

## Bepaling van per- en polyfluorverbindingen in water met LC-MS/MS

---

**INHOUD**

<b>1</b>	<b>Doel en toepassingsgebied</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Principe</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Materiaal</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Reagentia en standaarden</b>	<b>6</b>
<b>5</b>	<b>Monsterbewaring</b>	<b>7</b>
<b>6</b>	<b>Analyseprocedure</b>	<b>8</b>
6.1	<i>Extractie</i>	8
6.2	<i>Meting</i>	9
6.2.1	LC-condities	9
6.2.2	MS-condities	10
6.2.3	Identificatie en integratie	15
6.3	<i>Kalibratie</i>	15
6.4	<i>Kwantificatie</i>	15
<b>7</b>	<b>Kwaliteitscontroles</b>	<b>16</b>
7.1	<i>Chromatografische scheiding</i>	16
7.2	<i>Instrumentele detectielimiet</i>	16
7.3	<i>Procedureblanco</i>	17
7.4	<i>Controle van de geldigheid van de kalibratievergelijking</i>	17
7.5	<i>Terugvinding van de isotoopgemerkte fluorverbindingen</i>	17
7.6	<i>Controlemonster</i>	17
<b>8</b>	<b>Rapportering</b>	<b>18</b>
<b>9</b>	<b>Referenties</b>	<b>18</b>

## 1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

De hieronder beschreven analysemethode vervangt de procedure WAC/IV/A/025 van september 2016 en wordt gebruikt voor het bepalen van per- en polyfluorverbindingen (PFAS) (PFC):

in drink-, grond- en oppervlaktewater  
in afvalwater

en is gericht op de kwantificering van volgende componenten:

PFAS	Afkorting	CAS nr
perfluoro-n-butaanzuur	PFBA	375-22-4
perfluor-n-pentaanzuur	PFPA	2706-90-3
perfluor-n-hexaanzuur	PFHxA	307-24-4
perfluor-n-heptaanzuur	PFHpA	375-85-9
perfluor-n-octaanzuur	PFOA	335-67-1
perfluor-n-nonaanzuur	PFNA	375-95-1
perfluor-n-decaanzuur	PFDA	335-76-2
perfluor-n-undecaanzuur	PFUdA	2058-94-8
perfluor-n-dodecaanzuur	PFDoA	307-55-1
perfluor-n-tetradecanoic acid	PFTeDA	376-06-7
perfluor-n-hexadecaanzuur	PFHxDA	67905-19-5
perfluor-n-butaansulfonzuur	PFBS	375-73-5
Perfluor-n-pentaansulfonzuur	PFPeS	2706-91-4
perfluor-n-hexaansulfonzuur	PFHxS	355-46-4
perfluor-n-heptaansulfonzuur	PFHpS	375-92-8
perfluor-n-octaansulfonzuur	PFOS	1763-23-1
perfluor-n-nonaansulfonzuur	PFNS	68259-12-1
4:2 fluortelomeersulfonzuur	4:2 FTS	757124-72-4
6:2 fluortelomeersulfonzuur	6:2 FTS	27619-97-2
8:2 fluortelomeersulfonzuur	8:2 FTS	39108-34-4
perfluor-1-octaansulfonamide	FOSA	754-91-6
N-ethylperfluor-octaansulfonamido-azijnzuur	MeFOSAA	2355-31-9
N-methylperfluor-octaansulfonamido-azijnzuur	EtFOSAA	2991-50-6
8:2 fluortelomeerfosfaat diester	8:2 diPAP	678-41-1
hexafluorpropyleenoxidedimeerzuur	HFPO-DA (GenX)	13252-13-6
4,8-dioxa-3H-perfluornonaanzuur	ADONA	919005-14-4
perfluor-4-ethylcyclohexaansulfonzuur	PFECHS	646-83-3

— perfluorpentaanzuur — PFPA  
 — perfluorhexaanzuur — PFHxA  
 — perfluorheptaanzuur — PFHpA  
 — perfluor-octaanzuur — PFOA  
 — perfluornonaanzuur — PFNA  
 — perfluordecaanzuur — PFDA

<del>perfluorundecaanzuur</del>	<del>PFUdA</del>
<del>perfluordodecaanzuur</del>	<del>PFDoA</del>
<del>perfluorbutaansulfonaat</del>	<del>PFBS</del>
<del>perfluorhexaansulfonaat</del>	<del>PFHxS</del>
<del>perfluoroctaansulfonaat</del>	<del>PFOS</del>
<del>perfluoroctaansulfonamide</del>	<del>PFOSA</del>

De verbindingen kunnen bepaald worden vanaf een concentratie van 10 ~~tot 20~~ ng/l voor drink-, grond- en oppervlaktewater en ~~100 20~~ ng/l voor afvalwater.

