

Untargeted GC-MS analyse van metabolieten in polderbodem voor het monitoren van biodiversiteit



Informatie student:

Naam	Nick Jansen
Studentnummer	1090279
Datum	20-03-2023

Informatie stage instituut:

Naam	Leiden Centre of Applied Biosciences
Groep	Metabolomics
Adres	Darwinweg 24, 2333 CR Leiden
Praktisch begeleider	Marco van Klink
Theoretisch begeleider	Sonja Kaal

Stageperiode:

September 2021 – juni 2022

Informatie onderwijsinstituut:

Naam	Hogeschool Leiden
Opleiding	Chemie
Specialisatie	Analytische Chemie
Address	Zernikedreef 11, 2333 CK Leiden
Afstudeerdocent	Elise van der Hout

Afbeelding voorpagina: <https://en.molendatabase.nl/nederland/molen.php?nummer=1128>.

Inhoudsopgave

Samenvatting (Engels).....	5
1. Introductie	6
1.1 Biodiversiteit.....	6
1.2 Doel van het onderzoek.....	6
1.3 Untargeted Metabolomics.....	6
1.4 Metabolieten in bodem.....	7
1.5 Land Van Ons	7
1.6 Theoretische achtergrond	8
Gaschromatografie.....	8
Elektron Ionisatie en Massaspectrometrie.....	8
Derivatisatie.....	9
Vriesdrogen	10
Validatie.....	10
1.7 Methodeontwikkeling	10
2. Experimenteel.....	12
2.1 Chemicaliën	12
2.2 Monstername	12
2.3 Apparatuur.....	12
2.4 Standaard methode en instellingen	12
2.5 Extractievloeistof optimalisatie	13
2.6 Targeted componenten en blanco	14
2.7 Vriesdrogen.....	14
2.8 Extractie optimalisatie.....	15
2.9 Derivatisatie optimalisatie.....	16
2.10 Validatie.....	17
3. Resultaten en discussie	18
3.1 Monstername	18
3.2 Extractievloeistof optimalisatie	18
3.3 Targeted componenten	23
3.4 Vriesdrogen monsters	24
3.5 Extractie optimalisatie.....	25
3.6 Derivatisatie optimalisatie.....	28
3.7 Validatie.....	33
4. Conclusie en aanbevelingen	35
Aanbevelingen	35

5. Literatuurverwijzingen	36
Bijlagen.....	39
Bijlage I: Finale methode.....	39
Bijlage II: Chromatogrammen grondmonsters geëxtraheerd met selectie extractievloeistoffen.....	41
Bijlage III: Componenten lijst.....	45
Bijlage IV: Massa spectra targeted componenten	47
Bijlage V: Spreidingsgrafieken derivatisatie optimalisatie	49

Samenvatting (Engels)

The biodiversity in the Netherlands is at an all-time low, in 2020 this was at a level of 15% especially while compared to Europe's average of 40%. The biggest cause for this is intensive agriculture and lack of livable space for a wide variety of plants and animals. In the agricultural sector this is a consequence of the heavy use of manure to fertilize the acre's and keeping the water level of nearby trenches as low as possible. At the moment not much is known of the long-term recovery of biodiversity. The aim of this study is to use multiple environmental-OMICS techniques to develop an early warning system, by determining a metabolic fingerprint for acre and monitoring these over time with different conditions. By doing this it should be possible to link changes in the biodiversity at the chemical level. This thesis focuses it on the E-metabolomics part, by developing an untargeted method using GC-MS to determine these changing fingerprints of these acre's overtime. To achieve this is important to know what kind of metabolites these soil samples consist of and how to develop and validate a fitting method to measures these, using the available systems.

The method consist of freeze-drying the soil samples to keep these equal despite of season and weather conditions. The metabolites in the soil samples are extracted by using a mixture of dichloromethane:methanol 2:1 (v/v). Whereafter de solution liquid is evaporated and the samples are reconstituted using a methoxyamine solution in pyridine. While heated it kickstarts the derivatisation process and thereafter a MSTFA reagent is added to make them more compatible with the GC-system. Using a ISQ Thermo Scientific Trace1300 GC which was paired with an electron impact mass-spectrometer.

The final developed method could detect a wide range of phenols, alcohols, fatty acids, sugar and sterols. Finally the method was validated and deemed fit to be used for further study.

1. Introductie

1.1 Biodiversiteit

Biodiversiteit is de verscheidenheid aan leven in een bepaald gebied van een waterdruppel tot een compleet bos of zelfs de aarde als geheel. Biodiversiteit omvat alle soorten planten, dieren en micro-organismen, maar ook de enorme genetische variatie binnen die soorten en de variatie aan ecosystemen waar ze deel van uitmaken. Het begrip omvat het totaalpakket aan levende organismen en systemen, met de interacties daartussen.^[1]

De biodiversiteit is in Nederland historisch laag, deze lag in 2020 op de 15% terwijl het gemiddelde in Europa op 40% ligt. De grootste oorzaken hiervoor zijn de intensieve landbouw en gebrek aan leefruimte voor planten en dieren.^[2] In de agrarische sector komt dit voornamelijk door het overtollig bemesten van akkers en door het waterpeil in de omliggende sloten laag te houden. Er is momenteel niet veel bekend over het herstellen van de biodiversiteit over langere termijn.

Bij Leiden Centre of Applied Bioscience (LCAB) loopt momenteel een Environmental-OMICS project: Van lab, via levendlab, naar veenweide gebied. Hierbij worden verschillende OMICS-technieken gecombineerd voor het monitoren van het herstel van de biodiversiteit in en rondom agrarische landschappen. Onderdeel van dit project is het meten van metabolieten in de bodem van deze landschappen en zo een chemische vingerafdruk te bepalen. Door deze data te vergelijken kan een “early warning signal” systeem worden ontwikkeld, om zo in een vroeg stadium chemische veranderingen in de grond te kunnen waarnemen. Als deze veranderingen van te voren duiden op een afname van de biodiversiteit in de omgeving, zouden preventieve stappen ondernomen kunnen worden om dit te voorkomen.

1.2 Doel van het onderzoek

Het primaire doel van het stageproject is het ontwikkelen van betrouwbare methoden voor de un-targeted screening van metabolieten in bodemgrond door middel van GC-MS. Het grotere doel van het onderzoek is door Om hiermee bij te dragen aan een Environmental-omics screening van de biodiversiteit in Nederland.

Onderzoeksvragen:

Uit welke metabolieten zijn de grondmonsters opgebouwd? Hoe moeten de monsters voorbereid worden om deze metabolieten te kunnen meten? ; Welke parameters worden gesteld aan de GC-MS Methode om deze metabolieten over een breed spectrum te kunnen meten?; Welke eisen worden gesteld om de un-targeted methode te evalueren en te valideren?;

1.3 Untargeted Metabolomics

Zoals eerder beschreven, is het doel van dit onderzoek een un-targeted screening methode te ontwikkelen. Bij untargeted metabolomics staat data verzameling, identificatie, interpretatie en statische analyse centraal.^[3] Door de grote hoeveelheden data die bij identificatie wordt gegenereerd zijn multivariate analyse tools nodig, bijvoorbeeld MetaboAnalyst. Dit is een uitgebreid platform, ontworpen voor metabolomics-gegevensanalyse via een web gebaseerde interface. De huidige versie ondersteunt de verwerking van onbewerkte MS-spectra, tot verscheidende uitgebreide statistische analyses. Met als doel om high-throughput-analyse mogelijk te maken voor zowel targeted als non-targeted metabolomic. En hierdoor de kloof tussen ruwe data files en biologische inzichten te verkleinen.^[4]

De huidige focus van het stageproject gaat voornamelijk over het ontwikkelen van een methode, om een metabolieten profiel te kunnen meten uit bodemonsters. Hierbij is ook het verzamelen van data

en het identificeren van metabolieten van toepassing. Maar een breed en extensieve statistische data analyse van verschillende poldermonsters wordt voor nu als vervolg project geacht.

Andere meettechnieken die in binnen het werkveld van metabolomics veel gebruikt worden zijn LC-MS en NMR. De voordelen die GC-MS heeft over deze technieken zijn de grote hoeveelheid informatie aan spectra databasen, dit geeft een wijde range aan mogelijk te identificeren metabolieten. In dit onderzoek zal, voor de identificatie, gebruik worden gemaakt van de *National Institute of Standards and Technology* (NIST) GC-MS spectra database.

1.4 Metabolieten in bodem

Vanuit literatuur zijn verschillende groepen metabolieten die mogelijk gevonden kunnen worden in akkerbouwgrond. Hieronder in tabel 1 staat een overzicht van alle groepen stoffen die mogelijk in de grond gemeten gevonden kunnen worden, hierbij staan de artikelen vermeld in welke deze gevonden zijn. Hierbij is ook het soort grond in overweging genomen, dat deze lijken op de zelfde soort grond als de akkerbouwgrond die voor dit project gebruikt gaan worden. Deze zijn gebaseerd op het klimaat in de regio waar de bodemonster, die in deze literatuur gebruikt worden, genomen zijn. Deze metabolieten komen voort uit planten, dieren en microben bronnen, micro-organismen hebben hier een actieve rol in de vorming van microbe en metabolische producten.^[5]

Tabel 1 – Lijst met groepen metabolieten die uit literatuur onderzoek gevonden zijn en mogelijk in de poldergrond van het veenweide gebied kunnen zitten.

Literatuur ^{[5][6][7]}	Functionele Groepen
Swenson et al. 2014	Aminozuren, vetzuren, fosfolipiden, nucleobasen, alcoholen, polyamines, fenolen, steroïden, suikers
Withers et al. 2020	Aminozuren, organische zuren, lipiden, nucleobasen, alcoholen, suikers
Vancampenhout et al. 2008	Vetzuren, lipiden, aromaten, fenolen, polysachariden, lignine

1.5 Land Van Ons

Een van de partners die met het LCAB samenwerkt in dit onderzoek is het Holland Rijnland bedrijf Land Van Ons. Dit is een bedrijf zonder winstoogmerk dat diverse landbouwgrondgebieden opkoopt en deze door de natuur laat herstellen. Zij richten zich op landbouwgebieden, omdat in deze gebieden het verlies van de biodiversiteit het grootst is. Het is de ambitie van het bedrijf om een basis te worden voor een, door hen zo genoemde, nieuwe “Ecologische hoofdstructuur”.^[8] Door samen met de boer duurzamere keuzes te maken, met kleinschalige en natuurlijke akkers. Het bedrijf begon hiermee in 2019 en heeft de ambitie om een omvang van 300.000 ha grond te hebben, ongeveer 15% van alle landbouwgrond in Nederland.

Voor dit project wordt gebruik gemaakt van veenweide percelen gelegen in Warmond, Zuid-Holland momenteel wordt een deel beheerd door Land van Ons. Dit is een van de partners die met het LCAB samenwerkt in dit onderzoek. Tot voor kort werd veel mest uitgereden op deze percelen, hierdoor kwamen schadelijke stoffen op het land en in het oppervlaktewater terecht. Deze stoffen kunnen het microbiom en fauna verstoren, maar nu wordt het door de natuur weer “geheeld”. Door deze teruggave aan de natuur is de kans erg groot dat het ecosysteem, zowel in de slootjes als op het land, gaat veranderen.

In het veenweide gebied bevinden zich drie polders die als bemonsteringsvelden dienen, voor alle huidige Environmental-Omics projecten. Deze polders staan hieronder weergegeven met

satellietbeeld, verkregen door middel van google maps.^[9] Hiervan is de Lakerpolder niet bemest, de boterhuispolder weinig bemest en de vrouw vennepolder herstellend van hevige bemesting. De Vrouw Vennepolder is aangeschaft op 5 maart 2021 door het partner bedrijf Land Van Ons, deze was daarna niet meer bemest en toegewezen als “PolderLab” voor verschillende onderzoeks- en onderwijsinstellingen.^[8]



Figuur 1 – Foto's met genummerd overzicht van de bemonsterde polders in het veen weide gebied, met de volgende locaties; nummer 1 is de Lakerpolder, nummer 2 is de Vrouw Vennepolder en nummer 3 is de Boterhuis polder.^[9] Op de satelliet foto's is te zien dat elke polder in verschillende velden is verdeeld, deze zijn gescheiden door een slootje met water.

Voor de monsternamen van de polders staan verschillende momenten gepland, namelijk; juni 2021, november 2021 en maart 2022. Deze monsters waren in teams van stagiaires, analisten en onderzoekers genomen. Met deze monsters kunnen van elk van deze veldjes een metaboliëten profiel, een soort “vingerafdruk”, worden gemeten en vergeleken met de andere polders. Om zo deze “vingerafdrukken” te vergelijken en een goed beeld te kunnen van de metabolische samenstelling van de bodem en hoe deze over verloop van tijd veranderd. Voor het begin van dit project zal voor de methodeontwikkeling, geëxperimenteerd worden met een bodemonster die afgenomen is uit de Vrouw Vennepolder.

1.6 Theoretische achtergrond

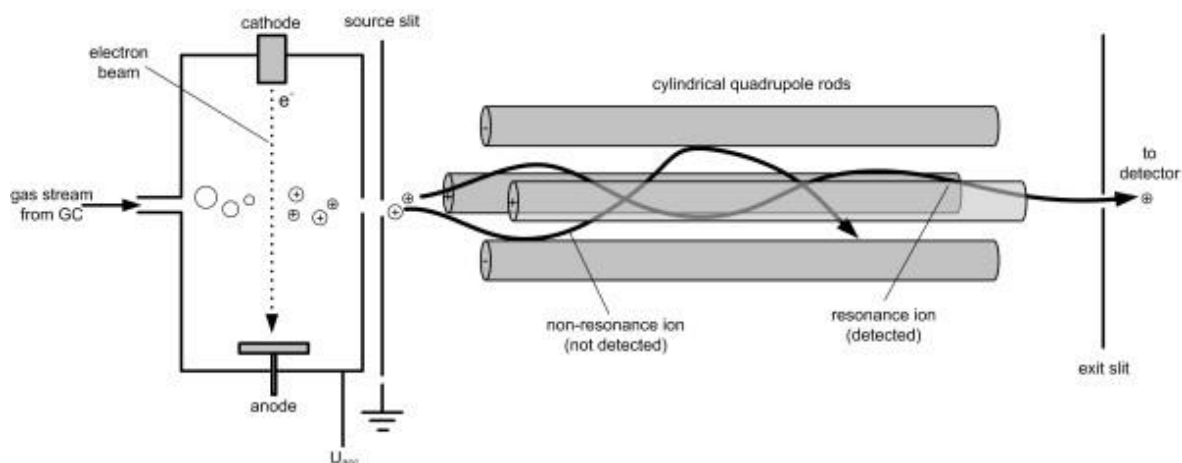
Gaschromatografie

Gaschromatografie (GC) is een analytische techniek die wordt gebruikt om de chemische componenten van een monstermengsel te scheiden en deze vervolgens te detecteren om hun aan- of afwezigheid en/of hoeveel aanwezig is te bepalen. Deze chemische componenten zijn meestal organische moleculen of gassen. Voor een succesvolle GC-analyse moeten deze componenten vluchtig zijn, meestal met een molecuulgewicht van minder 1250 Da en thermisch stabiel zodat deze niet degraderen in het GC-systeem. Het huidige systeem gebruikt een Programmed Time and Vaporisation temperature (PTV) injector.

Elektron Ionisatie en Massaspectrometrie

De meest voorkomende vorm van ionisatie, die gekoppeld wordt aan een gaschromatograaf, is elektron ionisatie ook wel elektron impact ionisatie genoemd. Deze vorm van ionisatie, gekoppeld aan

een massaspectrometer, wordt het meest frequent gebruikt met gaschromatografie. De neutrale moleculen komen in gasfase binnen in de ionisatie kamer, hier botsen ze met vrije elektronen die geproduceerd worden door het onder weerstand verhitten van een gloeidraad. Hierbij ontstaan kleinere positief geladen ion fragmenten, met lage m/z waarde in verhouding tot het originele molecuul, elektron ionisatie wordt hierdoor beschouwd als een “harde” ionisatie techniek. De geladen ion fragmenten worden van de ionisatie kamer geleid naar een massaspectrometer doormiddel van een magnetisch veld.^[10]

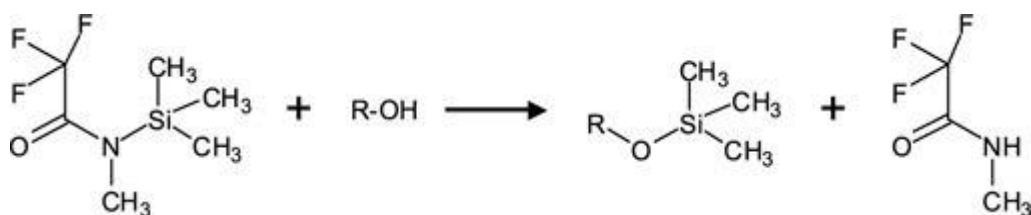


Figuur 2 – Hierboven staat een schematische weergave van een elektro-impact fragmentatie proces met massa detectie via een quadrapole.

De fragmentatie gebeurt volgens de formule: $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$; hierin is M het neutrale molecuul dat geïoniseerd wordt, e^- een elektron en M^+ het positief geladen ion dat ontstaat tijdens de ionisatie. De moleculen het breken van de moleculen is te voorspellen aan de hand van de structuur en binding sterkte, hierdoor ontstaan vaste patronen in de massa spectra.^[11] Om deze reden zijn er door de jaren heen veel spectra bibliotheken gemaakt in de vorm van databases, die gebruikt kunnen worden voor de identificatie van onbekende chemische stoffen.

Derivatisatie

Metaboliëten hebben over het algemeen polaire groepen en hoger liggende kookpunten, dit kan problemen geven voor analyse met GC-MS. Om de metaboliëten in de bodemgrondmonsters beter meetbaar te maken voor GC zullen deze gederiviseerd worden, hiervoor is *N*-Trimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (MSTFA) als reagens een goede optie. MSTFA is het meest voorkomende reagens voor derivatisatie wanneer het over GC-analyses gaat. Dit reagens werkt op het principe van de silylering op functionele groepen met een actieve waterstof zoals: -SH, -OH, -NH en -COOH groepen.^{[12][13]} Doordat het reagens zich richt op deze groepen worden sterke polaire intermoleculaire banden zoals waterstofbruggen verbroken, hierdoor worden de metaboliëten meer vluchtig en apolair. Door deze nieuwe eigenschappen zijn deze stoffen geschikt om te meten met een GC-MS systeem.



