De ontwikkeling van een GC-methode voor de identificatie van feromonen van de rode Amerikaanse rivierkreeft



Maurits Wildeboer Leiden Centre for Applied Biosciences (LCAB) Lectoraat Metabolomics 1 september 2021 – 28 februari 2022

# Titelblad

De ontwikkeling van een GC-methode voor de identificatie van feromonen van de rode Amerikaanse rivierkreeft.

Naam	Maurits Wildeboer
Studentnummer	s1100622
Datum	18-3-2022
Stageperiode	01-09-2021 t/m 28-02-2022



Bedrijf	Leiden Centre for Applied Bioscience
Afdeling	Lectoraat Metabolomics
Adres	Darwinweg 24 2333 CR leiden
E-mail	LCAB@hsleiden.nl
Lector	Dr. Peter Lindenburg
Externe begeleider	Dr. André van Roon
Praktisch begeleider	Ing. Marco van Klink



Onderwijsinstelling	Hogeschool Leiden
Adres	Zernikdreef 11, 2333 CK Leiden
Afdeling	Faculteit Science and Technology
Opleiding	Chemie
Specialisatie	Analytische Chemie
1e examinator	Dr. Siswati Lasalvia-Lestari
1e examinator	Dr. Siswati Lasalvia-Lestari
2e examinator	Dr. Natasja Carol-Visser

# Lijst met afkortingen

GC-MS	Gaschromatografie gekoppeld aan een massaspectrometer
LC-MS	Vloeistofchromatografie gekoppeld aan een massaspectrometer
PTV	Programmed Temperature Vaporizer
NIST	National Institute of Standards and Technology
SPE	Soldid Phase Extraction
MCX	Mixed Mode strong Cation Exchange
MAX	Mixed Mode strong Anion Echchange
MTBSTFA	N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide
TBDMS	Tert-butyldimethylsilyl
%RSD	Relatieve Standaard Deviatie

## Summary

This graduation report describes a research project at the research group metabolomics of the Leiden center of Applied Biosciences (LCAB). The aim of this project was to develop a GC-MS method for the identification of red swamp crayfish pheromones (Procambarus clarkii). Once this method has been developed, it can be used to monitor a population of crayfish by analyzing water samples. This is much less labour-intensive compared to the current method: the manual capture and registration of the crayfish.

Biogenic amines were expected to be potential pheromones of the crayfish. For this reason the method was developed on the basis of a mixing standard consisting of eight amino acids octopamine and serotonin. Water samples were processed with the Waters MCX SPE column. After solid phase extraction, the samples were derivatized with MTBSTFA and as catalyst pyridine. All samples were analyzed on the GC-MS. The NIST database was used to identify the analytes.

During the method development the split ratio of the GC injection and the recovery percentage of the SPE procedure were optimized. After optimization, the reproducibility and the detection limits of the analytical method were determined. Finally a selection of water samples were analyzed obtained from previously performed laboratory experiments with crayfish in aquaria.

The results show that the analytical method is capable of identifying biogenic amines in water samples. However no pheromones specific for the red American crayfish were identified. It was concluded that the detection limits of the method for the pheromones are too high. As a result, the analytical method is not yet able to monitor a population of crayfish.

## Samenvatting

Dit afstudeerverslag beschrijft een onderzoekproject wat uitgevoerd werd bij het lectoraat metabolomics van het Leiden centre of Applied Biosciences (LCAB). Het doel van dit project was het ontwikkelen van een GC-MS methode voor de identificatie van de feromonen van de rode Amerikaanse rivierkreeft (Procambarus clarkii). Wanneer deze methode ontwikkeld is kan het worden ingezet tijdens het monitoren van een populatie rivierkreeften door watermonsters te analyseren. Dit is veel minder arbeidsintensief in vergelijking met de huidige werkwijze: het handmatig vangen en registreren van de rivierkreeften.

Er werd verwacht dat biogene amines potentiële feromonen van de rivierkreeften zijn. Hierom werd de methode ontwikkeld aan de hand van een mengstandaard bestaande uit acht aminozuren, octopamine en serotonine. Watermonsters werden opgewerkt met de Waters MCX SPE kolom. Na extractie werden de monsters gederivatiseerd met MTBSTFA en als katalysator pyridine. Alle monsters werden geanalyseerd op de GC-MS. De NIST-database werd gebruikt om de analieten te identificeren.

Tijdens de methodeontwikkeling werden de splitverhouding van de GC injectie en het terugvinding percentage van de SPE procedure geoptimaliseerd. Na optimalisatie werden de reproduceerbaarheid en de detectielimieten van de analysemethode bepaald. Ten slotte werd een selectie van watermonsters geanalyseerd die waren verkregen uit eerder uitgevoerde experimenten met rivierkreeften in aquaria.

De resultaten laten zien dat de analysemethode in staat is om biogene amines in watermonsters te identificeren. Echter werden er geen specifieke feromonen geïdentificeerd voor de rode Amerikaanse rivierkreeft. Er werd geconcludeerd dat de detectielimieten van de methode voor de feromonen te hoog zijn. Hierdoor is de analysemethode nog niet in staat om de aanwezigheid van de rivierkreeft in een watergebied aan te tonen.

# Inhoudsopgave

Tite	Iblad	2
Lijst	t met afkortingen	3
Sum	nmary	4
Sam	nenvatting	5
1.	Inleiding	8
	1.1 Rivierkreeften in Nederland	8
	1.2 Problemen door de rode Amerikaanse rivierkreeft in een hoogheemraadschap	8
	1.2 Monitoringsonderzoek	8
	1.4 Analytische chemie als monitoringstechniek	9
	1.4 Wegvangen van de kreeften	9
	1.5 Raak initiatief	9
	1.6 Onderzoek uit het verleden bij het LCAB	10
	1.7 Doel van dit onderzoek	10
	1.8 Verantwoording analysetechniek	11
	1.9 Detectielimieten	12
	1.10 Reproduceerbaarheid	12
2.Tł	neoretische hoofdstukken	13
	2.1 (e)Metabolomics	13
	2.2 Componenten uit de mengstandaard	13
	2.3 Feromonen	13
	2.4 Derivatisatie reactie met MTBSTFA	14
	2.5 MCX en MAX SPE kolom	14
3.M	lethode	16
	3.1 Chemicaliën	16
	3.2 Apparatuur	16
	3.3 Chromatografische condities	16
	3.4 Kreeften aquaria	16
	3.5 Testmonster aquarium	17
	3.6 Mengstandaard	17
	3.8 Derivatisatie reactie	
	3.9 Split verhouding optimalisatie	
	3.10 Optimalisatie SPE procedure	
	3.11 Testmonsters	19
	3.12 Bepalen prestatiekenmerken	20
	3.13 Watermonsters vanuit het RAAK initiatief	21

4. Resultaten en discussie	. 22
4.1 Optimalisatie derivatisatie reactie	. 22
4.1.1 Verlengen van de reactietijd	.24
4.1.2 Slootwater testmonster derivatiseren met pyridine en acetonitril	. 25
4.2 Optimalisatie Split verhouding	. 27
4.3 Optimalisatie Solid Phase Extraction	. 29
4.3.1 SPE met de MAX kolom	.31
4.4 Testmonsters	. 32
4.4.1 Kraanwater testmonsters	. 32
4.4.2 Testmonster opgewerkt met een lager monstervolume	. 33
4.5 Prestatiekenmerken LOD en reproduceerbaarheid	. 35
4.5.1 Serotonine kalibratielijnen	. 36
4.5.2 Reproduceerbaarheid	. 37
4.6 De twintig geanalyseerde monsters uit het RAAK initiatief	. 38
5.Conclusie en aanbevelingen	.40
6. Referenties	.41
7. Bijlagen	.44
Bijlage A Flowschema van proces van de methode ontwikkeling	.44
Bijlage B: Chromatogrammen horende bij de derivatisatie optimalisatie	.44
Bijlage C: Retentietijden van de componenten uit de mengstandaard	.45
Bijlage D: Vergelijking in piekoppervlakte bij het gebruik van de katalysator pyridine en acetonitril	.46
Bijlage E: Relatieve standaarddeviaties na 4 uur en 8 uur derivatiseren	.46
Bijlage F: Gemeten piekoppervlaktes tijdens de split optimalisatie	.47
Bijlage G: Piekoppervlaktes geanalyseerd tijdens het bepalen van het terugvinding percentage	e . 48
Bijlage H: Componenten geïdentificeerd in het blanco testmonster	.49
Bijlage I: Componenten geïdentificeerd in het slootwater testmonster	.49
Bijlage J: Componenten geïdentificeerd in het kraanwater testmonster	. 50
Bijlage K: componenten geïdentificeerd in het kraanwater testmonster met als monstervolum 250 mL	າe . 51
Bijlage L: Data gebruikt voor het berekenen van de prestatiekenmerken	. 52
Bijlage M: Componenten geïdentificeerd in de aquarium watermonsters vanuit het RAAK initiatief	.54
Bijlage N: Structuurformules van taurocholic acid en petromuzonamine	. 55

# 1. Inleiding

### 1.1 Rivierkreeften in Nederland

Een inheemse rivierkreeft in Nederland is de Europese rivierkreeft. Tot in de tweede helft van de 19<sup>e</sup> eeuw was dit een soort die veelvuldig voorkwam. Hij werd graag geconsumeerd. In het Oosten van het land kwam hij vaker voor dan in het Westen van het land. Echter zijn de aantallen van deze soort sindsdien sterk afgenomen. In 2006 kwam de kreeft voor beperkt tot één vijver op landgoed Warnsborn bij Arnhem. Omdat vissers steeds minder rivierkreeften vingen zijn in 1890 in West-Europa verschillende pogingen gedaan om de gevlekte Amerikaanse rivierkreeft te introduceren. Deze uitzettingen hebben ervoor gezorgd dat deze soort in 1968 ook in Nederland is gesignaleerd.

Tegenwoordig komt de soort in een groot gebied in Nederland voor. Een andere kreeftensoort die zich in de afgelopen decennia in Nederland heeft gevestigd is de Turkse rivierkreeft. Nadat de inheemse Europese rivierkreeft vanaf 1973 wettelijk is beschermd is deze soort uitgezet in Twente en de Achterhoek. Deze rivierkreeft is uitstekend voor consumptie en wordt ook commercieel gekweekt. Vanaf 1985 zijn er in Nederland meldingen gedaan van een derde uitheemse rivierkreeft. De rode Amerikaanse rivierkreeft. De verwachting was dat deze soort zich niet blijvend in Nederland zou vestigen. Maar tot op heden blijkt de soort zich in grote hoeveelheden in Nederland te hebben gevestigd. <sup>[1]</sup> In afbeelding 1 zijn de Turkse, rode Amerikaanse en Europese rivierkreeft weergegeven.



*Afbeelding 1: Links de Turkse rivierkreeft, in het midden de rode Amerikaanse rivierkreeft en rechts de inheemse Europese rivierkreeft.*<sup>[2]</sup>

#### 1.2 Problemen door de rode Amerikaanse rivierkreeft in een hoogheemraadschap

De rode Amerikaanse rivierkreeft veroorzaakt problemen in watergebieden in Nederland. Om deze problemen te illustreren zal het hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden als voorbeeld worden gebruikt. Sinds juli 2005 is in het Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden door omwonenden en voorbijgangers waargenomen dat er in de Kamerikse wetering steeds minder waterplanten stonden. Het water was troebel en er leefden veel kreeften in de wetering.

Later is er ontdekt dat het ging om een nieuwe kreeftensoort voor Nederland de rode Amerikaanse rivierkreeft. In 2008 is er in het gebied een onderzoek gestart naar causale verbanden tussen de aanwezigheid van de kreeften en het verdwijnen van waterplanten. Ook zijn maatregelen onderzocht om de kreeften in het gebied te beheren. Tijdens het onderzoek lag de nadruk op de rode Amerikaanse rivierkreeft en de geknobbelde Amerikaanse rivierkreeft. Uit het onderzoek bleek dat het wegvangen van de kreeften een succesvolle maatregel zou zijn. <sup>[3]</sup>

#### 1.2 Monitoringsonderzoek

Om de populatie rivierkreeften in een gebied in kaart te brengen worden monitoringsonderzoeken uitgevoerd. Dit gebeurt door de kreeften handmatig te vangen en te registeren. In het hoogheemraadschap is in 2011 door muskusrattenbeheer in drie ronden een monitoring onderzoek uitgevoerd. Tijdens de trek van de muskusratten zijn fuiken en kooien gebruikt om de dieren te vangen. In deze fuiken en kooien wordt ook bijvangst aangetroffen dat direct dient te worden teruggezet. Tijdens dit monitoringonderzoek hebben de vangers bijgehouden welke soorten kreeftachtigen zij aantroffen als bijvangst.

Uit dit onderzoek is geconcludeerd dat muskusrattenbeheerders een goed beeld van de verspreiding van de rivierkreeften kan geven. Maar een kwantitatieve beoordeling bleek niet mogelijk door variatie van de aanlevering van de resultaten. Het opgestelde formulier om de waarnemingen te rapporteren werd door de muskusrattenvangers op verschillende wijze ingevuld.<sup>[3]</sup>

#### 1.4 Analytische chemie als monitoringstechniek

Analytische chemie zou bij het wegvangen van de kreeften en bij monitoringsonderzoeken een bijdrage kunnen leveren door de feromonen te identificeren van de rode Amerikaanse rivierkreeft. Wanneer tijdens een monitoringsonderzoek in watermonsters uit een gebied de feromonen worden aangetroffen kan er worden geconcludeerd dat de kreeften aanwezig zijn. Mogelijk kan er ook een inschatting worden gemaakt van het aantal rivierkreeften wat in een gebied leeft wanneer de concentratie feromonen in een watermonster kan worden bepaald. Bovendien is deze wijze van monitoren veel minder arbeidsintensief dan het vangen en registeren van de kreeften.