**Opmerkingen:**

- Tegelijk kunnen de onderstaande verbindingen bepaald worden. Afhankelijk van de toegepaste methode kunnen hiervoor minder betrouwbare gehalten bekomen als gevolg van onvoldoende terugvinding, verlies door adsorptie of mogelijke interferentie. De gemeten gehalten kunnen in dat geval enkel gerapporteerd worden als indicatief.

<del>perfluorbutaanzuur</del>	<del>PFBA</del>
<del>perfluortridecaanzuur</del>	<del>PFTrDA</del>
<del>perfluortetradecaanzuur</del>	<del>PFTeDA</del>
<del>perfluorhexadecaanzuur</del>	<del>PFHxDA</del>
<del>perfluoroctadecaanzuur</del>	<del>PFODA</del>
<del>perfluordecaansulfonaat</del>	<del>PFDS</del>

<i>PFAS</i>	<i>Afkorting</i>	<i>CAS nr</i>
perfluor-n-tridecaanzuur	PFTrDA	72629-94--8
perfluor-n-octadecaanzuur	PFODA	16517-11-6
perfluor-1-decaansulfonzuur	PFDS	335-77-3
perfluor-1-dodecaansulfonzuur	PFDoS	79780-39-5
10:2 fluortelomeersulfonzuur	10:2 FTS	120226-60-0
N-methylperfluoroctaansulfonamide	MeFOSA	31506-32-8
N-ethylperfluoroctaansulfonamide	EtFOSA	4151-50-2
6:2 fluortelomeerfosfaat diester	6:2 diPAP	57677-95-9
6:2/8:2 fluortelomeerfosfaat diester	6:2/8:2 diPAP	943913-15-3

- Daarnaast kunnen optioneel (wanneer de aanwezigheid vermoed wordt) de onderstaande verbindingen bepaald worden; de bepaling hiervan maakt echter gebruik van een LC-MS methode met een andere mobiele fase

<i>PFAS</i>	<i>Afkorting</i>	<i>CAS nr</i>
perfluoroctaansulfonamidoazijnzuur	FOSAA	2355-31-9
6:2 fluortelomeerfosfaat monoester	6:2 PAP	57678-01-0
8:2 fluortelomeerfosfaat monoester	8:2 PAP	57678-03-2

- Van de meeste perfluorverbindingen komt uitsluitend de lineaire vorm voor; de beschikbare standaarden zijn ook lineair. Van een aantal perfluorverbindingen kan ook de vertakte vorm teruggevonden worden, die al dan niet afhankelijk van regelgeving en aard van het water mee gekwantificeerd wordt (zie 6.4). Voor technische PFOA en PFOS gesynthetiseerd via telomerisatie geldt dat enkel de lineaire vorm voorkomt. Voor PFOA gesynthetiseerd via electrochemische fluorering geldt een typische samenstelling van 78% lineair en 22% vertakt; voor PFOS is dit 70% lineair en 30% vertakt.

## 2 PRINCIPE

Aan waterstalen worden gekende hoeveelheden isotoopgemerkte fluorverbindingen toegevoegd. De waterstalen worden 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 verschillende PFCs wordt berekend met de interne standaard methode.