Figuur 3 – Derivatisatie reactie van MSTFA met een voorbeeld verbinding $R-OH$ ^[13]

Bij een silyleringsreactie waarbij hydroxyl houdende chemische verbindingen aanwezig zijn is het mogelijk dat er meerdere TMS derivaten ontstaan. Door de metabolieten hiervoor te laten reageren met methoxyamine wordt de kans of meerder TMS derivaten geminimaliseerd.^[14]

Vriesdrogen

De aarde in de grondmonsters bevat een percentage vocht, dit kan verschillen door de tijd, plaats en weersomstandigheden wanneer ze genomen zijn. Als onderdeel om deze te homogeniseren zal het droog gewicht van de monsters bepaald worden, hiervoor kan een techniek worden toegepast genaamd vriesdrogen. Deze techniek is gebaseerd op de sublimatie van ingevroren vloeistoffen. Eerst worden de grondmonsters ingevroren op -80 °C, daarna worden deze in de vriesdroger langdurig verwarmd onder een lage atmosferische druk.^[15] Het vocht wordt op deze manier uit de monsters gesublimeerd en zorgt ervoor dat de metabolieten net als de stabiliteit van de aarde zelf, intact blijft (dagesse et al 2009).^[25] Dit bevordert ook de extractie door het contactoppervlak met de grond te vergroten, doordat deze niet meer bij elkaar wordt gehouden door het vocht.

Validatie

Voor de validatie van deze methode is “Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry”^[16] geraadpleegd, uitgegeven door de Amerikaanse Food and Drugs Administration (FDA). Deze wordt voornamelijk gebruikt voor targeted methodes en is niet vastgesteld voor het metabolomics werkveld (Guy et al. 2008)^[17], maar bevat goede aanbevelingen voor validatieparameters. In “NAZ et al. 2014”^[18] wordt aanbevolen om bij het valideren van een non-targeted methode in ieder geval de lineariteit, accuraatheid en precisie te bepalen.

De herhaalbaarheid wordt geëvalueerd aan de hand van de relatieve standaarddeviatie (RSD%) tussen injecties en opgewerkte samples. Volgens het eerder genoemde FDA document zal deze onder de 15% moeten liggen, voor biologische monsters die gemeten worden met een targeted analysemethode.^[16] Voor untargeted analyse methodes in het metabolomics werkveld, wordt in NAZ et al. 2014^[18] gesuggereerd dat een RSD(%) van 30% herhaalbaarheid betrouwbaar genoeg is voor een non-targeted methode.

Om de stabiliteit te bepalen van de methode wordt de, zoals in het FDA document genoemd wordt, de “autosampler stability” en de “longterm stability” bepaald.^[16] Deze twee zijn het meest van belang, aangezien de autosampler van het GC-MS systeem geen klimaatcontrole opties heeft.

1.7 Methodeontwikkeling

Voor de ontwikkeling van de juiste methode voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen is het flowschema in figuur 4 opgesteld, om dit zo overzichtelijk mogelijk weer te geven. Aan de start van de monster voorbereiding staan de monsternamen, vriesdrogen en extractie van de metabolieten centraal. Bij deze onderwerpen wordt gezorgd dat de monsters zo min mogelijk gecontamineerd kunnen worden en zo homogeen mogelijk zijn. Verschillende extractievloeistoffen worden vergeleken om zoveel mogelijk metaboliet hier uit onttrokken kan worden. Tijdens dit proces worden per aangetroffen chemische groep verschillende targeted componenten gekozen, waarop de methode verder geoptimaliseerd wordt. Voor de verdere optimalisatie zal de juiste hoeveelheid grond en extractievloeistof bepaald worden voor de methode. De reactie met Methoxyamine en MSTFA zal geoptimaliseerd worden op basis van tijd en temperatuur. De details van deze experimenten staan beschrijven in het hoofdstuk *experimenteel*.



Figuur 4 –Hierboven staat het overzicht van de methode ontwikkeling en welke relevante aspecten hiervan getest zijn tijdens dit proces.

2. Experimenteel

Voor de ontwikkeling van de analyse methode staan in dit project vier onderwerpen centraal namelijk; de afname van de bodemonsters, de methode van het meetinstrument, de monstervoorbewerkingsmethode en de methodevalidatie. De initiële voorbewerkings- en instrumentmethoden die gebruik worden, zijn gebaseerd op een protocol van Swenson, Northen et al. 2019.^[19] Met deze methode waren een aantal testmetingen uitgevoerd om mogelijk metabolieten in een bodemonster te kunnen detecteren, alleen waren hier nog geen concrete resultaten uit voortgekomen.

2.1 Chemicaliën

Aceton (VWR, CAS nr. 67-64-1, LC-MS grade); Acetonitril (VWR, CAS nr. 75-05-8, LC-MS grade); Chloroform (Supersolv, CAS nr. 67-66-3, zuiverheid $\geq 99,9\%$); Ethylacetaat (VWR, CAS nr. 141-78-6, LC-MS grade); Methanol (Superclo., CAS nr. 67-56-1, LC-MS grade); Methoxyamine hydrochloride (Sigma-Aldrich®, CAS nr. 593-56-6, 98%); MSFTA (Marcherey Nagel, CAS nr. 24589-78-4, zuiverheid $\geq 99\%$); 2-Propanol (VWR, CAS nr. 67-63-0, LC-MS grade); Pyridine (Honeywell, CAS nr. 110-86-1, zuiverheid $\geq 99,9\%$); Water (Merck LiChrosolv®, CAS nr. 7732-18-5, LC-MS grade)

2.2 Monstername

Per monster was rond het midden van één veld, 30 steken met een grondboor vanaf 10 cm diepte genomen. Tijdens dit proces werden Kimtech nitrile blauwe handschoenen gedragen, om contaminatie afkomstig van de handen te voorkomen. De grondboor had een omvang van 30 cm bij 1 cm, de grond werd hier uitgehaald door middel van een ontsmette metalen lepel. Deze steken grond werden bij elkaar gevoegd in een steriele afsluitbare swirl-bag, daarna werd het project- en monstercode genoteerd. Om de exacte locatie van de sample plek vast te leggen werden ook per monster de coördinaten genoteerd, met twee absolute getallen (lengte, breedte) op 7 decimalen precies. De monsters werden na de monstername opgeslagen in een $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vriezer. In totaal waren drie van dit soort monsters genomen voor de methode ontwikkeling, waarvan één al aanwezig was.

2.3 Apparatuur

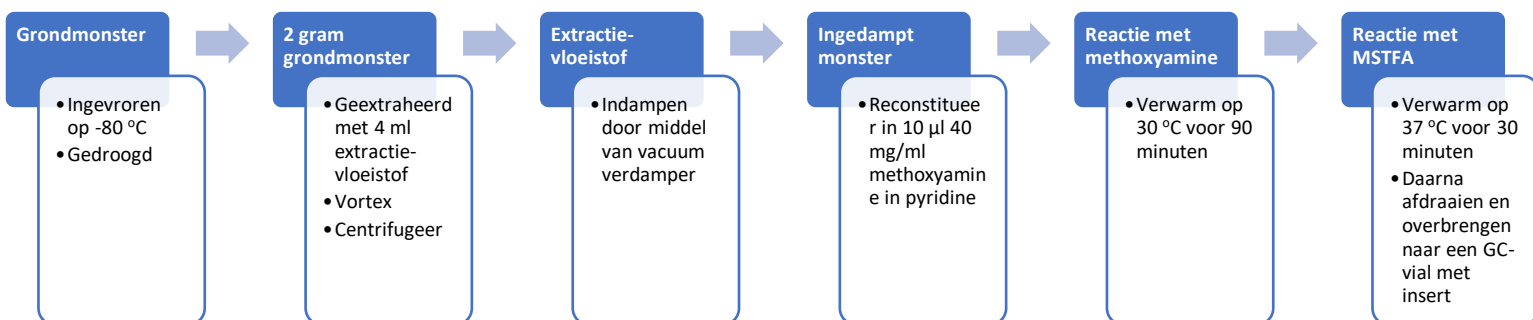
Voor de monstervoorbewerking in dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een L-200 Vriesdroger van Buchi, een Eppendorf 5810 centrifuge, een Thermo SPD111V SpeedVac concentrator en een Eppendorf Centrifuge 5427 R refrigerated microcentrifuge.

Het meet instrument waarvan gebruik werd gemaakt tijdens dit onderzoek was een van een ISQ Thermo Scientific Trace1300 Gaschromatograaf (GC), gekoppeld met een electron impact massaspectrometer (EI-MS). Ook is deze uitgerust met een autosampler en Programmed Time Vaporisator-injector (PTV-injector), hierdoor is het onder andere mogelijk om de temperatuur bij injecteren aan te passen. Hierdoor kunnen hete- en koude split/splitless injectie worden gedaan, hoewel dit mogelijk was werd deze voor dit onderzoek als een normale injector gebruikt.

2.4 Standaard methode en instellingen

De bodemonsters werden uit opslag gehaald en hieruit werd 2 gram grond afgewogen op een analytische balans, door middel van een weegbootje. Daarna werd dit kwantitatief overgebracht naar een 15 ml falcon tube. Daarna werd 4 ml water toegevoegd, de grondmonsters werden geëxtraheerd door deze te vortexen op 2400 RPM voor 30 seconden. Na het vortexen werden de monsters gecentrifugeerd voor 3 minuten op 5000 RPM, van het supernatant werd 2 ml over gebracht naar een 2 ml epje. Deze werd vervolgens geplaatst in een vacuüm verdamper, waar deze werden ingedampt op $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Voor de derivatisatie werd 10 µl 40 mg/ml methoxyamine in pyridine toegevoegd. Deze werd gemaakt door 71,05 mg methoxyamine-chloride af te wegen op een analytische balans en hieraan 1 ml pyridine toe te voegen, waarna deze werd opgelost door te sonificeren/vortexen op 60 °C. Na het toevoegen van de methoxyamine oplossing werd het monster verwarmd op 30 °C voor 90 minuten in een waterbad. Om de derivatisatie te starten werd 100 µl MSTFA toegevoegd, daarna werd deze verwarmd op 37 °C voor 30 minuten. Het gederivatiseerde monster werd gecentrifugeerd op 12000 RPM voor 10 minuten en het supernatant werd overgebracht naar een GC-vial met insert. Hieronder in figuur 5 is het proces van de monstervoorbewerking schematisch weergegeven.

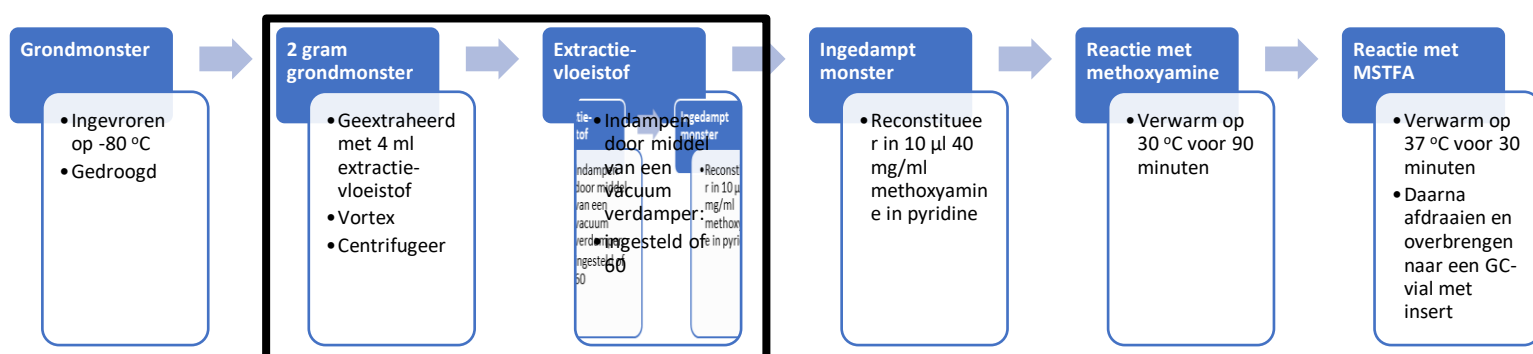


Figuur 5 – Hierboven staat een flowschema van de “start” monstervoorbewerking, hierna werden de monsters geïnjecteerd in het GC-systeem. Dit figuur zal als basis worden genomen om aan te geven waar veranderingen in de methode plaats vinden.

De GC-Methode was als volgt: Injectie volume 1 µl, Split ratio 1:10, Split flow 12,0 ml/min, inlet temperatuur 250 °C, Purge flow 5,0 ml/min, Gas saver flow 10,0 ml/min, Gas saver time 2,50 min, Ion source temperatuur 310 °C, Ion Collision 70 eV, Mass filter [50-700 m/z]. Temperatuurgradiënt: Start op 50 °C en wordt vastgehouden voor 1 minuut, daarna wordt deze verhoogd naar 65 °C met 5 °C/min. Dit wordt vastgehouden voor 0,2 minuten en wordt daarna verhoogd naar 100 °C met een helling van 7 °C/min. Deze wordt ook voor 0,2 minuten vastgehouden, waarna de temperatuur wordt verhoogd naar 310 °C met 7 °C/min. Als laatste houdt het systeem de 310 °C voor 10 minuten constant. De methode was inclusief een Prep run time-out van 10 minuten.^[19]

2.5 Extractievloeistof optimalisatie

Om zoveel mogelijk metabolieten uit de grond monsters te kunnen halen, waren meerdere extractie vloeistoffen getest. In figuur 6 staat aangegeven welk deel van de monstervoorbewerking tijdens deze experimenten reeks aangepast werd.



Figuur 6 – Het flowschema van de monstervoorbewerking, hierin werden veranderingen gemaakt in de keuze van extractie vloeistof.

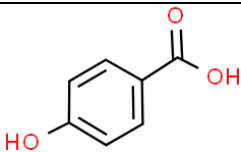
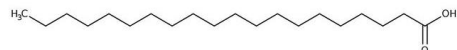
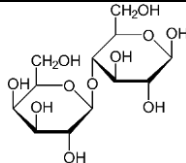
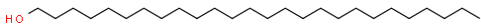
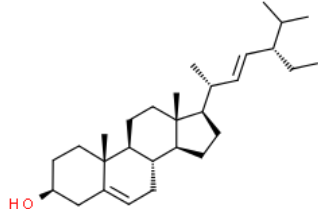
Hierbij waren eerst water en methanol met elkaar vergelijken zoals deze aangegeven waren in de standaard methode. Daarna werden methanol, acetonitril, aceton, ethylacetaat vergeleken, daarnaast waren ook twee mengsels gebruikt namelijk; acetonitril:i-propanol:water 3:3:2 (v/v/v)^[6] en

chloroform:methanol 2:1 (v/v).^[20] Na deze experimenten was ook overwogen de chloroform in het mengsel chloroform:methanol 2:1 (v/v) te vervangen met dichloormethaan, dit werd getest in een opvolgend experiment. Elke extractievloeistof werd in duplo een monster opgewerkt. Dit werd gedaan volgens de aangegeven standaard methode in figuur 6.

2.6 Targeted componenten en blanco

Aan de hand van de gevonden chemische verbindingen werden verschillende componenten gekozen per chemische groep. De componenten werden gekozen op basis van RSI score en mogelijkheid deze in de bodem aanwezig is, deze staan weergegeven hieronder in tabel 2.

Tabel 2 – Hieronder staan de targeted componenten die gekozen zijn als representatief per functionele groep. Met de naam, groep en structuur per component.

Chemicaliën	Groep	Structuur component
4-Hydroxybenzoic acid	Phenol zuur	
Arachidic acid	vetzuur	
Lactose	Suiker	
1-Hexacosanol	Fatty alcohol	
Stigmasterol	Sterol	

Verder werd een blanco meting aan de methode toegevoegd, voor deze blanco werd alleen de extractievloeistof zonder grond genomen. En werd tijdens de voorbereidingsmethode samen met de rest van de monsters in de vacuümverdamer geplaatst. Daarna werden deze op dezelfde wijze voorbereid volgens de standaard methode.

2.7 Vriesdrogen

Het doel van dit experiment was om de monsters te vriesdrogen en deze te vergelijken met gevriesdroogde monsters. De bodemonsters werden ingevroren op -80°C voor ongeveer 24 uur, in 50 ml falcon tubes. Hierna werden deze (zonder dop) bedekt met een op maat geknipte doek of gaas, zodat alleen het vocht kan worden afgezogen. De bedekking werd vast gemaakt met een elastiek, waarbij gelet werd dat deze niet in contact kwam met het desbetreffende monster. Hieronder in tabel 3 staan de verdere instellingen van de vriesdroger weergegeven.

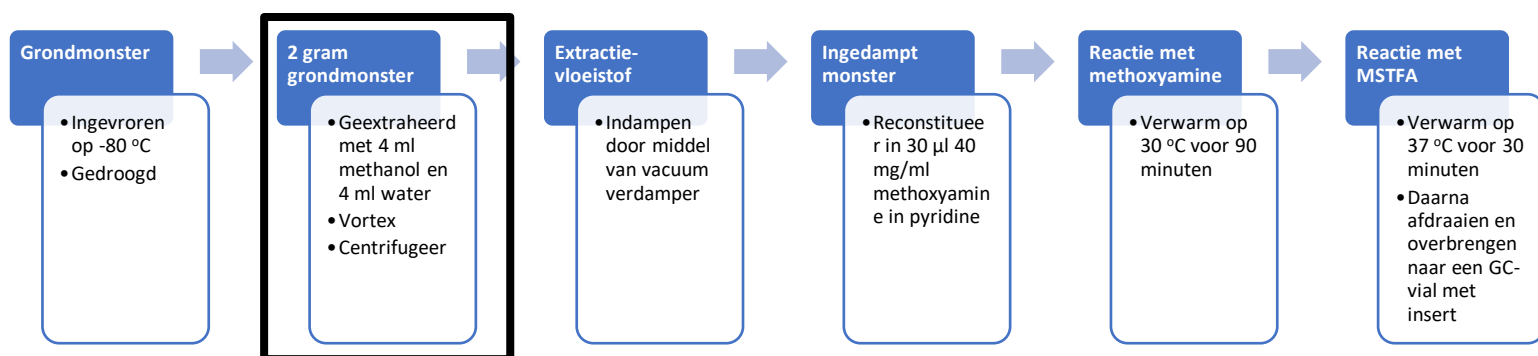
Tabel 3 – Gebruikte instellingen voor het vriesdrogen van de bodemonsters.

Instellingen vriesdroger	Ingestelde waarden
Temperatuur ice condenser	-60 °C
Temperatuur kookplaat	5 °C
Druk	0,3 mbar
Tijd	~48h

Daarna werden verschillende fracties uit deze buizen opgewerkt volgens de methode, zoals aangegeven in figuur 6.

2.8 Extractie optimalisatie

In dit experiment werden verschillende hoeveelheden grond vergeleken in eenzelfde verhouding extractievloeistof. Verder werd meerdere malen geëxtraheerd om zo te bepalen na hoeveel maal alle metabolieten uit de grondmonster geëxtraheerd zijn. Hieronder in figuur 7 staat waar in het flowschema deze aanpassingen gemaakt werden.