#### 1.4 Wegvangen van de kreeften

Een oplossing die voor de rivierkreeften plaag wordt aangedragen is het wegvangen van de kreeften.<sup>[4]</sup> Wanneer de feromonen waarmee de kreeften communiceren geïdentificeerd zijn kan dit ook helpen tijdens het wegvangen, door de kreeften met de feromonen te lokken naar een kooi. Op deze manier kan gemakkelijk zonder bijvangst worden weggevangen. Een Leidse kreeftenvisser Pieter Jan Keyser heeft het LCAB laten weten een vangwijze te gebruiken die hierop lijkt. De visser plaatst een kooi in de sloot waar al een aantal vrouwtjes inzitten. Hiermee lokt hij mannetjes en vrouwtjes rivierkreeften naar zijn kooi.

#### 1.5 Raak initiatief

Door het RAAK initiatief in 2018 <sup>[5]</sup> zijn er in een gecontroleerde omgeving in het foodlab in Leiden rode Amerikaanse rivierkreeften gehouden. De kreeften zijn gehouden in 22 aquaria met afmetingen van 30x30x30 cm. In 10 aquaria zijn volwassen mannetjes gehouden, en in 10 aquaria zijn volwassen vrouwtjes gehouden. In de overige twee aquaria zijn twee andere proefopzetten opgezet.

In één aquarium zijn een volwassen vrouwtje en een volwassen mannetje gehouden. In het laatste aquarium zijn twee volwassen mannetjes gehouden. Bij deze experimenten kan er worden onderzocht welke feromonen er vrij komen bij agressie tussen twee mannetjes en welke feromonen er vrij komen tijdens het lokken van een voortplantingspartner. Maandelijks zijn er monsters genomen uit de aquaria. De aquaria gebruikt tijdens dit onderzoek zijn weergegeven in afbeelding 1.



Afbeelding 1: De aquaria waarin de rode Amerikaanse rivierkreeften zijn gehouden.

Voor dit afstudeerproject is er gebruik gemaakt van de aquarium monsters uit het RAAK initiatief. Omdat in de aquaria de rivierkreeften in een minder grote hoeveelheid water hebben geleefd dan in een sloot of rivier is de verwachting dat in deze aquarium monsters de feromonen in hogere concentratie aanwezig zullen zijn dan in het oppervlaktewater. Dit maakt het makkelijker om met behulp van de analyseapparatuur de feromonen van de rivierkreeft te identificeren.

Bovendien zullen er in oppervlaktewater ook feromonen voorkomen van andere diersoorten die daar leven. Wanneer er een feromoon is geïdentificeerd is het moeilijker om met zekerheid vast te stellen dat de feromonen afkomstig zijn van de rode Amerikaanse rivierkreeft.

#### 1.6 Onderzoek uit het verleden bij het LCAB

Naar aanleiding van het RAAK initiatief heeft er bij het LCAB een project gelopen om een methode te ontwikkelen voor het identificeren en kwantificeren van biogene amines van de rode Amerikaanse rivierkreeft.

Deze methode bestond uit een monstervoorbewerking met SPE een derivatisatie reactie met MTBSTFA, en een analyse met GC-MS. De conclusie uit dit onderzoek is dat er met succes een mengstandaard is geanalyseerd die aminozuren en de feromonen octopamine en serotonine bevatte. Maar vooralsnog waren de detectielimieten van de analysemethode te hoog om nieuwe feromonen in de aquariumwater monsters te identificeren. <sup>[6]</sup>

#### 1.7 Doel van dit onderzoek

Het doel van dit onderzoek is het ontwikkelen van een GC-MS methode voor de identificatie van de feromonen van de rode Amerikaanse rivierkreeft in het aquariumwater uit het RAAK onderzoek. Dit doel kan worden opgebroken in drie subdoelen.

Het eerste subdoel is het verlagen van de detectielimieten van de bestaande methode, zodat er nieuwe feromonen in de aquariumwater monsters kunnen worden geïdentificeerd. Dit zal worden gedaan door de derivatisatie reactie uit het vorige onderzoek te optimaliseren. Het terugvinding percentage van de monstervoorbewerking met SPE te verhogen, en door splitverhouding van de GCinjectie te optimaliseren. Het bereiken van dit subdoel was een complex proces. Om meer inzicht in dit proces te geven is er van dit subdoel een flowschema opgesteld. Dit schema is te zien in figuur 1. Delen van dit schema zullen in het hoofdstuk resultaten en discussie terugkomen.

Het tweede subdoel is het bepalen en beoordelen van de reproduceerbaarheid en de detectielimiet van de analysemethode.

Het derde subdoel is het identificeren van nieuwe feromonen in de aquariummonsters van het RAAK initiatief.



Figuur 1: Flowschema van het proces van het verlagen van de detectielimieten van de bestaande methode.

### 1.8 Verantwoording analysetechniek

De analieten in dit onderzoek zijn feromonen in watermonsters, deze zijn niet-vluchtig en polair. Twee feromonen waarvan wordt verwacht dat de kreeften deze gebruiken tijdens de communicatie zijn weergegeven in afbeelding 2. <sup>[7]</sup> In het volgende hoofdstuk theoretische hoofdstukken zal hier meer aandacht aan worden besteed.

Wanneer er wordt gekeken naar de matrix en de structuurformule analieten ligt het gebruik van vloeistofchromatografie voor de hand. Toch is er gekozen voor het gebruik van de GC-MS. Dit heeft een belangrijke reden: de feromonen van de rode Amerikaanse rivierkreeft zijn nog niet bekend en moeten worden geïdentificeerd.

Voor dit doeleinde is de GC-MS geschikter dan LC omdat deze gebruik maakt van de National Instute of Standards and Technology (NIST) database. Verkregen massaspectra worden door de computer vergeleken met spectra uit de database voor een zo goed mogelijke match. Identificatie is hierdoor een stuk eenvoudiger. Ook is de ionisatietechniek van de GC-MS geschikter voor het identificeren van onbekende stoffen in monsters. De GC-MS maakt gebruik van electron impact ionization (EI). Dit is een harde ionisatietechniek waarbij veel verschillende massafragmenten worden gevormd.

De ionisatietechniek van de LC-MS electron spray ionization (ESI) is een zachte ionisatietechniek. Tijdens deze ionisatie worden minder massafragmenten gevormd. <sup>[8]</sup> Tijdens identificatie van nieuwe stoffen is vanwege de meerdere fragmenten EI geschikter dan ESI. Meer fragmenten leidt tot meer pieken in het massaspectrum, en een grotere kans op identificatie. Het nadeel van de analyse met GC-MS is dat de monsters voor analyse moeten worden gederivatiseerd om de polariteit en het kookpunt van de analieten te verlagen. Ook zullende de monsters voor derivatisatie worden voorbewerkt met Solid Phase Extration (SPE).



Afbeelding 2: Links de structuurformule van octopamine en rechts de structuurformule van serotonine<sup>. [9], [10]</sup>

#### 1.9 Detectielimieten

In een vergelijkbaar onderzoek zijn in Chili met SPE, derivatisatie en GC/MS pesticides gekwantificeerd in oppervlaktewater. In dit onderzoek zijn halve liter watermonsters genomen uit verschillende rivieren en beekjes. Deze halve liter is opgewerkt via SPE en geanalyseerd met behulp van de GC-MS. De concentraties van de pesticides in het oppervlaktewater varieerden tussen de 0,1 en 1,0 µg/L.<sup>[11]</sup>

Het is moeilijk om in te schatten of in dit onderzoek de concentraties van de analieten in de aquariummonsters vergelijkbaar zullen zijn. Ten eerste gaat het in het onderzoek in Chili om pesticides en niet om feromonen. Ten tweede zal er in dit onderzoek geen oppervlaktewater worden geanalyseerd maar aquarium water.

Door de Instrument Detection Limit (IDL) van beide massaspectrometers te vergelijken is er wel een inschatting gemaakt of het mogelijk is om met de GC-MS op het LCAB deze concentraties te bepalen. Op het laboratorium in het LCAB staat de Thermo Scientific ISQ QD. Dit instrument heeft een IDL van 10 fg/ $\mu$ L. <sup>[12]</sup> In het onderzoek in Chili is er gebruik gemaakt van de Agilent 5975C TAD GC/MSD. Dit instrument heeft een IDL van 24 fg/ $\mu$ L. <sup>[13]</sup> Dit is een aanwijzing dat het haalbaar is om dezelfde concentraties te bepalen als in het onderzoek uit Chili.

#### 1.10 Reproduceerbaarheid

Om de reproduceerbaarheid te beoordelen is er gebruik gemaakt van de horwitz functie. Deze functie is opgesteld door dr. William Horwitz. Hij ontdekte een verband tussen de relatieve standaarddeviatie van een analysemethode en de concentratie van een analiet in een monster. Wanneer de concentratie daalde met een factor twee. Steeg de relatieve standaarddeviatie met een factor twee. In formule 2.4 in het hoofdstuk methode is de Horwitz functie weergegeven. <sup>[14]</sup>

# 2. Theoretische hoofdstukken

#### 2.1 (e)Metabolomics

Het vakgebied metabolomics is ontstaan uit grootschalige studies naar kleine moleculen bekend als metabolieten. Deze metabolieten worden bijvoorbeeld onderzocht in: cellen, biovloeistoffen en weefsels. Gezamenlijk staan de metabolieten en hun interacties binnen een organisme bekend als het metaboloom. Deze benadering brengt direct de onderliggende biochemische activiteit van cellen en weefsels in kaart.

Een toepassing van metabolomics op het gebied van de menselijke gezondheid is de ontwikkeling van de gepersonaliseerde geneeskunde, ook wel bekend als personalized medicine.<sup>[15]</sup> Bij het lectoraat metabolomics van het LCAB is er de ambitie om de metabolomics benadering toe te passen op een ecosysteem dit heet ook wel enviromental metabolomics (eMetabolomics). Dit afstudeeronderzoek is onderdeel van het eMetabolics project. De chemische interacties binnen een ecosysteem worden op grote schaal in kaart gebracht. Wanneer deze interacties in kaart zijn gebracht, kan een sterke verandering in deze interacties een gevoelige indicator zijn voor externe stressoren van het ecosysteem.<sup>[16]</sup>

#### 2.2 Componenten uit de mengstandaard

Voor de methodeontwikkeling werd er gebruik gemaakt van een mengstandaard met 10 verschillende stoffen. Deze mengstandaard bestond uit biogene amines. De reden hiervoor is dat in het boek Chemical Communication in Crustaceans biogene amines genoemd worden als mogelijke signaalstoffen van de rivierkreeften. <sup>[17]</sup> Deze stoffen zijn weergeven in afbeelding 3. De mengstandaard bestond uit 8 aminozuren. Hierbij werd gelet op de zijgroepen van de aminozuren. De insteek was om een zo breed mogelijk spectrum aan (a)polariteit van analieten te analyseren. <sup>[6]</sup> Ook bevatte de mengstandaard twee feromonen octopamine en serotonine. Serotonine werd toegevoegd omdat in een artikel werd geconcludeerd dat deze stof het gedrag van rivierkreeften beïnvloedde. <sup>[7]</sup>



Afbeelding 3: Van links naar rechts de structuurformules van: glycine, valine, threonine, isoleucine, fenylalanine, lysine, hydroxyproline, serine, octopamine en serotonine.

#### 2.3 Feromonen

Feromonen zijn gedefinieerd als chemische signalen die worden gebruikt binnen een diersoort om te communiceren.<sup>[18]</sup> Rivierkreeften vervellen regelmatig om te kunnen groeien. Tijdens dit proces is een vrouwelijke rivierkreeft voor korte tijd vruchtbaar. Geslachtsferomonen komen vrij tijdens vroege stadia van het vervel proces. Deze feromonen trekken mannelijke rivierkreeften aan en lokken baltsgedrag bij hen uit.

