

SOP monstervoorbewerking

Generieke standaardprocedure (standard operating procedure; SOP) voor monsternamen en monsterverwerking

Dit document is gebaseerd op het volgende GWRC project rapport:

Neale P, Escher, B, Leusch, F. Effect Based Monitoring in Water Safety Planning. GWRC Project Report 2022. Work packages 5.3 Development of protocols and user guides and 5.4 Development of a decision-making tool for evaluation, selection and harmonization of candidate in vitro bioassays and implementation in water-related policies

1 Inleiding

Deze SOP is ontwikkeld op basis van de wetenschappelijke literatuur en wordt verder onderbouwd in het "Achtergronddocument Bemonstering en Monstervoorbewerking". De SOP richt zich op extractie met behulp van vaste fase extractie (SPE), aangezien dit de meest gebruikte methode voor monsterextractie is voor zowel de chemische als biologische testmethoden uit de wetenschappelijke literatuur. Verder is de SOP bedoeld als een algemeen protocol, en wordt hierin geen specifieke SPE-sorbens of bepaalde conditionerings- en elutievlloeistoffen voorgeschreven. Als de definitieve set bioassays en voorbehandelings- en verwerkingsmethoden zijn gekozen, moet in ieder geval dezelfde aanpak worden gevolgd voor alle monsters die men wil vergelijken. Het verdient aanbeveling deze stappen dan ook vast te leggen en verder te standaardiseren.

2 Benodigdheden

2.1 Uitrusting

- Monsternamen apparatuur
- Filtratie-eenheid
- SPE-verdeelstuk en leidingen
- Verdampers om het volume van het oplosmiddelextract te verminderen
- Glaswerk (bv. maatcilinders, bekertjes, glazen serologische pipetten)
- Troebelheidsmeter (indien water deeltjes bevat)

Opmerking: Reinig alle laboratorium apparatuur (bv. SPE-verdeelstuk, leidingen, filtereenheid) die met de monsters in contact zal komen voordat de monsters worden genomen en verwerkt, met de oplosmiddelen die voor de conditionering en elutie van de SPE worden gebruikt.

2.2 Verbruiksgoederen

- Amberkleurige glazen flessen voor monsternamen
- SPE-kolom (bv. Oasis HLB, StrataX, Chromabond HR-X)
- Pasteurpipetten
- pH-indicatorpapier
- Glasvezelfilters (poriegrootte 0,7 tot 1,5 µm)
- Glazen reageerbuizen

2.3 Chemicaliën en oplosmiddelen

- Zoutzuur (geconcentreerd)

- Natriumthiosulfaat (optioneel, van toepassing bij gechloreerd water)
- Oplosmiddelen van HPLC-kwaliteit voor conditionering en elutie (bv. methanol, hexaan:aceton, ethylacetaat)
- Ultrapuur water (>18 MΩ·cm)

3 Monstername

- Verzamel watermonsters in met oplosmiddel gewassen amberkleurige glazen flessen.
- Zorg ervoor dat er geen besmetting kan zijn door handen, sigarettenrook en vervuilde apparatuur. Sluit zo veel mogelijk aan bij bestaande protocollen voor monsterneming als (standaard) microbiologische en chemische analyses (NEN/ISO, SIKB, etc.).
- Het volume dat moet worden verzameld, hangt af van het watertype en het aantal uit te voeren bioassays. Op basis van een SPE-kolom van 200 mg kan 0,5 L afvalwater influent, 1 L afvalwater effluent of oppervlaktewater en 2 L drinkwater, behandeld gerecycleerd water of schoon oppervlaktewater extraheren. Het dubbele volume kan worden geëxtraheerd met SPE-kolommen van 500 mg.
- De hoeveelheid eindoplosmiddel bepaalt de concentratiefactor, zie onderdeel 7 van deze SOP.
- Steekbemonstering is voldoende voor de bemonstering van oppervlaktewater, gerecycleerd water en drinkwater met relatief constante emissiebronnen. Is dit onbekend dan zijn samengestelde monsters aanbevolen. Samengestelde monsters van 24 uur worden aanbevolen voor afvalwaterinlaat en afvalwateruitlaat vanwege de dagelijkse variaties in de concentraties van sommige microverontreinigingen.
- Gebruik een unieke monsteridentificatiecode, waaruit tenminste de volgende gegevens eenduidig zijn te herleiden: projectcode, monsternamelocatie, monstercode, naam veldwerker(s) en datum en tijd monsterneming.

