

Non-target analyse van PFAS

INHOUD

1	Toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Apparatuur	3
4	Materiaal	4
5	Reagentia en standaarden	4
6	Monsterbewaring	4
7	Procedure	5
7.1	<i>Extractie</i>	5
7.2	<i>Monster analyse</i>	5
7.3	<i>Data processing</i>	5
7.4	<i>Data filtering en identificatie</i>	6
7.5	<i>Rapportering</i>	10

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft een werkwijze voor de identificatie en semi-kwantitatieve bepaling van de aanwezige per- en polyalkylstoffen (PFAS) verbindingen in oppervlaktewater, grondwater, drinkwater en afvalwater aan de hand van vloeistof chromatografie gekoppeld met hoge resolutie mass spectrometrie (HRMS).

De regelgeving is momenteel gebaseerd op de ontwikkeling van gerichte kwantitatieve methoden aan de hand van WAC/IV/A/025. Deze kwantitatieve methoden zijn beperkt vanwege het gebrek aan beschikbare (commerciële) referentiestandaarden. Ondertussen zijn er al meer dan 9000 PFAS bekend (suspect) en worden er dag dagelijks nog anderen ontdekt. Aan de hand van intrinsieke kenmerken zoals kenmerkende productionen, ketenlengte en het typerende negatief massadefect van fluor de vorming van homologe reeksen (CF₂-patronen, Kendrick mass defect KMD), kunnen helpen om bij de identificatie en detectie van nieuwe PFAS componenten te vereenvoudigen.

Alleen verbindingen die ioneesbaar zijn kunnen gedetecteerd worden met LC-HRMS. De neutrale en meer vluchtige PFAS verbindingen kunnen niet worden gedetecteerd met deze vooropgestelde methode.

De gebruikte techniek laat de bepaling van de identiteit van de organische PFAS verbindingen toe vanaf een concentratieniveau van bijvoorbeeld 0.01 tot 0.1 mg/l (afhankelijk van de fabrikant).

2 PRINCIPE

Aan waterstalen worden gekende hoeveelheden isotoopgemerkte fluorverbindingen toegevoegd. De waterstalen worden vervolgens geëxtraheerd met vaste fase extractie (WAC/IV/A/025). De vaste fase wordt geëlueerd met methanol en het methanolextract wordt ingedampt. Het residu wordt opgenomen in een gekend volume mobiele fase en geanalyseerd met vloeistofchromatografie met hoge resolutie massaspectrometrische detectie.

De PFAS non-target analyse (NTA) workflow bestaat uit verschillende stappen die onderling met elkaar verbonden zijn en die geoptimaliseerd zijn voor de analyse van PFAS componenten en kan worden toegepast op accurate massaspectrometrie gegevens met hoge resolutie. De methode is toepasbaar voor drink-, grond-, oppervlakte- en afvalwater. Per monster wordt een full scan en gecombineerd met fragmentatiedata van ten minste één blanco en drie replicaten in negatieve modus aanbevolen. De workflow zal finaal leiden tot elucidatie van een brutoformule op basis van accurate massa en beste spectrale fit. De afleiding van de brutoformule wordt beperkt door een maximum van 50 fluoratomen om een optimale dekking te bieden in het voorkomen van PFAS.

3 APPARATUUR

3.1 LC-HRMS systeem bestaande uit:

- Een HPLC of UPLC vloeistofchromatograaf met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid Opm.: met het oog op de reductie van de systeemblanco wordt een isolator of delay kolom, die geplaatst wordt tussen LC-pomp en injector, sterk aanbevolen.

- Een hoge resolutie massaspectrometer; een hoge resolutie accurate massa (time-of-flight (TOF) of Fourier Transform) massaspectrometer of gelijkwaardig
- Een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse

3.2 LC-kolom:

- bv. voor UPLC: Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18, 1.7µm, 2.1 x 100 mm kolom en bijhorende prekolom - bv. voor HPLC: Altima C18, 5 µm, 4 x 150 mm en bijhorende prekolom

4 MATERIAAL

4.1.1 Gebruikelijk laboratoriumglaswerk

4.1.2 Injectiespuiten van 25 tot 100 µl voor het doperen van isotoopgemerkte fluorverbindingen of matrixaddities

4.1.3 Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg

4.1.4 Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g

4.1.5 Opstelling voor elutie van de SPE patronen

4.1.6 SPE patronen met een zwakke anionenwisselaar fase, bv OASIS WAX 6cc cart, 150mg. Andere patronen kunnen ook gebruikt worden mits gevalideerd.

