



Bijlage B Testprotocol Waterproef

Samenvatting

Om de LCMS-systemen van de verschillende firma's te kunnen vergelijken worden door Waterproef twee verschillende oppervlaktewatermonsters en twee standaarden beschikbaar gesteld. Aan inschrijvers die voornemens zijn een inschrijving in te dienen wat betreft de Europese aanbesteding Levering en installatie UHPLC – MSMS t.b.v. Stichting Waterproef. Deze dienen door de Inschrijvers binnen de door Waterproef vastgestelde kaders te worden geanalyseerd.

Stichting Waterproef bepaalt uit de resultaten o.a., de ratio's, retentietijden en de gevoeligheid van het systeem en of op de aangegeven concentratieniveaus nog betrouwbare resultaten kunnen worden gerapporteerd.

De Inschrijver maakt een afspraak via TenderNed over het ophalen van de testmonsters en bijbehorende oplossingen. In de planning (zie de Aanbestedingsleidraad) staat aangegeven vanaf wanneer de testmonsters beschikbaar zijn en tot wanneer de resultaten ingestuurd kunnen worden.

Betreffende risico's van breuk, zoekraken etc. zijn voor rekening voor de inschrijver. Voor calamiteiten (breuk/zoekraken) zijn er reservemonsters beschikbaar op basis van beschikbaarheid.

Er is een selectie gemaakt van een aantal componenten die geanalyseerd moeten worden met positieve en negatieve ionisatie. De addities worden door de inschrijver op hun laboratorium aan de matrix oppervlaktewater toegevoegd volgens het bijgeleverde schema (Bijlage 1: Bereidingsschema kalibratie en monsters, van dit document).

Informatie over analyse en rapportage

1.1 Te meten componenten

De te meten componenten zijn weergegeven in onderstaande tabel:

Component	CAS nummer
Amisulbrom	348635-87-0
Clothianidine	210880-92-5
Cyazofamide	120116-88-3
Cymoxanil	57966-95-7
Desmedifam	13684-56-5
Fenmedifam	13684-63-4
Fenoxycarb	72490-01-8
Fipronil	120068-37-3
Florasulam	145701-23-1
Fluazifop-P-butyl	79241-46-6
Fluazinam	79622-59-6
Fludioxonil	131341-86-1
Mesotrione	104206-82-8
Methoxyfenozide	161050-58-4
Oxamyl	23135-22-0
Triallaat	2303-17-5

De aangeleverde standaarden bevatten naast de geselecteerde componenten uit bovenstaande tabel nog circa 200 andere GBM-componenten.

Er is een selectie van 16 componenten gemaakt omdat het voor de inschrijver een onredelijke hoeveelheid werk is om voor te veel componenten de gevraagde parameters te rapporteren.

De selectie bestaat uit diverse bestrijdingsmiddelen. Hierbij is een selectie gemaakt met criteria zoals:

- Negatieve en positieve ionisatie
- Hoge en lage massa's van precursor/fragment, goede ratio (> 0.3)
- Polariteit
- Lastig/eenvoudige analyse
- Selectiviteit (daarom veel andere componenten aanwezig)

Met de resultaten uit de geselecteerde componenten kan Stichting Waterproef een goed beeld krijgen van de prestatiekenmerken en performance van het systeem.

1.2 Opzet instrument/ processing/ rapportage

Om de resultaten correct met elkaar te kunnen vergelijken zijn de volgende eisen gesteld aan enkele parameters/onderdelen om de meetomstandigheden voor de verschillende inschrijvers zo gelijk mogelijk te houden.

Onderdeel	Eis aan het betreffende onderdeel
Injectievolume	50 µl directe injectie zonder extra voorbereidingen zoals SPE
Eluens + gradiënt	Methanol - water
Injectie	Elke injectie uit een andere vial, geen meerdere injecties uit een vial
MRM	Minimaal 2 MRM's per component (indien mogelijk), geen sommaties van respons toepassen

Tr bereik	4 – 25 min
Filtratie	Filtratie van het oppervlaktewater voor het spiken over 0.45 µm filter. Niet gespikete meetoplossingen moeten ook gefiltreerd worden over 0.45 µm.
Interne standaard	Geen correctie toegestaan
Kolom/ dimensie	C18 kolom, 100 mm (1.5-10 u/m deeltjesgrootte)
Meting	Alle metingen worden uitgevoerd conform de aangeleverde volgorde van de sequence. Hierin mag niet afgeweken worden
Foutieve data	Zie paragraaf 1.6
Smoothing	Geen smoothing toegestaan
Kalibratie	Kalibratielijn type kwadratisch, niet geforceerd door 0, 1/x
Rapportage	Alleen resultaten aangeleverd in de Bijlage Rapportage formulier worden verwerkt. (Afbeeldingen uitgezonderd)

De monsters moeten gefiltreerd worden (bijvoorbeeld 0,45 µm) **voor** de additie en analyse. Dit is om mogelijke adsorptie effecten tegen te gaan, er zullen er waarschijnlijk verschillende filters worden gebruikt. Graag het type/merk/poriegrootte rapporteren in de Bijlage Rapportage formulier.