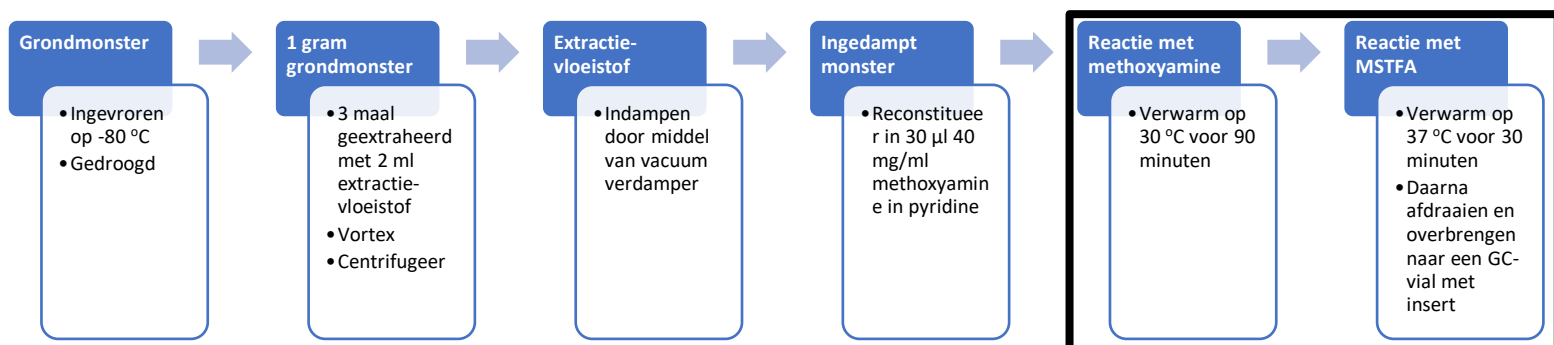


Figuur 7 – Het flowschema met daarin de extractie parameters aangepast uit door het resultaat van het vorige experiment, met het huidige aspect van de methode zwart omlijnt.

Voor dit experiment werd 2 gram monster 5 keer geëxtraheerd met 4 ml dichloormethaan:methanol 2:1 (v/v), hetzelfde werd gedaan voor 1 gram monster met 2 ml extractievloeistof en voor 500 mg monster met 1 ml extractievloeistof. Dit komt op een totaal van 5 fracties per monster, per fractie werd zo veel mogelijk van het monster toegevoegd in een 2 ml eppendorf epje. Deze worden elk apart opgewerkt. Per extractie worden deze gevortexd en gecentrifugeerd voor 3 minuten op maximale stand. Na het overbrengen werd het supernatant werd ingedampt in de vacuumverdamer op 50 °C. Na het indampen werd aan de fracties 10 µl 40 mg/ml methoxyamine in pyridine oplossing toegevoegd, totdat deze volledig contact maakt met de ingedampte monsters. Daarna werden deze op 30 °C voor 1,5 uur verwarmd, waarin regelmatig gevortexd werd. De monsters waren daarna verder voorbereid volgens de standaard methode voorbereid.

2.9 Derivatisatie optimalisatie

De optimalisatie van de derivatisatie methode was verdeeld in drie delen, als eerst werden verschillende reactie condities getest voor de reactie met MSTFA. Daarna werden verschillende reactie condities getest voor de reactie met methoxyamine.



Figuur 8 – Het flowschema met daarin de extractie parameters aangepast uit door het resultaat van het vorige experiment, met het huidige aspect van de methode zwart omlijnt.

Voor het optimaliseren van de derivatisatie reactie wordt met twee factoren rekening gehouden, de temperatuur en de tijd van de reactie. De temperatuur van de reactie zal op 60 °C gezet worden, hierbij zullen de volgende tijden vergeleken worden: 30 minuten, 1-, 2- en 4 uur. Ook de methode op 37 °C voor 30 minuten wordt meegenomen, om het verschil met de huidige methode te zien. En aangezien de tijdswinst een belangrijkere factor is dan de hoogte van de temperatuur wordt op deze temperatuur alleen de originele tijdsduur genomen. Uit het vorige experiment bleek dat deze beter minimaal in triplo gemeten konden worden om in ieder geval de standaardfout te kunnen gebruiken. Voor dit experiment werd 90 °C met 60 °C vergeleken met een derivatisatie tijd van 60-, 90- en 120 minuten.

Tabel 4 – Hieronder staat de lijst staan de monsterlijst weergegeven met de daarbij horende temperatuur en tijd, voor de derivatisatie reactie met MSTFA.

Monsterlijst (1g)	T(°C)	Tijd (minuten)
Monster 1	37	30
Monster 2	60	30
Monster 3	60	60
Monster 4	60	120
Monster 5	60	240
Monster 8	60	60
Monster 9	60	90
Monster 10	60	120
Monster 11	90	60
Monster 12	90	90
Monster 13	90	120

Reactie met Methoxyamine:

Voor deze reactie werden twee methoden vergeleken 30 minuten op 50 °C met 90 minuten op 30 °C, zoals hieronder in het overzicht.^[21] Daarna worden deze voor 60 minuten gederiviseerd op 60 °C, de samples werden in triplo opgewerkt.

Tabel 5 – Hier staan de twee monsters die gebruikt zijn voor de reactie met methoxyamine.

Monster portie	T(°C)	Tijd (minuten)
Monster 6	30	90
Monster 7	50	30

2.10 Validatie

De validatie van de methode werd over een tijdsinterval van 3 dagen uitgevoerd, tijdens de validatie werden de volgende aspecten van de methode bepaald: Herhaalbaarheid, Carry over, Stabiliteit en de reproduceerbaarheid. Voor het bepalen hiervan werden de targeted componenten als proefstuk genomen.

Voor de herhaalbaarheid werden 8 monsters opgewerkt, hiervan werd de relatieve standaard deviatie (RSD) berekend de liggen ideaal onder de 15%, maar om het feit dat met een untargeted methode gewerkt werd een cut off van 30% gebruikt. De RSD werd berekend door middel van formule 1, deze wordt hieronder verder toegelicht.

$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} * 100\%$		(Formule 1)
%RSD	= Relatieve Standaard Deviatie in procenten (%)	
SD	= Standaard deviatie	
$\bar{x}$	= Gemiddeld gemeten signaal area (Counts*min)	

Om de stabiliteit te bepalen van de methode werd de zoals in het FDA document, de “autosampler stability” en de “longterm Stability” bepaald. Deze twee waren het meest van belang, aangezien de autosampler van het GC-MS systeem geen klimaatcontrole opties had. Ook werden de monster gelijk na opwerken geïnjecteerd of deze ingevroren en daarna één maal gebruikt. Voor autosampler stabiliteit werden vijf opgewerkte samples drie keer gemeten met intervallen van 24 uur. Voor de stabiliteit op lange termijn werden vijf opgewerkte monsters gemeten en daarna ingevroren op -20 °C, voor vervolgend onderzoek naar de stabiliteit van de monsters onder deze bewaar conditie.

$\%DEV = \frac{\bar{x} - N_{Area}}{N_{Area}} * 100\%$		(Formule 2)
%DEV	= Afwijking in procenten (%)	
$\bar{x}$	= Gemiddeld gemeten signaal area (Counts*min)	
N_{Area}	= Nominale area (Counts*min)	

Om de reproduceerbaarheid van de methode te bepalen werden, over drie verschillende dagen, per dag vijf monsters opgewerkt. Voor het kwantificeren van de reproduceerbaarheid werd de RSD per dag en onderling met elkaar vergeleken, deze werden op de zelfde manier als de herhaalbaarheid berekenend gebruik makend van formule 1. Voor RSD waarden van de reproduceerbaarheid gelden de zelfde eisen als voor de herhaalbaarheid.

3. Resultaten en discussie

3.1 Monsternamen

Voor de methodeontwikkeling werden verschillende monsters gebruikt, een monster uit de Vrouw Vennepolder in Oud Ade was al aanwezig op het lab. Dit monster werd als startpunt gebruikt en gelabeld met monster VV1, de precieze coördinaten van afname waren hiervan niet bekend. Dit monster werd gebruikt voor het experiment dat in paragraaf 2.5 beschreven stond, namelijk de optimalisatie van de extractievloeistoffen. Dit monster was opgeslagen in delen van 50 ml falcon tubes. Later werden volgens methode twee andere monsters gehaald uit deze zelfde polder, dit werd gedaan omwille de houdbaarheid van het huidige monster. Deze staan hieronder in tabel weergegeven met Coördinaten en datum van afname.

Tabel 6 – Hier staat de lijst met gebruikte monsters weergegeven met naam, locatie waar deze genomen zijn, precieze coördinaten en de datum van afname.

Sample naam	Locatie	Coördinaten (Breedte • Lengte graad (DD))	Datum afname
Monster VV2	Oud Ade, Vrouw vennepolder	52,191046 • 04,557527	05-10-2021
Monster VV3	Oud Ade, Vrouw vennepolder	52,190770 • 04,555919	13-12-2021

Monster VV2 uit de tabel hierboven werd verdeeld twee 50 ml falcon tubes en daarna ingevroren op -20 °C. Dit monster werd gebruikt voor de experimenten die in paragraaf 2.7, 2.8 en 2.9 beschreven stonden. Van het monster VV3 werden verdeeld over negen 50 ml falcon tubes, deze werden daarna ingevroren op -80 °C. Monster VV3 werd gebruikt voor de validatie van de methode, beschreven in paragraaf 2.10. Een grotere hoeveelheid van dit monster was opgeslagen zodat in de toekomst dezelfde monsters beschikbaar zullen zijn, zoals gebruikt tijdens de validatie.

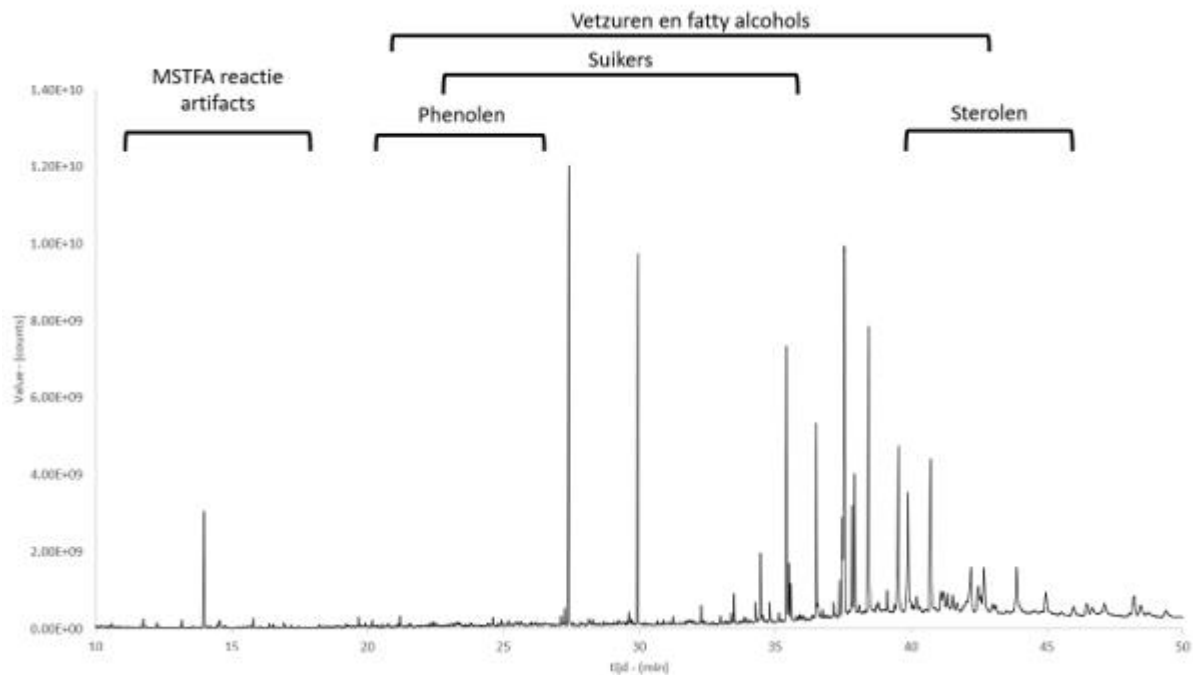
3.2 Extractievloeistof optimalisatie

Zoals beschreven werden in dit experiment verschillende extractievloeistoffen met elkaar vergeleken. Het monster hiervoor gebruikt komt uit de Vrouw Vennepolder. De verschillende chromatogrammen verkregen met de beschreven methode staan weergegeven per extractie vloeistof in bijlage II. Het doel van dit experiment was het vergelijken van de extractiemiddelen, de belangrijkste criteria hierin is hoeveel mogelijke metabolieten geïdentificeerd kunnen worden. Hieronder in tabel 7 staat hoeveel dit per extractievloeistof waren samengevat voor beide experimenten.

Tabel 7 – Overzicht van de hoeveelheid mogelijk gevonden metabolieten per extractie vloeistof.

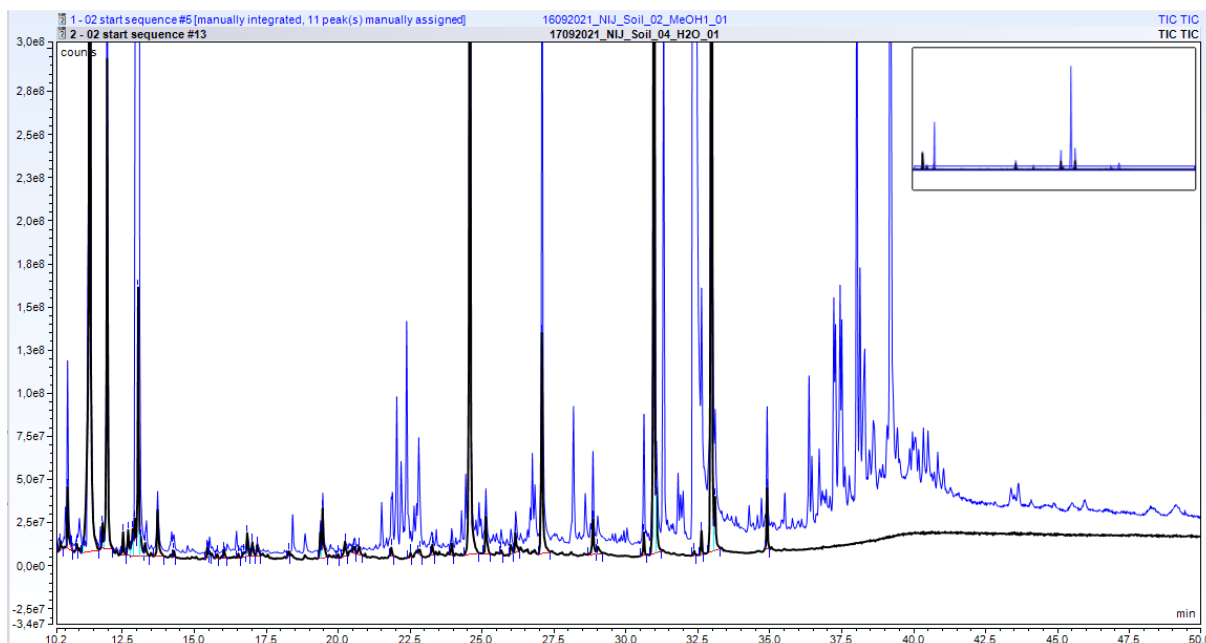
Extractiemiddel	Potentieel geïdentificeerde Metabolieten
Water	≥20
Methanol	≥46
Acetonitril	≥32
Aceton	≥42
Ethyl acetaat	≥51
Acetonitril:iso-propanol:Water	≥39
Chloroform:Methanol	≥75

Uit tabel 7 is te halen dat voor het extractie mengsel chloroform:methanol 2:1 (v/v) de meeste metabolieten geïdentificeerd konden worden. Ook zijn de verschillen te zien wanneer deze vergeleken worden met de chromatogrammen van de alle geteste mengsels en vloeistoffen, in bijlage II. Van de verwachte chemische componenten waren voornamelijk fenolen, vetzuren, fatty alcohols, suikers en sterolen aangetroffen in de monsters. Hieronder in figuur 9 wordt aangegeven hoe deze groepen ongeveer verdeeld zijn over het chromatogram. Hiervoor is het chromatogram van de geëxtraheerde grond met chloroform:methanol 2:1 (v/v) als voorbeeld genomen.



Figuur 9- Het chromatogram van de extractie met chloroform:methanol 2:1 (v/v), met daar in aangegeven de range van chemische groepen die werden gevonden in de grondmonsters.

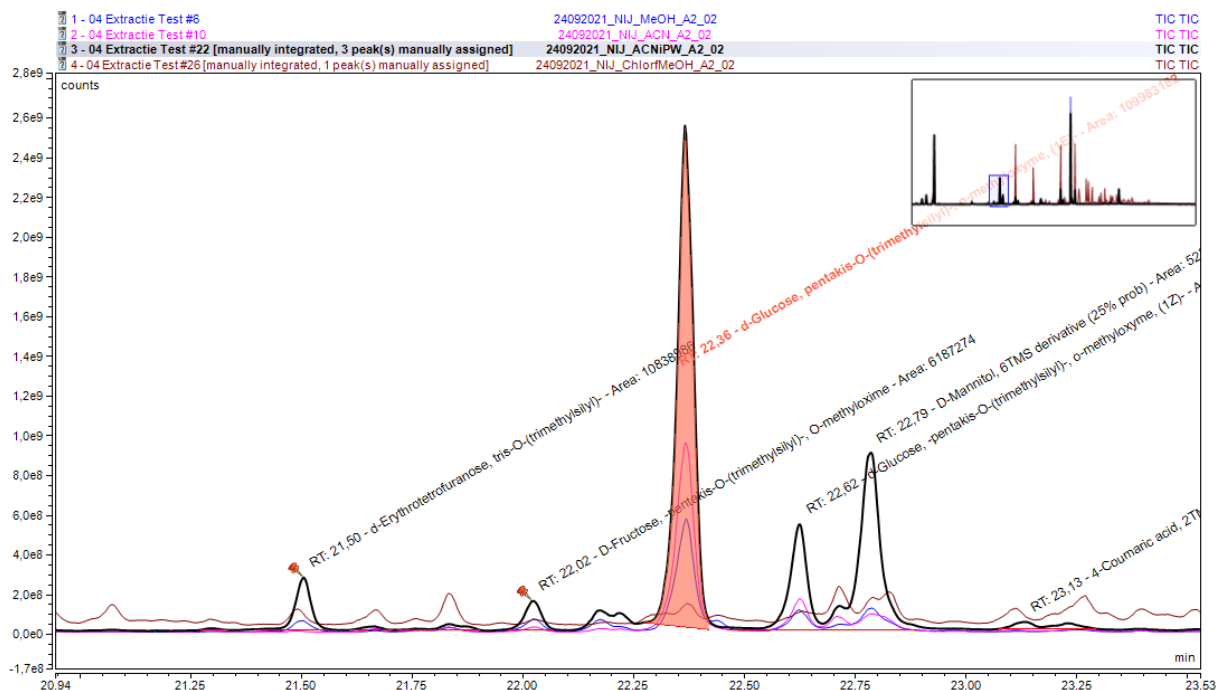
Verder werden de vloeistoffen en mengsels onderling vergeleken, als startpunt werd hiervoor eerst gekeken naar de verschillen tussen methanol en water als extractievloeistof. Tijdens het voorbereiding van de monsters was al op te merken dat het indampen van de monsters geëxtraheerd met water aanzienlijk langer duurde dan de meer apolaire extractievloeistoffen. Voor de met water geëxtraheerde monsters duurde het circa 24 uur om deze in te dampen met de vacuümverdampner, terwijl het voor de andere monsters circa 1 uur en 30 minuten duurde voordat deze volledig waren ingedampt.