Er zijn een aantal onderzoeken geweest naar welke chemische stof de vrouwtjes uitscheiden tijdens het vervel proces maar tot nu toe zijn deze nog niet succesvol geweest. <sup>[19]</sup> Mannelijke geslachtsferomonen van rivierkreeften zijn veel minder onderzocht. Mannetjes zijn over het algemeen het geslacht die het baltsgedrag initiëren. Het vermoeden is dat vrouwtjes niet worden aangetrokken door mannetjes met feromonen. Maar door de schuilplaats van een dominant mannetje. Wanneer een vrouwtje de schuilplaats van een mannetje bezoekt wordt de urineafgifte verhoogd. Wanneer de urineafgifte van een mannetje wordt geblokkeerd daalt de aantrekkelijkheid van de schuilplaats voor het vrouwtje. <sup>[20]</sup>

#### 2.4 Derivatisatie reactie met MTBSTFA

Trimethylsilyl derivaten worden routinematig gebruikt tijdens GC-MS analyses. Het MTBSTFA reageert met functionele groepen. Voorbeelden hiervan zijn primaire en secundaire amines en zuurgroepen. Tijdens deze reactie derivatiseren de functionele groepen tot vluchtigere esters en carbamaten. Hierdoor wordt het makkelijker om deze componenten te analyseren met GC-MS. Een voorbeeld van een derivatisatie reactie met een alcoholgroep en MTBSTFA is weergegeven in afbeelding 4. Echter vormen een aantal functionele groepen onder specifieke omstandigheden meerdere derivaten. Dit leidt tot meerdere pieken van hetzelfde component in de GC-MS analyse. <sup>[21]</sup>

Wanneer een molecuul meerdere functionele groepen heeft kan deze ook meerdere keren een derivatisatiereactie ondergaan. Wanneer een derivatisatie reactie niet volledig is verlopen kunnen hierdoor per component meerdere derivaten worden gevormd. Deze derivaten hebben een andere interactie met de stationaire fase van de GC-kolom. Niet volledig gederivatiseerde componenten zullen eerder van de GC-kolom afkomen dan volledig gederivatiseerde componenten.



Afbeelding 4: De derivatisatie reactie met een alcoholgroep en een TBDMS molecuul

#### 2.5 MCX en MAX SPE kolom

Monstervoorbewerking met SPE heeft een aantal voordelen. Analieten worden geconcentreerd. Monsters met complexe matrices worden schoner, doordat interferende stoffen in de matrix worden verwijderd. Dit verlaagt de detectielimieten van de analysemethode. Er zijn verschillende SPE kolommen op de markt die gemaakt zijn om verschillende klassen van analieten te analyseren <sup>[23]</sup>.

In dit onderzoek werd er gebruik gemaakt van de Mixed mode strong Cation eXchange kolom (MCX), en de Mixed mode strong Anion eXchange kolom (MAX). De MAX kolom is ontwikkeld voor de concentratie van zwakke zuren. De MCX kolom is ontwikkeld voor de concentratie van zwakke bases. In afbeelding 5 is een schematische weergave te zien van de interacties in beide kolommen.<sup>[24]</sup>



Afbeelding 5: Links de interactie tijdens de Solid Phase Extraction met de MAX kolom, rechts de interactie met de MCX kolom.

In de afbeelding is te zien is dat er twee verschillende interacties plaatsvinden in beide kolommen. Een reversed phase interactie, en een cation of anion exchange interactie. Het evenwicht tussen deze interacties kan worden aangepast door de pH te veranderen van de buffer die wordt gebruikt tijdens de SPE procedure. Bij gebruik van de MAX kolom resulteert een pH boven de 7 in een sterkere anion exchange en een zwakkere reverse phase interactie. Bij gebruik van de MCX kolom resulteert een pH onder de 7 in een sterkere cation exchange en een zwakkere reverse phase interactie. <sup>[24]</sup>

## 3.Methode

#### 3.1 Chemicaliën

Acetonitril ≥99,9%, CAS nr.: 275-05-8, Honeywell; Ammonia 7M CAS nr.: 7664-41-7, Alfa Aesar; Ammoniumformiaat ≥99%, CAS nr.: 540-69-2 VWR; Dichloormethaan 99,9%, CAS nr.: 75-09-2, VWR; Fosforzuur ≥85%, CAS nr.:7664-38-2, LiChropur®; Glycine ≥99%, CAS nr.:56-40-6, Sigma Aldrich; L-Fenylalanine ≥98%, CAS nr.: 63-91-2, Sigma Aldrich; L-Isoleucine ≥99%, CAS nr.: 73-32-5, Sigma Aldrich; L-Lysine monohydrochloride ≥99%, CAS nr.: 657-27-2, Sigma Aldrich; L-Serine ≥99%, CAS nr.: 56-45-1, Sigma Aldrich; L-Threonine ≥99%, CAS nr.: 67-26-1, Supelco LiChroSolv; Mierenzuur ≥99%, CAS nr.: 64-16-6, VWR; MTBSTFA (MBDSTFA) 95-100%, CAS nr.: 77377-52-7, Machery-Nagel; Natriumwaterstofcarbonaat assay 101%, CAS nr.: 144-55-8, VWR; Natriumcarbonaat decahydraat assay (NA2CO3) 37,4%, CAS nr.: 6132-02-1, VWR; Octopamine 99%, CAS nr.: 770-05-8, Alfa Aesar; Pyridine ≥99%, CAS nr.: 51-35-4, Sigma Aldrich; Water HPLC-grade, CAS nr.: 7732-18-5, Merck LiChroSolv.

#### 3.2 Apparatuur

Tijdens de Solid Phase Extractie werd er gebruik gemaakt van een Waters extraction manifold, en Oasis<sup>®</sup> prime MCX 6CC (150 mg) extraction cartridges. Ook werd er een Solid Phase extractie uitgevoerd met Oasis <sup>®</sup> MAX 1cc (30 mg) extraction cartridges.

Voor het afdampen van monsters onder stikstofstroom werd er gebruik gemaakt van de Zymark TurboVap™ LV Evaporator. De analyse van de monsters werd uitgevoerd met een Thermo Scientific ISQ QD Single Quadruple Mass Spectrometer. De GC maakte gebruik van een wcot fused silica 30mx0.25mm id coating cp-sil 8 cb low bleed/ms kolom.

#### 3.3 Chromatografische condities

De begintemperatuur van het ovenprogramma van de GC was 60°C voor 60 seconden. Hierna steeg de temperatuur met 10°C per minuut tot 300°C. Daarna bleef de temperatuur voor 12,5 minuten op 300°C. De totale analysetijd was 37,5 minuten. Er werd per analyse 1  $\mu$ L geïnjecteerd met een PTVinjectie. Bij deze injectie werd er geïnjecteerd bij 60 °C en werd het monster in de transferline met 13,5°C per minuut verhit tot 325°C. <sup>[25]</sup>

Tijdens de analyse van watermonsters, reproduceerbaarheidsmonsters en de standaarden uit de kalibratielijn werd er geïnjecteerd in de split modus met een split van 1:5. Tijdens de analyse van de mengstandaard en SPE terugvinding monsters werd er geïnjecteerd met een split van 1:50.

#### 3.4 Kreeften aquaria

Tussen februari 2021 en mei 2021 is vanuit het RAAK initiatief <sup>[5]</sup> een proefopzet geweest met rode Amerikaanse rivierkreeften in aquaria. Regelmatig zijn er monsters genomen uit de aquaria. De opzet bestond uit 22 aquaria opgesteld in het foodlab in Leiden. In 10 aquaria werd een mannetje geplaatst. In 10 aquaria werd een vrouwtje geplaatst. In één aquarium werd een mannetje en een vrouwtje geplaatst. In één aquarium werden twee mannetjes geplaatst. Om de mogelijke variatie in de resultaten door de verschillen in leeftijd en conditie van de kreeften zo klein mogelijk te houden, werd er gebruik gemaakt van kreeften van ongeveer gelijke grootte en leeftijd.

Een schematische weergave van de proefopzet is weergegeven in afbeelding 6. De eerste 20 aquaria hadden afmetingen van 30x30x30 cm. De laatste twee aquaria hadden afmetingen van 39x22x36cm.

Elk aquarium werd uitgerust met een luchtsteen en een schuilplaats. In de laatste twee aquaria met twee kreeften werd een gaas geplaatst om hen van elkaar te scheiden. Dit om te voorkomen dat de kreeften interacties met elkaar aan gingen. Er werden watermonsters genomen van 40 mL. Deze monsters werden gefiltreerd over een 0,20  $\mu$ M filter en opgeslagen bij 20°C. Wekelijks kregen de kreeften 1,6 gram van het voer CrustaGran van het merk Dennerle. Iedere maand is het water in de aquaria vervangen met vers kraanwater.<sup>[6]</sup>



Afbeelding 6: Schematische weergave van de kreeften aquaria proefopzet.

Met de monsters uit de eerste twintig aquaria waar apart de vrouwtjes en de mannetjes in werden geplaatst. Kunnen de geslacht specifieke feromonen van de kreeften worden geïdentificeerd. Met de monsters uit de het aquarium waar een mannetje en een vrouwtje in werden geplaatst kunnen de voortplantingsferomonen worden geïdentificeerd. Met de monsters uit het aquarium waar twee mannetjes in werden geplaatst kunnen de agressie feromonen worden geïdentificeerd.

#### 3.5 Testmonster aquarium

Tussen november 2021 en januari 2022 is er een proefopzet geweest met één aquarium met afmetingen van 40x33x30 cm. De monsters uit dit aquarium diende als testmonsters tijdens de ontwikkeling van de analytische methode. Het aquarium werd gevuld met slootwater en er werden 7 volwassen rode Amerikaanse rivierkreeften in geplaatst. De kreeften kregen dagelijks hetzelfde voer te eten als in de proefopzet tussen februari en mei. Na vier dagen werd er een monster genomen van 2 liter.

Hierna is in hetzelfde aquarium een proefopzet geweest met drie rode Amerikaanse rivierkreeften. Twee mannetjes en één vrouwtje. Ditmaal werd het aquarium gevuld met kraanwater. Er werd een blanco monster genomen van 2 liter kraanwater nadat het aquarium twee dagen leeg had gestaan. De drie kreeften werden in het aquarium geplaatst, en na twee dagen werd opnieuw een watermonster genomen van 2 liter. In deze periode hebben de kreeften geen voer gekregen. Na de monstername kregen de kreeften direct te eten. Hierna is na 10 dagen opnieuw een watermonster genomen van 2 liter. In deze periode kreeften iedere dag te eten. Wederom kregen de kreeften hetzelfde voer te eten als in de proefopzet tussen februari en mei.

#### 3.6 Mengstandaard

Tijdens de ontwikkeling van de methode werd er gebruik gemaakt van een mengstandaard. De mengstandaard bevatte acht aminozuren en twee feromonen. De aminozuren in de mengstandaard

waren: glycine, L-fenylalanine, L-isoleucine, L- lysine, L-serine, L-threonine, L-valine en trans-4hydroxy-L-proline. De twee feromonen waren serotonine en octopamine. Van iedere stof werd 10 mg afgewogen en opgelost in 1 mL water:methanol (60:40) oplossing. Vervolgens werd van iedere stof 100  $\mu$ L toegevoegd aan een telpotje. Op deze manier werd er 1 mL mengstandaard geprepareerd van de 10 benoemde stoffen met een concentratie van 1 mg/mL.

#### 3.8 Derivatisatie reactie

De mengstandaard van 1 mg/mL werd in triplo opgewerkt. Er werd verdund tot 200  $\mu$ g/mL, en er werd 50  $\mu$ L overgebracht naar een SPE buis. Deze werd voor 20 minuten bij 40°C ingedampt onder een stikstofstroom. Hierna werd 1 mL dichloormethaan toegevoegd en ingedampt onder stikstof voor 10 minuten bij 40°C. Na indampen werd er na 30 seconden vortexen voor vier uur gederivatiseerd met 100  $\mu$ L MTBSTFA en 100  $\mu$ L pyridine in een waterbad op 70°C. Na de reactie werd er voor 30 seconden gevortext en werd de vloeistof overgebracht in een GC-vial met een 250  $\mu$ L insert en geanalyseerd met de GC-MS.

#### Katalysator Acetonitril

Als vervolg experiment werd de katalysator acetonitril vergeleken ten opzichte van pyridine. In triplo werd dezelfde procedure uitgevoerd in plaats van pyridine werd er gebruik gemaakt van acetonitril.

#### Verlengen Reactietijd

Ook werd als vervolgexperiment de reactietijd van de derivatisatiereactie verlengd van 4 uur tot 8 uur. In triplo werd dezelfde procedure uitgevoerd in plaats 4 uur werd er voor 8 uur gederivatiseerd.

#### 3.9 Split verhouding optimalisatie

De splitmodus van de GC werd geoptimaliseerd door systematisch dezelfde mengstandaard met een concentratie van 200  $\mu$ g/mL te injecteren, met split 1:50, 1:40, 1:30, 1:20 en 1:10. Deze mengstandaard werd opgewerkt met de procedure beschreven onder de paragraaf derivatisatie reactie 3.6. Er werd gebruik gemaakt van de katalystor pyridine en MTBSTFA, de reactietijd was 4 uur.

#### 3.10 Optimalisatie SPE procedure

Om analieten te concentreren uit watermonsters werd er gebruik gemaakt van Solid Phase Extraction. Er werden twee procedures gebruikt. Een procedure met de MCX kolom, en een procedure met de MAX kolom. In paragraaf 3.10 is de procedure met de MCX kolom en de MAX kolom beschreven

Het watermonster werd 1:1 verdund met een 200mM ammoniumformiaat buffer aangezuurd met 0,6% fosforzuur. Het monster werd op de SPE kolom gebracht. Er werd gewassen met 1mL methanol en geëlueerd met 1 mL 5% ammoniumhydroxide in methanol. <sup>[26]</sup> Het elutiemiddel werd voor 25 minuten ingedampt onder een stikstofstroom bij 40°C. Na indampen werd er 1 mL dichloormethaan toegevoegd en voor 10 minuten ingedampt onder een stikstofstroom bij 40°C. Hierna werd aan de SPE buis 100  $\mu$ L MTBSTFA en 100  $\mu$ L pyridine toegevoegd. Na 30 seconden vortexen werd er gederivatiseerd voor 4 uur in een waterbad bij een temperatuur van 70°C. Na de reactie werd er voor 30 seconden gevortexd en werd de vloeistof overgebracht in een GC-vial met een insert van 250 $\mu$ L. De monsters zijn volgens paragraaf 3.3 geanalyseerd op de GC.