Het doel is om de performance van de apparatuur te meten en dit zo weinig mogelijk te laten beïnvloeden door mogelijke beïnvloeding door de filtratiestap.

De richtlijn voor de retentietijden is tussen de ca. 4 minuten en 25 minuten.

Het is niet de bedoeling om tijdens de analyse van de testmonsters een zo snel mogelijke chromatografie te realiseren voor de doelcomponenten. De methode in het laboratorium bestaat, na validatie, uit circa 50 – 100 componenten. Hiervoor is de chromatografie ook voldoende waarbij de componenten verdeeld zullen zijn over het retentiegebied van circa 4-25 minuten.

1.3 Matrix

Voor de bereiding worden twee oppervlaktewatermatrices en twee vials met een standaard beschikbaar gesteld. Aan de hand van Bijlage 1: Bereidingsschema kalibratie en monsters, van dit document, moeten de monsters en kalibraties worden bereid.

De monsters worden aangeboden in flessen waar bij het monster bevroren is. De set bestaat uit twee matrices oppervlaktewater en twee standaard vials van met elk ca. 10 ml standaard in methanol.

Oppervlaktewater matrix A

Fortwater Edam,

Kalibratie, checkstandaarden, lage addities

4 x 500 ml fles met ca. 250 ml ingevroren oppervlaktewater per fles

Oppervlaktewater matrix B

Ringvaart Edam,

Hoge additie

1 x 500 ml fles met ca. 250 ml ingevroren oppervlaktewater per fles

Tussenoplossing Laag

1 x 10 ml vial met ca. 10 ml standaard in methanol

Tussenoplossing Hoog

1 x 10 ml vial met ca. 10 ml standaard in methanol

De monsters worden in bevroren toestand aangeboden om de resultaten onderling beter te kunnen vergelijken. Het is niet erg als de monsters bij aankomst (gedeeltelijk) zijn ontdooid.

Er is voor gekozen om de inschrijvers de kalibratiestandaarden en de addities te laten uitvoeren. Dit geeft meer vrijheid in de datum van analyse en omdat er vrij lage concentraties worden geaddieerd wordt het mogelijke effect van afbraak in de periode tussen additie en analyse zoveel mogelijk geminimaliseerd.

1.4 Bereiding monsters

Ontdooi de monsters en homogeniseer deze. De meetoplossingen kunnen worden bereid in maatkolven van 50 ml maar dit mag ook op een andere wijze uitgevoerd worden mits de concentraties van de monsters identiek zijn met Bijlage 1: Bereidingsschema kalibratie en monsters, van dit document. Per meetoplossing is 50 ml (oppervlakte)water nodig volgens het schema.

Aan elke te meten oplossing mag methanol toegevoegd worden, als de methanol concentratie in alle te meten oplossingen maar gelijk is.

Alle verschillende oplossingen van het spikeschema hoeven maar 1x bereid te worden. Deze worden daarna in aparte vials uitgevuld volgens de sequence (Bijlage 2, Sequence van dit document). Elke meting wordt uit een eigen vial gemeten.

De 2x en 5x verdunning van kal 1 wordt gemaakt door deze te verdunnen met KAL 0.

1.5 Sequence voor de meting

De sequence moet in de vastgestelde volgorde plaatsvinden.

Vooraf aan de kalibratie mogen er enkele proefinjecties plaatsvinden om het systeem te optimaliseren. Dit is ter beoordeling van de inschrijver zelf. Daarna moeten de monsters volgens de aangeleverde sequence gemeten worden.

Voor de samenstelling van de sequence zie Bijlage 2, Sequence van dit document.

1.6 Rapportage

De rapportage moet volgens "Bijlage C: rapportage formulier" (zie onderstaande beschrijving) worden gerapporteerd.

Dit om de volgende redenen:

- De dataverwerking van de opdrachtgever te vereenvoudigen
- Invoer-fouten te voorkomen die leiden tot foute scores

In de rapportage moeten alle belangrijke parameters worden weergegeven zowel van de instrumentgegevens, methodegegevens als de respons.

"Bijlage rapportage formulier" bestaat uit drie tabbladen waarvan er twee volledig ingevuld dienen te worden door de inschrijver.