Figuur 10 - De TIC chromatogrammen van de bodem samples geëxtraheerd met water (zwart) en methanol (blauw) overlaid weergegeven, Zonder tijds- of signaal offset.

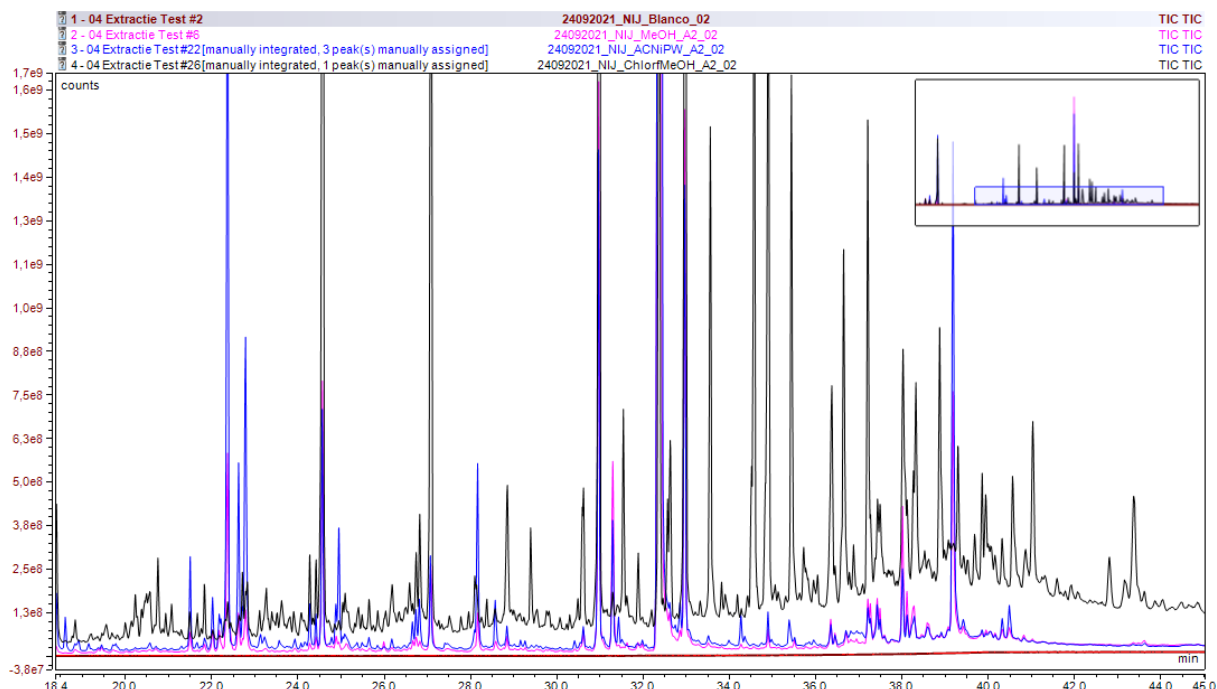
Zoals te zien is in figuur 10 heeft het bodemonmonster geëxtraheerd met methanol een groter en duidelijker hoeveelheid pieken in het gemeten chromatogram. In het bijgevoegde Excel bestand staat per extractie een tabel met mogelijk geïdentificeerde componenten. Hieruit is op te maken dat dat methanol een groter potentieel heeft als extractie vloeistof in de methode en zal meegenomen en vergeleken worden in verdere experimenten.

Wanneer de mengsels vergeleken worden met het eerder gebruikte extractiemiddel methanol is er een duidelijk verschil in de hoeveelheid pieken te zien. Uit eerdere experimenten werden ongeveer 46 Componenten gemeten met de methanol geëxtraheerde monsters. Met chloroform waren dit circa 75 potentieel geïdentificeerde componenten. Qua samenstelling kwamen deze aardig overeen, behalve voor een verschil in het met ACN:iP:H₂O 3:3:2 (v/v/v) geëxtraheerde monsters een cluster met suiker laat zien die hieronder wordt weergegeven. Deze zijn ook lichtelijk te zien met het door aceton geëxtraheerde monster, maar in mindere maten.



Figuur 11 - Vergelijking Suiker cluster RT [21,3-23,0], vergelijking extractie middelen MeOH (Blauw), ACN (Roze), ACN:iP:H₂O 3:3:2 (v/v/v) (Zwart) en Chloroform:MeOH 2:1 (v/v) (Bruin), Zonder tijds- of signaal offset.

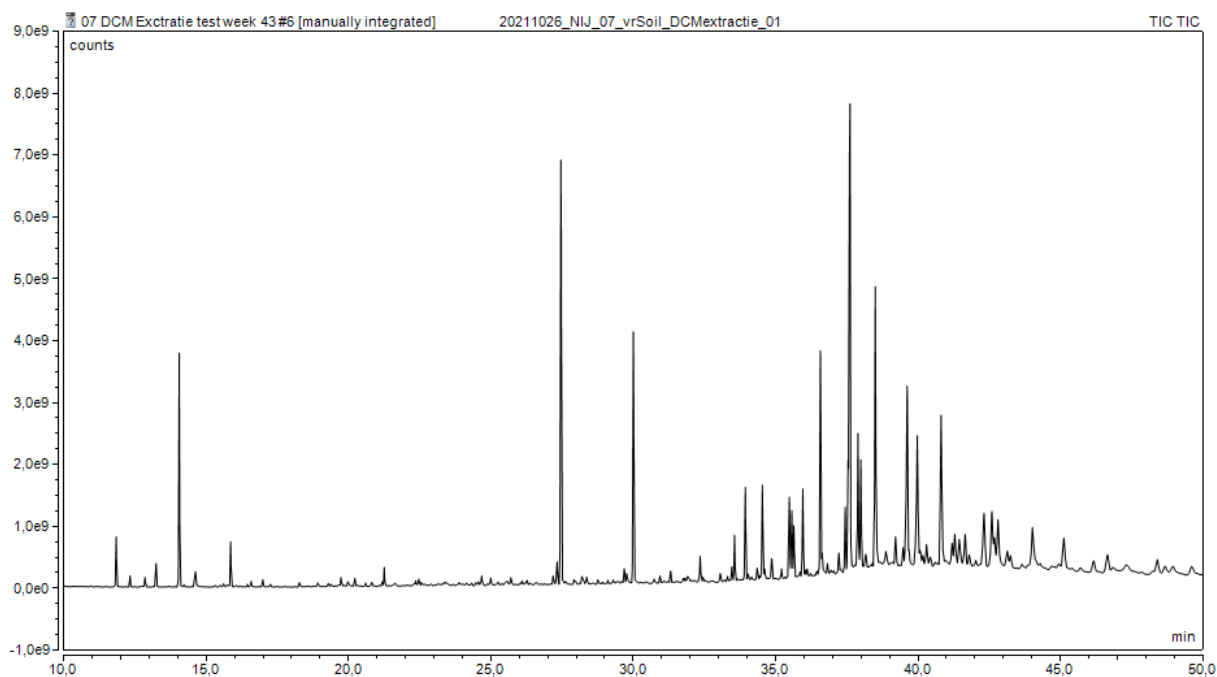
Een ander verschil tussen de geëxtraheerde mengsels is de achtergrond ruis, de met Chloroform:MeOH 2:1 (v/v) geeft een veel hogere baseline dan de andere gebruikte extractie vloeistoffen. Ondanks dit kunnen alsnog meer componenten geïdentificeerd worden en eventueel beter in beeld worden gebracht met een extracted ion chromatogram.



Figuur 12 - Vergelijking Chromatogrammen met extractie middelen MeOH (Roze), ACN:iP:H₂O 3:3:2 (v/v/v) (Blauw), Chloroform:MeOH 2:1 (v/v) (Zwart) en Blanco DCM (Bruin), Zonder tijds- of signaal offset.

Het collectieve doel van deze experimenten was het meten van zoveel mogelijk metabolieten. Door het vergelijken van deze extractiemiddelen is gebleken dat de extractie met chloroform:methanol 2:1

(v/v) de meeste potentiële metabolieten in beeld brengt. Ondanks de hoge ruis wat dit mengsel meebrengt is GC-MS een selectief genoeg meetmethode om de te kunnen onderscheiden. In verband met de veiligheid op het lab werd de chloroform in het mengsel chloroform:methanol 2:1 (v/v) vervangen met dichloormethaan. Met het nieuwe dichloormethaan:methanol 2:1 mengsel was het chromatogram in figuur 13 verkregen.

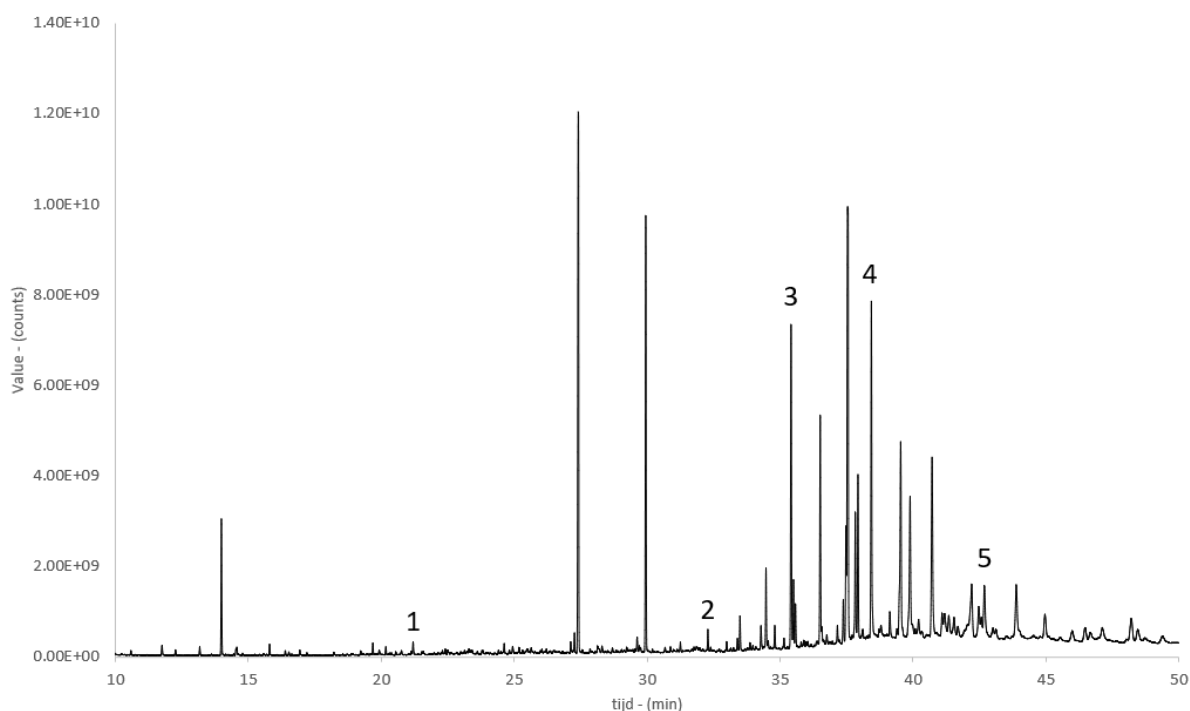


Figuur 13 - Chromatogram van het met dichloormethaan:methanol 2:1 (v/v) geëxtraheerd monster

Alle targeted componenten waren terug te vinden in het chromatogram. De samenstellingen qua verbindingen die gezien worden is hetzelfde gebleven. Dichloormethaan lijkt hieruit even effectief te werken als chloroform, dit is ook te zien aan de componenten lijst in bijlagen II.

3.3 Targeted componenten

Zoals beschreven in paragraaf 2.5, vijf componenten waren gekozen op basis van chemische groep. Hieronder in figuur 14 staat aangegeven waar deze aanwezig zijn.



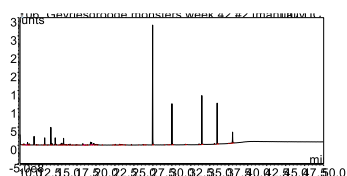
Figuur 14 – Chromatogram: Grondmonster geëxtraheerd met Dichloormethaan:methanol 2:1 (v/v), Target compounds genummerd weergegeven in chromatogram met retentietijden in tabel 9

De gekozen targeted componenten uit figuur 14 staan hieronder in tabel 9 met relevante informatie, de spectrum database geeft een hoge RSI score voor elk component. De probability liggen voor lactose en 1-Hexacosanol ligt iets lager, maar wanneer de fragmentatie patronen worden vergeleken lijken deze goed overeen te komen.

Tabel 8 – In deze tabel staan de gekozen componenten voor optimalisatie van de voorberekings- en GC-MS methode. De bijbehorende massa spectra staan onder in dit document bijgeleverd IV

Chemicaliën	Groep	RSI/Prob(%)	Retentie tijd (minuten)
4-Hydroxybenzoic acid	fenolzuur	941/84,6%	21,2
Arachidic acid	vetzuur	938/92,7%	32,3
Lactose	Suiker	926/51,1%	35,4
1-Hexacosanol	Fatty alcohol	915/44,4%	37,5
Stigmasterol	Sterol	888/94,3%	42,6

Naast het bepalen van de targeted componenten werden ook blanco metingen uitgevoerd. Dit werd gedaan om een beter beeld te krijgen van mogelijke vervuiling die aanwezig kunnen zijn in de GC-metingen.



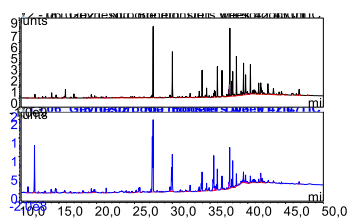
Component	RT (min)	Component	RT(min)
Reaction artefacts	RT <15	Palmitic Acid	27.47
Nonanoic acid	15.61	Stearic acid	30.01
p-Toluic acid	15.69	1-Monomyristin	31.79
2-Methylglutaric acid	17.47	2-Palmitoylglycerol	33.58
2,4-Di-tert-butylphenol	19.29	1-Monopalmitin	33.95
L-5-Oxoproline	19.43	2-Monostearin	35.61
Myristic acid	24.69	Glycerol monostearate	35.97
		Unknown	38

Figuur 15 – Blanco van de monstervoorbewerkingsmethode, in de tabel geïdentificeerde componenten met de retentietijd bijgeleverd.

De gemeten blanco geeft aan dat een groot aantal vervuiling van vetzuren optreed. Dit betekent dat deze vetzuren waarvan sommige gedacht in het monsters te zitten, niet aanwezig zijn en hiermee rekening gehouden moet worden. De vetzuren in de blanco meting zijn waarschijnlijk afkomstig van de huid en zijn zo gaande weg van de monstervoorbewerking in de monsters gekomen

3.4 Vriesdrogen monsters

De monsters werden na 2734 minuten uit de vriesdroger gehaald, al het vocht leek uit de monsters getrokken te zijn. Daarna waren deze met schilders tape om de doppen afgesloten en opgeslagen in de koelkast. Tijdens het opwerken waren de geëxtraheerde monsters binnen 1 uur tijd ingedampt, met gebruik van de vacuüm verdamper, in plaats van 1,5 uur. Hieruit blijkt dat het water wat zich in de monsters bevond, voor een deel mengt met de extractievloeistof. Voor dit experiment was nog geen droog gewicht bepaald van de monsters, aangezien deze in bulk waren gevriesdroogd. De gevriesdroogde monsters waren nauwkeuriger af te wegen, omdat er geen grote hoeveelheden aan elkaar bleven plakken.



Figuur 16 – Chromatogram van de gevriesdroogde monsters

Hierboven in figuur 2 staat het chromatogram van het gevriesdroogde monster vergeleken met het niet gevriesdroogde monster weergegeven, zoals te zien is geeft het vriesdrogen grote voordelen voor het signaal in het chromatogram.

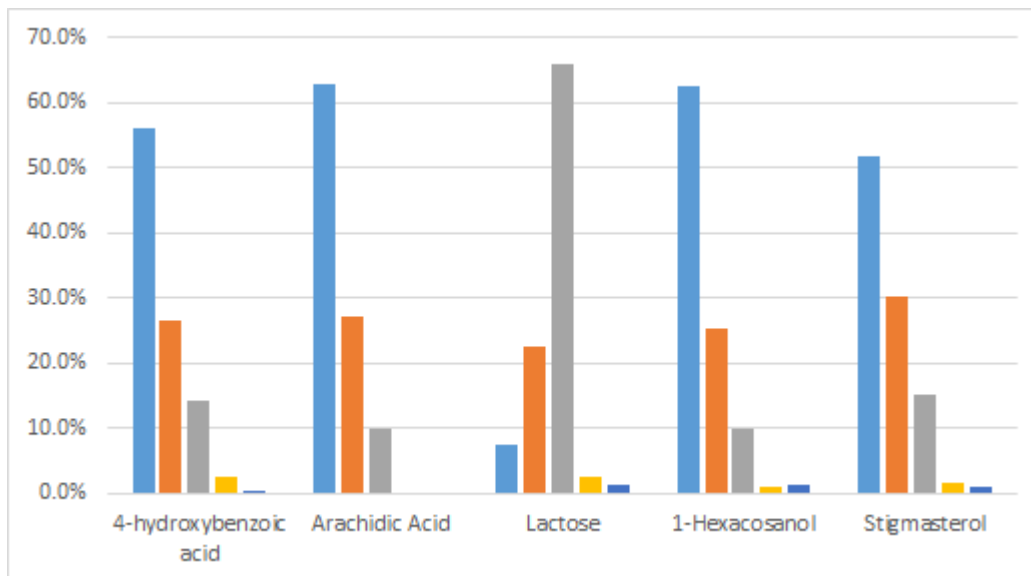
Tabel 9 – De targeted componenten met XIC gemeten massa en bepaalde relatieve standaard deviaties in procenten

Component	Fragment (m/z)	RDS% Gevriesdroogde monsters
4-Hydroxybenzoëzuur	267	23,5
Arachidinezuur	117	9,88
Lactose	361	25,4
1-hexacosanol	439	0,49
Stigmasterol	219	4,36

De monsters zijn in drievoud opgewerkt hierboven is te zien hoe het signaal relatief van elkaar verschilt voor de targeted componenten. Hierin is te zien dat de RSD% waardes heel gevarieerd zijn. Dit geeft aan dat de methode mogelijk moet geoptimaliseerd worden voor deze componenten. Uit de resultaten van dit experiment blijkt dat het vriesdrogen voordelen heeft voor zowel de monstervoorbewerking als het meten van de monsters. Hoewel het Vriesdrogen van de monsters veel tijd inneemt, wegen de voordelen hier meer op dan dit nadeel. Ook vanwege het feit dat de monsters gelijk maakt ongeacht het klimaat van de monstername en hoe nat de bodem die dag was.