4.1.7 Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet

5 REAGENTIA EN STANDAARDEN

Voor de reagentia en standaarden wordt verwezen naar WAC/IV/A/025.

6 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering en bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010. Grondwaterstalen (gewoonlijk bemonsterd in het kader van bodemonderzoek) worden bij aankomst in het labo opgeschud en men laat de stalen gedurende minstens 4 uur rusten zodat de deeltjes kunnen uitzakken. Aansluitend worden de stalen voorzichtig gedecanteerd. Niet meer dan de helft van de bovenstaande waterlaag wordt gedecanteerd om zo weinig mogelijk deeltjes in bewerking te nemen. Waterstalen die geanalyseerd worden in het kader van menselijke consumptie worden niet gedecanteerd.

- Contact met teflon of andere fluorhoudende polymeren dient vermeden te worden.
- De concentratie van >C10 PFAS in waterstalen neemt af bij toenemende bewaartijd, door sorptie aan recipientwand of neerslaan.
- Het is belangrijk om het volledige monster (voor grondwater: het volledig monster na decantatie) in bewerking te nemen, gevolgd door naspoelen van monsterfles met methanol; afhankelijk van de laboratoriumwerkwijze, toestelgevoeligheid en aard van het staal worden de watermonsters genomen in recipiënten van geschikt volume; de flessen worden volledig gevuld om de verhouding specifiek oppervlak/volume zo klein mogelijk te houden.
- In geval van analyse via directe injectie is het toevoegen van een organisch solvent aan het watermonster in de monsterfles noodzakelijk (bv. 50% methanol) ofwel wordt de monsterfles

in het laboratorium geledigd en vervolgens gespoeld met voldoende methanol, waarna het water en de methanol samengevoegd worden vooraleer een deelmonster te nemen.

- In geval omwille van concentratieredenen of de organische belading van het water het monster niet in zijn volledigheid kan opgewerkt worden en verdunning van een deelmonster noodzakelijk blijkt, dan zal de monsterfles eerst geledigd worden en vervolgens gespoeld met voldoende methanol, waarna het water en de methanol samengevoegd worden vooraleer een deelmonster te nemen. Het laboratorium vermeldt in dit geval op het verslag dat de analyse uitgevoerd werd op een deelmonster.

7 PROCEDURE

7.1 EXTRACTIE

De extractie wordt conform WAC/IV/A/025 uitgevoerd. Van het extract wordt typisch 10 µl in de LC-HRMS geïnjecteerd. De houdbaarheid van preparaten bedraagt, bij bewaring in de koelkast, 1 maand. Preparaten die in de koelkast hebben gestaan worden best gevortext vooraleer deze in de injectie-automaat te plaatsen

7.2 MONSTER ANALYSE

7.2.1 Massakalibratie van de MS

De tuning kan manueel of automatisch verlopen. De tuning wordt bij voorkeur uitgevoerd zoals aanbevolen door de fabrikant.

7.2.2 Data acquisitie

Voor de werkwijze wordt verwezen naar de handleiding van het gebruikte apparaat. Bij elke meetreeks wordt een multicomponent referentiestandaard(en) (zie WAC/IV/A/025) geïnjecteerd om de aanwezigheid van target PFAS componenten te kunnen bevestigen (confidence level 1).

De analyse wordt uitgevoerd bij voorkeur in triplicate en als ionisatie wordt een (H)ESI bron (negatief, optioneel ook positief) gebruikt. Een veldblanco of procedureblanco wordt per meetreeks meegenomen.

De data dient minstens opgenomen te worden in full scan en ook fragmentatie data is noodzakelijk voor de betrouwbaarheid voor de identificatie van de ongekende PFAS componenten. De manier waarop dit gedaan wordt is afhankelijk van de fabrikant (bijvoorbeeld DDA en DIA).