*Opmerkingen:*

- ~~In bepaalde gevallen kan~~, Afhankelijk van de aard van de monsters, **de toestelgevoeligheid** en de gewenste rapportagemaxima, **kan** de meting rechtstreeks gebeuren zonder voorafgaandelijke opwerking.
- Alternatief aan de interne standaardmethode kan gekozen worden voor de externe standaardmethode, met controle op de aanwezigheid van matrixeffecten, ofwel kwantificatie aan de hand van standaard additie. 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 Opstelling voor elutie van de SPE patronen
- 3.6 SPE patronen **met een zwakke anionenwisselaar fase, bv** OASIS WAX 6cc cart, 150mg. 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  
**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 quadropool 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
- 3.9 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 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- 4.1 Methanol, p.a.
- 4.2 Water, ultrapuur
- 4.3 Ammoniumacetaat, p.a.
- 4.4 NH<sub>3</sub>-oplossing, p.a.: bv. 25 %
- 4.5 Azijnzuur 100 %, p.a.
- 4.6 Ammoniak/methanol oplossing: 0,4 ml van een 25 % NH<sub>3</sub>-oplossing in 99,6 ml methanol
- 4.7 Acetaatbufferoplossing: los 0,286 ml azijnzuur op in 200 ml ultrapuur water (oplossing 1).  
Los 0,097 g ammoniumacetaat op in 50 ml ultrapuur water (oplossing 2). Voeg oplossing 1 en oplossing 2 samen, eindvolume is 250 ml.
- 4.8 Stock kalibratiestandaardenoplossingen van PFC's natieve PFAS in methanol: monocomponent stockoplossingen, aangekocht of zelf aangemaakt vanuit de zuivere stoffen
- ~~4.9 Stock kalibratieoplossingen van natieve PFC's: dit zijn monocomponentstandaarden aangemaakt in methanol vanuit de stock kalibratiestandaarden uit 4.8, in een concentratie van +/- 10 mg/l~~
- 4.10 Stock controlestandaard van natieve PFC's PFAS: dit is een onafhankelijke mengstandaard in methanol
- 4.11 Standaardoplossing van isotoop aangerijkte PFC's PFAS (inwendige standaarden): deze wordt als mengstandaardoplossing aangekocht of aangemaakt mbv individuele standaarden in een concentratie van bv. 400 µg/l. ~~± 2000 µg/l en verdund naar een concentratie van ± 400 µg/l~~ De volgende isotoop gemerkte PFC's PFAS worden gebruikt :

Perfluor-n-[1,2,3,4- <sup>13</sup> C1]-butaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFBA
Perfluor-n-[ <sup>13</sup> C5]-hexaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFPeA
Perfluor-n-[1,2- <sup>13</sup> C2]-hexaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFHxA
Perfluor -n-[1,2,3,4- <sup>13</sup> C4]-octaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOA
Perfluor-n-[1,2,3,4,5- <sup>13</sup> C5]-nonaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFNA
Perfluor-n-[1,2- <sup>13</sup> C2]-decaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFDA
Perfluor-n-[1,2- <sup>13</sup> C2]-undecaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PUdA
Perfluor-n-[1,2- <sup>13</sup> C2]-dodecaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFDoA
Perfluor-n-[1,2- <sup>13</sup> C2]-tetradecaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFTeDA
Perfluor-n-[1,2- <sup>13</sup> C2]-hexadecaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFHxDA
Perfluor-1-hexaan[ <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ]sulfoaat	<sup>18</sup> O <sub>2</sub> -PFHxS
Perfluor-1-[1,2,3,4- <sup>13</sup> C4]-octaansulfoaat	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOS
Natrium 1H,1H,2H,2H-perfluor-1-[1,2- <sup>13</sup> C2]-octaansulfoaat	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -6:2FTS
Perfluor-1-[ <sup>13</sup> C8]-octaansulfonamide	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -FOSA
N-methyl-d <sub>3</sub> -perfluor-1-octaansulfonamide	D <sub>3</sub> -MeFOSA
N-methyl-d <sub>3</sub> -perfluor-1-octaansulfonamidoazijnzuur	D <sub>3</sub> -MeFOSAA
Natrium 1H,1H,2H,2H-[1,2- <sup>13</sup> C2]perfluordecylfosfaat	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -8:2 PAP
Natrium bis(1H,1H,2H,2H-[1,2- <sup>13</sup> C2]perfluordecyl)fosfaat	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -8:2 diPAP
2,3,3,3-Tetrafluor-2-(1,1,2,2,3,3,3-heptafluorpropoxy)- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> -propaanzuur	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -HFPO-DA

*Opm.* : Van sommige isotoop gemerkte verbindingen zijn ook varianten beschikbaar (bv. <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-PFHxS)

<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFBA  
<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFHxA  
<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA

<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-PFNA  
<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFDA  
<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFUdA  
<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFDoA  
<sup>18</sup>O-PFHxS  
<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS  
<sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOSA

- 4.12 ~~Natieve PFC standaardreeks : maak uitgaande van de stock kalibratieoplossingen van natieve PFC's (4.9) een mengsel van alle natieve PFC's en hieruit een reeks verdunningen met wisselende concentraties aan natieve PFC's, lopende van ca 2 tot 500 µg/l; deze worden aangemaakt in methanol~~
- 4.13 ~~Kalibratiestandaarden: maak uitgaande van de natieve PFC standaardreeks (4.12) een reeks verdunningen in 1/1 methanol/water met wisselende concentraties aan natieve PFC's, lopende van ca 1 tot 250 µg/l, en constante concentraties aan isotoop aangerijkte PFC's van ca. 4 µg/l; deze oplossingen worden bij elke meetreeks opnieuw aangemaakt~~
- 4.14 ~~Kalibratiestandaarden: maak uitgaande van de stock kalibratieoplossingen van natieve PFAS en de standaardoplossing van isotoop aangerijkte PFAS een reeks verdunningen in 1/1 methanol/water met wisselende concentraties aan natieve PFAS, lopende van bv. 0.1 tot 100 µg/l, en constante concentraties aan isotoop aangerijkte PFAS van ca. 4 µg/l; deze oplossingen worden bij elke meetreeks opnieuw aangemaakt~~
- 4.15 ~~QC standaarden: uitgaande van de stock controlestandaard worden twee QC standaarden in 1/1 methanol/water aangemaakt op twee verschillende op één of meer concentratieniveaus~~
- ~~4.16 QC meetstandaarden: van de twee QC standaarden (4.14) worden QC meetstandaarden aangemaakt door ze 1/1 te verdunnen met ultra-puur water~~
- 4.16 ~~PFOS standaard voor de controle van de chromatografische scheiding: uitgaande van technische PFOS wordt een oplossing van ca. bv. 50 µg/l in 1/1 methanol-water gemaakt~~

## 5 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering en –bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

### Opmerkingen:

- Contact met teflon of andere fluorhoudende polymeren dient vermeden te worden.
- Polypropyleen (PP) of high density polyethyleen (HDPE) monsterflessen verdienen de voorkeur boven glas (ISO 21675); voor neutrale PFAS zoals FOSAs is echter glas meer geschikt.
- 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 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 recipienten van geschikt volume (bv. 25 ml, 50 ml, 100 ml, ...); 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 geleidigd 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.

## 6 ANALYSEPROCEDURE

### 6.1 EXTRACTIE

~~Het watermonster wordt gehomogeniseerd door opschudden en hiervan wordt een deelmonster genomen van 25 ml (indien afvalwater) of 50 ml (indien drink-, grond- of oppervlaktewater). Aan dit deelmonster worden de interne standaarden gedopeerd (10 µl van een 400 µg/l oplossing of 4 ng absoluut; dit resulteert bij een eindextract van 1 ml in een theoretische concentratie die gelijk is aan deze van de kalibratiestandaarden).~~

~~Voor de extractie wordt gebruik gemaakt van een 6-ml patroon met 150 mg Oasis WAX. Andere patronen kunnen ook gebruikt worden mits gevalideerd.~~

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~~
- ~~▪ breng het staal over de SPE-cartridge~~
- ~~▪ spoel met 4 ml acetaatbufferoplossing~~
- ~~▪ droog de cartridges door 15 minuten te centrifugeren aan 3000 rpm~~
- ~~▪ elueer met 4 ml MeOH, gevolgd door 4 ml ammoniak/MeOH oplossing~~
- ~~▪ damp het extract in onder een N<sub>2</sub>-stroom tot 500 µl~~
- ~~▪ leng aan met 500 µl ultrapuur water~~
- ~~▪ breng over in een meetvial van 1,5 ml~~

Hiervan wordt 10 µl in de LC-MS geïnjecteerd.

- Weeg de monsterfles met stop en inhoud.
- Breng het watermonster in het monsterrecipiënt op pH +3 met azijnzuur of NH<sub>3</sub>.
- Voeg een geschikte hoeveelheid van de standaardoplossing van isotoop gemerkte PFAS 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 over het SPE-patroon;



- spoel het SPE-patroon met 4 ml acetaatbufferoplossing (noodzaak hiervan zal geëvalueerd worden);
- droog het patroon door 15 minuten te centrifugeren aan 3000 rpm (noodzaak hiervan zal geëvalueerd worden);
- spoel de monsterfles met 4 ml methanol en elueer hiermee het SPE-patroon; vang deze fractie op;
- spoel de monsterfles met 4 ml methanol/ammoniak oplossing (4.6) en elueer hiermee het SPE-patroon; combineer deze fractie met de voorgaande;
- damp indien nodig het extract in onder een N<sub>2</sub> stroom tot 500 µl;
- leng het extract aan met 500 µl een gelijke hoeveelheid ultrapuur water;
- breng over in een meetvial van 1,5 ml;
- 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 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

Een voorbeeld van een geschikte kolom voor de UPLC bepaling van perfluorverbindingen is Acquity UPLC BEH Shield RP18, 1.7µm, 2.1 x 100 mm.