#### SPE procedure met de MAX kolom

Het watermonster werd 1:1 verdund met een 10mM natriumcarbonaat buffer. Deze buffer bestond voor 9,1 mM uit natriumbicarbonaat, en voor 0,9 mM uit natriumwaterstofcarbonaat. De MAX kolom werd geactiveerd met 1 mL methanol, en geconditioneerd met 1 mL natriumcarbonaat buffer. Het monster werd op de SPE kolom gebracht. Er werd gewassen met 1 mL methanol, en geëlueerd met 1mL 2% mierenzuur in methanol. Het elutiemiddel werd voor 25 minuten ingedampt onder een stikstogstroom bij 40°C. Na indampen werd er 1 mL dichloormethaan toegevoegd en voor 10 minuten

ingedampt onder een stikstofstroom bij 40°C. Hierna werd 100  $\mu$ L MTBSTFA en 100  $\mu$ L pyridine toegevoegd. Na 30 seconden vortexen werd er gederivatiseerd voor 4 uur in een waterbad bij een temperatuur van 70°C. Na de reactie werd er voor 30 seconden gevortexd en werd de vloeistof overgebracht in een GC-vial met een insert van 250 $\mu$ L. De monsters zijn volgens paragraaf 3.3 geanalyseerd op de GC.

#### Terugvindingpercentage SPE

Om het terugvindingpercentage van de MCX en de MAX kolom te bepalen werd in triplo 50  $\mu$ L 200  $\mu$ g/mL mengstandaard toegevoegd aan 10 mL kraanwater. Ook werd er in duplo een 50 $\mu$ L mengstandaard ingedampt en gederivatiseerd met een concentratie van 200  $\mu$ g/mL. Dit monster diende als de 100% controle voor de bepaling van de terugvinding. De monsters werden opgewerkt met de procedure beschreven in paragraaf 3.10.

#### Opvangen van de methanol wasstap

Als vervolgexperiment werd de 1 mL methanol in de wasstap van de MCX SPE procedure opgevangen. Deze werd voor 25 minuten ingedampt onder een stikstofstroom bij 40°C. Na indampen werd er 1 mL dichloormethaan toegevoegd, en voor 10 minuten ingedampt onder een stikstofstroom bij 40°C. Hierna werd 100  $\mu$ L MTBSTFA en 100  $\mu$ L pyridine toegevoegd. Na 30 seconden vortexen werd er gederivatiseerd voor 4 uur in een waterbad bij een temperatuur van 70°C. Na de reactie werd er voor 30 seconden gevortexd en werd de vloeistof overgebracht in een GC-vial met een insert van 250 $\mu$ L. De monsters zijn volgens paragraaf 3.3 geanalyseerd op de GC.

#### Elueren met 15% NH4OH in methanol

Als vervolgexperiment werd ook na het elueren met 1mL 5% NH4OH in methanol beschreven in paragraaf 3.10, opnieuw geëlueerd met 1mL 15% NH4OH. Deze werd voor 25 minuten ingedampt onder een stikstofstroom bij 40°C. Na indampen werd er 1 mL dichloormethaan toegevoegd, en voor 10 minuten ingedampt onder een stikstofstroom bij 40°C. Hierna werd 100  $\mu$ L MTBSTFA en 100  $\mu$ L pyridine toegevoegd. Na 30 seconden vortexen werd er gederivatiseerd voor 4 uur in een waterbad bij een temperatuur van 70°C. Na de reactie werd er voor 30 seconden gevortexd en werd de vloeistof overgebracht in een GC-vial met een insert van 250 $\mu$ L. De monsters zijn volgens paragraaf 3.3 geanalyseerd op de GC.

#### 3.11 Testmonsters

Er werd in duplo 500 mL slootwater testmonster opgewerkt volgens de SPE procedure beschreven onder paragraaf 3.10. Voor deze twee monsters werd er gebruik gemaakt van de katalysator pyridine en een reactietijd van 4 uur. Ook werd er via dezelfde procedure in enkelvoud een 500 mL testmonster opgewerkt. Hier was de katalysator acetonitril en de reactietijd 4 uur.

#### Testmonsters kraanwater

Er werd in duplo 500 mL kraanwater testmonster opgewerkt. Dit monster werd genomen twee dagen na het moment dat de kreeften in het aquarium werden geplaatst. Ook werd er in enkelvoud het blanco testmonster opgewerkt van 500 mL. Beide monsters zijn opgewerkt volgens de SPE procedure beschreven onder paragraaf 3.10.

#### Testmonsters opgewerkt met 250 mL ipv 500 mL

Als vervolgexperiment werd er van hetzelfde monster in duplo 250 mL testmonster opgewerkt. Beide monsters zijn voorbewerkt volgens de procedure beschreven onder paragraaf 3.10.

#### 3.12 Bepalen prestatiekenmerken

Vanuit de mengstandaard met de 10 stoffen werd een kalibratielijn opgesteld met 8 standaarden van de concentraties 1,2 0,8 0,6 0,4 0,3 0,2 0,1 en 0,05  $\mu$ g/mL.

Alle standaarden zijn opgewerkt volgens de procedure beschreven in paragraaf 3.8. De katalysator was pyridine het reagens MTBSTFA en de reactietijd was 4 uur. De standaarden zijn geanalyseerd met de GC-MS zoals is beschreven in paragraaf 3.3. Volgens de formule 2.1 is er per component uit de mengstandaard het detectielimiet berekend. Hierin is LOD Limit Of Detction in  $\mu$ g/mL, Sy de standaardfout en slope de richtingscoëfficent van de trendlijn.<sup>[27]</sup>

$$LOD = 3,3 \cdot \left(\frac{Sy}{Slope}\right)[2.1]$$

#### LOD van serotonine

Als vervolgexperiment werd de serotonine oplossing van 1 mg/mL verdund tot 200  $\mu$ g/mL, en werden er vanuit deze oplossing twee kalibratielijnen geprepareerd. Deze bestonden beide uit 6 standaarden. De eerste kalibratielijn bestond uit standaarden met een concentratie van 10 8 6 4 2 en 1  $\mu$ g/mL. De tweede kalibratielijn bestond uit standaarden met een concentratie van 20 18 16 14 12 en 10  $\mu$ g/mL.

Standaarden werden opgewerkt zoals is beschreven in paragraaf 3.8. De standaarden werden geanalyseerd zoals staat beschreven in paragraaf 3.3. Bij het berekenen van het detectielimiet werd er gebruik gemaakt van formule 2.1.

#### Reproduceerbaarheid

Om de reproduceerbaarheid van de analysemethode te bepalen werd in achtvoud hetzelfde monster opgewerkt onder verschillende omstandigheden. Dit monster bestond uit 40 mL testmonster wat na 10 dagen uit het aquarium werd bemonsterd. Aan deze 40 mL werd 50  $\mu$ L van standaard 6 uit tabel 1 toegevoegd. Hierna werd er gevortexd voor 30 seconden en werden de acht monsters onder verschillende omstandigheden opgewerkt zoals staat beschreven in paragraaf 3.10.

Volgens de formule 2.2 is de reproduceerbaarheid berekend. Hierin is SRw de reproduceerbaarheid n de hoeveelheid monsters dat werd geanalyseerd Xi de waarde van het individuele monster, en X het gemiddelde alle waardes.<sup>[27]</sup>

$$SRw = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n} \left(Xi - \overline{X}\right)^{2}} [2.2]$$

Aan de hand van de reproduceerbaarheid werd het detectielimiet berekenend dit is gedaan volgens formule 2.2. Hierin is AG het detectielimiet en SRw de reproduceerbaarheid.

$$AG = 3 \cdot SRw [2.3]$$

Gebruikmakende van de Horwitz functie in formule 2.4 zijn de voorspelde relatieve standaarddeviatie berekend. Deze voorspelde relatieve standaarddeviatie werd vergeleken ten op zichtte van de relatieve standaarddeviatie die in de praktijk werd bepaald. Op basis van deze gegevens werd een uitspraak gedaan over de kwaliteit van de reproduceerbaarheid van de analysemethode. Ook werd de HorRat berekend. Dit is de verhouding tussen de voorspelde relatieve standaarddeviatie en de waargenomen relatieve standaarddeviatie. Hierin is SR de waargenomen relatieve standaarddeviatie en oH de voorspelde relatieve standaarddeviatie. <sup>[14]</sup>

$$\sigma H = 0,02C^{0,8495}$$
[2.4]  
 $HorRat = \frac{SR}{\sigma H}$ [2.5]

#### 3.13 Watermonsters vanuit het RAAK initiatief

Er werden twintig monsters opgewerkt vanuit de 22 kreeften aquaria. Twee monsters van waar werd waargenomen dat de kreeft verveld was. Negen monsters afkomstig van een vrouwelijke rivierkreeft. Negen monsters afkomstig va een mannelijke rivierkreeft. Ieder monster had een volume van 40 mL en werd gefiltreerd met een 0,2  $\mu$ M filter. Na filtratie werd de SPE procedure gevolgd zoals is beschreven in paragraaf 3.10. De twintig monsters werden geanalyseerd met de GC onder de condities beschreven in paragraaf 3.3.

### 4. Resultaten en discussie

#### 4.1 Optimalisatie derivatisatie reactie

In figuur 2 en in figuur 3 zijn de chromatogrammen te zien van de analyse van de mengstandaard bestaande uit Glycine, L-valine, L-hydroxyproline, L-serine, L-threonine, L-fenylalanine, L-lysine , octopamine en serotonine. In figuur 2 werd de mengstandaard opgewerkt met pyridine. In figuur 3 werd de mengstandaard opgewerkt met acetonitril. In bijlage C zijn in een tabel de 10 componenten weergegeven met de bijbehorende retentietijden.





Figuur 2: De mengstandaard opgewerkt met als katalysator pyridine



Figuur 3: De mengstandaard opgewerkt met als katalysator acetonitril.

Wanneer de twee figuren met elkaar werden vergeleken, werden er een aantal waarnemingen gedaan. In figuur 3 zijn meer pieken te zien dan in figuur 2. Deze observatie werd ook gedaan in de chromatogrammen van de blanco monsters deze zijn weergegeven in bijlage B. In de literatuur is deze observatie eerder gedaan bij een derivatisatie met als katalysator acetonitril <sup>[28]</sup>. In figuur 2 zijn meer derivatisatie producten aangetroffen dan in figuur 3. De verklaring hiervoor is dat de in figuur 2 twee niet volledig gederivatiseerde derivatisatie producten werden aangetroffen. <sup>[21]</sup> Dit waren threonine 2TBDMS en octopamine 3TBDMS. De pieken in figuur 3 zijn hoger dan in figuur 2. Dit is ook terug te zien in het staafdiagram in bijlage B.

Deze waarnemingen wijzen erop dat de katalysator acetonitril reactiever is dan pyridine. Vanwege deze reden werd er geconcludeerd dat acetonitril de voorkeur had over pyridine. Het is voordelig wanneer pieken een hogere intensiteit hebben. Dit geeft als resultaat een analytische methode met een lager detectielimiet.

	RSD% Acentonitril	RSD% Pyridine
Glycine 2TBDMS	22,0	10,0
L-valine 2TBDMS	21,6	9,1
Isoleucine 2TBDMS	22,2	10,9
L-hydroxyproline2TBDMS	12,8	16,3
L-Serine3TBDMS	22,2	9,4
L-Threonine 3TBMS	22,4	6,6
L-phenylalanine 2TBDMS	21,3	11,8
L-Lysine 3TBDMS	30,0	18,0
Octopamine 3TBDMS	26,8	11,8
Serotonine derivaat	28,0	18,9
Gemiddeld	22,9	12,3

Tabel 1: Relatieve standaard deviatie per component uit de mengstandaard bij gebruik van acetonitril en pyridine als katalysator.

Het nadeel van derivatiseren met acetonitril ten opzichte van derivatiseren met pyridine is weergegeven in tabel 1. Hierin is te zien dat bij de derivatisatie met acetonitril de componenten een gemiddelde RSD hadden van 22,9%, en bij derivatisatie met pyridine een gemiddelde RSD van 12,3%. De reden hiervoor is dat acetonitril een polairder oplosmiddel is met een hoger expansievolume dan pyridine. Na de injectie van 1  $\mu$ L acetonitril zou het kunnen dat na de verdamping het maximale volume van de liner wordt overschreden. In vervolgonderzoek kan er worden onderzocht of de herhaalbaarheid van de analyse verbeterd wanneer er een minder groot volume wordt geïnjecteerd. Het nadeel hiervan is wel dat met een lager injectievolume de piekintensiteiten ook zullen verminderen.

#### 4.1.1 Verlengen van de reactietijd

In figuur 4 is het resultaat weergegeven van het experiment waar de reactietijd van de derivatisatiereactie werd verlengd naar 8 uur. Wat er werd waargenomen is dat de piekoppervlaktes van 9 componenten na 8 uur derivatiseren groter waren dan na 4 uur derivatiseren. Dit wijst erop dat ondanks er geen halve derivatisatieproducten werden aangetroffen bij de reactie met acetonitril, de derivatisatiereactie na 4 uur niet volledig was verlopen. Ook is in de bijlage in tabel E te zien dat er een kleine verbetering was in de RSD% bij een langere reactietijd. De gemiddelde RSD na 8 uur derivatiseren was 13,8%, en na 4 uur derivatiseren 17,5%.



