

Bepaling van ultrakorte keten PFAS in water met LC-MS/MS

INHOUD

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

1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

De hieronder beschreven analysemethode vervangt WAC/IV/A/026 van mei 2025. De hieronder beschreven analysemethode wordt gebruikt voor het bepalen van ultra korte keten per- en polyfluoralkylverbindingen (PFAS) in drinkwater, grondwater, oppervlaktewater en 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
perfluor-n-ethaansulfonzuur	PFEtS	354-88-1
2,3,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur	2,3,3,3-TeFPrA	359-49-9
2,2,3,3-tetrafluor-n-propaanzuur	2,2,3,3-TeFPrA	756-09-2

De verbindingen kunnen bepaald worden vanaf een concentratie zoals vastgelegd in onderstaande tabel:

Bepalingsgrens	DW, GW en OW (ng/l)	AW (ng/l)
TFA	500	1000
PFPrA	20	100
PFPrS	20	100
PFEtS	100	500
TFMS	50	200
2,3,3,3-TeFPrA	500	500
2,2,3,3-TeFPrA	50	200

2 PRINCIPE

~~De waterstalen worden verdund met acetonitrile of methanol en na toevoeging van interne standaarden direct geïnjecteerd in een vloeistofchromatograaf met tandem massaspectrometrische detectie. Waterstalen kunnen ook rechtstreeks (zonder additie van acetonitrile of methanol) geïnjecteerd worden, na toevoeging van de interne standaarden.~~

Aan het waterstaal worden gekende hoeveelheden isotoopgemerkte interne standaarden toegevoegd. Het staal wordt vervolgens geëxtraheerd met vaste fase extractie. De vaste fase wordt geëluëerd met methanol en het methanolextract wordt ingedampt. Het residu wordt opgenomen in een gekend volume mobiele fase en geanalyseerd met vloeistofchromatografie met massaspectrometrische detectie. Het gehalte van de PFAS wordt berekend met de interne standaard methode.

Opmerkingen:

- De gewenste bepalingsgrenzen zijn ook haalbaar met toepassing van groot-volume directe injectie in plaats van opconcentrering dmv SPE. De directe injectie techniek is echter minder

- geschikt voor sterk vervuilde waterstalen, de invloed van matrixinterferenties dient grondig gevalideerd te worden bij toepassing van de directe injectie techniek.
- Als interne standaarden moeten isotoopgemerkte PFAS gebruikt worden. De keuze van interne standaarden is vrij, behalve voor TFA waarvoor verplicht ^{13}C -TFA gebruikt moet worden. ~~Voor componenten waarvoor geen identieke isotoopgemerkte verbinding beschikbaar is mag 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”).~~
 - Om blancoproblemen met ultra korte keten PFAS te minimaliseren kan het nodig zijn om gebruik te maken van “positive displacement” pipetten en/of om de opwerking uit te voeren in een geoptimaliseerd lokaal dat afgezonderd is van de rest van het laboratorium.
 - De staalnamerecipiënten en gebruiksmaterialen dienen bij ingebruikname van een nieuwe batch gecontroleerd te worden op contaminatie met ultra korte PFAS
 - Ultra korte keten PFAS kunnen in reële stalen soms in hoge concentraties voorkomen. Er bestaat in dat geval een risico dat de daaropvolgende stalen in een meetreeks gecontamineerd worden door overdracht (cross-contamination). Als er een vermoeden is van cross-contamination dan dienen de daaropvolgende stalen opnieuw geanalyseerd te worden.

3 MATERIAAL

- 3.1 Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- 3.2 Injectiespuiten van 25 tot 100 μl voor het doperen van de isotoopgemerkte fluorverbinding 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 **Opstelling voor elutie van de SPE patronen**
- 3.6 **SPE patronen met een zwakke anionenwisselaar fase, bv strata WAX/GCB 6mL cartridge, 200mg/50mg. Andere patronen kunnen ook gebruikt worden mits gevalideerd.**
- 3.7 **Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet**
- 3.8 LC-MS 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 tandem quadrupool massaspectrometer met electrospray ionisatiekamer
Opm.: 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
- 3.9 LC-kolom:
 - bv. voor UPLC: Grace Davison PREVAIL $3\mu\text{M}$ C18-SELECT COLUMN 150X2.1MM of PREVAIL $5\mu\text{M}$ 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 **Ammoniak/methanol oplossing: 0.4 ml van een 25 % NH₃-oplossing in 99.6 ml methanol**
 4.7 Stock kalibratieoplossingen van natieve PFAS in methanol: monocomponent stockoplossingen, aangekocht of zelf aangemaakt vanuit de zuivere stoffen
 4.8 Stock controlestandaard van natieve PFAS: dit is een onafhankelijke mengstandaard in methanol
 4.9 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 C ₁]-propaanzuur	¹³ C ₃ -PFPrA
perfluor-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₁]-butaansulfonzuur	¹³ C ₃ -PFBS
13C-trifluorazijnzuur	¹³ C ₂ -TFA

- 4.10 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. 1 tot 100 µg/l, en constante concentraties aan isotoop aangerijkte PFAS van bv. 10 µg/l; deze oplossingen worden bij elke meetreeks opnieuw aangemaakt
 4.11 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 monster conservering 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.