Typische UPLC-instellingen zijn:

- mobiele fase:
  - A= Water + 5 % MeOH en 2 mM ammoniumacetaat
  - B= MeOH + 2 mM ammoniumacetaat
- debiet: ~~0.25~~ 0.3 ml/min
- kolomtemperatuur: 40°C
- injectievolume: 10 µl
- gradiënt:

Time	A%	B%
min	%	%
0,00	75	25
0,50	75	25
20,00	10	90
22,00	10	90
22,20	±	99
23,00	±	99
23,20	75	25
25,00	75	25

Tijd	A%	B%
min	%	%
0	70	30
0.5	70	30

25	10	90
27	10	90
28	1	99
30	70	30

**Opmerkingen:**

- De LC-analyse kan ook gebeuren met een HPLC configuratie, gebruikmakend van een C18 kolom en gradiëntelutie.
- Voor de detectie van FOSAA, 6:2 PAP en 8:2 PAP is een alkalische mobiele fase nodig; een voorbeeld van UPLC-instellingen is hieronder gegeven:
  - mobiele fase:
    - A = Water + 2 mM ammoniumacetaat + NH<sub>3</sub> (pH 10.5)
    - B = ACN/MeOH 1/1 + 5 mM methylpiperidine
    - C = Water/MeOH/ACN/isopropanol 25/25/25/25
  - debiet: 0.3 ml/min
  - kolomtemperatuur: 40°C
  - injectievolume: 10 µl
  - gradiënt:

Tijd	A	B	C
	(%)	(%)	(%)
0.0	90	10	0
0.5	90	10	0
5	55	45	0
10	55	45	0
20	0	95	5
23	0	95	5
25	90	10	0

**6.2.2 MS-CONDITIES**

Alle opnamen worden met Multiple Reaction Monitoring (MRM) uitgevoerd, met ionisatie via electrospray in negatieve modus (ES<sup>-</sup>).

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

Ion Mode :	ES <sup>-</sup>
Capillary Voltage :	1kV
Cone Voltage :	componentafhankelijk
Source Offset :	30V
Desolvation Temperature :	450°C
Source Temperature :	150°C
Desolvation :	800L/Hr
Cone :	150L/Hr
Nebuliser :	7Bar
Ion Energy1 :	0.9

Ion Energy2 :	1.1
Collision gas flow :	0.20 ml/min
Collision energy:	componentafhankelijk

Polarity	ES-
Calibration	Static-2
Capillary (kV)	3.00
Cone (V)	componentafhankelijk
Extractor (V)	3.00
RF Lens (V)	0.1
Source Temperature (°C)	120
Desolvation Temperature (°C)	350
Cone Gas Flow (L/Hr)	49
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	799
LM-1 Resolution	14.0
HM-1 Resolution	14.0
Ion Energy 1	1.0
Entrance	0
Collision	componentafhankelijk
Exit	1
LM-2 Resolution	14.0
HM-2 Resolution	14.0
Ion Energy 2	1.0
Multiplier (V)	650

De onderstaande ionentransities worden geregistreerd. Tegelijk zijn typische UPLC retentietijden aangegeven. Deze kunnen verschuiven afhankelijk van de gebruikte kolom. 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 (agv. sorptie aan 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 (m/z)	Daughter (m/z)	(Q/q)	Cone (V)	Collision (V)	IS	Rt NH <sub>4</sub> Ac (min)	Rt NH <sub>3</sub> (min)
PFBA	213	169	Q	30	8	13C-PFBA	2.01	3.91
PFPeA	263	219	Q	30	8	13C-PFPeA	4.78	5.96
PFHxA	313	119	q	40	20	13C-PFHxA	8.72	7.24
		269	Q	40	8			
PFHpA	363	169	q	40	20	13C-PFHxA	12.21	8.75
		319	Q	40	11			
PFOA	413	169	q	40	17	13C-PFOA	14.94	11.81
		369	Q	40	11			
PFNA	463	169	q	40	17	13C-PFNA	17.13	14.48
		419	Q	40	11			
PFDA	513	219	q	40	20	13C-PFDA	18.95	15.69
		469	Q	40	11			
PFUdA	563	169	q	40	23	13C-PFUdA	20.5	16.57