Figuur 4: Piekoppervlaktes van de 10 componenten uit de mengstandaard na 4 uur en 8 uur derivatiseren.

Vanwege de grotere piekoppervlaktes en de verbeterde RSD% werd uit dit experiment geconcludeerd dat een reactietijd van 8 uur de voorkeur heeft over een reactietijd van 4 uur. Het nadeel hiervan is wel dat een reactietijd van 8 uur in de praktijk moeilijk te verwezenlijken is. Vanwege deze reden is er toch besloten om als standaardreactie tijd 4 uur aan te houden. In vervolgonderzoek kan er worden onderzocht of hetzelfde resultaat in 8 uur kan worden behaald in 4 uur door de temperatuur tijdens de reactie te verhogen. Of er kan worden gekozen om te investeren in een derivatisatie magnetron. Bij gebruik van deze apparaten kan een derivatisatiereactie van 4 uur worden verkort tot 20 minuten. [29]

#### 4.1.2 Slootwater testmonster derivatiseren met pyridine en acetonitril

In figuur 5 is een chromatogram uit het experiement beschreven in paragraaf 3.11. In figuur 6 is ook een chromatogram weergegeven uit het experiment beschreven in paragraaf 3.11.

In figuur 6 waar er met acetonitril is gederivatiseerd zijn hogere en meer pieken te zien dan in figuur 5 waar met pyridine is gederivatiseerd. Dit is te verklaren vanwege dat acetonitril reactiever is dan pyridine.



Figuur 5: Slootwater testmonster gederivatiseerd met de katalysator pyridine.



Figuur 6: Figuur 5: Slootwater testmonster gederivatiseerd met de katalysator acetonitril.

Ondanks dat een derivatisatie reactie met acetonitril resulteert in grotere piekoppervlaktes is op basis van dit resultaat de keuze gemaakt om in de standaard derivatisatie methode te kiezen voor pyridine. Met deze katalysator zijn minder pieken te zien in het chromatogram waardoor onbekende componenten gemakkelijker kunnen worden geïdentificeerd. In tabel 8 zijn de componenten weergegeven die zijn geïdentificeerd vanuit het chromatogram in figuur 5. In figuur 6 konden twee componenten worden geïdentificeerd benzoic acid TBDMS en het derivatisatie product van fosforzuur.

Wanneer duidelijk is welke stoffen de rivierkreeft gebuikt als signaalstoffen. Kan om de detectielimieten van de methode te verlagen de keuze worden gemaakt om over te stappen naar een derivatisatie met acetonitril. Stoffen kunnen dan worden geïdentificeerd en gekwantificeerd op basis van specifieke massafragmenten. Echter is dat nu nog niet mogelijk omdat de stoffen niet geïdentificeerd zijn en deze massafragmenten nog niet bekend zijn.

### 4.2 Optimalisatie Split verhouding

Uit het vorige project bij het LCAB met als doel het identificeren en kwantificeren van de biogene amines van de rode Amerikaanse rivierkreeft, werd geconcludeerd dat er met succes componenten uit de mengstandaard waren geanalyseerd. Maar dat vooralsnog de detectielimieten te laag waren om de biogene amines van de kreeften te kunnen detecteren. Tijdens dit project werd er gebruik gemaakt van een split verhouding van 1:50. <sup>[6]</sup>



Om weer te geven hoeveel winst in de detectielimiet in verhouding ten opzichte van een split van 1:50 kan worden behaald. Is in tabel 5 weergegeven bij de splitverhoudingen van 1:40, 1:30, 1:20 en 1:10 hoeveel groter de piekoppervlaktes van hetzelfde monster waren ten opzichte van een split van 1:50. In paragraaf is de werkwijze van dit experiment beschreven. In bijlage F zijn de piekoppervlaktes te zien waarop de gegevens in deze tabel zijn gebaseerd.

Component	Peak area split ratio 1:40	Peak area split ratio1:30	Peak area split ratio 1:20	Peak area split ratio 1:10
Glycine 2TBDMS	1,3	1,8	3,0	6,0
L-valine 2TBDMS	1,3	1,7	2,8	5,9
Isoleucine 2TBDMS	1,0	1,4	2,2	5,0
L-hydroxyproline 2TBDMS	2,0	2,0	2,9	3,0
L-Serine 3TBDMS	1,3	1,7	2,9	7,2
L-Threonine 3TBMS	1,3	1,6	2,7	6,6
L-phenylalanine 2TBDMS	1,3	1,7	2,8	6,6
L-Lysine 3TBDMS	1,4	2,2	4,0	11,1
Octopamine 3TBDMS	1,3	1,9	3,2	5,6
Serotonine derivaat	1,5	2,7	5,8	16,8
Gemiddelde	1,4	1,9	3,2	7,4

Tabel 2: Relatieve winst in het detectielimiet ten opzichte van een split verhouding van 1:50.

In de tabel is te zien dat bij een lagere splitverhouding de grote van de piekoppervlaktes significant toeneemt. Bij een split van 1:10 waren de piekoppervlaktes gemiddeld 7,4 keer hoger ten opzichte van een split van 1:50.

Wat opvalt is dat er per component variatie te zien is in de resultaten. Het piekoppervlakte van serotonine was bij een split van 1:10 16,8 keer groter dan bij split 1:50. Het piekoppervlakte van Lhydroxyproline was bij een split van 1:10 3,0 keer hoger dan bij een split van 1:50. Ook viel op dat er heel weinig verschil was in de piekoppervlakte van serotonine bij een split van 1:40 en 1:30. Hiervoor werd geen duidelijke verklaring gevonden.

Uit dit experiment werd geconcludeerd dat bij een lagere splitverhouding de grote van de piekoppervlaktes significant toeneemt. Hierom werd er besloten om als standaard splitverhouding voor de analyse van monsters een split van 1:5 aan te houden. Er werd niet getest om splitless te injecteren vanwege het gevaar van overbelading van de kolom. Echter kan een splitless injectie de detectielimiet van de analysemethode verder verbeteren.

### 4.3 Optimalisatie Solid Phase Extraction

In tabel 3 is het resultaat te zien van het bepalen het terugvinding percentage van de MCX kolom. In bijlage G zijn de piekoppervlaktes weergegeven waarop deze terugvinding percentages zijn gebaseerd. In de tabel is te zien dat een aantal componenten weinig tot niet werden teruggevonden met een percentage van 0,0% tot 1,2%. Dit waren glycine, L-hydroxyproline, serine, threonine en lysine. Ook is in de tabel weergegeven dat een aantal componenten redelijk tot goed werden teruggevonden. Dit waren L-valine, isoleucine, fenylalanine, octopamine en serotonine met een terugvinding van 45,9% tot 97.5%. Er werd geconstateerd dat



componenten met weinig tot geen terugvinding kleinere moleculen waren met polaire zijgroepen.

Tabel 3: Terugvinding percentage van de 10 componenten uit de mengstandaard bij gebruik van de MCX SPE kolom.

	Terugvinding percentage (%)
Glycine 2TBDMS	1,2
L-valine 2TBDMS	65,5
Isoleucine 2TBDMS	77,5
L-hydroxyproline2TBDMS	0,0
L-Serine3TBDMS	0,2
L-Threonine 3TBMS	0,5
L-phenylalanine 2TBDMS	45,9
L-Lysine 3TBDMS	0,2
Octopamine 3TBDMS	97,5
Serotonine derivaat	81,2

Als vervolgstap werd er onderzocht waar deze kleine polaire componenten terecht waren gekomen tijdens de SPE procedure. Dit werd gedaan door de was stap met methanol van de SPE procedure te op te werken en te analyseren. De werkwijze van dit experiment is beschreven in paragraaf 3.10. Het resultaat hiervan is weergegeven in figuur 7. In dit figuur waren door middel van de NIST drie stoffen geïdentificeerd. Dit waren 2,4-di-tert-butylfenol, fosforzuur tris(tert-butyldimethylsilyl) ester en palmitic acid TBDMS. Het fosforzuur ester is het TBDMS derivaat van fosforzuur, en is te verklaren omdat in de SPE procedure fosforzuur werd toegevoegd. Voor de aanwezigheid van 2,4-di-tert-butylfenol en palmitic acid TBDMS werd geen duidelijke verklaring gevonden. Er werden geen componenten uit de mengstandaard aangetroffen.



Figuur 7: Het chromatogram van de opgevangen wasstap uit de SPE procedure van de MCX kolom

Ook werd als vervolgstap na elutie met 5% NH4OH in methanol nogmaals geëlueerd met 15% NH4OH in methanol. De werkwijze van dit experiment is ook beschreven in paragraaf 3.10. Het resultaat hiervan is weergegeven in figuur 8. In dit figuur waren drie stoffen geïdentificeerd cyclohexylamine, Bis(tert-butyldimethylsilyl) carbonaat en diethyleen glycol 2TBDMS. Deze stoffen werden vaker geïdentificeerd in blanco monsters. Er werd geen duidelijke reden gevonden waarom deze stoffen werden aangetroffen in blanco monsters. Echter werden hier opnieuw geen componenten uit de mengstandaard aangetroffen.



Figuur 8: Het chromatogram van de elutie met 15% NH4OH in methanol na de elutie van 5% NH4OH in methanol.

Uit deze twee experimenten werd geconcludeerd dat de kleine polaire componenten niet aanwezig waren in de was stap en niet na elutie achterbleven op de SPE kolom. Hierom werd er aangenomen dat de kleine polaire moleculen geen retentie hebben op de MCX kolom, en dat er gebruik moet worden gemaakt van een andere SPE kolom om deze componenten uit de watermonsters te concentreren.

#### 4.3.1 SPE met de MAX kolom

Als vervolgstap werd de SPE procedure uitgevoerd met de MAX kolom. De terugvinding van de MAX kolom is samen met de terugvinding van de MCX kolom weergegeven in tabel 4. De piekoppervlaktes waarop de resultaten in tabel 4 zijn gebaseerd zijn weergegeven in bijlage G.

Tabel 4: Terugvinding percentage van de MCX kolom naast het terugvinding percentage van de MAX kolom van de 10 componenten uit de mengstandaard.

	Recovery percentage (%) MCX	Recovery pecentage (%) MAX
Glycine 2TBDMS	1,2	0,0
L-valine 2TBDMS	65,5	0,1
Isoleucine 2TBDMS	77,5	0,4
L-hydroxyproline2TBDMS	0,0	1,8
L-Serine3TBDMS	0,2	0,0
L-Threonine 3TBMS	0,5	0,1
L-phenylalanine 2TBDMS	45,9	35,5
L-Lysine 3TBDMS	0,2	0,1
Octopamine 3TBDMS	97,5	0,0
Serotonine derivaat	81,2	0,5

In de tabel is te zien dat de terugvinding van negen componenten tussen de 0% en de 1,8% lag. De terugvinding van fenylalanine was 35,5%. Echter was deze terugvinding nog lager dan de terugvinding van de MCX kolom van 45,9%. Uit dit experiment werd geconcludeerd dat er met dit resultaat geen reden was om gebruik te maken van de MAX kolom.

In vervolgonderzoek is het aan te raden om opnieuw de terugvinding te bepalen met recent geproduceerde MAX kolommen. Dit omdat de gebruikte kolommen waren geproduceerd in 2015. De fabrikant Oasis raad aan om na 3 jaar de kwaliteit van SPE kolommen opnieuw te beoordelen. <sup>[30]</sup>

#### 4.4 Testmonsters

In tabel 5 zijn de componenten weergegeven die zijn aangetroffen in het slootwater testmonster. In deze tabel zijn alleen de componenten weergegeven die niet zijn aangetroffen in het blanco monster. In bijlage I is de volledige tabel weergegeven. Ook is in bijlage I het chromatogram weergegeven waarin deze stoffen zijn aangetroffen.



Tabel 5: Componenten aangetroffen in het slootwater testmonster.

Retentietijd (min)	Component
11,80	Sarcosine 2TBDMS
12,79	Glycolic acid TBDMS
13,28	Oxalic acid 2TBDMS
13,48	Glycine 2TBDMS
13,82	Nonaic acid TBDMS
14,55	Urea TBDMS
14,43	Alanine 2TBDMS
16,88	Glycerol 3TBDMS
17,12	Dodecanoic acid TBDMS
17,73	L-pyroglutamic acid 2TBDMS
20,06	Cysteïne 3TBDMS
21,55	Lysine 3TBDMS

Wat opviel in tabel 5 is dat er geen serotonine en octopamine werd geïdentificeerd in de chromatogrammen. De verwachting was dat deze stoffen een rol zouden spelen bij de communicatie van de kreeften. <sup>[7]</sup> Echter is het mogelijk dat het detectielimiet van de methode nog niet laag genoeg is om de stoffen te identificeren. Dit omdat in het boek niet werd vermeld in welke concentratie de stoffen voor komen in het water.