7.3 DATA PROCESSING

7.3.1 Manuele dataprocessing

In eerste instantie wordt een massa defect filter op het TIC chromatogram (full scan) toegepast om selectief de fluor bevattende componenten te filteren. Fluor heeft een typisch negatief massadefect en volgende waarden worden bijvoorbeeld gehanteerd; -0.1 en +0.05. Van elke geregistreerde piek in het chromatogram met signaal/ruis verhouding van bijvoorbeeld >20 wordt aan de top van de piek het massaspectrum opgevraagd. Hiervan kan, indien het wenselijk is om een zuiverder spectrum te bekomen, het massaspectrum genomen aan de voet van de piek afgetrokken worden.

Het hele proces van data-analyse kan manueel gebeuren (de operator gaat piek voor piek de identiteit van de verbinding na, dit kan ter verificatie gebruikt worden) of bij voorkeur automatisch adhv software (open-source of van de fabrikant) (Hollender et al., 2023).

7.3.2 Dataprocessing adhv software

Verwerk de ESI- (en optioneel de ESI+) full scan data tov de veldblanco (voorkeur) of procedure blanco: deconvolveer de spectra, aligneer de retentietijden, identificeer adducten, isotopen, in-source fragmenten, massa-defect, neutrale losses en stel de *peak list* op van gedetecteerde moleculaire ionen i.f.v. de retentietijd; maak hiertoe gebruik van de *peak picking* algoritmes van de toestelsoftware of maak gebruik van *open source* software Fluoromatch (Koelmel et al., 2020). Om de identificatie te vergemakkelijken kunnen free masslists gebruikt worden (vb. PFAS NIST, PFAS EPA, fabrikant ea) gebruikt worden om de identificatie te vergemakkelijken. Bij voorkeur bevatten deze fragmentatiedata zodat de identificatie adhv een match bevestigd kunnen worden.

Selecteer de in het watermonster gedetecteerde moleculaire ionen voor zover het signaal hiervan minstens bevoorbeeld 5 tot 20 maal de blancowaarde bedraagt (afhankelijk van de belading aan PFAS in het monster) ; de RSD van de triplicate bepaling dient bijvoorbeeld lager dan 15% te zijn.

7.4 DATA FILTERING EN IDENTIFICATIE

7.4.1 Data filtering

Volgende data filters kunnen worden toegepast voor de identificatie van PFAS:

- Mass defect filtering om PFAS features in full-scan spectra te detecteren; PFAS hebben immers een lage of zelfs negatief massadefect (afwijking van de exacte massa tov. de nominatieve) agv. de vervanging van H-atomen door F-atomen
- Homologe reeksen van PFAS kunnen gedetecteerd worden obv. CF₂-genormaliseerde Kendrick mass defect diagrammen; deze benadering in combinatie met negatieve massadefecten is in meerdere studies aangewend voor de identificatie van PFAS met HRMS (Zweigle et al., 2023)).
- (Kaufmann et al., 2022) stelt een methode voor die gebaseerd is op het uitzetten van md/C plot tov mC plot. De evaluatie van deze plot kan helpen voor de identificatie van PFAS componenten. In eerste stap wordt het geschatte aantal koolstofatomen berekend. Vervolgens wordt de gemeten massa van de monoisotopische piek gedeeld door het aantal geschatte koolstofatomen (m/C). het massadefect wordt berekend door het gemeten massadefect md van het monoisotopische ion te delen door het aantal geschatte koolstofatomen (md/C). In de n de MD/C-m/C benadering kunnen zelfs verbindingen met zeer positieve MD's boven 0,5 Da, die dus ten onrechte aan negatieve MD's worden toegewezen, nog steeds worden gescheiden van echte negatieve massadefectkenmerken door de genormaliseerde massa (m/C).
- De componenten met een retentietijd tussen de 0 en 1 minuut worden weggefilterd omdat dit vaak zouten zijn, enkel de componenten (max. 10) worden weerhouden waarvan het vermoeden bestaat dat het over een PFAS-component gaat (vaak de ultra korte keten PFAS die in deze analysemethode een slechte retentie vertonen).