4 Transport en opslag

- De conserveringstermijn is de termijn tussen monsterneming (direct gevolgd door conservering) en het moment van zekerstellen van het extract. De conserveringstermijn van de watermonsters is beperkt vanwege de mogelijke afbraak van stoffen. Indien het monster op een SPE kolom is gebracht of in een extract is overgebracht is de conserveringstermijn veel langer, doorgaans tot 2 jaar in bevroren toestand. Hier kan men aansluiten bij de standaard protocollen voor chemische analyses.
- In het veld: Indien de watermonsters voor extractie naar het laboratorium worden gebracht, moet de pH ter plaatse op 3 worden gebracht om afbraak te beperken. Regel de pH door druppels geconcentreerd zoutzuur toe te voegen met een glazen pasteurpipet en de pH te controleren met pH-indicatorpapier of een pH-meter. Kan dit niet, dan moet het monster ten minste afgekoeld of bevroren worden. *N.b. pH-aanpassing is niet nodig bij extractie ter plaatse of bij gebruik van een groot volume SPE (LV SPE). Als HLB wordt toegepast dan is er geen pH correctie nodig (of neutraliseer naar pH 7).*
- In het veld: Indien het opslaan in een gekoelde ruimte niet mogelijk is, moet ervoor worden gezorgd dat de monsters gedurende de veldwerkdag en het transport zo min mogelijk opwarmen ten opzichte van de monstername temperatuur. Bewaar de watermonsters op ijs en in het donker en breng ze zo snel mogelijk terug naar het laboratorium.

- Eenmaal in het laboratorium dienen de watermonsters bij 4 °C worden bewaard als ze binnen 48 uur na de bemonstering worden geëxtraheerd. De monsters moeten bij -20°C worden bewaard als de extractie niet binnen 48 uur na de bemonstering kan worden uitgevoerd.

Specifieke omstandigheden

- Als het watermonster gechloreerd is, moet de vrije Cl₂ worden geneutraliseerd met natriumthiosulfaat of ascorbinezuur. Er is 3,5 mg/l natriumthiosulfaat nodig om 1 mg/l Cl₂ te doven, terwijl 5 mg/l ascorbinezuur nodig is om 1 mg/l Cl₂ te neutraliseren.
- Als een watermonster zichtbare deeltjes bevat, moet het vóór de SPE worden gefilterd om verstopping van de SPE-patroon te voorkomen. Watermonsters met een troebelheid van groter dan 5 nephelometrische troebelingsseenheden (NTU) moeten worden gefiltreerd met glasvezelfilters met een poriegrootte tussen 0,7 en 1,5 µm. Monsters met een troebelheid van minder dan 5 NTU kunnen met SPE worden geëxtraheerd zonder filtratie. Bij HPLC analyse moet filteren wel altijd worden gedaan. Indien filtratie vereist is en het doel van het onderzoek is de effecten van het gehele watermonster vast te leggen, kunnen de zwevende deeltjes in het watermonster op het filter worden verzameld en afzonderlijk met oplosmiddelen worden geëxtraheerd. Opmerking: De filtratie-eenheid moet tussen elk gefiltreerd monster worden gereinigd met de oplosmiddelen die voor het conditioneren en elueren worden gebruikt.

5 Conditionering

- Voordat het watermonster met SPE wordt geëxtraheerd, moet de SPE-kolom of -disc worden geconditioneerd. Met water mengbaar methanol, gevolgd door ultrapuur water wordt gewoonlijk gebruikt voor conditionering. Indien echter andere minder polaire oplosmiddelen worden gebruikt voor de elutie van de cartridge, zoals dichloormethaan of ethylacetaat, dan moeten deze oplosmiddelen ook worden gebruikt voor de conditionering. Na het conditioneren mag de kolom niet drooglopen en moet het watermonster onmiddellijk door de SPE-kolom worden gepercoleerd. Om een breder scala aan polaire en apolaire chemicaliën te elueren, worden vaak meerdere oplosmiddelen gebruikt voor de elutie. Op basis van 500 mg (6 cc) Oasis HLB SPE cartridge wordt doorgaans 10 mL van elk oplosmiddel gebruikt voor conditionering en 10 mL van elk oplosmiddel voor elutie.