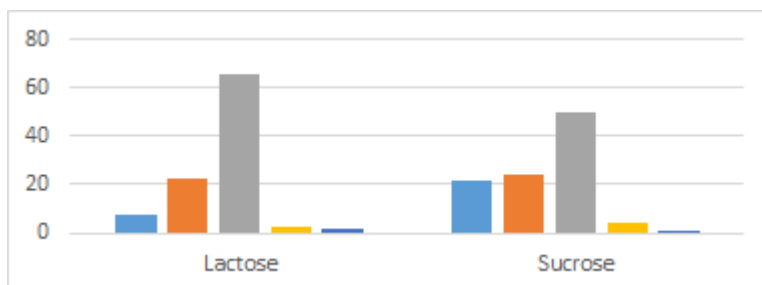
3.5 Extractie optimalisatie

Hieronder staan de percentages van de gemeten fracties weergegeven per hoeveelheid gebruikte monster. De stoffen zijn gemeten in elk een aparte XIC dit is voor; 4-Hydroxybenzoëzuur 267 (m/z), Arachidinezuur 117 (m/z), Lactose 361 (m/z), 1-hexacosanol 439 (m/z) en stigmasterol 219 (m/z). Het totale oppervlak van alle vijf gemeten fracties wordt als 100% genomen.



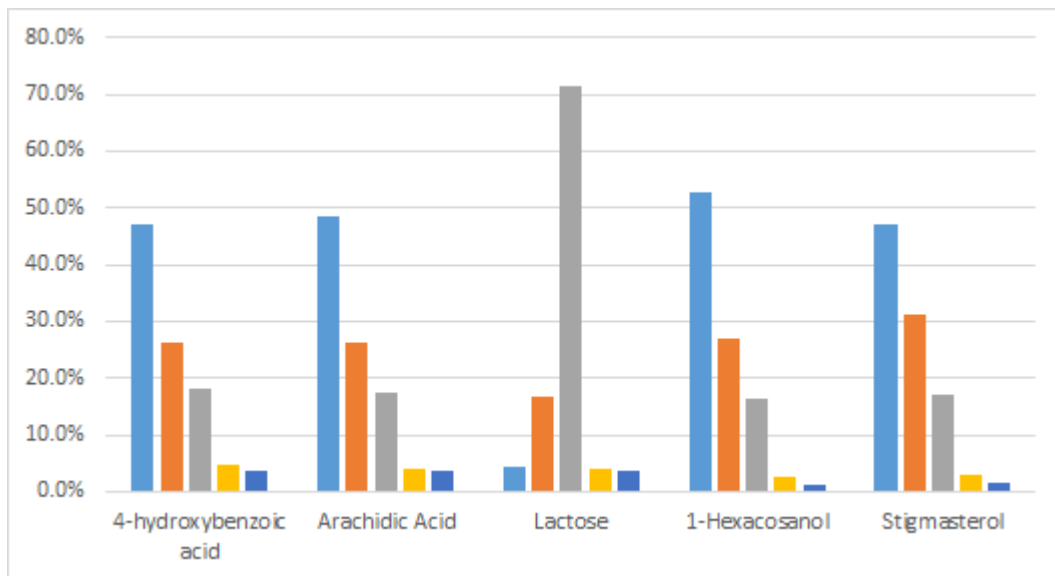
Figuur 17 - Kolomdiagram met de percentages van de gemeten fracties van 0,5 gram geëxtraheerd monster, hierbij is de totale piek oppervlakte genomen als 100%. Hierin is blauw de eerste fractie, oranje de tweede, grijs de derde, oranje de vierde en donkerblauw de vijfde en laatste.

In het eerste kolomdiagram is te zien dat bij 0,5 gram monster na drie keer extraheren het grootste gedeelte (>95%) van vijf targeted componenten in het monster is opgenomen door de extractievloeistof. Op merkelijk is dat bij lactose de derde fractie het grootste percentage is, dit is ook het geval bij derde fracties bij 1 gram en 2 gram monster. Dit is ook te zien voor andere suikers, zoals sucrose, hieronder in het staafdiagram worden de fracties van lactose en sucrose met elkaar vergeleken.



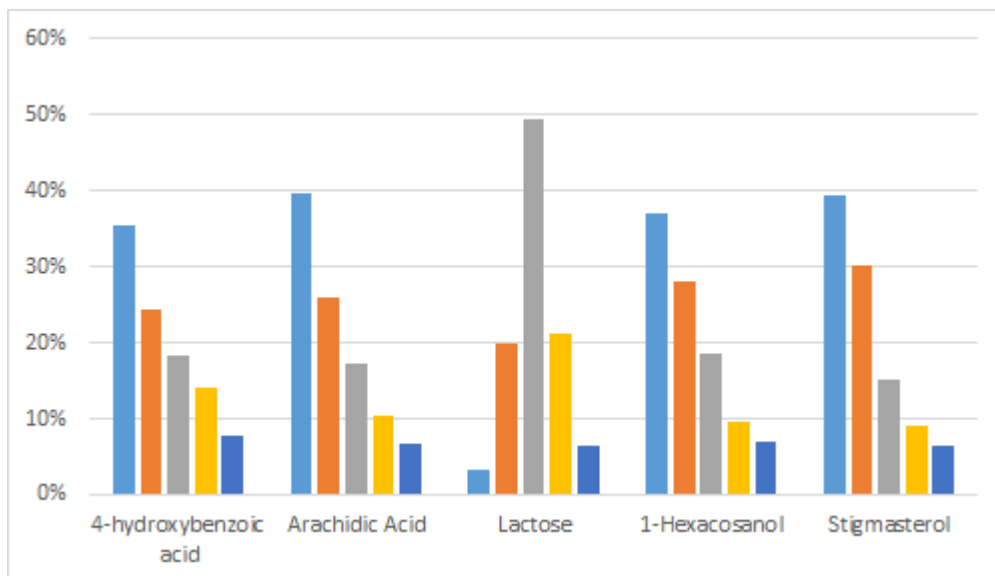
Figuur 18 - Kolomdiagram met de percentages van de gemeten fracties van 0,5 gram geëxtraheerd monster, hierbij worden lactose en sucrose vergeleken. Totale piek oppervlakte is wederom als 100% genomen. Hierin is blauw de eerste fractie, oranje de tweede, grijs de derde, oranje de vierde en donkerblauw de vijfde en laatste.

De vijf fracties van de twee suikers geven eenzelfde patroon, al lijkt bij de eerste twee keer extraheren een hoger percentage sucrose opgenomen te worden door de extractie vloeistof. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat suiker zich mogelijk sterker aan de aarde binden. In eerdere experimenten waren lactose en sucrose een stuk prominenter in die chromatogrammen te zien, met een piek hoogte van e10. Dit was het meest te zien toen het monster met 100% methanol werd geëxtraheerd, blijkbaar heeft het percentage methanol een grote invloed op de extractie van de suikers.



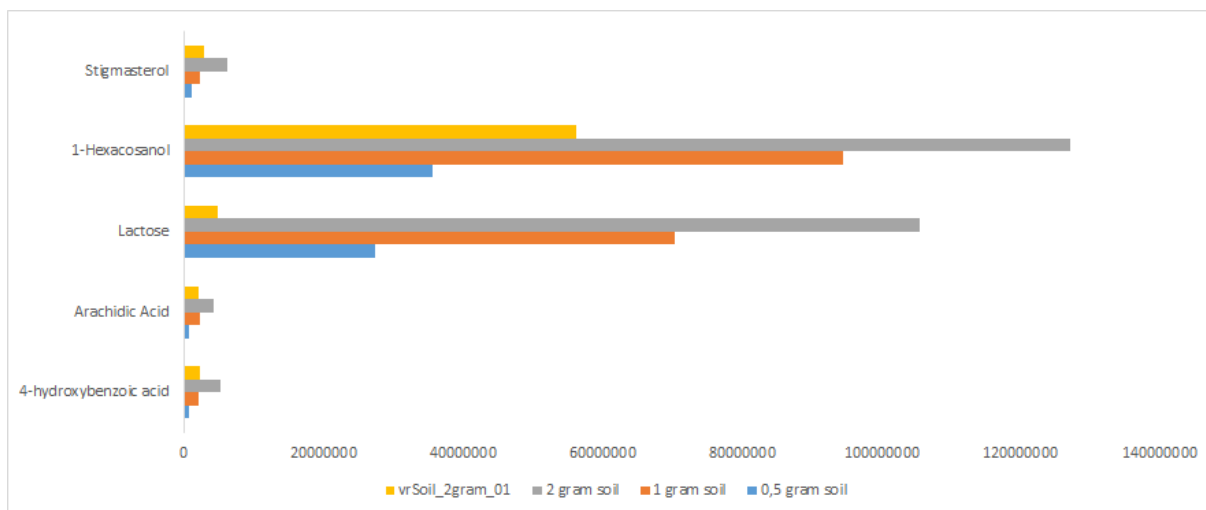
Figuur 19 - Kolomdiagram met de percentages van de gemeten fracties van 1 gram geëxtraheerd monster, hierbij is de totale piek oppervlakte genomen als 100%. Hierin is blauw de eerste fractie, oranje de tweede, grijs de derde, oranje de vierde en donkerblauw de vijfde en laatste.

De vijf extractie fracties voor 1 gram monster lijken eenzelfde patroon te hebben als dat voor 0,5 gram monster. Na drie keer extraheren is ook hier het grootste gedeelte van het monster (>90%) opgenomen door de extractievloeistof.



Figuur 20 - kolomdiagram met de percentages van de gemeten fracties van 2 gram geëxtraheerd monster, hierbij is de totale piek oppervlakte genomen als 100%. Hierin is blauw de eerste fractie, oranje de tweede, grijs de derde, oranje de vierde en donkerblauw de vijfde en laatste.

Het diagram voor 2 gram monster laat wat grotere verschillen zien vergeleken met de eerste twee. Hier lijkt alsnog het grootste gedeelte (>75%) opgenomen te worden door de extractievloeistof, hoewel het lijkt dat na 5 keer extraheren nog een groot deel van het monster achterblijft. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat bij het vortexen, door de hoeveelheid monster, een deel niet goed genoeg loskomt van de bodem. Hierdoor zou er niet voldoende contactoppervlak zijn om het monster volledig te kunnen extraheren.



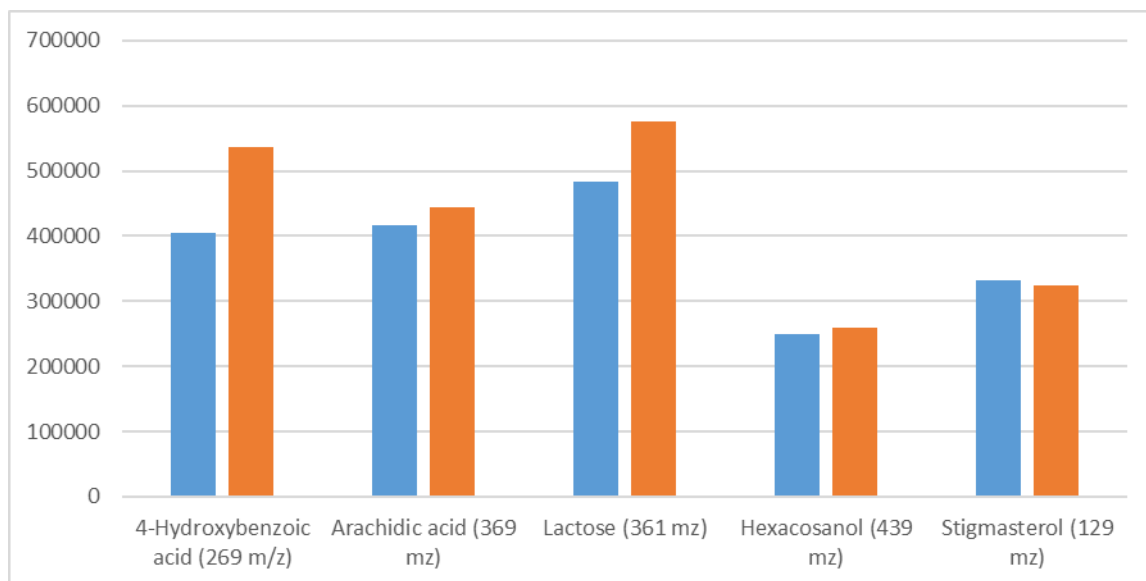
Figuur 21 - Totale piek oppervlaktes na drie keer extraheren van de monsters per component, behalve voor de gele staven. Dit zijn de eerste fractie gemeten met 2 gram bodemonster (ter vergelijking).

Als alleen uitgegaan van het percentage wat per fractie opgenomen wordt, zou 0,5 gram monster als beste keuze worden gezien. Maar de absolute piekoppervlakte is hierin ook van belang, uit de voorgaande resultaten is te zien dat na 3 keer extraheren het meeste van het monster wordt opgenomen. Hierboven in figuur 5 worden de totale piek oppervlaktes weergegeven na de bodemonsters drie keer geëxtraheerd te hebben. Ook staat het signaal bij de eerste fractie met 2 gram monster weergegeven, dit is gedaan om te vergelijken met de huidige methoden die gebruikt wordt. In het staafdiagram van figuur 21 is te zien dat er bijna geen signaal verlies is met de huidige methode en zelfs winst bij een deel van de stoffen.

Bij elke hoeveelheid grond was na de derde extractie het grootste deel van het monster opgenomen door de extractievloeistof. Dit lijkt de optimale hoeveelheid om mee te nemen in de monstervoorbewerking, dit is zeker het geval wanneer naar de suikers in het monster gekeken wordt. De tot zover gebruikte hoeveelheid van 2 gram monster lijkt uit de resultaten een te grote hoeveelheid om zich volledig met de extractievloeistof te mengen. Bij het gebruik van 0,5 gram monster en 1 gram monster lijkt dit niet het geval te zijn, aangezien de percentages vele malen lagen worden na de derde fractie. Wanneer naar het samengevoegd signaal wordt gekeken, van alle eerste drie de fracties, is bij 0,5 gram grond te veel signaal verlies in vergelijking met de eerste fractie 2 gram geëxtraheerd grond. Voor de extracties met 1 gram grondmonster is dit minder tot bijna niet. Uit de bovengenoemde resultaten blijkt uit de gemeten data dat drie keer extraheren met 1 gram grond momenteel optimaal is voor de monstervoorbewerkingsmethode.

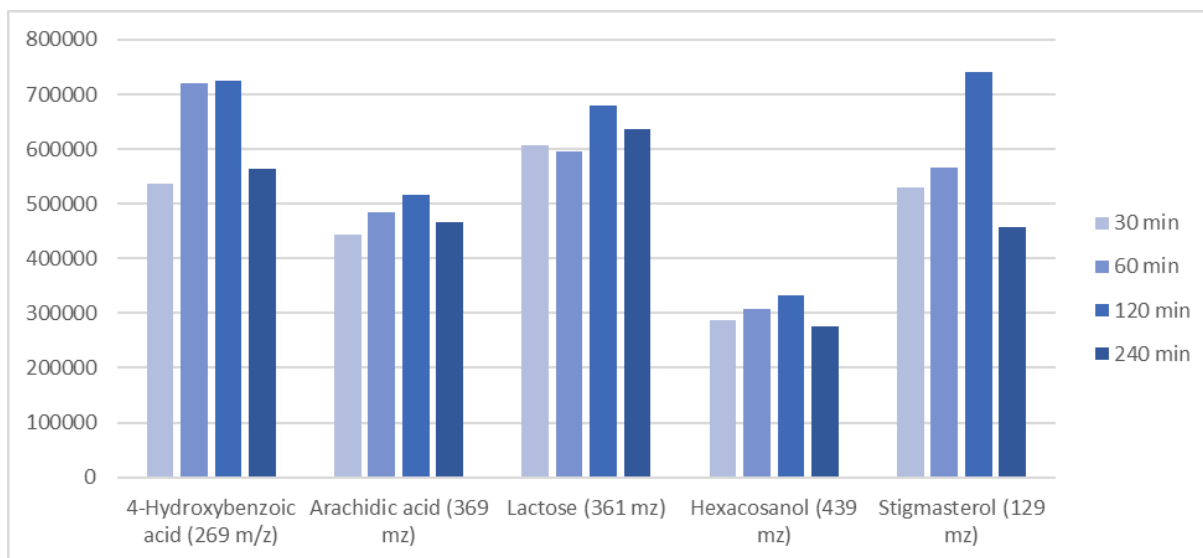
3.6 Derivatisatie optimalisatie

Hieronder staan twee staafdiagrammen weergegeven, met de derivatisatie methode op 37 °C (blauw) en op 60 °C (oranje) in figuur 22. In figuur 23 staat het verloop van tijd van de reactie weergegeven, met respectievelijk van licht- naar donkerblauw 30 minuten, 60 minuten, 120 minuten en 240 minuten op 60 °C.



Figuur 22 – Staaf diagram met het monster voor 30 minuten derivatiseren op 30 °C (blauw) en 60 °C (oranje). De area van lactose en hexacosanol zijn respectievelijk met een factor 10- en 100 verlaagd om deze beter in het figuur weer te geven.

In figuur 22 is te zien dat er een verschil te zien is tussen de twee verschillende temperaturen voor de derivatisatie reactie. Er is een klein verschil te zien tussen deze temperaturen, derivatiseren op 60 °C lijkt hieruit voordeliger, behalve voor stigmasterol maar het is niet zeker te zeggen of dit komt door een standaard fout. Voor de methode zal 60 °C, aangezien deze temperatuur winst lijkt te geven voor de meeste het grotere deel van de targeted stoffen en dit geen na of voordelen heeft op de workflow van de methode.