7.4.2 PFAS Identificatie

Na het groeperen wordt er dieper op de identificatie ingegaan met als voorkeur voor toekenning van een mogelijke kandidaat PFAS component (brutoformule) in volgende volgorde:

7.4.1.1 Spectrale database:

Een match tussen experimentele fragmentatie data en de spectrale bibliotheek. Gebruik makend van het in de software aanwezige algoritme wordt het bekomen massaspectrum vergeleken met de massaspectra aanwezig in de bibliotheken van het datastation (forward search) of omgekeerd wordt nagegaan in welke mate spectra aanwezig in de bibliotheken deel uitmaken van het geregistreerde spectrum (reversed search). Indien beide zoekmogelijkheden aanwezig zijn in de software van het toestel dan wordt aan reversed search de voorkeur gegeven. In volgorde van de mate van overeenkomst tussen geregistreerd spectrum en in de bibliotheek aangetroffen spectrum wordt door het datastation een opsomming gegeven van mogelijke kandidaat verbindingen samen met een waarde die de mate van overeenkomst weergeeft (match factor). Databases met MS/MS data zijn beschikbaar (mzCloud, MassBank | MassBank Europe Mass Spectral DataBase, 2020; MzCloud – Advanced Mass Spectral Database, 2020). Deze bevatten informatie voor een aantal PFAS die bruikbaar kan zijn bij verdere identificatie

7.4.1.2 Masslists

Indien er geen match gevonden wordt met behulp van de spectrale databases wordt gekeken naar de hits die gevonden worden via de mass listst (Chemspider search (EPA DSS TOX library) en mass list search (vb. PFAS NIST e, EPA master list) die online beschikbaar zijn. Idealiter bevatten deze masslists structuren zodat een theoretische fragmentatie tov de experimentele fragmentatie vergeleken kunnen worden (in praktijk is deze score vaak laag maar kan als leidraad dienen). Ter bevestiging van de voorgestelde structuur van gedetecteerde PFAS kunnen in het uiterste geval ook in-silico tools aangewend worden die toelaten om fragmentatiespectra te voorspellen (zoals MetFrag, CFM-ID of Sirius (CFM-ID, 2020; MetFrag—Home, 2020; “SIRIUS,” 2015)), alsook retentietijdgegevens (Aalizadeh et al., 2019; Bade et al., 2015). Deze tools zijn vooral belangrijk wanneer geen referentieverbindingen ter beschikking zijn.

Ook wordt gekeken of de isotopen van de vooropgestelde component overeen komen met de experimentele spectra. De fit dient bijvoorbeeld minstens 80% zijn om de voorgestelde PFAS kandidaat component te aanvaarden.

7.4.1.3 Diagnostische fragmenten en neutral losses

Evaluatie van diagnostische fragmenten (bv. $C_2F_5^-$) in product-ion spectra kan ook helpen om de aanwezigheid van PFAS aan te tonen. Ook kunnen de neutral losses gebruikt worden om de aanwezigheid van PFAS aan te tonen. Typische neutral losses zijn volgende; CF_2 , C_2F_4 , HF, $C_nH_3F_{2n-3}$, $C_nF_{2n}SO_3$, CF_3 , CF_2O , $HFCH_2CO_2$, and $HFOCH_2CO_2$. Een overzicht van de belangrijkste massaverschillen in fragmenten en de PFAS klassen waarin ze voorkomen worden weergegeven in Figuur 1. De selectie van precursor ionen voor verdere fragmentatie kan uitgevoerd worden op 2 manieren, met name met data-dependent acquisitie (DDA) en met data-independent acquisitie (DIA) en is fabrikant specifiek (Zweigle et al., 2022).