6 Opwerking

- Breng het monster (of blanco, zie punt 9) op de kolom in een laag tempo, ca. 10 ml/min.
- Zodra het monster op het SPE-sorptiemiddel is gesorbeerd, moet de cartridge volledig worden gedroogd in een vacuüm- of stikstofstroom, onder laag vacuüm (ca. 15 inch Hg). Dit kan tot 2 uur duren, waarna elutie plaatsvindt.
- *Opmerking De gedroogde cartridge kan worden verzegeld met parafilm en tegen licht worden beschermd met aluminiumfolie en bij -20°C worden bewaard tot de elutie. Hiermee wordt de conserveringstermijn verlengd tot ca. 2 jaar.*

7 Van elutie naar extract

- Na de elutie wordt het elutieoplosmiddel onder stikstofgas droog geblazen. Roterende verdampers moeten worden vermeden in verband met verontreinigingsproblemen. Het

gedroogde residu of het sterk gereduceerde volume wordt vervolgens geresuspendeerd in een eindoplosmiddel, zoals methanol, dimethylsulfoxide (DMSO) of ethanol en bewaard bij -20 °C tot gebruik.

- De hoeveelheid eindoplosmiddel bepaalt de concentratiefactor. Als richtlijn worden standaard concentratiefactoren aangehouden: zo is 1000 ml sample in 50 µl een concentratiefactor van 20.000x, een eerder gebruikte factor voor drinkwater en direct toepasbaar voor CALUX-assays.

8 Extract in bioassay

- Na elutie kan het monsterextract direct in de bioassay worden gedoseerd of worden omgezet naar een minder toxisch oplosmiddel door het elutie oplosmiddel af te blazen en opnieuw op te lossen in een eindoplosmiddel, zoals DMSO of methanol.
- Voor het toepassen van de verkregen extracten in de bioassay wordt verwezen naar de specifieke SOPs. Hierin worden de concentratiereeksen, replica's en geldigheidscriteria voorgeschreven.

Voorbeeld: Calux-assays worden doorgaans uitgevoerd voor tenminste drie verdunningen, namelijk 1x, 3x en 10x verdund t.o.v. oorspronkelijk extract. Bij monsters waarin een hoog effect wordt verwacht worden ook 30x en 100x verdunde extracten ingezet. Alle concentraties worden in drievoud (triplo) uitgevoerd. Indien effecten in dit bereik nog te hoog zijn voor het bereik van de analyse, dan wordt de meting herhaald bij hogere verdunningen. De hoogste verdunning die tot een goed kwantificeerbaar resultaat (eerste conc. boven de LOQ, Limit of Quantification) leidt, wordt als eindresultaat gebruikt.

- Aandachtspunten zijn de maximale hoeveelheid oplosmiddel om negatieve effecten op cellen te voorkomen. Ook dient gezorgd te worden dat het monster goed is opgelost in het bioassay medium. Neem een oplosmiddelcontrole in de assay op om ervoor te zorgen dat men kan controleren of het oplosmiddel zelf een respons in de assay induceert.

Voorbeeld: Een DMSO-eindconcentratie van 0,1% in de bioassay wordt aanbevolen, en kan tot 1% methanol worden toegevoegd aan sommige zoogdier-reportergen-assays. Het monster kan ook in een glazen flesje (bijvoorbeeld een HPLC-flesje van 2 ml) worden gebracht, droog geblazen en opnieuw opgelost in celkweekmedium, dat rechtstreeks aan de cellen kan worden toegediend. Het is echter mogelijk dat sommige (hydrofopische) verbindingen niet oplosbaar zijn in het kweekmedium of neerslaan als gevolg van verschillende oplosbaarheidsconstanten (indien zij zeer geconcentreerd zijn).

9 Kwaliteitscontrole

- Naast de watermonsters is het ook belangrijk blancomonsters mee te nemen, zoals een veldblanco en een laboratoriumblanco. De veldblanco is ultrapuur water dat in het veld is gebracht en aan dezelfde omstandigheden is blootgesteld als de watermonsters, zoals de temperatuur in het veld en de reistijd, en dat samen met de verzamelde watermonsters is verwerkt. De laboratoriumblanco is ultrapuur water dat is verwerkt volgens dezelfde monsterverwerkingsprocedures als de watermonsters.
- Als kwaliteitscontrole kan men ook een monster spiken met gelabelde isotopen en de recovery van deze analyten meten, wat aan te bevelen is als de matrix veel verandert. Er moet voor worden gezorgd dat de spike geen effect heeft in de bioassay of er moet een apart recovery-monster worden verrijkt.