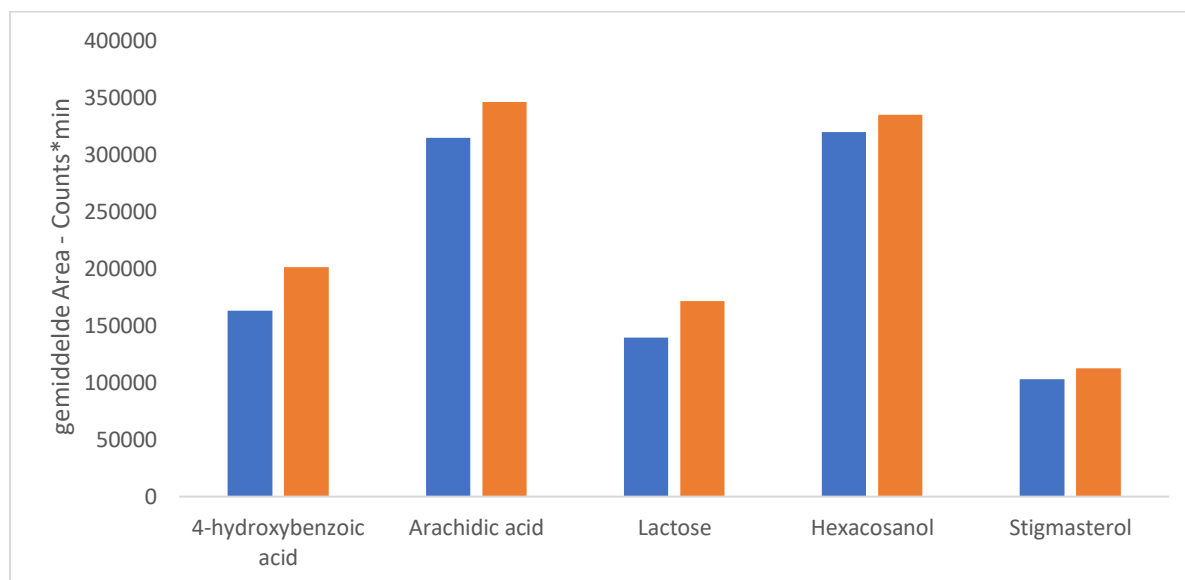


Figuur 23 – Staaf diagram met variërende derivatisatie tijd, dit is respectievelijk van licht- naar donkerblauw 30 minuten, 60 minuten, 120 minuten en 240 minuten. Al deze monsters zijn op een temperatuur van 60 °C gederiviseerd. De area van lactose en hexacosanol zijn respectievelijk met een factor 10- en 100 verlaagd om deze beter in het figuur weer te geven.

In figuur 23 zijn de verschillende reactietijden op 60 °C te zien. Er is een toename van signaal te zien wanneer derivatisatie tijd omhoog gaat, behalve bij de monsters die voor 240 minuten gederiviseerd zijn. Het vermoeden is dat iets misgegaan is tijdens de voorbereiding van dit monster. Al is er een toename te zien, is het nog niet duidelijk wanneer de monsters volledig gederiviseerd zijn. Ook door gebrek aan foutenbalken is niet te zeggen of dit normale

variatie zou zijn. Voor de werkzaamheden op het laboratorium was 4 uur derivatiseren niet realistisch om als methode te gebruiken, voor 30 minuten en of op 30 °C derivatiseren leek een minder hoog signaal te hebben.

Hieronder in figuur 24 staan de twee vergeleken methode voor de reactie met Methoxyamine weergegeven. In het figuur staan de gemiddelde area's per targeted component weergegeven, per component zijn er drie injecties gedaan.



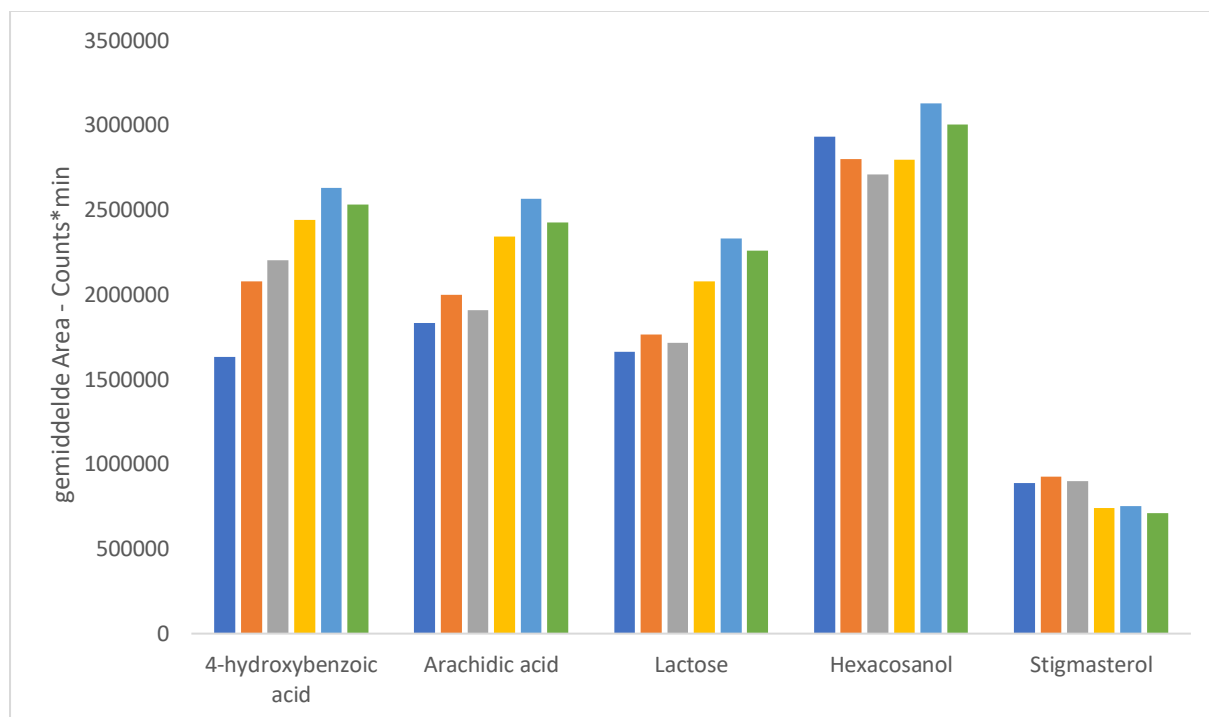
Figuur 24 – Staafdiagram van de methoxyamine reactie op 30 °C voor 90 minuten (blauw) en op 50 °C voor 30 minuten (oranje). Per targeted component geldt $n=3$, de area van lactose en hexacosanol zijn met een factor 10 verlaagd om deze beter in het figuur weer te geven.

Uit het staafdiagram hierboven is te zien dat er een kleine toename in signaal is, wanneer de relatieve standaard deviaties worden vergeleken is te zien dat deze verkleinen met de tweede methode die gebruikt werd. De gemiddelde RSD van de targeted componenten die gemeten waren, met de methoxyamine reactie op 30 °C voor 90 minuten en op 50 °C voor 30 minuten, zijn respectievelijk 23,7% en 8,8%. Doordat met de nieuwe methode geen signaal verloren lijkt te gaan en de resultaten met deze methode meer precies gemeten worden, gaat de voorkeur hier naar uit.

Tabel 10 – Deze tabel is bijbehorend aan figuur 24, hierin zijn de oppervlaktes van alle injecties weergegeven in counts*min. Per serie van drie injecties is ook voor elk targeted component de relatieve standaard deviatie bepaald.

	4-hydroxybenzoic acid (267 m/z)	Arachidic acid (117 m/z)	Lactose (361 m/z)	Hexacosanol (439 m/z)	Stigmasterol (129 m/z)
Injectie	Area (Counts*min)	Area (Counts*min)	Area (Counts*min)	Area (Counts*min)	Area (Counts*min)
	101257	160553	883471	2297918	85853.37
	149870	295231	1361505	3119039	92285.81
	176066	334451	1432498	3277812	113606.2
RSD	26.7%	34.6%	24.4%	18.1%	14.9%
	180158	300755	1565857	3144713	104876.3
	214236	341792	1840494	3502713	120879.8
	210459	396073	1747278	3407143	111972.8
RSD	9.3%	13.8%	8.1%	5.5%	7.1%

Verdere resultaten voor het optimaliseren van de derivatisatie reactie met MSTFA staan hieronder weergegeven in figuur 25, hierin zijn alle combinaties van factoren gezet. Beginnend bij het derivatiseren voor 60 minuten op 60 °C, met de daarop volgende toenames van tijd naar 90- en 120 minuten. Daarop volgend staan als derde, vierde en vijfde respectievelijk, de derivatisatie reactie voor 60-, 90- en 120 minuten op 90 °C. Hierbij is op te merken dat één meting ontbreekt, deze bij de reactie op 90 °C voor 90 minuten. Deze meting gaf een signaal gelijk aan de ruis, hoogstwaarschijnlijk door een onbekende mishandeling tijdens de monstervoorbewerking.



Figuur 25 – In dit figuur staan de het signaal van de verschillende reactiecondities voor de reactie met MSTFA als een staafdiagram weergegeven, elke staaf is een gemiddelde waarde waarvoor geldt $n=3$. Deze staan hier per zestal op een rij voor elk van de vijf targeted componenten. Hier staan de opeenvolgende reactiecondities met respectievelijk de temperatuur en tijd: blauw [60 °C, 60 min], oranje [60 °C, 90 min], lichtgroen [60 °C, 120 min], geel [90 °C, 60 min], paars [90 °C, 90 min], groen [90 °C, 120 min].

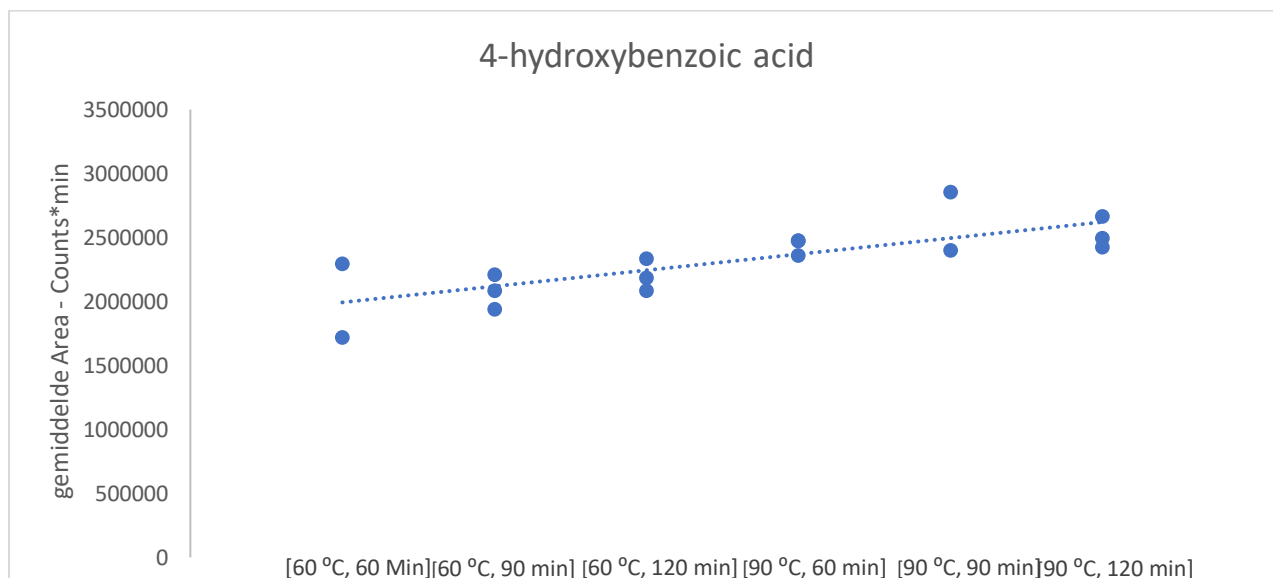
In het staafdiagram hierboven staat het overzicht voor de reactie met MSTFA, dit zijn de gemiddeld genomen waardes per reactie conditie. Zoals verwacht lijkt het signaal hoger te worden naar mate de temperatuur en tijd toenemen. De toename in temperatuur lijkt hier ook voor elk component, behalve stigmasterol, een grotere toename in signaal te geven dan een toename in tijd. Dit ook is zeer logisch aangezien een toename in van 10 °C de reactiesnelheid verdubbeld, zoals ooit is vastgesteld door middel van de vergelijking van Arrhenius.^[22] Een mogelijkheid waarom de area van stigmasterol lager zijn is vanwege de complexe structuur. Bij de esterificatie van stigmasterol treed oxidatie degradatie wanneer de temperatuur van de reactie boven de 60 °C komt.^[23] Mogelijk is dat tijdens de silylering van stigmasterol eenzelfde effect optreedt, al is dat niet met zekerheid te zeggen.

Ook is voor elk van deze waarde de relatieve standaard deviatie bepaald, deze staan hieronder weergegeven in tabel 13. Hierin is te zien dat met een toename van temperatuur en tijd de precisie van de methode groter wordt.

Tabel 11 – Hier staan de bepaalde relatieve standaard deviatie voor de monsters per reactie condities.

Monster(#), Reactie condities	4-hydroxy-benzoic acid (RSD %)	Arachidic acid (RSD %)	Lactose (RSD %)	Hexacosanol (RSD %)	Stigmasterol (RSD %)	Gemiddelde (RSD %)
(8) 60 °C, 60 min	20.2	10.2	11.5	15.8	7.1	12.9
(9) 60 °C, 90 min	6.5	7.7	6.4	3.0	4.3	5.6
(10) 60 °C, 120 min	5.8	10.6	10.3	9.0	2.8	7.7
(11) 90 °C, 60 min	2.8	10.9	4.9	2.9	2.1	4.7
(12) 90 °C, 90 min	12.3	7.9	10.0	6.2	6.2	8.5
(13) 90 °C, 120 min	4.9	1.1	4.3	5.7	1.6	3.5

In figuur 26 hieronder staan de reactie condities in oplopende volgorde volgens deze vergelijking in een spreidingsgrafiek weergegeven. Per reactie conditie zijn de drie gemeten area's genomen en hier een trendlijn doorheen getrokken, om vast te stellen of er een duidelijke toename van het signaal is waar te nemen. De gegevens voor het component 4-hydroxybenzoic acid staat hieronder weergegeven, de spreiding voor alle vijf targeted componenten zijn te vinden in bijlage V.



Figuur 26 – Hier staan de reactiecondities opvolgend op basis van reactie kinetiek, de gemeten punten staan in een spreiding met een trendlijn daar doorheen.

In de spreidingsgrafieken van de targeted componenten is een trendlijn getrokken, voor zowel 4-hydroxybenzoic acid, arachidic acid, lactose en 1-hexacosanol lijkt deze een opwaartse trend te zijn en voor stigmasterol een neerwaartse trend. Om te bepalen of deze punten daadwerkelijk met elkaar verschillen is doormiddel van ANOVA een F waarde berekend. Waarbij de nulhypothese is dat deze waardes de gevonden waardes significant verschillend van elkaar zijn, wanneer F en de alternatieve hypothese is dat deze waardes niet significant van elkaar verschillen. De berekende waarde F wordt vergeleken met een kritieke waarde voor F deze is gelijk aan 3,202874. Deze is bepaald op basis van 5

vrijheidsgraden tussen de groepen en 11 vrijheidsgraden binnen de groepen, met als voornemen $\alpha = 5\%$ (eenzijdig).

Tabel 12 – Hierin staan de berekende F waarden die daarna vergeleken worden met de kritieke F waarde. Hierbij is de kritieke waarde voor F gelijk aan 3,203874

Targeted component	F waarde	F > F krit
4-hydroxybenzoic acid	3.35	Ja
Arachidic acid	5.42	Ja
Lactose	6.18	Ja
Hexacosanol	1.40	Nee
Stigmasterol	11.2	Ja

Uit de resultaten in tabel 12 blijkt dat voor een meerderheid van de targeted componenten een significante stijging is van het signaal. Dit in combinatie met een lagere spreiding bij een langere derivatisatie reactie op hoge temperatuur, is een goed uitgangspunt om de methode parameters dermate aan te passen.

3.7 Validatie

Tijdens de validatie werd eerst acht keer hetzelfde monsters gemeten, Deze staan hieronder in tabel 14 aangegeven als monster 1A tot en met 1H. Van deze metingen werd door middel van formule 1 de relatieve standaard deviatie berekend, de resultaten hiervan staan weer gegeven in de eerder genoemde tabel. Aangezien deze resultaten onder de 15% lagen werd tijdens opvolgende dagen vijf metingen gedaan in plaats van acht. Daarna werden van 1H samen met de zeven opvolgende metingen de RSD berekend. Deze lagen ook onder de 15%, evenals de metingen in de dagen daarop volgend.

Tabel 13 – De validatie met daarbij de injectie variabiliteit en de variabiliteit tussen monsters per dag, deze is aangeduid met de RSD in procenten.

Targeted component	4-hydroxybenzoic acid	Arachidic acid	Lactose	Hexacosanol	Stigmasterol
RSD monster dag 1 #(01A-01H)	6.1	8.7	11.6	14.2	13.2
RSD monsters dag 1 #(1H-8)	14.2	12.1	8.7	12.4	6.8
RSD monster dag 2 #(01A-01E)	7.1	10.5	12.1	11.4	11.6
RSD monsters dag 2 #(01E-05)	15.0	9.0	12.7	11.8	12.5
RSD monster dag 3 #(01A-01E)	13.0	10.4	4.0	8.0	14.1
RSD monsters dag 3 #(01E-05)	9.9	10.6	11.7	14.9	9.2

De gemiddelde area werden van deze drie dagen genomen, hiervan werd de RSD berekend wederom met formule 1. Deze staan hieronder weergegeven in tabel 15, bijna elk van de targeted componenten ligt onder de 15% behalve voor lactose. Deze ligt alsnog onder de grens van 30%, maar het lijkt er op dat suikers een hogere variatie hebben over verschillende batches.

Tabel 14 – Hieronder staan de gemiddelde area's van de gemeten momnsters met de daarbij berekende RSD waarde in procenten.

Targeted component	4-hydroxybenzoic acid	Arachidic acid	Lactose	Hexacosanol	Stigmasterol
Gemiddelde dag 1	81969	265692	1128162	5004566	218948
Gemiddelde dag 2	72407	273023	1946304	5880609	240943
Gemiddelde dag 3	96697	287620	1496011	4663346	193341
RSD% gemiddelden	14.6	4.1	26.9	12.2	10.9

4. Conclusie en aanbevelingen

Voor dit onderzoek was het belangrijk om vooraf te weten uit welke soort metabolieten de grondmonster bestaan, om zodoende een passende monstervoorbewerkingsmethode te ontwikkelen. Uit literatuuronderzoek waren de volgende groepen metabolieten gevonden: Amino-zuren, vetzuren, fosfolipiden, nucleobasen, alcoholen, polyamines, fenolen, steroïden, suikers, polysachariden en lignine. De ontwikkelde methode geeft een weide range van fenolen, suikers alcoholen, vetzuren en sterolen. Waarin ongeveer 70 metabolieten geïdentificeerd konden worden, door te extraheren met een extractie mengsel van 2:1 dichloormethaan:methanol (v/v) en te derivatiseren met MSTFA. Vanwege de untargeted methode werden per groep één stof genomen als representatief voor de verdere methode ontwikkeling dit waren; 4-Hydroxybenzoic acid, arachidic acid, lactose, 1-hexacosanol en stigmaterol. Verder bleek uit de monstervoorbewerkings-experimenten dat het vriesdrogen van de monsters niet afdeed nemen in signaal en deze theoretisch de fysische eigenschappen van de monsters gelijkwaardig aan elkaar zou maken. Ook bleken een aantal verontreinigingen in de blanco teruggevonden te worden, al is niet met zekerheid te zeggen van welk hiervan (gedeeltelijk) ook in het monster aanwezig is.