Fragment difference	Exact mass	Fragmentation reactions	Compound classes	Compound examples
ΔCF_2 $\Delta(\text{CF}_2)_n$	49.99681		PFAS with perfluoroalkyl chains F-containing molecules	PFCAs ($\text{R} = \text{CO}_2^-$), PFSAAs ($\text{R} = \text{SO}_2^-$), PASF-based [e.g. N-EtFOSAA ($\text{R} = \text{SO}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{O}_2^-$) diAmPAP, FOSA], Capstone A & B, PFPIAs, PFECAs ^{21, 36}
$\Delta(\text{C}_2\text{F}_4)_n$ $\Delta(\text{C}_2\text{F}_4 - \text{H}_2\text{O})$ $\Delta(\text{C}_2\text{F}_4 + \text{H}_2\text{O})$	99.99361 81.98305 118.00418		$n/2/(n+2):2$ telomer-based PFAS	8:2/10:2 diPAP ($\text{R} = \text{PO}_4^-$), 10:2/12:2 FTMAPs ($\text{R} = \text{C}_2\text{H}_4\text{S}_2\text{PO}_4^-$) 10:2/12:2 FTMAP disulfoxide
ΔHF $\Delta(\text{H}_2\text{F}_2)$ $\Delta(\text{C}_2\text{F}_4 - \text{HF})$ $\Delta(\text{HF})_2(\text{CO}_2)_n$ ^{35, 36}	20.00623 40.01246 79.98738		telomer-based PFAS F-containing molecules H-substituted PFAS ³⁵⁻³⁷	diPAPs [$\text{R} = \text{PO}_4\text{C}_2\text{H}_4(\text{CF}_2)_n\text{F}^-$], FTMAPs, FTMAP sulfoxides FTSs ($\text{R} = \text{SO}_2^-$), FTCAs, FTUCAs H-PFCAs ³⁷
$\Delta\text{C}_n\text{H}_3\text{F}_{2n-3}$ $\Delta\text{C}_n\text{H}_2\text{F}_{2n-4}$ $\Delta\text{C}_n\text{HF}_{2n-5}$ $\Delta(\text{C}_n\text{H}_3\text{F}_{2n-3} + \text{H}_2\text{O})$	for $n = 8$ 346.00271 325.99648 305.99025 364.01327		telomer-based PFAS	diPAPs [$\text{R} = \text{PO}_4\text{C}_2\text{H}_4(\text{CF}_2)_n\text{F}^-$], FTMAPs, FTMAP sulfoxides, FTSs ($\text{R} = \text{SO}_2^-$).
$\Delta\text{C}_n\text{F}_{2n}\text{SO}_3$ $\Delta\text{C}_2\text{F}_4\text{SO}_3 + \text{HF}$ ³⁸ $\Delta\text{C}_2\text{F}_4\text{SO}_3 + \text{HF} + \text{CF}_2\text{O}$ ³⁶	for $n = 3$ 229.94723		PFSAAs, PFECAs, PFESAs H-substituted PFESAs ³⁸	PFOS [$\text{R} = (\text{CF}_2)_6\text{F}$], 9Cl-PF3ONS ($\text{R} = \text{OC}_6\text{H}_{13}\text{Cl}$), 11Cl-PF3ONS
ΔCF_3	68.99521	different reactions	CF_3 -containing molecules	e.g. pesticides, pharmaceuticals containing F_{33} , unsaturated ether PFAS ²⁷
$\Delta\text{CF}_2\text{O}$ ^{21, 35, 36}	65.99172		PFECAs, UPFAs, PFEAs Cl-substituted unsaturated alcohols ^{21, 35, 36}	4:4 PFESA ²¹ ($\text{R}_1 = \text{C}_2\text{F}_7^-$; $\text{R}_2 = \text{C}_6\text{F}_5\text{SO}_2^-$)

^aR refers to any organic or inorganic rest and is exemplified for several compounds (see right column). Fragment mass differences highlighted in blue were not observed in this study but found in MS/MS spectra from literature. Note: besides the identified fragmentation reactions there might be more that generate these mass differences.

Figuur 1: Een overzicht van de belangrijkste massaverschillen in fragmenten en de PFAS klassen waarin ze voorkomen.

7.4.1.4 Elementaire compositie

Toekenning van elementaire compositie op basis van de seven golden rules (Kind & Fiehn, 2007). Een identificatie (brutoformule) wordt als correct aanvaard indien de opgegeven match (isotopen fit) of quality factor bijvoorbeeld groter is dan 80 %. Worden verschillende verbindingen voorgesteld met voldoende hoge en vergelijkbare match factoren dan wordt die verbinding gekozen die afhankelijk van de herkomst van het genomen monster als meest relevant wordt beschouwd of die overeenkomt met de verwachte verontreiniging. Dikwijls helpt de aanwezigheid van soortgelijke verbindingen in de opgegeven lijst van kandidaatverbindingen, alsook de identiteit van andere in het chromatogram voorkomende verbindingen, de keuze bepalen. Vergelijk in elk geval het geregistreerde spectrum met de beste keuzes uit de bibliotheek. Het kan gebeuren dat de eerste keuze niet de beste is, omdat een specifieke m/z aanwezig voor het monster niet teruggevonden wordt in het spectrum van de eerste keuze maar wel in de daaropvolgende spectra. Zijn voor éénzelfde verbinding verschillende plaatsisomeren mogelijk dan wordt in het verslag het isomeer niet vermeld behalve indien de match factoren gevoelig verschillen (> 10 %) of indien op basis van de retentietijd hierover uitsluitsel gegeven kan worden.