De stoffen Sarcosine, L-pyroglutamic acid en urocanic acid zijn interessant. Deze spelen een rol in metabolische processen <sup>[31],[32],[33]</sup> Ook vallen alanine cysteïne glycine en lysine op dit zijn aminozuren. Ook is glycerol interessant dit is onderdeel van een vet. Vetten bestaan uit vetzuren en glycerol <sup>[34]</sup>

Omdat in deze proefopzet de kreeften in slootwater werden gehouden. Was het niet duidelijk of de geïdentificeerde stoffen afkomstig waren uit het slootwater, of dat deze door de kreeften waren uitgescheiden. Om dit uit te sluiten werden in een volgende proefopzet kreeften in kraanwater gehouden.

#### 4.4.1 Kraanwater testmonsters

In tabel 6 is het resultaat weergegeven van het kraanwater testmonster experiment. Het chromatogram waarin deze componenten zijn aangetroffen is te zien in bijlage. In de tabel zijn alleen de stoffen weergegeven die niet zijn geïdentificeerd in het blanco monster. De volledige tabel is te zien in bijlage J.

Component
Glycolic acid TBDMS
L-Proline 2TBDMS
L-Alanine 2TBDMS
Oxalic acid 2TBDMS
Glycine 2TBDMS
L-Valine 2TBDMS
Leucine 2TBDMS
L-serine 2TBDMS
Aceturic acid 2TBDMS
Threonine 2TBDMS
Glycerol 3TBDMS
L-serine 3TBDMS
Malic acid 3TBDMS
L-glutamic acid 3TBDMS
Sebacic acid 2TBDMS

Tabel 6: Componenten aangetroffen in het kraanwater testmonster.

De stoffen die opvielen zijn de aminozuren L-proline, L-alanine, glycine, valine, leucine, serine en threonine. Omdat als katalysator pyridine is gebruikt is zowel serine 2TBDMS aangetroffen als serine 3TBDMS.

In deze proefopzet werden de kreeften gehouden in kraanwater en kregen zij geen eten. Hierom kon er in dit experiment worden vastgesteld dat de geïdentificeerde stoffen afkomstig waren uit de kreeften. Echter werd er geen specifieke biomarker of feromoon aangetroffen in dit experiment die de aanwezigheid van de kreeften aanduidt. De geïdentificeerde stoffen zijn generieke componenten die voorkomen in verschillende organismen.

Om een eerste stap te zetten in het verlagen van het monstervolume werd in het volgende experiment 250 mL opgewerkt in plaats van 500 mL.

#### 4.4.2 Testmonster opgewerkt met een lager monstervolume

In tabel 7 is het resultaat weergegeven van het experiment beschreven in paragraaf 3.11 waarbij het monstervolume werd verlaagd tot 250 mL. In deze tabel zijn alleen de componenten weergegeven die niet in het blanco monster werden teruggevonden. De totale tabel is terug te vinden in bijlage K.

In tabel 7 is te zien dat er minder componenten zijn geïdentificeerd dan in tabel 7. Dit is te verklaren omdat er in dit experiment 250 mL testmonster werd opgewerkt. In het experiment horende bij tabel 6 werd 500 mL testmonster opgewerkt. Wanneer een groter monstervolume wordt opgewerkt wordt de eindconcentratie van de componenten in de GC-vial ook groter.

Rententietijd (min)	Component
12,74	Glycolic acid 2TBDMS
13,23	Glycine 2TBDMS
13,73	Sulfuric acid 2TBDMS
13,82	Nonanoic acid TBDMS
16,12	Glycerol 3TBDMS
19,73	Suberic acid 2TBDMS

Tabel 7: Componenten aangetroffen in het kraanwater testmonster na het verlagen van het monstervolume.

Wat ook te zien is dat er drie componenten zijn weergegeven in tabel 7 die niet te zien zijn in tabel 6. Dit zijn sulfuric acid 2TBDMS, nonanoic acid TBDMS en suberic acid 2TBDMS. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de SPE kolom in het vorige experient werd overbeladen vanwege het grote monstervolume. Wanneer SPE kolommen zijn overbeladen worden chemicaliën niet meer vastgehouden door de kolom. Ongeveer 5% procent van het gewicht van de vaste fase in de SPE kolom kan worden beladen. <sup>[35]</sup>

Omdat met een monstervolume van 250 mL minder chemicaliën werden geïdentificeerd dan met een monstervolume van 500 mL. Werd uit deze twee experimenten geconcludeerd dat een groter monstervolume voordelig is voor de identificatie van onbekende chemicaliën in watermonsters. Tijdens het RAAK initiatief zijn watermonsters genomen van 40 mL. Een aanbeveling voor een volgende proefopzet is om monsters te nemen met een groter volume.

# 4.5 Prestatiekenmerken LOD en reproduceerbaarheid

In figuur 9 zijn de kalibratielijnen te zien verkregen uit het experiment beschreven onder paragraaf 3.12. In de tabel in bijlage L zijn de piekoppervlaktes weergegeven waarop de kalibratielijnen in de figuur gebaseerd zijn.





#### Figuur 9: Gemeten piekoppervakte als functie van de concentratie

glycine 2TBDMS (Lichtblauw) Y= -8377 (± 6639) + 94302 (± 10612) x, 95% Bl, n=7, r^2= 0,9905, sr= 3891. L-valine 2TBDMS (Oranje) Y= 18720 (± 6962) + 86513 (± 11981) x, 95% Bl, n=8, r^2= 0,9814, sr= 5043. Isoleucine 2TBDMS (Grijs) Y= 1971 (± 4257)+ 60396 (± 7271) x, 95% Bl, n=8 r^2= 0,9857, sr= 3084. L-serine 3TBDMS (Geel) Y= -1947 (± 1966) + 26462 (± 3358), 95% Bl n=8 r^2= 0,9841, sr= 1424. L-threonine 3TBDMS (Donkerblauw) Y= -402 (± 28898) + (±4618) x, 95% Bl, n=7 r^2=0,9691, sr= 1693. L-fenylalanine 2TBDMS (groen) Y= -1190 (±1664) + 15182 (±2659) x, 95% Bl, n=7 r^2=0,9773, sr= 975. L-lysine 3TBDMS (paars) Y= -520 (±777) + 3609 (±963) x, 95% Bl, n=4 r^2=0,9923, sr=132. Octopamine 3TBDMS (Bruin) Y= -1123 (±1440) + 18732 (±2135) x, 95% Bl, n=6 r^2= 0,9933, sr= 638.

In figuur 9 valt op dat de R^2 van de componenten van elkaar verschillen, ondanks dat deze in dezelfde mengstandaard waren geprepareerd. Octopamine 3TBDMS had de hoogste r^2 van 0,9933 en L-threonine 3TBDMS de laagste r^2 van 0,9691. In paragraaf 4.1 is aangetoond dat met de gebruikte condities de derivatisatie reactie niet volledig verloopt. Een mogelijke verklaring voor de variërende r^2'en zou zijn dat de reactiesnelheden in de gebruikte standaarden niet gelijk zijn aan elkaar. Ook viel op dat voor een aantal componenten in de standaarden met de lagere concentraties geen meetsignaal kon worden gedetecteerd. Dit is de reden waarom voor glycine 3TBDMS, L-threonine 3TBDMS en L-fenylalanine 2TBDMS 7 meetpunten staan weergegeven in figuur 9. Voor octopamine zes meetpunten, en voor L-lysine 3TBDMS vier meetpunten staan weergegeven in de figuur. Ook is er in bijlage L te zien dat van twee componten L-hydroxyproline 2TBDMS en het serotonine derivaat geen kalibratielijnen zijn opgesteld. Dit omdat de concentraties van deze stoffen te laag waren om te kunnen worden gedetecteerd.

#### 4.5.1 Serotonine kalibratielijnen

Als vervolgexperiment werden er twee kalibratielijnen opgesteld voor serotonine. Dit omdat in een onderzoek werd geconcludeerd dat serotonine het gedrag van rivierkreeften beïnvloedde [7] De eerste kalibratielijn had een bereik tussen 1 µg/mL en 10 µg/mL. De tweede kalibratielijn had een bereik tussen 10 µg/mL en 20 µg/mL. Het resultaat van de eerste kalibratielijn is te zien in bijlage L. Het resultaat van de tweede kalibratielijn is weergegeven in figuur 10.

In bijlage L is een exponentieel verband te zien. Dit is te verklaren omdat de concentratie serotonine van de analysemethode nog te laag was. In het bereik tussen de 1  $\mu$ g/mL en 10  $\mu$ g/mL werd voor serotonine niet in het lineaire bereik van de kalibratielijn geanalyseerd. <sup>[36]</sup>



Figuur 10: Gemeten piekoppervlakte als functie van de concentratie serotonine Y = 1485025 (±3824396) + 2501542 (±248596) x, 95% BI, n=6, r^2=0,9949, sr=749125

In tabel 8 zijn de LOD's weergegeven van de componenten uit de mengstandaard. Deze zijn berekend met formule 2.1 en de waardes uit de kalibratielijnen te zien in figuur 9 en figuur 10. Voor de componenten glycine, valine, isoleucine, serine, threonine, fenylalanine en octopamine lag de LOD tussen de 0,09 µg/mL en de 0,16 µg/mL. Wat opviel is dat de LOD van serotonine en lysine een stuk hoger liggen 1,82 µg/mL en 0,33 µg/mL. Hiervoor werd geen duidelijke verklaring gevonden.

Tabel 8: LOD van de 10 componente	n uit de mengstandaard bere	kend aan de hand van de kalibratielijne
-----------------------------------	-----------------------------	---

	LOD (µg/mL)
Glycine	0,09
Valine	0,11
Isoleucine	0,10
Serine	0,10
Threonine	0,16
Fenylalanine	0,14
Lysine	0,33
Octopamine	0,09
Serotonine	1,82

#### 4.5.2 Reproduceerbaarheid

In tabel 9 is het resultaat weergegeven van het reproduceerbaarheid experiment. In de tabel zijn vier componenten weergegeven uit de mengstandaard glycine, isoleucine, serine en octopamine. De overige componenten konden niet worden gekwantifceerd omdat het meetsignaal onder het signaal van de standaard met de laagste concentratie viel. Als aanbeveling voor vervolgonderzoek zal terugkomen om dit experiment opnieuw uit te voeren. Maar om ditmaal in het experiment een mengstandaard met een hogere concentratie toe te voegen.

	Concentratie (µg/mL)	SRw (µg/mL)	Detectielimiet (µg/mL)
Glycine	0,23	0,04	0,12
Isoleucine	0,18	0,06	0,18
Serine	0,21	0,05	0,15
Octopamine	0,97	0,09	0,27

Tabel 9: De reproduceerbaarheid en het detectielimiet van glycine, isoleucine, serine en octopamine.

Wat opvalt in tabel 9 is dat er een concentratie kon worden bepaald voor glycine en serine. Dit omdat in paragraaf 4.3 te zien is dat deze componenten een SPE terugvinding percentage hebben van 1,2% en 0,2%. Een verklaring hiervoor is dat in het testmonster al een concentratie glycine en serine zat voordat er mengstandaard werd toegevoegd. Wat deze verklaring ondersteund is dat in paragraaf 4.4.1 glycine en serine werden gedetecteerd.

Ook valt op dat de detectielimieten berekend met formule 2.2. Hoger liggen dan de LOD's weergegeven in tabel 8. De reden hiervoor is dat de standaarden waarmee de kalibratielijnen werden opgesteld niet werden opgewerkt met SPE. Omdat monsters ook zullen worden opgewerkt met SPE zijn de detectielimieten in tabel 9 representatiever voor de werkelijkheid dan de LOD's in tabel 8. Vanwege deze reden zullen deze detectielimieten worden gerapporteerd in het hoofdstuk conclusie en aanbevelingen.

In tabel 10 zijn de gemeten RSD%, de voorspelde RSD% door middel van de Horwitz functie en de HorRat weergegeven. De voorspelde RSD% werd berekend met formule 2.3. De HorRat werd berekend met formule 2.4. Een HorRat tussen de 0,5 en 2,0 wijst op een analyse dicht bij de grens van een betrouwbare meting<sup>. [37]</sup> De HorRat waardes van de vier componenten lagen tussen de 1,0 en 1,6. Hierom werd geconcludeerd dat de gemeten RSD dicht bij een betrouwbare meting lag.

Tabel 10: Relatieve standaarddeviatie vergeleken ten op zichte van de voorspelde relatieve standaarddeviatie met de Horwitz functie en de HorRat.

	RSD%	Voorspelde RSD%	HorRat
		d.m.v. Horwitz	
Glycine	27,8	26,0	1,1
Isoleucine	32,7	24,4	1,3
Serine	40,5	25,1	1,6
Octopamine	22,7	23,0	1,0

#### 4.6 De twintig geanalyseerde monsters uit het RAAK initiatief

In figuur 11 is het chromatogram weergegeven van één van de monsters geanalyseerd uit het RAAK initiatief. Wat in dit chromatogram opviel was dat er na 34 minuten een onbekende stof te zien was. Deze piek was in de eerdere experimenten met de testmonsters nog niet waargenomen. De NIST identificeerde deze stof als prostaglandine echter was de betrouwbaarheid van deze identificatie laag. In een onderzoek is vastgesteld dat prostaglandine één van de feromonen is waarmee vissen met elkaar communiceren<sup>[38]</sup>. In monsters van mannelijke en vrouwelijke kreeften werd dezelfde stof aangetroffen. Als deze stof een feromoon is van de kreeften gaat het niet om een geslachtsferomoon. Als aanbeveling voor vervolgonderzoek zal terugkomen om te proberen om deze stof te identificeren als prostaglandine.