Voor de optimalisatie van de methode werden de vijf targeted componenten als uitgangspunt genomen. Door verschillende hoeveelheden monster meerdere keren te extraheren werd bepaald dat drie keer 1 gram bodemmonster extraheren de optimale conditie, voor deze methode is. Door drie keer te extraheren werd meer dan 90% van het monster terug gevonden, daarnaast bleek dit ook het signaal hierdoor niet omlaag te gaan. Uit de optimalisatie van de derivatisatie reactie bleek dat voorkeur lag bij een temperatuur van 90 °C en een tijd van 2 uur. Deze parameters gaven een toename in signaal en lag de spreiding voor de targeted componenten vrijwel het laagst.

De relatieve standaard deviatie voor onderlinge metingen als monster in dezelfde batch lagen allebei onder de 15%. Voor het onderlinge verschil in meetdagen lag alleen de spreiding voor lactose boven de 15%. Deze lag wel nog onder de grens van 30%, maar uit het resultaat van deze metingen lijkt het dat de spreiding voor suiker binnen deze methode groter is dan voor de andere chemische groepen. Door alle resultaten bij elkaar te nemen is een methode ontwikkeld om mogelijk een chemische moment opname van een bodemmonster te bepalen.

Aanbevelingen

Door de grote hoeveelheden data die bij identificatie wordt gegenereerd zijn multivariate analyse tools nodig, bijvoorbeeld MetaboAnalyst. Dit is een uitgebreid platform, ontworpen voor metabolomics-gegevensanalyse via een web gebaseerde interface. De huidige versie ondersteunt de verwerking van onbewerkte MS-spectra, tot verscheidende uitgebreide statistische analyses. Met als doel om high-throughput-analyse mogelijk te maken voor zowel targeted als non-targeted metabolomic. En hierdoor de kloof tussen ruwe data files en biologische inzichten te verkleinen.^[24]

5. Literatuurverwijzingen

1. Website van Universiteit Wageningen over biodiversiteit: <https://www.wur.nl/nl/show-longread/Biodiversiteit-longread.htm> , geraadpleegd februari 2022
2. Artikel over de Biodiversiteit in Nederland: <https://www.voordewereldvanmorgen.nl/artikelen/hoe-gaat-het-met-de-biodiversiteit-in-nederland>, geraadpleegd februari 2022
3. Thermo Fischer: <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-applications-area/metabolomics-mass-spectrometry/metabolomics-workflows/untargeted-metabolomics-workflows.html> , geraadpleegd oktober 2021
5. Swenson et al. 2014: *Untargeted soil metabolomics methods for analysis of extractable organic matter*; Tami L. Swenson, Stefan Jenkins, Benjamin P. Bowen, Trent R. Northen; gepubliceerd 5 oktober 2014; Soil Biology and Biochemistry, Volume 80, January 2015, Pagina 189-198
6. Whithers et al. 2020: *Use of untargeted metabolomics for assessing soil quality and microbial function*; Emma Withers, Paul W. Hill , David R. Chadwick, Davey L. Jones; gepubliceerd 14 februari 2020; Soil Biology and Biochemistry, Volume 143, April 2020, 107758
7. Vancampenhout et al. 2008: *Differences in chemical composition of soil organic matter in natural ecosystems from different climatic regions – A pyrolysis–GC/MS study*; Karen Vancampenhout, Katinka Wouters, Bruno De Vos, Peter Buurman, Rudy Swennen, Jozef Deckers, gepubliceerd 17 december 2008; Soil Biology and Biochemistry, Volume 41, published 2009, pagina 568-579
8. Land Van Ons: <https://landvanons.nl/onsplan/> , geraadpleegd November 2021
9. Google Maps Veenweide gebied: <https://www.google.com/maps/@52.1981302,4.5424375,1922m/data=!3m1!1e3>, geraadpleegd december 2021
10. Saitman et al 2019: *Overview of Analytical Methods in Drugs of Abuse Analysis: Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Liquid Chromatography Combined With Tandem Mass Spectrometry and Related Methods*; Alec Saitman, Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing (Second Edition), pages 157-171, 2019; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815607-0.00013-7>
11. Thomas et al. 2019: Urine drug screens: Caveats for interpreting results; S Thomas, C Knezevic; Contemporary PEDS Journal, 6th edition, volume 36, 2019
12. Schummer et al. 2008: *Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis*; Claude Schummer, Olivier DelhommeBrice, M.R. Appenzeller, Robert Wennig, Maurice Millet; gepubliceerd 21 september 2008; Talanta Volume 77, Issue 4, 15 February 2009, Pagina 1473-1482
13. Sigma Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/gas-chromatography/mstfa-d9-derivatization>, geraadpleegd november 2021

14. Yuetian Yan et al. 2014: *Mass spectrometry combinations for structural characterization of sulfated-steroid metabolites*; Yuetian Yan, Don Rempel, Timothy E. Holy, and Michael L. Gross, *J Am Soc Mass Spectrom* May 2014, doi: 10.1007/s13361-014-0836-9, pagina 869-879
15. Science.howstuffworks: <https://science.howstuffworks.com/innovation/edible-innovations/freeze-drying2.htm>, geraadpleegd november 2021
16. FDA protocol: *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); gepubliceerd maart 2018, 37 pagina's
17. Guy et al. 2008: *Global metabolic profiling analysis on human urine by UPLC–TOFMS: Issues and method validation in nutritional metabolomics*; Philippe A. Guy, Isabelle Tavazzi, Stephen J. Bruce, Ziad Ramadan, Sunil Kochhar; gepubliceerd april 2008, *Journal of Chromatography B*, 871 (2008) pagina 253–260
18. Naz et al. 2014: *Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics*; Shama Naz, Maria Vallejo, Antonia García, Coral Barba; gepubliceerd april 2014, *Journal of Chromatography A*, 1353 (2014) Pagina 99–105
19. Swenson, Northen et al. 2019: *Untargeted Soil Metabolomics Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and Gas Chromatography–Mass Spectrometry*; Tami L. Swenson and Trent R. Northen; Edward E.K. Baidoo (ed.), *Microbial Metabolomics: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1859, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8757-3_4, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019, Pagina 97-109
20. Olivera Melo et al. 2021: *Univariate statistical analysis of gas chromatography – mass spectrometry fingerprints analyses*; Tamires Oliveira Melo, Luziane Franciscon, George Brown, Joachim Kopka, Luis Cunha, Federico Martinez-Seidel, Luiz Augusto dos Santos Madureira, Fabricio Augusto Hansel, TPI Network; gepubliceerd mei 2021, *Chemical Data Collections* 33 (2021) 100719
21. Wang et al. 2017: *Recommendations for Improving Identification and Quantification in Non-Targeted, GC-MS-Based Metabolomic Profiling of Human Plasma*; Hanghang Wang, Michael J. Muehlbauer, Sara K. O'Neal, Christopher B. Newgard, Elizabeth R. Hauser, James R. Bain and Svati H. Shah; gepubliceerd augustus 2017, *Metabolites*. 2017;7:45. doi: 10.3390/metabo7030045
22. Vergelijking van Arrhenius: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/06%3A_Modeling_Reaction_Kinetics/6.02%3A_Temperature_Dependence_of_Reaction_Rates/6.2.03%3A_The_Arrhenius_Law/6.2.3.01%3A_Arrhenius_Equation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/06%3A_Modeling_Reaction_Kinetics/6.02%3A_Temperature_Dependence_of_Reaction_Rates/6.2.03%3A_The_Arrhenius_Law/6.2.3.01%3A_Arrhenius_Equation), geraadpleegd augustus 2022
23. Raczyk et al. 2017: *Effect of Fatty Acid Unsaturation on Phytosteryl Ester Degradation* Marianna Raczyk, Dominik Kmiecik, Roman Przybylski, Magdalena Rudzińska; *J Am Oil Chem Soc.* 2017; 94(5): pages 701–711. april 2017, doi: 10.1007/s11746-017-2979-x
24. Metaboanalyst analyse tool: <https://www.metaboanalyst.ca/> , geraadpleegd februari 2022
25. Dagesse et al. 2011: *Effect of Freeze-Drying on Soil Aggregate Stability*; Daryl Dagesse Geography Dep. Brock Univ. St. Catharines, ON, L2S 3A1 Canada, gepubliceerd november 2011;

Soil Science Society of America Journal; Madison Vol. 75, Iss. 6, (Nov/Dec 2011): Pagina 2111-2121

Bijlagen

Bijlage I: Finale methode

Monstervoorbewerking

Apparatuur:

Vacuümverdamper (speedvac)
Centrifuge voor 15 ml falcon tubes
Centrifuge voor eppjes
Eppjes 2 ml
GC vials met insert
Falcon tubes 15 ml
Waterbad

Chemicaliën:

Methanol (Superclo., CAS nr. 67-56-1, LC-MS grade);
Methoxyamine hydrochloride (Sigma-Aldrich®, CAS nr. 593-56-6, 98%);
MSFTA (Marcherey Nagel, CAS nr. 24589-78-4, zuiverheid ≥99%);
Pyridine (Honeywell, CAS nr. 110-86-1, zuiverheid ≥99,9%);
Dichloormethaan (VWR, CAS nr. 75-09-2, >99%);

Vriesdrogen (Foodlab):

De bodemonsters worden ingevroren op –80 °C voor ongeveer 24 uur, in 15 ml of 50 ml falcon tubes. Hierna worden deze (zonder dop) bedekt met een op maat geknipte doek of gaas, zodat het vocht kan worden afgezogen. Deze worden vast gemaakt met een elastiek, let hierbij op dat deze niet in contact komen met het monster. De vriesdroger wordt bediend volgens de bijbehorende SOP van het apparaat.

Instellingen vriesdroger: Temperatuur ice condenser = -60 °C, Heater = 5 °C, Set Pa = 0,3 mbar, Time set = ~48h (circa. 2880 minuten)

Extractie:

Weeg 1 gram grondmonster af (vermaal grote korrels door hier voorzichtig op te drukken met de spatel/lepel) op een weeg bootje. Breng deze over in een 15 ml falcon tube en weeg het weegbootje terug. Extraheer het monster met 2ml dichloormethaan:methanol 2:1 (v/v), deze worden gedaan door te vortexen op 2400 RPM voor 30 seconden. Centrifugeer dit 3 minuten op 5000 RPM[*] en breng het supernatant per monster over naar een aparte 15 ml falcon tube. Herhaal dit twee keer, zodat het monster in totaal drie keer wordt geëxtraheerd. Breng van het supernatant 2 ml over in een 2 ml eppje, neem ook 2 ml pure extractievloeistof in een apart eppje mee zonder grond als blanco meting. Plaats deze daarna in de vacuümverdamper en damp het in op 60 °C (niet voorverwarmd) tot deze zijn droog gedampt, ongeveer 60 minuten.

Methoxyamine oplossing:

Weeg 71,05 mg Methoxyamine-chloride af op een analytische balans (zuurkast) op een weeg papiertje en breng dit over naar een eppje. Voeg 1 ml pyridine toe om een 40 mg/ml methoxyamine oplossing te maken, los deze op door middel van sonificatie/vortex verwarmd op 60 °C.

Derivatisatie:

Voeg aan het ingedampde monster 30 µl methoxyamine in pyridine oplossing toe (zie beschrijving hierboven). Vortex en verwarm op 50 °C voor 30 minuten. Voeg hierna 100 µl MSFTA toe om de derivatisatie te starten. Verwarm op 90 °C voor 120 minuten, centrifugeer daarna voor 5 minuten

op maximale snelheid, met een temperatuur van 4 °C. Pipetteer het supernatant over naar een GC-MS vial met insert.

GC Methode

Instrument:

ISQ Thermo Scientific Trace 1300 GC-MS

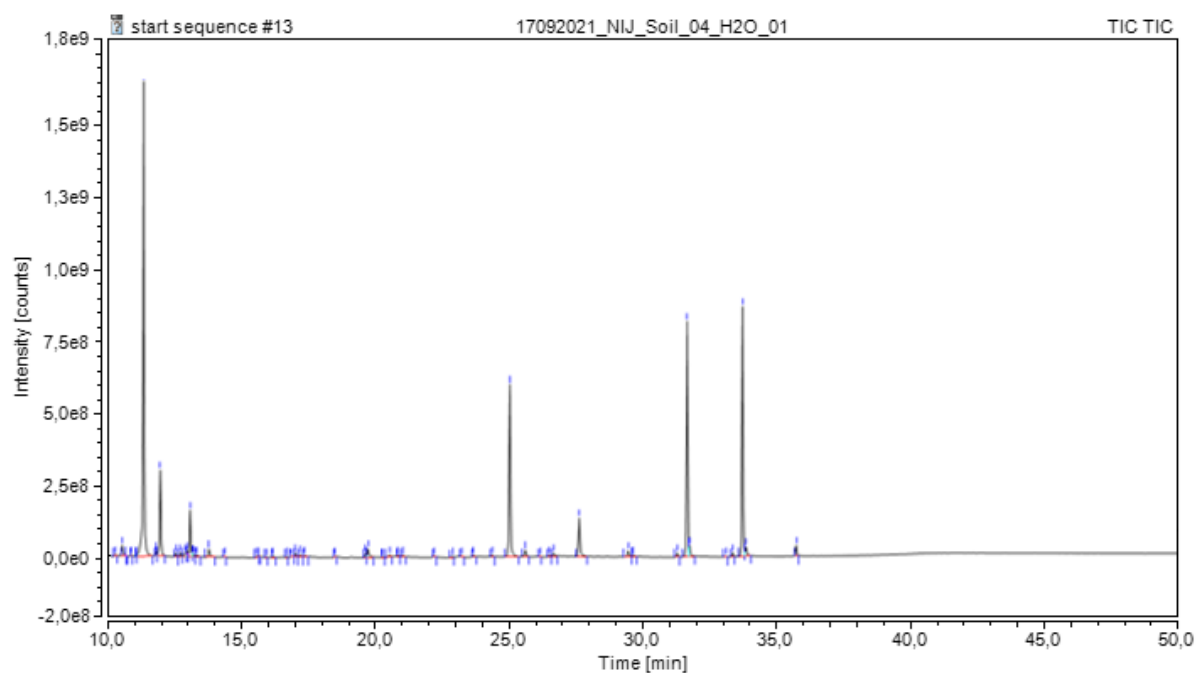
Instellingen:

Injectie volume	1 µl
Split ratio	1:30
Inlet temperatuur	250 °C
Purge flow	5,0 ml/min
Gas saver flow	10,0 ml/min
Gas saver time	2,50 min
Ion source temperatuur	310 °C
Ion Collision	70 eV
Mass filter	[50-700]

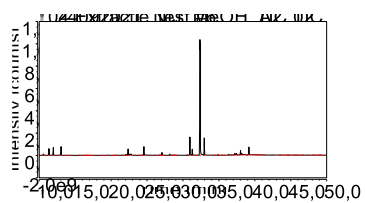
Temperatuurgradiënt:

Start op 50 °C en wordt vastgehouden voor 1 minuut, daarna wordt deze verhoogd naar 65 °C met 5 °C/min. Dit wordt vastgehouden voor 0,2 minuten en wordt daarna verhoogd naar 100 °C met een helling van 7 °C/min. Deze wordt ook voor 0,2 minuten vastgehouden, waarna de temperatuur wordt verhoogd naar 310 °C met 7 °C/min. Als laatste houdt het systeem de 310 °C voor 10 minuten constant. De methode is inclusief een Prep run timeout van 10 minuten.

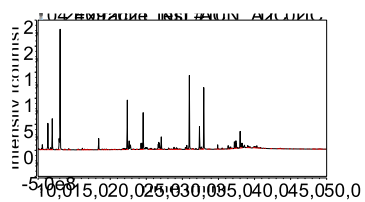
Bijlage II: Chromatogrammen grondmonsters geëxtraheerd met selectie extractievloeistoffen



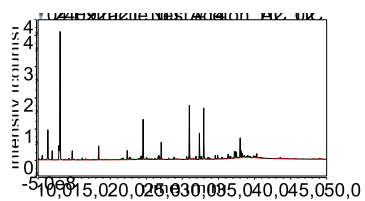
Figuur 27 – Chromatogram van de bodemonsters geëxtraheerd met 100% water.



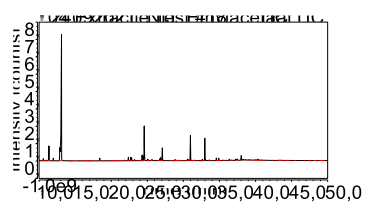
Figuur 28 - Chromatogram van de bodemonsters geëxtraheerd met methanol



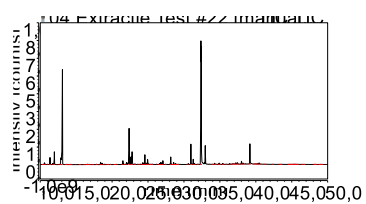
Figuur 29 - Chromatogram van de bodemonsters geextraheerd met actonitril



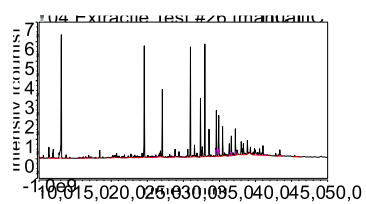
Figuur 30 - Chromatogram van de bodemonsters geextraheerd met aceton.



Figuur 31 - Chromatogram van de bodemonsters geextraheerd met ethylacetaat.



Figuur 32 - Chromatogram van de bodemonsters geextraheerd met acetonitril:i-propanol:water 3:3:2 (v/v/v).



