930847		Stdev	4768432		Stdev	5800505
	Herhaalbaarheid opwerking	20,3		Herhaalbaarheid opwerking	18,3		Herhaalbaarheid opwerking	25,7

8.8 Validatie herhaalbaarheid opwerking CS

Tabel 17: Resultaten van de herhaalbaarheid van de opwerking van CS

[illegible]