Figuur 11: Chromatogram van een monster uit het RAAK initiatief.

In hetzelfde onderzoek uit 2013 is ook te zien dat taurocholic acid (TCA) en petromuzonamine disulfate (PADS). Zijn geïdentificeerd als belangrijke stoffen met een feromanale functie [38]. De structuurformules van deze twee stoffen zijn weergegeven in bijlage N. Wanneer de feromonen van de kreeften zullen lijken op deze visferomonen. Is het niet mogelijk om deze te analyseren met de huidige analysemethode op de GC-MS. Het vermoeden is dat deze vanwege de polaire zijgroepen en de totale molmassa, ook na derivatisatie een te hoog kookpunt hebben om te worden gedetecteerd met GC-MS. De maximale temperatuur van de wcot fused silica 30mx0.25mm id coating cp-sil 8 cb low bleed/ms kolom is 300 °C <sup>[39]</sup>. Bij gebruik van een LC/MS is het wel mogelijk om deze stoffen te detecteren <sup>[38]</sup>. Als aanbeveling voor vervolgonderzoek zal terugkomen om een aantal aquariumwater monsters uit het RAAK initiatief te analyseren met LC/MS.

In tabel 11 zijn de componenten weergegeven die met de NIST database zijn geïdentificeerd in het chromatogram weergegeven in figuur 11. In deze tabel zijn alleen de componenten weergegeven die niet waren geïdentificeerd in het blanco monster. De volledige tabel is weergegeven in bijlage M. In de tabel zijn net als in tabel 6 en tabel 7 aminozuren te zien en een aantal stoffen die betrokken zijn bij biologische processen. In figuur 12 zijn deze componenten opnieuw weergegeven in een staafdiagram.

Retentietijd (min)	Component
13,51	Nonanoic acid TBDMS
14,25	Urea 2TBDMS
14,58	L-Leucine 2TBDMS
14,81	Isoleucine 2TBDMS
15,28	4-aminobutanoic acid 2TBDMS
16,52	Glycerol 3TBDMS
17,53	N-Acetylaspartic acid 2TBDMS
18,78	L-Phenylalanine 2TBDMS
22,75	Urocanic acid 2TBDMS
23,12	L-Tyrosine 3TBDMS
34,23	Prostaglandin

Tabel 11: Componenten aangetroffen in aquarium watermonsters uit het RAAK initiatief.

Tijdens de monstername uit de aquaria vanuit het RAAK initiatief werd er waargenomen dat bij een aantal monsternames kreeften waren verveld. In het staafdiagram in figuur 12 is te zien dat in de monsters waarin kreeften verveld waren meer aminozuren zijn aangetroffen dan in de monsters waarin de kreeften niet verveld waren. Echter was er in deze weergave geen verschil te zien tussen een monster van een vrouwelijke kreeft, en een monster van een mannelijke kreeft. Een aanbeveling is om met de resultaten uit dit onderzoek een PCA uit te voeren. Het zou kunnen dat met behulp van een PCA wel een onderscheid kan worden gemaakt tussen een monster van een vrouwelijke en een mannelijke kreeft.



Figuur 12: Componenten aangetroffen in watermonsters van vervelde en niet vervelde kreeften, en mannelijke en vrouwelijke kreeften.

# 5.Conclusie en aanbevelingen

Het doel van dit afstudeeronderzoek was het ontwikkelen van een GC-MS methode voor de identificatie van de feromonen van de rode Amerikaanse rivierkreeft. De detectielimieten werden bepaald voor glycine 0,12  $\mu$ g/mL, isoleucine 0,18  $\mu$ g/mL, serine 0,15  $\mu$ g/mL en octopamine 0,27  $\mu$ g/mL. De reproduceerbaarheid werd bepaald voor glycine 0,04  $\mu$ g/mL, isoleucine 0,06  $\mu$ g/mL, serine 0,05  $\mu$ g/mL en octopamine 0,09  $\mu$ g/mL en beoordeeld door middel van de Horwitz functie.

De resultaten laten zien dat de ontwikkelde analysemethode in staat is om biogene amines in de aquarium watermonsters te detecteren. Echter werden er geen feromonen geïdentificeerd die specifiek zijn voor de aanwezigheid van de rode Amerikaanse rivierkreeft. Er werd geconcludeerd dat de detectielimieten van de methode voor de feromonen te hoog zijn. Hierdoor is de analysemethode nog niet in staat om de aanwezigheid van de rivierkreeft in een watergebied aan te tonen.

Om de detectielimieten van de analysemethode te verlagen kunnen de volgende aanbevelingen worden gedaan.

- 1. Het bepalen van de reactiecondities voor een volledige derivatisatiereactie.
- 2. Het SPE terugvindingpercentage van glycine, serine, threonine en lysine verhogen. Dit kan worden gedaan door een SPE procedure te ontwikkelen met de MAX kolom.
- 3. In een volgende proefopzet met aquaria te bemonsteren met een groter volume dan 40 mL.

Om de kwaliteit van de analysemethode verder te verbeteren kunnen de volgende aanbevelingen worden gedaan.

- 1. Het toevoegen van een interne standaard. Dit verbetert de kwaliteit van de analysemethode aanzienlijk. Een potentiële interne standaard kan een gedeutereerd aminozuur zijn.
- 2. Het bepalen van de reproduceerbaarheid van de methode voor de componenten valine, threonine, fenylalanine, lysine en serotonine. Dit kan worden gedaan door een hogere concentratie van de mengstandaard toe te voegen aan de reproduceerbaarheid monsters.

## 6. Referenties

[1] Menno Soes & Rombout van Eekelen, Rivierkreeften, een oprukkend probleem?, De Levende Natuur, (2006), pagina 56 t/m 59

[2] Afbeeldingen Turkse rivierkreeft, Europese rivierkreeft en Amerikaanse rivierkreeft https://rivierkreeft.nl/soorten-indentificatie/Geraadpleegd op: 30-9-2021

[3] Onderzoek naar rivierkreeften in het beheergebied van het Hoogheemraadschap De Stichtse Rijnlanden, Peter Heuts, versie 1.4, Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden, (21 december 2012) pagina: 6 t/m 14

[4] Drie manieren om natuurschade door rode rivierkreeft aan te pakken <u>https://hansmiddendorp.nl/rode-rivierkreeft/</u> Geraadpleegd op: 26-1-2022

[5] Projectvoorstel RAAK-Publiek 2018, *eDNA en eMetabolomics: moleculaire foto's van het onderwaterleven.* 

[6] M. van Klink, Methodeontwikkeling voor het identificeren en kwantificeren van biogene amines van de rode Amerikaanse rivierkreeft met GC, LCAB (31 mei 2021)

[7] R. Huber A. Delago Serotonn alters decisions to withdraw in fighting crayfsh, Astacus astacs: the motivational concept revisited, researchgate (Oktober 1997) pagina: 573 t/m 583

[8] D.C. Harris, quantitive chemical analysis, W.H. Freeman and Company New York, 5e editie (1998) pagina: 700 & 743

[9] Afbeelding structuurformule (±) Octopamine hydrochloride https://www.selleckchem.com/products/octopamine-hcl.html Geraadpleegd op: 30-9-2021

[10] Afbeelding structuurformule serotonine
<u>https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/product/sial/14927?context=product</u>
Geraadpleegd op: 30-9-2021

[11] Determination of pesticides in river surface water of central Chile using SPE-GC-MS multiresidue method, Maria José Climent Maria Jesús Sánchez-Martin Maria Sonia Rodríguez-Cruz Pablo Pedreros Roberto Urrutia en Eliseo Herrero-Hernández, (juni 2018)

[12] Thermo Scientific ISQ Series Single Quadrupole GC-MS Systems Advanced GC-MS systems designed for continuous high-throughput operation, Thermo scientific, (2016), pagina: 1 & 2

[13] Agilent 5975C TAD Series GC/MSD SystemData Sheet, Agilent Technologies, (2012), pagina: 1 t/m 4

[14] M. Thompson, The amazing Horwitz function, Royal Society of Chemistry (17 juli 2004), Pagina: 1 & 2

[15] What is metabolomics? https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/what-is/ Geraadpleegd op: 3-3-2022 [16] Lindenburg, P.W.; Van Roon, A., The promis of eMetabolomics, the analytical scientist (10 februari 2020)

https://theanalyticalscientist.com/fields-applications/the-promise-of-emetabolomics Geraadpleegd op: 25-1-2022

[17] T. Beithaupt & M. Thiel chemical communication in crustaceans , Springer Science+Business Media, LLC (2011) hoofdstuk: 13

[18] T.D Wyatt, fifty years of pheromones, Nature (15 januari 2009), pagina: 263 & 264

[19] Pheromones mediating seks and dominance in aquatic animals, Thomas Breithaupt & Jorg Hardege, (Maart 2012), Hoofdstuk 3 Pagina: 39

[20] Bushmann, P.j. and Atema, j. chemically mediated mate location and evaluation in the lobster homarus americanus, Journal of Chemical Ecology, (2000) pagina: 883

[21] J.L. Little, Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them, Eastman Chemical Company (22 februari 1999) pagina: 2

[22] Afbeelding MTBSTFA reactie

https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/technical-article/analyticalchemistry/gas-chromatography/the-derivatization Geraadpleegd op: 3-3-2022

[23] Goals and benefits of SPE

https://www.waters.com/waters/en\_US/Goals-and-Benefits-of-SPE/nav.htm?cid=10083495&locale=en\_US Geraadpleegd op: 3-3-2022

[24] Sample preparation, Waters (Juli 2014) pagina 32 & 33

[25] O. Fiehn, Metabolomics by Gas chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling, John Wiley & Sons, Inc (april 2016)

[26] Quick start guide oasis Prime MCX Mixed-mode (Reversed-phase/Cation eXchange) SPE in 3 or 4 steps, Waters (januari 2018) pagina: 1 & 2

[27] J.W.A. Klaessens, Statistiek, validatie en meetonzerkerheid voor het laboratorium, Syntax Media (Arnhem 2006)

[28] Shareef A, Angove M.J, Wells J.D. Optimzation of silylation uising *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, *N*,*O*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and  $17\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry, Elsevier (Maart 2006), pagina: 121 t/m 128

[29] S.L. Söderholm, M. Damn & C.O. Kappe, Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis, Springer Science+Business Media B.V. (12 maart 2010) pagina:

[30] What is the expiration date of Sep-Pak and Oasis products? (22 december 2021) https://support.waters.com/KB\_Chem/Sample\_Preparation/WKB27214\_What\_is\_the\_expiration\_d ate\_of\_Sep-Paks\_and\_Oasis\_products Geraadpleegd op: 13-12-2021 [31] Z. Heger, J. Gumulec, N. Cernei, H. Polanska, M. Raudenska, M. Masarik, T. Eckschlager, M. Stibrova, V. Adam and R. Kizek. Relation of exposure to amino acids involved in sarcosine metabolic pathway on behavior of non-tumor and malignant prostatic cell lines, Wiley Periodicals, Inc. (2016) pagina: 1

[32] Pyroglutamic acid

https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/pyroglutamic-acid Geraadpleegd op: 3-3-2022

[33] Urocanic acid https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/urocanic-acid Geraadpleegd op: 3-3-2022

[34] Lipids

https://courses.lumenlearning.com/boundless-chemistry/chapter/lipids/ Geraadpleegd op: 3-3-2022

[35] Solid Phase Extraction Products Improve Sensitivity and Increase Throughput, Sigma-A Idrich Co. LLC. (2015) pagina: 5

[36] A.Hubraux, G. Vos, Decision and detection limits for linear calibration curves, Euratom (8 juli 1970) pagina: 850

[37] W. Horwitz & R. Albert, The Horwitz ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, U.S. Food and Drug Administration (2006) pagina: 1101

[38] M. Stewart, C.F. Baker and P.W. Sorensen, Chemical Analysis of Aquatic Pheromones in Fish, Springer Science+Business media (2013) pagina: 56

[39] CP-Sil 8 CB Columns https://www.agilent.com/en/product/gc-columns/standard-polysiloxane-gc-columns/cp-sil-8-cbcolumns Geraadpleegd op: 3-3-2022

[40] Afbeelding taurocholic acid https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Taurocholic-acid Geraadpleegd op: 2-3-2022

# 7. Bijlagen



Bijlage A Flowschema van proces van de methode ontwikkeling





Figuur 13: Chromatogram van het blancomonster na derivatisatie met pyridine.



Figuur 14: Chromatogram van het blancomonster na derivatisatie met acetonitril.

### Bijlage C: Retentietijden van de componenten uit de mengstandaard

Tabel 12: De 10 componenten uit de mengstandaard met de bijbehorende retentietijden in figuur 2 en figuur 3.

Retentietijd (min)	Component
11,4	Glycine 2TBDMS
12,3	L-valine 2TBDMS
13,0	Isoleucine 2TBDMS
13,2	L-serine 2TBDMS
13,3	L-Threonine 2TBMS
15,6	L-hydroxyproline2TBDMS
15,8	L-Serine3TBDMS
16,0	L-Threonine 3TBMS
16,8	L-phenylalanine 2TBDMS
17,4	octopamine 2TBDMS
19,3	L-Lysine 3TBDMS
19,8	Octopamine 3TBDMS
21,9	Serotonine derivaat



Bijlage D: Vergelijking in piekoppervlakte bij het gebruik van de katalysator pyridine en acetonitril

Figuur 15: Piekoppervlaktes van de 10 componenten uit de mengstandaard bij derivatisatie met pyridine en acetonitril.

