

Bepaling van ultrakorte keten per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS) in water met LC-MS/MS

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Materiaal	4
4	Reagentia en standaarden	4
5	Monsterbewaring	5
6	Analyseprocedure	5
6.1	<i>Staalvoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Meting</i>	5
6.2.1	LC-condities	5
6.2.2	MS-condities	6
6.2.3	Identificatie en integratie	7
6.3	<i>Kalibratie</i>	7
6.4	<i>Kwantificatie</i>	8
7	Kwaliteitscontroles	8
7.1	<i>Terugvinding van de isotoopgemerkte fluorverbindingen</i>	8
8	Rapportering	9

1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

De hieronder beschreven analysemethode is nieuw en wordt gebruikt voor het bepalen van ultrakorte keten per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS):

in drink-, grond- en oppervlaktewater
in afvalwater

en is gericht op de kwantificering van volgende componenten:

PFAS	Afkorting	CAS nr
trifluorazijnzuur	TFA	76-05-1
perfluor-n-propaanzuur	PFPrA	422-64-0
perfluor-n-propaansulfonzuur	PFPrS	423-41-6
trifluor-n-methaansulfonzuur	TFMS	1493-13-6
pentafluor-n-ethaansulfonzuur	PFEtS	354-88-1
2,3,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur	2,3,3,3-TFPA	359-49-9
2,2,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur	2,2,3,3-TFPA	756-09-2

De bepalingsgrenzen zijn samengevat in onderstaande tabel:

BG (ng/l)	Directe injectie
TFA	4000
PFPrA	120
PFPrS	575
PFEtS	200
TFMS	500
2,3,3,3-TFPA	2000
2,2,3,3-TFPA	175

2 PRINCIPE

De waterstalen worden verdund met acetonitrile en na toevoeging van interne standaarden direct geïnjecteerd in een vloeistofchromatograaf met tandem massaspectrometrische detectie. Het gehalte van de verschillende PFAS wordt berekend met de interne standaard methode.

Opmerkingen:

- Voor sommige PFAS kan geen isotoopdilutie toegepast worden omdat de identieke isotoopgemerkte verbinding niet beschikbaar is. Deze PFAS worden gekwantificeerd aan de hand van een zo goed mogelijk gelijkende isotoopgemerkte verbinding. Alternatief mag voor deze componenten de externe standaardmethode toegepast worden (met controle op de aanwezigheid van matrixeffecten), ofwel kwantificering aan de hand van standaard additie, op voorwaarde dat bij de validatie aangetoond wordt dat daarmee betere resultaten bekomen worden. In geval de meetreeks steeds hetzelfde type monster omvat dan kan de

kalibratiereeks aangemaakt worden in het monster of het monsterextract (“matrix matched calibration”).

3 MATERIAAL

- 3.1 Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- 3.2 Injectiespuiten van 25 tot 100 µl voor het doperen van isotoopgemerkte fluorverbindingen of matrixaddities
- 3.3 Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- 3.4 Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- 3.5 LC-MS systeem bestaande uit:
 - een HPLC of UPLC vloeistofchromatograaf met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid
Opn.: 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 tandem quadrupool massaspectrometer met electrospray ionisatiekamer
Opn.: Alternatief kan gebruik gemaakt worden van een ion trap of een hoge resolutie accurate massa (time-of-flight (TOF) of Fourier Transform) massaspectrometer
 - een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- 3.6 LC-kolom:
 - bv. voor UPLC: Grace Davison PREVAIL 3µM C18-SELECT COLUMN 150X2.1MM of PREVAIL 5µM C18-SELECT COLUMN 150X2.1MM

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- 4.1 Methanol, p.a.
- 4.2 Acetonitrile p.a.
- 4.3 Water, ultrapuur
- 4.4 Ammoniumacetaat, p.a.
- 4.5 NH₃-oplossing, p.a.: bv. 25 %
- 4.6 Stock kalibratieoplossingen van natieve PFAS in methanol: monocomponent stockoplossingen, aangekocht of zelf aangemaakt vanuit de zuivere stoffen
- 4.7 Stock controlestandaard van natieve PFAS: dit is een onafhankelijke mengstandaard in methanol
- 4.8 Standaardoplossing van isotoop aangerijkte PFAS (inwendige standaarden): deze wordt als mengstandaardoplossing aangekocht of aangemaakt mbv individuele standaarden in een concentratie van bv. 400 µg/l. De volgende isotoopgemerkte PFAS worden minimaal gebruikt:

pefluor-n-[1,2,3- ¹³ C1]-propaanzuur	¹³ C ₃ -PFPrA
perfluor-n-[1,2,3,4- ¹³ C1]-butaanzuur	¹³ C ₄ -PFBA
perfluor-n-[1,2,3,4- ¹³ C1]-butaansulfonzuur	¹³ C ₃ -PFBS
¹³ C-trifluorazijnzuur	¹³ C ₂ -TFA