		519	Q	40	11			
PFD <sub>o</sub> A	613	319	q	40	20	13C-PFD <sub>o</sub> A	21.84	17.27
		569	Q	40	11			
PFT <sub>r</sub> DA	663	319	q	40	23	13C-PFD <sub>o</sub> A	22.97	17.87
		619	Q	40	14			
PFT <sub>e</sub> DA	713	319	q	40	20	13C-PFT <sub>e</sub> DA	23.96	18.4
		669	Q	40	14			
PFH <sub>x</sub> DA	813	219	q	40	32	13C-PFH <sub>x</sub> DA	25.56	19.24
		769	Q	40	14			
PFODA	913	219	q	50	29	13C-PFH <sub>x</sub> DA	26.79	19.89
		869	Q	50	17			
PFBS	299	80	Q	50	41	13C-PFH <sub>x</sub> S	5.76	6.84
		99	q	50	41			
PFP <sub>e</sub> S	349	80	Q	50	32	18O <sub>2</sub> -PFH <sub>x</sub> S	9.53	8.09
		99	q	50	30			
PFH <sub>x</sub> S	399	80	Q	50	38	18O <sub>2</sub> -PFH <sub>x</sub> S	12.7	10.4
		99	q	50	32			
PFH <sub>p</sub> S	449	80	Q	50	41	13C-PFH <sub>x</sub> S	15.23	13.8
		99	q	50	36			
PFOS	499	80	Q	60	50	13C-PFOS	17.29	15.26
		99	q	60	40			
PFNS	549	80	Q	60	46	13C-PFOS	19.04	16.2
		99	q	60	45			
PFDS	599	80	Q	65	50	13C-PFOS	20.53	16.94
		99	q	65	50			
PFD <sub>o</sub> S	699	80	Q	65	49	13C-PFOS	22.95	18.11
		99	q	65	47			
4:2 FTS	327	80.5	q	40	26	13C 6:2 FTS	8.37	7
		306.9	Q	40	20			
6:2 FTS	427	80.7	q	40	28	13C 6:2 FTS	14.8	10.83
		406.9	Q	40	30			
8:2 FTS	527	80.7	q	40	32	13C 6:2 FTS	18.92	15.44
		506.9	Q	40	34			
10:2 FTS	627	80.7	q	40	37	13C 6:2 FTS	21.87	17.14
		606.9	Q	40	30			
FOSA	498	78	Q	50	29	13C-PFOSA	19.99	14.67
		169	q	50	32			
MeFOSA	512	169	Q	40	25	D3-MeFOSA	22.64	15.84
		219	q	40	22			
EtFOSA	526	169	Q	50	25	D3-MeFOSA	23.49	16.69
		219	q	50	25			
FOSAA	556	419	q	86	26	D3-MeFOSAA	-	9.61
		498	Q	86	28			
MeFOSAA	570	419	Q	40	19	D3-MeFOSAA	19.7	16.05
		483	q	40	15			
EtFOSAA	584	419	Q	40	20	D3-MeFOSAA	20.44	16.45
		526	q	40	20			

6:2 PAP	443	79 97	q Q	28 28	46 18	13C 8:2 PAP	-	6.5
8:2 PAP	543	79 97	q Q	32 32	58 16	13C 8:2 PAP	-	8.62
6:2 diPAP	789	97 443	Q q	40 40	31 19	13C 8:2 diPAP	23.75	18.19
6:2/8:2 diPAP	889	97 443	Q q	40 40	30 20	13C 8:2 diPAP	25.18	19
8:2 diPAP	989	97 543	Q q	50 50	30 25	13C 8:2 diPAP	26.3	19.63
HFPO-DA	285	119 169	Q q	7 7	18 14	13C HFPO-DA	9.7	7.64
ADONA	376.97	84.95 250.96	q Q	8 8	26 12	13C HFPO-DA	12.54	9.31
PFECHS	461	99 381	q Q	40 40	24 24	13C-PFOA	14.84	13.47
13C-PFBA	217	172	IS	30	8		2.01	3.9
13C-PFPeA	268	223	IS	30	8		4.77	5.96
13C-PFHxA	315	270	IS	40	11		8.72	7.24
13C-PFOA	417	372	IS	40	8		14.95	11.8
13C-PFNA	468	423	IS	40	11		17.13	14.47
13C-PFDA	515	470	IS	50	11		18.95	15.69
13C-PFUdA	565	520	IS	50	14		20.5	16.57
13C-PFDoA	615	570	IS	50	14		21.84	17.27
13C-PFTeDA	715	670	IS	50	14		23.96	18.4
13C-PFHxDA	815	770	IS	50	14		25.56	19.25
18O2-PFHxS	403	84	IS	50	40		12.7	10.41
13C-PFOS	503	80	IS	60	40		17.28	15.26
13C 6:2 FTS	429	409	IS	10	24		14.8	10.82
13C-FOSA	506	78	IS	50	40		19.99	14.68
D3-MeFOSA	515	169	IS	50	40		22.62	15.82
D3-MeFOSAA	573	419	IS	40	20		19.69	16.03
13C 8:2 PAP	545	97	IS	32	16			8.62
13C 8:2 diPAP	993	97	IS	25	20		23.75	18.19
13C HFPO-DA	287	119	IS	10	18		9.7	7.64