Bepaal de mogelijke brutoformule(s); de toegestane afwijking tussen gemeten monoisotopische massa en deze van de kandidaat brutoformule(s) dient <5 ppm; de overeenkomst tussen waargenomen isotooppatroon en deze van de kandidaat brutoformule(s) dient bijvoorbeeld >70 (isotope fit score). Ga ook na of de voorgestelde brutoformules realistisch zijn (bepaal het dubbele binding equivalent (onverzadigheidsgraad) en toets af aan de Seven Golden Rules).

Voor een match factor gelegen bijvoorbeeld gelegen tussen 70 en 80 % dienen het geregistreerde spectrum en het spectrum van de voorgestelde verbinding nader bekeken te worden. De voorgestelde verbinding wordt aanvaard indien ze voor het genomen monster als relevant wordt beschouwd en indien voor alle meest karakteristieke ionen een overeenkomst bestaat.

7.4.3 iConfidentie levels voor identificatie

Finaal wordt het resultaat gerapporteerd met een *confidence level*. Een onderscheid wordt gemaakt tussen de *PFAS unknowns*. De *confidence levels* worden opgedeeld in 5 levels (Schymanski et al., 2014).

- **Level 1 – bevestigde structuur door een referentiestandaard**
De minimum vereisten hierbij zijn: accurate massa, fragmentatie data, retentietijd match en bevestiging door een referentiestandaard. Dit is het hoogste *confidence level* dat bereikt kan worden.
- **Level 2 - waarschijnlijke structuur**De structuur kan gevonden door een spectrale *library match*. De minimum vereisten hierbij zijn: accurate massa, fragmentatie data, Kendrick *mass defect*, homologe reeks, m/C en md/C plot en een library match (spectraal of via een mass list)
- **Level 3 – waarschijnlijke kandidaat**
Dit wordt bepaald op basis van de accurate massa, fragmentatie data, *Kendrick mass defect*, homologe reeks, m/C en md/C plot en retentijd. Deze wordt vervolgens ingedeeld in een overeenkomstige PFAS-klasse. Vaak worden homologe reeksen gevonden in monsters. PFAS komen vaak voor als mengsel waardoor deze de individuele PFAS componenten kunnen bevestigen. Het voorkomen van de homologe reeksen is niet te wijten is aan meetartefacten en wordt als kwaliteitscriteria gebruikt in het confidence level.
- **Level 4 – moleculaire formule**
Indeling gebeurt op basis van de isotoopmatch, *Kendrick mass defect*, homologe reeks, m/C en md/C plot en accurate massa. Op basis hiervan kan een voorstel gedaan worden van mogelijke moleculaire brutoformule. Deze wordt ingedeeld in een overeenkomstige PFAS-klasse. Vaak worden homologe reeksen gevonden in monsters. PFAS komen vaak voor als mengsel waardoor deze de individuele PFAS componenten kunnen bevestigen. Het voorkomen van de homologe reeksen is niet te wijten is aan meetartefacten en wordt als kwaliteitscriteria gebruikt in het confidence level.
- **Level 5 – exact mass**
Indeling gebeurt op basis van de accurate massa, *Kendrick mass defect*, m/C en md/C plot. De exacte massa kan niet toegekend worden aan een PFAS-klasse en deze wordt als *unknown PFAS-component* gerapporteerd. De homologe reeks identifier ontbreekt bij level 5 componenten. Deze componenten kunnen daarom ook niet eenduidig als PFAS worden aangeduid. Level 5 bevat mogelijks vals positieve moleculen. Deze vals positieve moleculen kunnen halogeenatomen bevatten die de karakteristieke eigenschappen vertonen van fluoratomen. Een volledige opheldering van deze level 5 componenten zitten niet in de scope van deze WAC vervat.