- 4.9 Kalibratiestandaarden: maak uitgaande van de stock kalibratieoplossingen van natieve PFAS en de standaardoplossing van isotoop aangerijkte PFAS een reeks verdunningen in acetonitrile/water (1/1) met wisselende concentraties aan natieve PFAS, lopende van bv. 0.1

tot 150 µg/l, en constante concentraties aan isotoop aangerijkte PFAS van bv. 4 µg/l; deze oplossingen worden bij elke meetreeks opnieuw aangemaakt

4.10 QC standaarden: uitgaande van de stock controlestandaard worden QC standaarden in acetonitrile/water (1/1) aangemaakt op één of meer concentratieniveaus

5 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering wordt verwezen naar WAC/IV/A/010 voor de monsterbewaring gebeurt bij 4°C in het donker en maximaal gedurende 1 week. 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.

6 ANALYSEPROCEDURE

6.1 STAALVOORBEREIDING

- ~~— Weeg de monsterfles. Breng de volledige inhoud van de monsterfles over in een tweede fles. Weeg de oorspronkelijke monsterfles opnieuw en bereken de hoeveelheid waterstaal (ml).~~
- ~~Spoel de oorspronkelijke monsterfles enkele keren na met acetonitrile en breng de acetonitrile over in de tweede fles. Gebruik in totaal evenveel ml acetonitrile als waterstaal, zodat de tweede fles een mengsel bevat van 50% acetonitrile en 50% staal.~~
- Neem een deelstaal van 1 mL en meng met 1 mL acetonitrile.
- Homogeniseer en vul een meetvial met een afgemeten hoeveelheid van het mengsel en voeg een geschikte hoeveelheid isotoop gemerkte PFAS toe, zodat de theoretische concentraties van de interne standaarden in het meetextract gelijk zijn aan deze in de kalibratiestandaarden.
- Analyseer het mengsel met directe injectie LC-MS/MS.

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.

6.2 METING

6.2.1 LC-CONDITIES

Onderstaand zijn typische instellingen weergegeven voor een Grace Davison PREVAIL 3µM C18-SELECT 150X2.1MM kolom.

Typische UPLC-instellingen zijn:

- mobiele fase:
 - A= 10mM ammoniumacetaat (pH 5)
 - B= acetonitrile
- debiet: 0.3 ml/min
- kolomtemperatuur: 45°C

- injectievolume: 2 μ l
- gradiënt:

Tijd	A%	B%
min	%	%
0	98	2
3	98	2
9	60	40
10	5	95
10.5	5	95
11	98	2
15	98	2

Opmerkingen:

- De LC-analyse kan ook gebeuren met een HPLC configuratie, gebruikmakend van een Grace Davison PREVAIL 5 μ M C18-SELECT COLUMN 150X2.1MM kolom en gradiënt elutie.

6.2.2 MS-CONDITIES

Alle opnamen worden met Multiple Reaction Monitoring (MRM) uitgevoerd, met ionisatie via electrospray in negatieve modus (ES⁻).

Hieronder zijn bij wijze van voorbeeld, voor een Waters Xevo TQ-S, typische instellingen voor de MS-acquisitie gegeven:

Ion Mode :	ES ⁻
Capillary Voltage :	0.5 kV
Cone Voltage :	componentafhankelijk
Source Offset :	30 V
Desolvation Temperature :	450 °C
Source Temperature :	150 °C
Desolvation :	1000 L/Hr
Cone :	150 L/Hr
Nebuliser :	7 Bar
Ion Energy1 :	1.0
Ion Energy2 :	2.0
Collision gas flow :	0.20 ml/min
Collision energy:	componentafhankelijk

De onderstaande ionentransities worden geregistreerd. Tegelijk zijn typische UPLC retentietijden aangegeven. In de tabel is ook aangegeven welke isotoop gemerkte interne standaard gebruikt kan worden voor de kwantificatie van de native verbinding. Om zoveel mogelijk problemen van geringe terugvinding of spreiding van resultaten te vermijden (als gevolg van sorptie aan de recipiëntwand of injector en/of matrixonderdrukking/versterking), dient ernaar gestreefd te worden om een zo groot mogelijk aantal overeenkomstige inwendige standaarden te gebruiken.