Q: transitie voor kwantificatie van de component

q: transitie ter bevestiging (kwalificatie) van de kwantificatietransitie

komponente #	mode		Parent-ion	Daughter-ion		Retentietijd (min)	dwell time (s)	span	coneV	Collision-E	Function <sup>2</sup>	IS
PFBA	ES-	MRM	213	169	Q	3.50	0.150	0.1	14	8	1	<sup>13</sup> C-PFBA
PFPeA	ES-	MRM	263	219	Q	6.67	0.175	0.1	14	8	2	<sup>13</sup> C-PFHxA
PFHxA	ES-	MRM	313	269	Q	9.54	0.150	0.1	14	8	4	<sup>13</sup> C-PFHxA

	ES-	MRM		119	q		0.150	0.1	14	20	4	
PFHpA	ES-	MRM	363	319	Q	11.73	0.150	0.1	17	11	5	<sup>13</sup> C-PFOA
	ES-	MRM		169	q		0.150	0.1	17	20	5	
PFOA	ES-	MRM	413	369	Q	13.43	0.150	0.1	17	11	7	<sup>13</sup> C-PFOA
	ES-	MRM		169	q		0.150	0.1	17	17	7	
PFNA	ES-	MRM	463	419	Q	14.80	0.075	0.1	17	11	9	<sup>13</sup> C-PFNA
	ES-	MRM		169	q		0.075	0.1	17	17	9	
PFDA	ES-	MRM	513	469	Q	15.96	0.100	0.1	17	11	11	<sup>13</sup> C-PFDA
	ES-	MRM		219	q		0.100	0.1	17	20	11	
PFUdA	ES-	MRM	563	519	Q	16.96	0.100	0.1	17	11	12	<sup>13</sup> C-PFUdA
	ES-	MRM		169	q		0.100	0.1	17	23	12	
PFDoA	ES-	MRM	613	569	Q	17.80	0.150	0.1	20	11	14	<sup>13</sup> C-PFDoA
	ES-	MRM		319	q		0.150	0.1	20	20	14	
PFTeDA	ES-	MRM	663	619	Q	18.53	0.175	0.1	17	14	15	<sup>13</sup> C-PFDoA
	ES-	MRM		319	q		0.175	0.1	17	23	15	
PFTeDA	ES-	MRM	713	669	Q	19.15	0.150	0.1	20	14	16	<sup>13</sup> C-PFDoA
	ES-	MRM		319	q		0.150	0.1	20	20	16	
PFHxDA	ES-	MRM	813	769	Q	20.17	0.150	0.1	20	14	17	<sup>13</sup> C-PFDoA
	ES-	MRM		219	q		0.150	0.1	20	32	17	
PFODA	ES-	MRM	913	869	Q	20.96	0.150	0.1	23	17	18	<sup>13</sup> C-PFDoA
	ES-	MRM		219	q		0.150	0.1	23	29	18	
PFBS	ES-	MRM	299	80	Q	7.48	0.150	0.1	44	41	3	<sup>18</sup> O-PFHxS
	ES-	MRM		99	q		0.150	0.1	44	41	3	
PFHxS	ES-	MRM	399	80	Q	12.00	0.150	0.1	47	38	6	<sup>18</sup> O-PFHxS
	ES-	MRM		99	q		0.150	0.1	47	32	6	
PFOS	ES-	MRM	499	80	Q	14.90	0.075	0.1	59	50	8	<sup>13</sup> C-PFOS
	ES-	MRM		99	q		0.075	0.1	59	40	8	
PFDS	ES-	MRM	599	80	Q	16.97	0.100	0.1	65	50	13	<sup>13</sup> C-PFOS
	ES-	MRM		99	q		0.100	0.1	65	50	13	
PFOSA	ES-	MRM	498	78	Q	16.04	0.100	0.1	41	29	10	<sup>13</sup> C-PFOSA
	ES-	MRM		169	q		0.100	0.1	41	32	10	
<sup>13</sup> C-PFBA	ES-	MRM	217	172	IS	3.50	0.150	0.1	14	10	1	
<sup>13</sup> C-PFHxA	ES-	MRM	315	270	IS	9.54	0.150	0.1	14	11	4	
<sup>13</sup> C-PFOA	ES-	MRM	417	372	IS	13.43	0.150	0.1	17	8	7	
<sup>13</sup> C-PFNA	ES-	MRM	468	423	IS	14.80	0.075	0.1	17	11	9	
<sup>13</sup> C-PFDA	ES-	MRM	515	470	IS	15.96	0.100	0.1	17	11	11	
<sup>13</sup> C-PFUdA	ES-	MRM	565	520	IS	16.96	0.100	0.1	17	14	12	
<sup>13</sup> C-PFDoA	ES-	MRM	615	570	IS	17.80	0.150	0.1	20	14	14	
<sup>18</sup> O-PFHxS	ES-	MRM	403	84	IS	12.00	0.150	0.1	47	40	6	
<sup>13</sup> C-PFOS	ES-	MRM	503	80	IS	14.90	0.075	0.1	59	40	8	
<sup>13</sup> C-PFOSA	ES-	MRM	506	78	IS	16.04	0.100	0.1	41	36	10	