- Sequence + methode
- Rapportage formulier

Alle witte cellen in dit formulier moeten zijn ingevuld. Wanneer voor een meting geen resultaat is verkregen, moet er 0 worden ingevuld. Wanneer voor een onderdeel waar punten aan worden toegekend een lege cel wordt gerapporteerd, wordt er voor dat component/onderdeel geen punten toegekend.

De punten toekenning per component per onderdeel is direct zichtbaar in de spreadsheet. Als decimaalscheidingsteken moet een komma (,) worden gebruikt.

Het is niet toegestaan dat er ruis wordt geïntegreerd en gerapporteerd. Indien een piek niet zichtbaar is, dient er 0 gerapporteerd te worden. Waterproef houdt zich het recht voor om resultaten te wijzigen in de spreadsheet naar 0 wanneer zij van mening is dat er bij een component ruis is geïntegreerd.

Wanneer er door de opdrachtgever een fout in het formulier wordt geconstateerd die invloed zou kunnen hebben op de resultaten, dan worden alle resultaten van de inschrijvers opnieuw verwerkt in de aangepaste spreadsheet.

Rapportage in tabblad "Sequence + methode"

Vul de witte cellen in. Voor meting 1 mogen eerst andere metingen plaatst vinden, vanaf meting 1 moet de sequence volgorde aangehouden worden.

Onderdeel "Gegevens sequence":

- Injectienummer
- Injectie datum + tijd
- Naam acquisitiemethode

Onderdeel "Methode gegevens":

- Precursor 1 (Da, afronding 0,1)
- Fragment 1 (Da, afronding 0,1)
- Precursor 2 (Da, afronding 0,1)
- Fragment 2 (Da, afronding 0,1)
- Vergelijking van de kalibratielijn
- Correlatiecoëfficiënt van de kalibratielijn
- Gebruik van een filter, zo ja het merk, type
- Gebruik van een guardkolom, zo ja: Merk en Type.
- Merk analytische kolom, type, deeltjesgrootte, lengte en diameter
- Samenstelling eluens A en B (eventuele buffers/toevoegingen)
- Opbouw van het gradiëntprogramma

Rapportage in tabblad "Rapportage formulier"

In het tabblad "Rapportage formulier" moeten van alle metingen en componenten het onderstaande worden ingevuld:

- Retentietijd per component (min, afronding 0,001)

- Piekoppervlak Quantitation overgang (area)
- Piekoppervlak Kwalificatie overgang (area)
- Berekende concentratie in ng/l (afgerond op 0,01 ng/l)

Wanneer er van een component geen piek kan worden geïntegreerd, dan mag bij de retentietijd voor de component "-" gerapporteerd worden. Bij de piek oppervlaktes en berekende concentratie wordt dan 0 ingevuld.

Het is niet toegestaan om punten uit de kalibratielijn te verwijderen of de resultaten te corrigeren voor een interne standaard of matrix etc.

Verder een overzicht met minimaal de volgende parameter in pdf, Excel of Word worden aangeleverd:

- Grafische weergeving van kalibratielijnen
- Chromatogrammen van alle componenten en metingen met een afmeting van ca 10x10cm.

Als er sprake is van afbraak (bijvoorbeeld gedurende de analyse of in de aangeleverde standaarden) en dat de resultaten van de laboratoria daardoor beïnvloed worden, heeft de opdrachtgever het recht om bij alle inschrijver deze component/scores te verwijderen zodat de vergelijking tussen de inschrijvers eerlijk kan verlopen.

Ter ondersteuning wordt het op prijs gesteld als er meerdere data wordt opgestuurd ter verduidelijking van de resultaten.

Bijlagen

- 2.1 Bereidingsschema kalibratie en monsters
- 2.2 Sequence

2.1 Bijlage 1: Bereidingsschema kalibratie en monsters

Omschrijving	KAL 0/ BL matrix A	KAL 1	KAL 2	KAL 3	KAL 4	KAL 5	KAL 6	Additie laag	Blanco Matrix B	Additie hoog
Matrix	Matrix A	Matrix A	Matrix A	Matrix A	Matrix A	Matrix A	Matrix A	Matrix A	Matrix B	Matrix B
Eindvolume (ml)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Spike volume (ul)	0	100	300	700	250	500	1000	150		300
Gebruikte spike standaard	--	Laag	Laag	Laag	Hoog	Hoog	Hoog	Laag	--	Hoog