Opmerking:

- lage terugvindingen van de interne standaarden kunnen verbeterd worden door het waterstaal voor analyse aan te zuren, bv. naar pH 3.

6 ANALYSEPROCEDURE

6.1 STAALVOORBEREIDING

~~— Bij verdunning met acetonitrile: 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 de meetoplossing gelijk zijn aan deze in de kalibratiestandaarden.~~

~~Opmerking: bij verdunning van stalen in ACN kan met sommige LC-kolommen peak splitting van TFA optreden.~~

~~— Bij rechtstreekse injectie van het waterstaal: homogeniseer het staal en vul een meetvial met een afgemeten hoeveelheid van het staal; voeg een geschikte hoeveelheid isotoop gemerkte PFAS toe, zodat de theoretische concentraties van de interne standaarden in de meetoplossing gelijk zijn aan deze in de kalibratiestandaarden.~~

~~— Analyseer de meetoplossing met directe injectie LC-MS/MS.~~

- Weeg de monsterfles met stop en inhoud.
- Voeg een geschikte hoeveelheid van de standaardoplossing van isotoop gemerkte interne standaarden toe, zodat de theoretische concentratie van de IS in het meetextract gelijk is aan deze in de kalibratiestandaarden.
- Schud het geheel krachtig op.
- Voor de extractie wordt gebruik gemaakt van een SPE-patroon (3.6).

De procedure omvat volgende stappen:

- conditioneer het SPE-patroon met 4 ml ammoniak/MeOH oplossing;
- conditioneer het SPE-patroon met 4 ml MeOH;
- spoel het SPE-patroon met 4 ml ultrapuur water; let erop om het patroon niet droog te laten komen;
- breng het volledige staal (vb. 50 mL) over het SPE-patroon;
- centrifugeer de SPE cartridge tot droog; alternatief mag de cartridge gedroogd worden op de SPE-manifold dmv vacuüm
- elueer de SPE- cartridge met 4 mL methanol;
- elueer de SPE-cartridge vervolgens met 4 ml methanol/ammoniak oplossing (4.6)
- damp indien nodig het extract in onder een N₂ stroom bij 40 – 65 °C tot 500 µl;
- laat het extract daarbij niet droogdampen;
- leng het extract desgewenst aan met ultrapuur water en/of methanol; de kalibratiestandaarden dienen in hetzelfde solventmengsel aangemaakt te worden als de meetextracten;
- breng over in een meetvial;
- bepaal het volume van het opgebrachte staal door herweging van de monsterfles met stop.

Van het extract wordt typisch 10 µl in de LC-MS geïnjecteerd

De houdbaarheid van de meetoplossingen water:methanol 1:1 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 3 μ M 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: 10 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.
- Voor analyse van waterstalen met hoge zoutconcentraties kunnen betere piekvormen bekomen worden met mobiele fase A = 10 mM ammoniumacetaat (pH 5).

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 :	575 °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 :	0.15 ml/min
Collision energy:	componentafhankelijk

De onderstaande ionentransities worden **typisch** 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 natieve 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. Voor TFA dient steeds ¹³C-TFA als interne standaard gebruikt te worden.

Compound	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	(Q/q)	Cone (V)	Collision (V)	IS	Rt (min)
TFA	113	69	Q	20	12	¹³ C-TFA	3.12
PFPrA	163	119	Q	20	10	¹³ C-PFPrA	6.04
PFPrS	249	80	Q	20	30	¹³ C-PFBS	9.56
PFEtS	199	80	Q	10	20	¹³ C-PFBS	8.00
TFMS	149	80	Q	20	10	¹³ C-PFBS	5.40
2,3,3,3-TeFPrA	145	81	q	10	15	¹³ C-PFPrA	3.23
	145	101	Q	10	15		
2,2,3,3- TeFPrA	145	81	q	10	10	¹³ C-PFPrA	3.86
	145	101	Q	10	15		
¹³ C-TFA	115	70	IS	10	10		3.12
¹³ C-PFPrA	166	121	IS	20	10		6.08
¹³ C-PFBA	217	172	IS	30	8		8.15
¹³ C-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, zie WAC/VI/A/003. Voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt eveneens verwezen naar WAC/VI/A/003.

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:

- De meetoplossing bedraagt in de regel 1 ml.
- Bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied dient voor de bepaling van de betrokken fluorverbinding de meetoplossing verdund te worden met ofwel water ofwel water:methanol 1:1. 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 standaard bepaald, d.i. de experimenteel teruggevonden hoeveelheid van elk van de bij het begin van de analyse toegevoegde standaard. 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 fluorverbinding minimaal 30 % en maximaal 200% te bedragen.

Opmerking:

Als voor de 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.