De *confidence levels* die gerapporteerd worden variëren dus van level 1 tot 5. Een onzekerheid gaat hierbij gepaard en level 1 kan enkel bereikt worden door confirmatie a.d.h.v. een referentiestandaard. Voor PFAS van level 2 en level 5 zijn geen referentiestandaarden beschikbaar en kan het hoogste level 1 dus niet bereikt worden. De hoogste zekerheid die kan bereikt worden is level 1 en de laagste onzekerheid is level 5 met als volgorde van onzekerheid; $lv5 < 4 < 3 < 2 < 1$.

Er dient rekening te worden gehouden dat het hier uitsluitend over LC-HRMS gebaseerde data gaat. Absolute bevestiging van een structuur dient te gebeuren door bijkomende technieken zoals

NMR. Desalniettemin draagt daarbovenop ook het simultaan voorkomen van verschillende gerelateerde componenten in de meeste gevallen ook bij aan de betrouwbaarheid van de identificatie.

7.5 RAPPORTERING

Confirmatie van de geïdentificeerde PFAS gebeurt door vergelijking met een referentiestandaard. Wanneer dit niet mogelijk is en de structuur is voorgesteld obv. de verkregen massaspectrometrische informatie dan dient het confidentieniveau vermeld te worden (gaande van 1 (bevestigde structuur) tot 5 (alleen gebaseerd op exacte massa)) zoals gesuggereerd door Schymanski et al. (Schymanski et al., 2014). Omwille van het gebrek aan referentieverbindingen zijn in de meeste publicaties rond NTS van PFAS de gerapporteerde confidentieniveau's gelegen tussen 2 en 3 (Liu et al., 2019).

- Rapporteer voor de gedetecteerde verbindingen:
 - o de retentietijd R_t ,
 - o de mono-isotopische massa M van het neutrale molecule (dus niet van $[M+H]^+$ of $[M-H]^-$)
 - o de kandidaat brutoformule
 - o de mogelijke structuur
 - o het CAS nummer
 - o het confidence level
- Geef, indien de klant hierom vraagt, TIC chromatogrammen en m/z - R_t diagrammen (ESI+, ESI-) voor de onderzochte waters alsook voor de blanco's indien geen blancosubtractie is gebeurd.
- Rapporteer ook de toegepaste LC-HRMS werkwijze

REFERENTIES

- Hollender, J., Schymanski, E. L., Ahrens, L., Alygizakis, N., Béen, F., Bijlsma, L., Brunner, A. M., Celma, A., Fildier, A., Fu, Q., Gago-Ferrero, P., Gil-Solsona, R., Haglund, P., Hansen, M., Kaserzon, S., Kruve, A., Lamoree, M., Margoum, C., Meijer, J., ... Krauss, M. (2023). NORMAN guidance on suspect and non-target screening in environmental monitoring. In *Environmental Sciences Europe* (Vol. 35, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00779-4>
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2022). Simplifying Nontargeted Analysis of PFAS in Complex Food Matrixes. *Journal of AOAC International*, 105(5), 1280–1287. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac071>
- Kind, T., & Fiehn, O. (2007). Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-105>
- Koelmel, J. P., Paige, M. K., Aristizabal-Henao, J. J., Robey, N. M., Nason, S. L., Stelben, P. J., Li, Y., Kroeger, N. M., Napolitano, M. P., Savvaides, T., Vasiliou, V., Rostkowski, P., Garrett, T. J., Lin, E., Deigl, C., Jobst, K., Townsend, T. G., Godri Pollitt, K. J., & Bowden, J. A. (2020). Toward Comprehensive Per- and Polyfluoroalkyl Substances Annotation Using FluoroMatch Software and Intelligent High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Acquisition. *Analytical Chemistry*, 92(16), 11186–11194. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01591>
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 48, Issue 4, pp. 2097–2098). <https://doi.org/10.1021/es5002105>
- Zweigle, J., Bugsel, B., & Zwiener, C. (2022). *FindPFAS: Non-Target Screening for PFAS Comprehensive Data Mining for MS 2 Fragment Mass Differences*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6797353>
- Zweigle, J., Bugsel, B., & Zwiener, C. (2023). Efficient PFAS prioritization in non-target HRMS data: systematic evaluation of the novel MD/C-m/C approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(10), 1791–1801. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04601-1>