#### Bijlage E: Relatieve standaarddeviaties na 4 uur en 8 uur derivatiseren

Tabel 13: Relatieve standaarddeviatie van de 10 componenten uit de mengstandaard na 4 uur en 8 uur derivatiseren met acetonitril.

	4 uur	8 uur	4 uur RSD%	8 uur RSD%
glycine 2TBDMS	5997151,7	7640659	21,0	16,1
L-valine 2TBDMS	5105701,3	6474597	20,4	15,1
isoleucine 2TBDMS	3005970,7	3871999	19,9	17,9
L-hydroxyproline 2TBDMS	514387,33	496425,7	28,2	16
L-serine 3TBDMS	2156229,3	2845207	17,2	13,8
L-threonine 3TBDMS	2268243,7	3134813	17,0	12,8
L-phenylalanine 2TBDMS	1810189,3	2408627	15,2	12,8
L-lysine 3TBDMS	1050088	2089290	17,2	10,8
octopamine 3TBDMS	11667885	16467332	11,0	11
serotonine derivaat	3215167	3865999	8,2	11,4

# Bijlage F: Gemeten piekoppervlaktes tijdens de split optimalisatie

Component	Peak area				
	split 1:50	split 1:40	split 1:30	split 1:20	split 1:10
Glycine 2TBDMS	4269091	5570681	7808165	12723677	25658009
L-valine 2TBDMS	3804930	4824647	6591588	10743205	22578955
Isoleucine 2TBDMS	2733787	2733787	3781712	6112195	13590417
L- hydroxyprolin e2TBDMS	18113	36642	36642	52348	54259
L- Serine3TBDM S	1446511	1844077	2436502	4173436	10453454
L-Threonine 3TBMS	1178816	1479169	1903577	3155797	7798392
L- phenylalanine 2TBDMS	1069719	1356215	1840874	3029668	7053214
L-Lysine 3TBDMS	495286	705587	1077978	2001320	5490391
Octopamine 3TBDMS	6628625	8713865	12606443	21220678	37299973
Serotonine TBDMS derivaat	747245	1142195	2015682	4331486	12523320

Bijlage G: Piekoppervlaktes geanalyseerd tijdens het bepalen van het terugvinding percentage

Componenten	Gemiddelde	Gemiddelde 100% standaard
Glycine 2TBDMS	496332,5	40207304
L-valine 2TBDMS	17849684	27236892
Isoleucine 2TBDMS	16971056	21884916
L-hydroxyproline	-	2830525
2TBDMS		
L-Serine3TBDMS	38785,5	23027807
L-Threonine 3TBMS	106113	19405200
L-phenylalanine	7250044	15787675
2TBDMS		
L-Lysine 3TBDMS	34663	16550643
Octopamine 3TBDMS	48669021	49939443
Serotonine derivaat	26084885	32125185

Tabel 14: Piekoppervlaktes van de terugvinding monsters opgewerkt met de MCX kolom.

#### Piekoppervlaktes MAX kolom

Tabel 15: Piekoppervlaktes van de terugvinding monsters opgewerkt met de MAX kolom.

	Gemiddelde	100%std gemiddelde
Glycine 2TBDMS	15192	12652745
L-valine 2TBDMS	41393	9469320
Isoleucine 2TBDMS	66617	3750740
Lhydroxyproline 2TBDMS	n.a.	159679
L-Serine3TBDMS	1608	2961293
L-Threonine 3TBMS	138446	421583
L-phenylalanine 2TBDMS	748640	2107746
L-Lysine 3TBDMS	n.a.	1497580
Octopamine 3TBDMS	47968	9613838
Serotonine derivaat	4551	2470842

#### Bijlage H: Componenten geïdentificeerd in het blanco testmonster

Retentietijd (min)	Component
10,15	Cyclohexylamine N-tert-butyldimethylsilyl
10,94	Levulinic acid
11,10	Bis(tert-butyldimethylsilyl) carbonaat
11,34	Ethylhexanoic acid TBDMS
12,54	Bis(tert-butyldimethylsiyl) carbamaat
12,61	Benzoic acid TBDMS
14,81	Diethyleen glycol 2TBDMS
16,08	Undecanoic acid TBDMS
17,21	Dodecanoic acid TBDMS
17,82	Adipic acid 2TBDMS
19,12	Myristic acid TBDMS
19,93	4-hydroxybenzoic acid
20,73	Azelaic acid 2TBDMS
20,78	Palmitic acid TBDMS
22,40	Oleic acid TBDMS
22,53	Stearic acid TBDMS
22,68	Urocanic acid 2TBDMS

Tabel 16: Componenten geïdentificeerd in het blanco testmonster.

### Bijlage I: Componenten geïdentificeerd in het slootwater testmonster



Figuur 16: Chromatogram van het slootwater testmonster.

Tabel 17: Componenten geïdentificeerd in het slootwater testmonster

Retentietijd (min)	Component
11,35	Heptanoic acid TBDMS
11,80	Sarcosine 2TBDMS
12,69	Benzoic acid TBDMS
12,79	Glycolic acid TBDMS
13,28	Oxalic acid 2TBDMS
13,48	Glycine 2TBDMS
13,82	Nonaic acid TBDMS
14,86	Boric acid TBDMS
14,55	Urea TBDMS
14,43	Alanine 2TBDMS
14,97	Decanoic acid TBDMS
16,88	Glycerol 3TBDMS
17,12	Dodecanoic acid TBDMS
17,73	L-pyroglutamic acid 2TBDMS
19,08	Myristic acid TBDMS
20,06	Cysteïne 3TBDMS
21,55	Lysine 3TBDMS
22,65	Urocanic acid 2TBDMS

# Bijlage J: Componenten geïdentificeerd in het kraanwater testmonster

Tabel 18: Componen	ten geïdentifice	erd in het kraar	nwater testmonster.
--------------------	------------------	------------------	---------------------

Component	NIST match percentage	Geïdentificeerd in blanco	Gezien in slootwater sample
Cyclohexylamine N-	76,7	Ja	Ja
tert-			
butyldimethylsilyl			
Levulinic acid TBDMS	79,2	Ja	Nee
Bis(tert-	80,2	Ja	Ja
butyldimethylsilyl)			
carbonaat			
Ethyl hexanoic acid	28,9	Ja	Nee
TBDMS			
Bis(tert-	87,3	Ja	Ja
butyldimethylsilyl)			
carbamaat			
Benzoic acid TBDMS	84,3	Ja	Ja
Glycolic acid TBDMS	73,4	Nee	Ja
Butylated hydroxy	71,4	Ja	Nee
tolueen			
L-Proline 2TBDMS	47,1	Nee	Nee
L-Alanine 2TBDMS	54,3	Nee	Ja
Oxalic acid 2TBDMS	74,9	Nee	Ja
Glycine 2TBDMS	80,8	Nee	Ja
L-Valine 2TBDMS	67,4	Nee	Nee
Leucine 2TBDMS	43,4	Nee	Nee

L-serine 2TBDMS	97,9	Nee	Nee
Aceturic acid	9,6	Nee	Nee
21BDMS			
Threonine 2TBDMS	50,8	Nee	Nee
Butadecanoic acid	84,5	Ja	Nee
2TBDMS			
Undecanoic acid	11,2	Ja	Nee
TBDMS			
Glycerol 3TBDMS	95,1	Nee	Ja
Phosporic acid tert	90,1	Ja	Ja
methyl ester			
L-serine 3TBDMS	95,5	Nee	Nee
Myristic acid TBDMS	79,0	Ja	Ja
Malic acid 3TBDMS	89,4	Nee	Nee
4-hydroxybenzoic	76,5	Ja	Nee
acid 2TBDMS			
Pentadecanoic acid	70,3	Ja	Nee
TBDMS			
Triethanolamine	63,3	Nee	Nee
3TBDMS*			
Azelaic acid 2TBDMS	97,1	Ja	Nee
L-glutamic acid	42,5	Nee	Ja
<b>3TBDMS</b>			
Sebacic acid 2TBDMS	8,2	Nee	Nee
Stearic acid TBDMS	90,2	Ja	Ja

# Bijlage K: componenten geïdentificeerd in het kraanwater testmonster met als monstervolume 250 mL

Tabel 19: Componenten geïdentificeerd in het kraanwater testmonster met een verkleind monstervolume.

Retentietijd (min)	Component
10,12	Cyclohexylamine N-tertbutyldimethylsilyl
10,98	Levulinic acid TBDMS
11,04	Bis(tert-butyldimethylsilyl carbonaat
11,28	Heptanoic acid TBDMS
11,52	Ethyleen glycol 2TBDMS
11,78	Methyl malonic acid 2TBDMS
12,50	N,O-Bis-tert-butyldimethylsilyl carbamaat
12,71	Benzoic acid TBDMS
12,74	Glycolic acid 2TBDMS
13,08	Butylated hydroxytolueen
13,23	Glycine 2TBDMS
13,73	Sulfuric acid 2TBDMS
13,82	Nonanoic acid TBDMS
14,78	Diethyleen glycol 2TBDMS
14,92	Decanoic acid TBDMS
15,75	Butanedioicacid 2TBDMS
15,98	Undecanoic acid TBDMS
16,12	Glycerol 3TBDMS

16,61	Dodecanoic acid TBDMS
17,42	Phosporic acid tert-butylester
18,03	Adipic acid 2TBDMS
18,82	Heptanedioic acid 2TBDMS
18,96	Myrisitic acid TBDMS
19,27	4-hydroxy benzoic acid 2TBDMS
19,73	Suberic acid 2TBDMS
19,92	Pentadecanoic acid TBDMS
20,48	Phloretic acid TBDMS
20,71	Azelaic acid TBDMS
20,82	Palmitic acid TBDMS
22,51	Stearic acid TBDMS
22,61	Urocanic acid 2TBDMS

### Bijlage L: Data gebruikt voor het berekenen van de prestatiekenmerken



Figuur 17: kalibratielijn van serotonine met het bereik van 1 μg/mL en 10 μg/mL.

Conce	Glycine	valine	Isoleucine	hydroxy	Serine	Threo	phenylal	Lysine	Octopamine	Serotonin
ntratie	2TBDMS	2TBDMS	2TBDMS	proline	<b>3TBDMS</b>	nine	anine	<b>3TBDMS</b>	3TBDMS	e derivaat
(µg/m				2TBDMS		3TBMS	2TBDMS			
L)										
0,05	n.a.	24519	5600	n.a.	729	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
0,1	4875	30130	9061	n.a.	2155	2935	1028	n.a.	n.a.	n.a.
0,2	11136	35315	15134	n.a.	2889	5099	2313	n.a.	2778	n.a.
0,3	21550	48438	21900	n.a.	5729	7193	3433	n.a.	4821	n.a.
0,4	25216	50214	24456	n.a.	6835	7035	4707	808	5627	n.a.
0,6	42502	60570	31740	n.a.	12623	10745	6202	1784	9778	n.a.
0,8	68052	90725	51923	n.a.	18617	16881	10631	2388	14734	n.a.
1,2	107519	125626	76404	n.a.	31427	28316	18008	3765	21083	n.a.

Tabel 23: Piekoppervlaktes van de componenten uit de mengstandaard gebruikt bij het opstellen van de kalibratielijnen weergegeven in figuur 9.

Tabel 24: Piekoppervlaktes van de acht reproduceerbaarheids monsters gebruikt bij bepalen van de reproduceerbaarheid en detectielimieten.

Monster	Glycine	Isoleucine	L-Serine	Octopamine
	2TBDMS	2TBDMS	3TBDMS	3TBDMS
1	17946	15650	5038	14623
2	11973	15580	2224	19346
3	12609	16030	5541	14616
4	9069	6612	2896	14974
5	13231	16832	2749	17354
6	7592	16539	2247	16547
7	16866	8926	5043	19871
8	15816	8469	2420	18794

Bijlage M: Componenten geïdentificeerd in de aquarium watermonsters vanuit het RAAK initiatief

Retentietijd (min)	Component
10,92	Bis(tert-butyldimethylsilyl) carbonaat
12,29	N,O-Bis(tert-butyldimethylsilyl) carbamaat
12,48	Benzoic acid TBDMS derivate
12,68	butylated hydroxytolueen
13,51	Nonanoic acid TBDMS
14,25	Urea 2TBDMS
14,48	diethyleen glycol 2TBDMS
14,58	L-Leucine 2TBDMS
14,81	Isoleucine 2TBDMS
15,28	4-aminobutanoic acid 2TBDMS
16,52	Glycerol 3TBDMS
16,73	Dodecanoic acid TBDMS
17,04	Phosporic acid, tris(tert-butyldimethylsilyl) ester
17,53	N-Acetylaspartic acid 2TBDMS
18,78	L-Phenylalanine 2TBDMS
19,22	4-hydroxybenzoic acid 2TBDMS
20,58	palmitic acid TBDMS
22,75	Urocanic acid 2TBDMS
23,12	L-Tyrosine 3TBDMS
34,23	Prostaglandin

Tabel 25: Componenten geïdentificeerd in de aquarium watermonsters vanuit het RAAK initiatief.

Bijlage N: Structuurformules van taurocholic acid en petromuzonamine