Figuur 33 - Chromatogram van de bodemonsters geextraheerd met chloroform:methanol 2:1 (v/v)

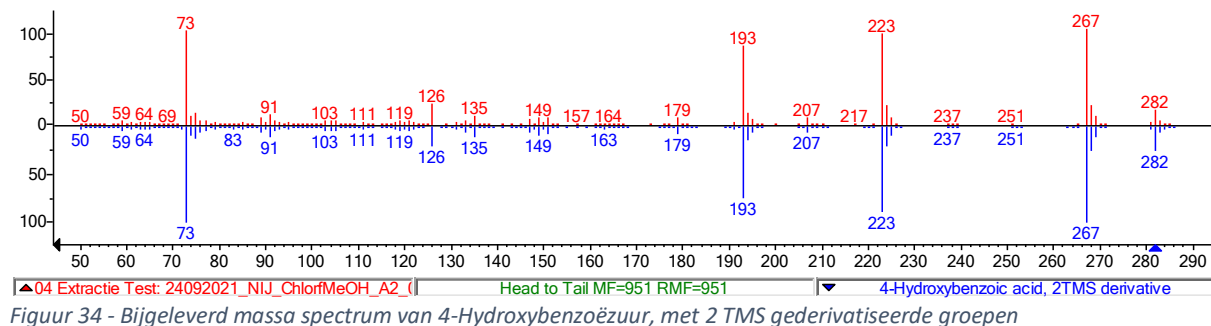
Bijlage III: Componenten lijst

No.	Peak Name	Retention Time
		min
TIC	TIC	TIC
4	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide RSI=752	10.589
5	Diethylene glycol, 2TMS derivative	11.359
7	Ethanolamine, 3TMS derivative	11.734
8	Octanoic acid, TMS derivative	11.801
10	Glycerol, 3TMS derivative	11.965
19	Nonanoic acid, TMS derivative	13.716
20	p-Toluic acid, TMS derivative	13.752
23	Decanoic acid, TMS derivative	15.521
27	Tiglic acid, TMS derivative	16.13
28	2,4-Di-tert-butylphenol (53,6% Prob)	16.459
30	2,4-Di-tert-butylphenoxytrimethylsilane	16.875
35	4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative	18.405
36	Dodecanoic acid, TMS derivative	18.839
43	Phosphoric acid, oxy propyl ester	20.452
46	Phosphorylethanolamine, 4TMS derivative	20.755
48	Azelaic acid, 2TMS derivative	21.071
50	1-Pentadecanol, TMS derivative	21.489
51	Neophytadien	21.669
53	Myristic acid, TMS derivative	21.831
56	d-Glucose, pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1E)-	22.37
57	Methyl galactoside, 4TMS derivative (isomers?)	22.442
58	d-Glucose, -pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1Z)-	22.632
59	Pentadecanoic acid, TMS derivative	22.711
60	D-Mannitol, 6TMS derivative (25% prob)	22.788
62	4-Coumaric acid, 2TMS derivative	23.112
69	Palmitic Acid, TMS derivative	24.072
70	Palmitelaidic acid, TMS derivative	24.275
72	Palmitelaidic acid, TMS derivative (Isomer?)	24.422
73	Palmitic acid, TMS	24.578
74	: 6''-O-Acetylglycitin	24.85
75	Myo-Inositol, 6TMS derivative	24.948
77	Heptadecanoic acid, TMS derivative	25.094
80	Octadecanenitrile	25.405
85	Silane, dimethyl(octadecyloxy)propyl- (Kolom?)	26.034
89	Monolaurin, 2TMS derivative	26.589
90	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	26.658
91	Oleic Acid, (Z)-, TMS derivative (45% prob)	26.74
92	Oleic Acid, (Z)-, TMS derivative	26.822
93	Stearic acid, TMS derivative	27.084
98	10-Nonadecenoic acid, (Z)-, TMS derivative	28.099

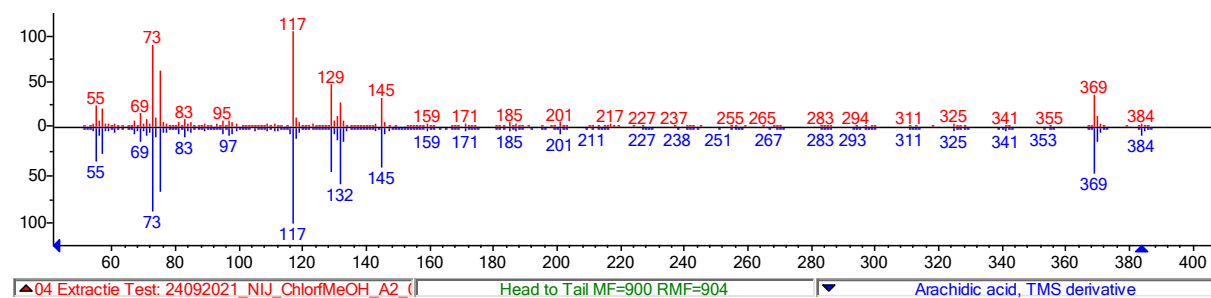
99	D-Myo-Inositol, pkis-O-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) phosphate	28.137
100	Nonadecanoic acid, TMS derivative	28.253
101	13,14-Dihydro-15(R)-prostaglandin E1	28.379
103	1-Monomyristin, 2TMS derivative	28.854
105	Ethanol, 2-butoxy-, phosphate (3:1)	29
106	Arachidic acid, TMS derivative	29.393
110	Phenol, 2,4-bis(1-methyl-1-phenylethyl)-	30.071
111	Eicosanenitrile	30.297
112	Heneicosanoic acid, TMS derivative	30.489
113	Docosanol, TMS derivative	30.589
114	2-Palmitoylglycerol, 2TMS derivative	30.618
115	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	30.982
116	Sucrose, 8TMS derivative (36% prob)	31.29
118	Behenic acid, TMS derivative	31.542
120	3-Dimethyl(octyl)silyloxypentadecane (29,5% prob)	31.886
122	Lactose, 8TMS derivative (45% prob)	32.369
124	Trimethylsilyl tricosanoate	32.567
125	2-Monostearin, 2 TMS	32.626
126	Glycerol monostearate, 2TMS derivative	32.977
128	Lignoceric acid, TMS derivative	33.555
130	Tricin	33.817
136	1-Hexacosanol, TMS derivative	34.572
138	Leupeptin	34.821
143	Hexacosanoic acid, TMS derivative	35.435
146	Cholestan-3-ol, (3 α ,5 β)-, TMS derivative (45% prob)	35.766
151	Cholestan-3-ol, (3 β ,5 α)-, TMS derivative	36.449
153	Trimethylsilyl 24-(trimethylsilyloxy)tetracosanoate	36.647
154	Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3 β ,22E)-, TMS derivative	36.706
158	Trimethylsilyl octacosanoate	37.204
159	Campesterol, TMS derivative	37.271
162	Stigmasterol, TMS Derivative	37.489
164	Stigmast-5-ene, 3 β -(trimethylsiloxy)-, (24S)-	38.021
165	1-Triacontanol, TMS derivative	38.08
166	Stigmastanol, TMS derivative	38.118
168	Olean-18-en-3-ol, O-TMS, (3 β) (RSI=741)	38.321
170	9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3 β)-, TMS derivative	38.614
174	9,19-Cyclolanostan-3-ol, 24-methylene-, (3 β)-	39.073
182	Hydrastine	40.152
183	Ursolic acid, 2 TMS	40.319

Bijlage IV: Massa spectra targeted componenten

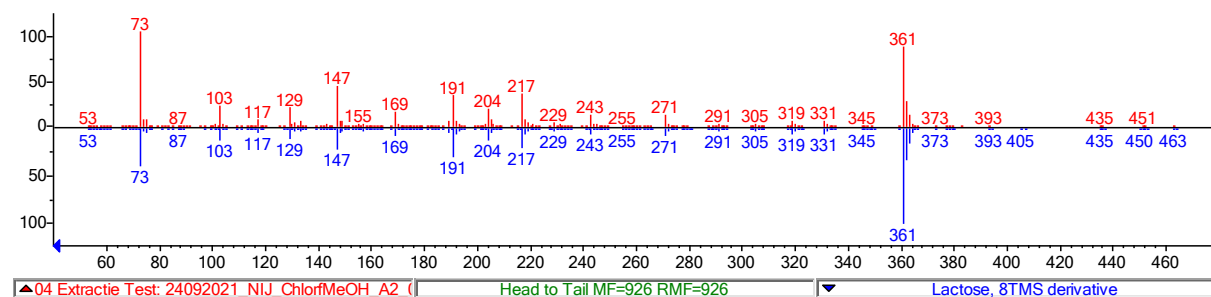
De volgende spectra zijn uit het chromatogram van figuur ** gehaald en staan hieronder weergegeven op volgorde van pieknummer.



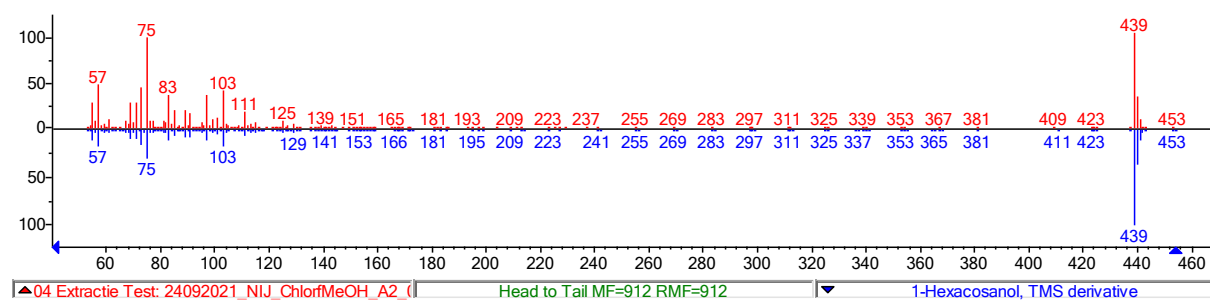
Figuur 34 - Bijgeleverd massa spectrum van 4-Hydroxybenzoëzuur, met 2 TMS gederivatiseerde groepen



Figuur 35 - Bijgeleverd massa spectrum van Arachidinezuur, met 1 TMS gederivatiseerde groep



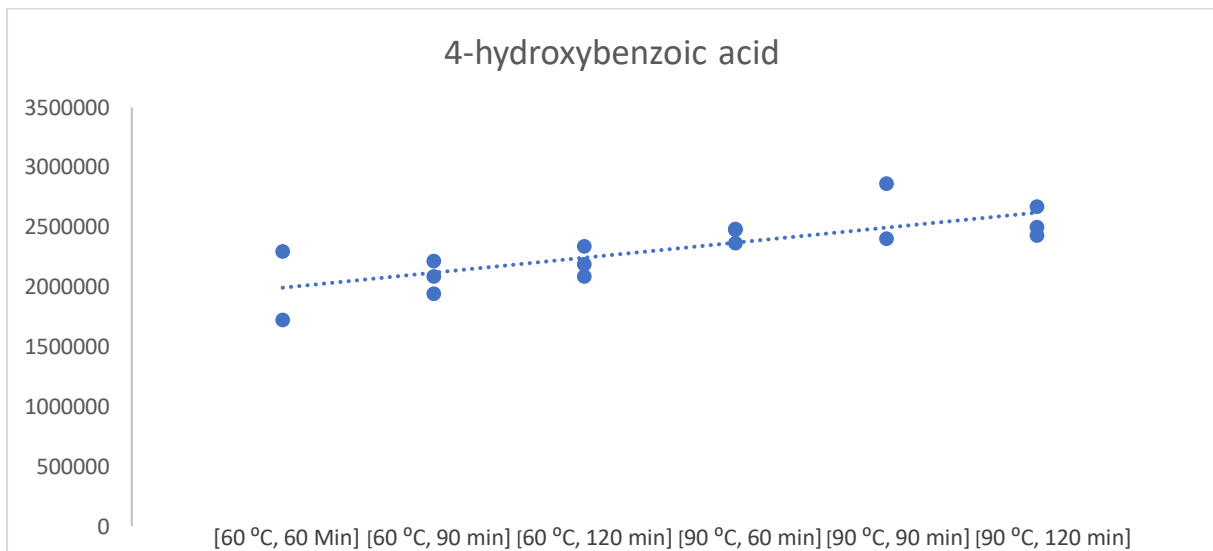
Figuur 36 - Bijgeleverd massa spectrum van Lactose, met 8 TMS gederivatiseerde groepen. Massa 463 is aanwezig alleen niet zichtbaar in deze weergave van het massa spectrum



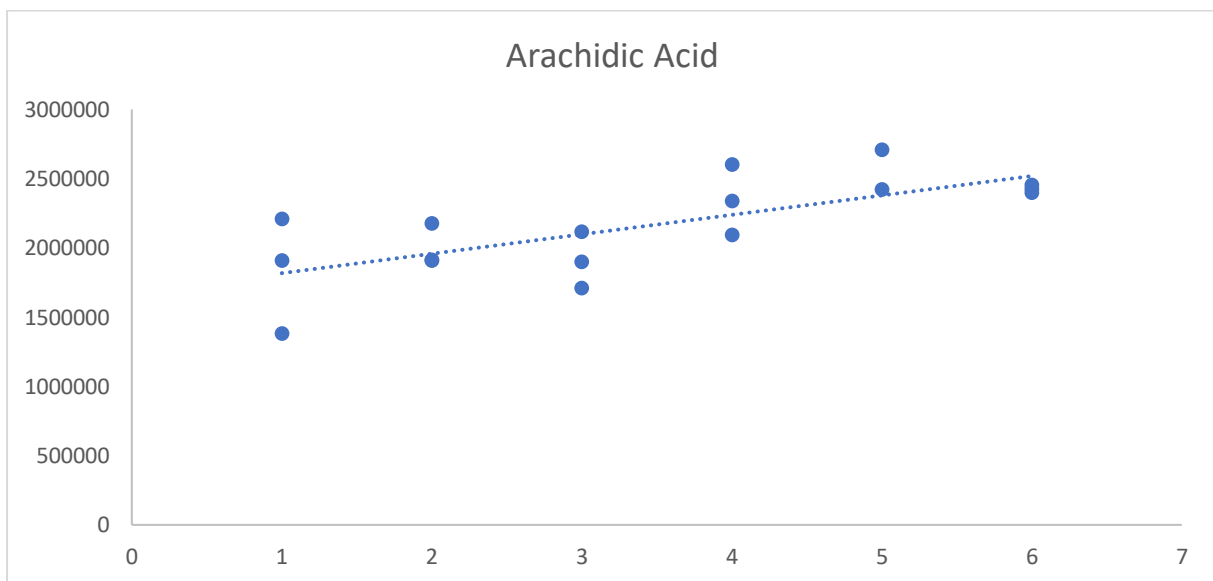
Figuur 37 - Bijgeleverd massa spectrum van 1-Hexacosanol, met 1 TMS gederivatiseerde groep

Figuur 38 - Bijgeleverd massa spectrum van Stigmasterol, met 1 TMS gederivatiseerde groep

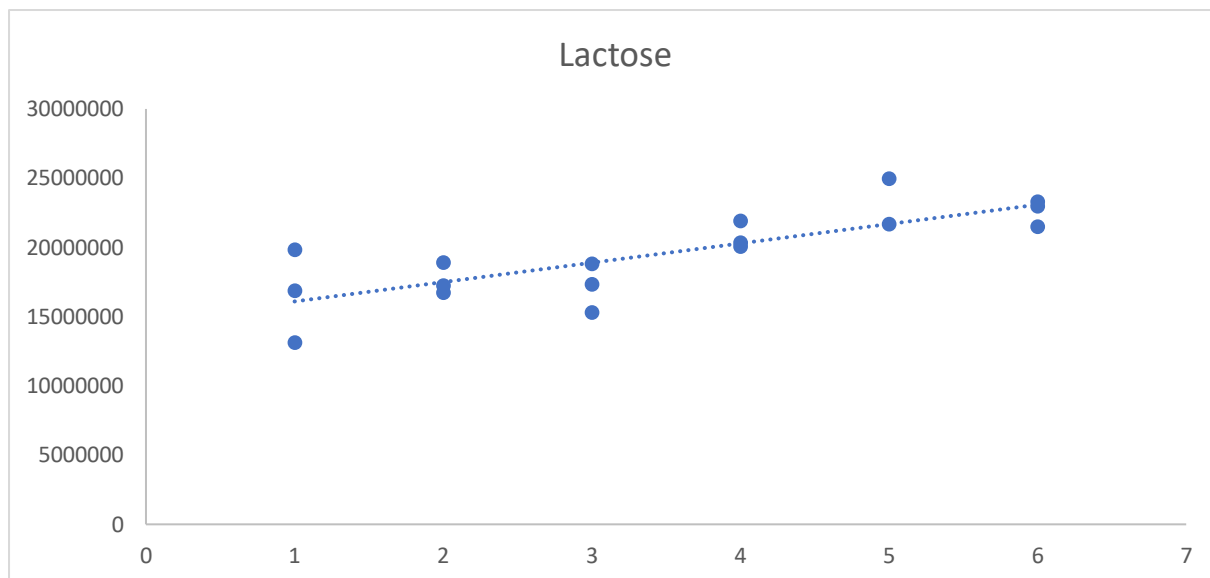
Bijlage V: Spreidingsgrafieken derivatisatie optimalisatie



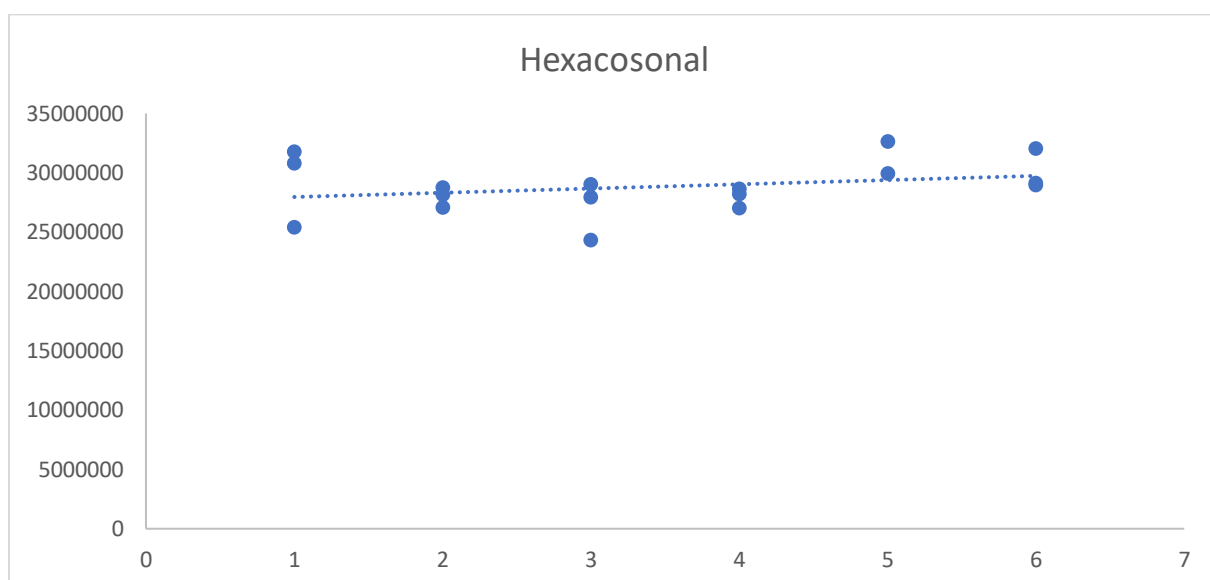
Figuur 39 -



Figuur 40 -



Figuur 41 -



Figuur 42 -