Compound	Parent	Daughter		Cone	Collision	IS	Rt
	(m/z)	(m/z)	(Q/q)	(V)	(V)		(min)

TFA	113	69	Q	20	20	13C-PFBA	3.12
PFPrA	163	119	Q	20	10	13C-PFPrA	6.04
PFPrS	249	80	Q	20	30	13C-PFBS	9.56
PFEtS	199	80	Q	10	20	13C-PFBS	8.00
TFMS	149	80	Q	20	10	13C-PFBS	5.40
2,3,3,3-TFPA	145	101	Q	10	15	13C-PFBA	3.23
2,2,3,3-TFPA	145	81	q	10	10	13C-PFBA	3.86
2,2,3,3-TFPA	145	81	Q	10	15	13C-PFBA	3.86
13C-TFA	115	70	IS	10	10		3.12
13C-PFPrA	166	121	IS	20	10		6.08
13C-PFBA	217	172	IS	30	8		8.15
13C-PFBS	302	80	IS	50	30		10.0

Q: transitie voor kwantificatie van de component

q: transitie ter bevestiging (kwalificatie) van de kwantificatietransitie

6.2.3 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De per- en polyfluoralkylverbindingen en de interne standaarden worden geïdentificeerd op basis van de criteria voor retentietijden en ionenratio's zoals vermeld in WAC/VI/A/003.

De geïdentificeerde pieken worden geïntegreerd met behulp van de software van de apparatuur en manueel geverifieerd.

6.3 KALIBRATIE

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar WAC/VI/A/003) :

- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval worden aan het begin van de analysereeks minimaal 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan 0 en verspreid over het lineair gebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve PFAS en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt door middel van lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. De afwijking van elk punt tot de rechte mag maximum 20% bedragen.
- aan de hand van kwadratische curven. Indien bij de lineariteitstest gebleken is dat er geen lineair maar een kwadratisch verband is tussen concentratie en respons, dan kunnen kwadratische curven gebruikt worden voor de kalibratie. Daartoe worden aan het begin van de analysereeks minimaal 5 kalibratie-oplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve PFAS en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt door middel van kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend. De afwijking van elk punt tot de curve mag maximum 15% bedragen.

6.4 KWANTIFICATIE

Voor de monsterextracten worden de transities geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen. Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de kalibratierechte/curve bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend.

Opmerkingen:

- Het eindextract bedraagt in de regel 1 ml, het monstervolume 50 ml voor drink- en oppervlaktewater en 25 ml voor afvalwater.
- Bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied dient voor de bepaling van de betrokken fluorverbinding het extract verdund te worden met mobiele fase en opnieuw gemeten. Er mag maximum 10 keer verdund worden zodat de interne standaard nog meetbaar is. Indien de concentraties dermate hoog zijn dat meer dan 10 keer verdund moet worden, dan moet verse interne standaard toegevoegd worden.
- Als er een som van PFAS gemaakt wordt dan dient het "lower bound" principe toegepast te worden.

7 KWALITEITSCONTROLES

Voor de kwaliteitseisen in verband met kalibratie, procedureblanco, controle op gevoeligheid, controlestaal, driftcontrole en onafhankelijke controlestandaard wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

7.1 TERUGVINDING VAN DE ISOTOOPGEMERKTE FLUORVERBINDINGEN

Voor elk monster wordt de terugvinding van de isotoopgemerkte interne standaarden bepaald, d.i. de experimenteel teruggevonden hoeveelheid van elk van de bij het begin van de analyse toegevoegde standaarden. Dit gebeurt door vergelijking van de oppervlakte van de isotoop aangerijkte verbinding bekomen voor het monster ($A_{is}(\text{monster})$) t.o.v. de oppervlakte bekomen voor een kalibratiestandaard ($A_{is}(\text{kalibratiestandaard})$) waarin ongeveer dezelfde concentratie aan natieve verbinding aanwezig is als gemeten in het monsterpreparaat (dit om rekening te houden met de onderdrukking van het signaal van de isotoopgemerkte verbinding door de coëluerende natieve verbinding). De terugvinding wordt gegeven door:

$$R\% = A_{is}(\text{monster}) * 100 / A_{is}(\text{kalibratiestandaard})$$

Het terugvindingsrendement is afhankelijk van sorptiefenomenen, signaalsuppressie/versterking door matrixbestanddelen en extractierendement. Voor een verantwoorde kwantificering dient het terugvindingsrendement van de ^{13}C -gemerkte fluorverbindingen minimaal 30 % en maximaal 200% te bedragen.

Opmerking:

Als voor een bepaalde interne standaard in praktijk systematisch te hoge of te lage terugvindingen bekomen worden, dan hoeft dit niet als afwijking op het analyserapport vermeld te worden op voorwaarde dat aan de hand van validatiegegevens aangetoond werd dat dit geen negatieve invloed heeft op het resultaat.

8 RAPPORTERING

Vermeld op het analyseverslag het gehalte van elke component in $\mu\text{g/l}$ of ng/l . Vermeld op het verslag ook eventueel vastgestelde afwijkingen.