Component	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)	Concentrat ie (ng/l)
Amisulbrom	0	8,0	24,1	56,2	120,5	241,1	482,1	12,1	0,0	144,6
Clothianidine	0	8,0	23,9	55,7	119,3	238,6	477,2	11,9	0,0	143,2
Cyazofamide	0	8,0	24,0	56,0	120,0	240,1	480,2	12,0	0,0	144,1
Cymoxanil	0	8,0	23,9	55,9	119,7	239,5	479,0	12,0	0,0	143,7
Desmedifam	0	8,0	24,1	56,1	120,3	240,6	481,2	12,0	0,0	144,4
Fenmedifam	0	8,0	24,0	56,0	119,9	239,8	479,6	12,0	0,0	143,9
Fenoxycarb	0	8,2	24,5	57,1	122,4	244,9	489,8	12,2	0,0	146,9
Fipronil	0	8,0	24,0	56,1	120,2	240,3	480,6	12,0	0,0	144,2
Florasulam	0	8,0	24,1	56,3	120,6	241,2	482,4	12,1	0,0	144,7
Fluazifop-P-butyl	0	8,1	24,2	56,4	120,8	241,6	483,1	12,1	0,0	144,9
Fluazinam	0	8,1	24,2	56,5	121,2	242,3	484,6	12,1	0,0	145,4
Fludioxonil	0	8,0	24,1	56,1	120,3	240,6	481,2	12,0	0,0	144,4
Mesotrione	0	8,1	24,2	56,4	120,8	241,6	483,2	12,1	0,0	145,0
Methoxyfenozide	0	8,0	24,1	56,3	120,7	241,4	482,8	12,1	0,0	144,8
Oxamyl	0	8,1	24,2	56,6	121,2	242,5	485,0	12,1	0,0	145,5
Triallaat	0	8,0	24,0	55,9	119,8	239,6	479,1	12,0	0,0	143,7

2.2 Bijlage 2: Sequence

Meting/injectie	Type	Sequence	Te meten oplossing van het spikeschema
1	kal	KAL standaard 0	KAL 0
2	kal	KAL standaard 1	KAL 1
3	kal	KAL standaard 2	KAL 2
4	kal	KAL standaard 3	KAL 3
5	kal	KAL standaard 4	KAL 4
6	kal	KAL standaard 5	KAL 5
7	kal	KAL standaard 6	KAL 6
8	sample	Blanco eluens water 01	eluens water
9	sample	Blanco eluens water 02	eluens water
10	sample	OW A (KAL 0) 01	KAL 0
11	sample	OW A (KAL 0) 02	KAL 0
12	sample	OW A additie laag 01	additie laag
13	sample	OW A additie laag 02	additie laag
14	sample	OW A additie laag 03	additie laag
15	sample	OW A additie laag 04	additie laag
16	sample	OW A additie laag 05	additie laag
17	sample	OW A additie laag 06	additie laag
18	sample	OW A additie laag 07	additie laag
19	sample	OW A additie laag 08	additie laag
20	sample	KAL standaard 4 - 01	KAL 4
21	sample	OW B 01	Blanco matrix B
22	sample	OW B 02	Blanco matrix B
23	sample	OW B additie hoog 01	additie hoog
24	sample	OW B additie hoog 02	additie hoog
25	sample	OW B additie hoog 03	additie hoog
26	sample	OW B additie hoog 04	additie hoog
27	sample	OW B additie hoog 05	additie hoog
28	sample	OW B additie hoog 06	additie hoog
29	sample	OW B additie hoog 07	additie hoog
30	sample	OW B additie hoog 08	additie hoog
31	sample	KAL standaard 4 - 02	KAL 4
32	sample	Blanco eluens water 03	eluens water
33	sample	KAL 1 - 2 x verdund 01	2x verdunning kal 1
34	sample	KAL 1 - 5 x verdund 01	5x verdunning kal 1
35	sample	KAL standaard 4 - 03	KAL 4
36	sample	OW B additie hoog 09	additie hoog
37	sample	OW B additie hoog 10	additie hoog
38	sample	KAL standaard 4 - 04	KAL 4
39	sample	OW B additie hoog 11	additie hoog
40	sample	OW B additie hoog 12	additie hoog
41	sample	KAL standaard 4 - 05	KAL 4
42	sample	OW B additie hoog 13	additie hoog
43	sample	OW B additie hoog 14	additie hoog
44	sample	KAL standaard 4 - 06	KAL 4
45	sample	OW B additie hoog 15	additie hoog
46	sample	OW B additie hoog 16	additie hoog
47	sample	KAL standaard 4 - 07	KAL 4
48	sample	OW B additie hoog 17	additie hoog
49	sample	OW B additie hoog 18	additie hoog
50	sample	KAL standaard 4 - 08	KAL 4