Q: ——— transitie voor kwantificatie van de component

q: ——— transitie ter bevestiging (kwalificatie) van de kwantificatietransitie

### 6.2.3 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De per- en polyfluorverbindingen 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 omvat de injectie van minstens 5 standaardoplossingen die de te bepalen fluorverbindingen bevatten in oplopende concentraties en de isotoopgemerkte verbindingen in een constante concentratie. De kalibratievergelijking heeft gewoonlijk een lineair verloop:

$$\frac{A_i}{A_{is}} = a \frac{C_i}{C_{is}} + b$$

met

- $A_i$  = de gemeten piekoppervlakte voor de natieve fluorverbinding i in de standaardoplossing  
 $A_{is}$  = de gemeten piekoppervlakte voor de overeenkomstige interne standaard in de standaardoplossing  
 $C_i$  = de concentratie van de fluorverbinding i in ng/ml in de standaardoplossing  
 $C_{is}$  = de concentratie van de interne standaard i in ng/ml in de standaardoplossing

De verhouding van piekoppervlakten van de natieve PFC PFAS en de overeenkomstige interne standaard wordt voor elke te bepalen PFC PFAS uitgezet ifv van de verhouding van de concentraties van beide verbindingen. De coëfficiënten a (helling of relatieve reponsfactor) en b (afgesneden stuk) worden bepaald door lineaire regressie ~~met inbegrip van het punt (0,0) en~~ met 1/X weging.

De correlatiecoëfficiënt dient > 0.990. Het werkgebied wordt bepaald door de concentraties waarvoor de residuele afwijking tot de rechte < 20%.

De berekening van de kalibratiecurve gebeurt bij elke analysereeks.

*Opmerking:*

Indien het verloop van de kalibratiecurve niet aan de lineariteit voldoet dan kan gebruik gemaakt worden van een kwadratische of andere functie.

### 6.4 KWANTIFICATIE

De concentraties in het monster worden vervolgens berekend als volgt:

$$C_i(\text{monster}) = \left( \frac{\frac{A_i}{A_{is}} - b}{a} \right) * \frac{g_{is}}{V}$$

met

$C_i(\text{monster})$	=	de concentratie van de fluorverbinding $i$ in het monster in ng/l
$A_i$	=	de gemeten piekoppervlakte voor de natieve fluorverbinding $i$ in het monsterextract
$A_{is}$	=	de gemeten piekoppervlakte voor de overeenkomstige interne standaard in het monsterextract
$g_{is}$	=	de aan het monster toegevoegde hoeveelheid interne standaard in ng
$V$	=	het ingenomen volume van het monster in l
$a$ en $b$	=	de coëfficiënten van de kalibratievergelijking

*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.
- Voor een aantal perfluorverbindingen zoals PFOS en **PFOSA PFOA** bestaan de technische mengsels uit zowel lineaire als vertakte isomeren. De standaarden daarentegen zijn zuiver lineaire vormen. Kwantificeer, in afwachting van geschikte standaarden en duidelijke regelgeving/internationale afspraken, zowel de lineaire als de vertakte vormen gebruikmakend van de **MRM-transitie en de** RRF-waarde bekomen voor de lineaire vorm.

## 7 KWALITEITSCONTROLES

### 7.1 CHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING

De kolomkwaliteit wordt geverifieerd aan de hand van de scheiding van het kritische paar PFOS(vertakt)-PFOS(lineair) in het chromatogram van de oplossing met technische PFOS (zie 4.16). Het scheidingspercentage ( $100 \times$  hoogte vallei / hoogte hoogste piek) dient kleiner te zijn dan 30 %.

### 7.2 INSTRUMENTELE DETECTIELIMIET

De instrumentele detectielimiet is een maat voor de gevoeligheid van het apparaat. Aan de hand van het chromatogram van de laagste kalibratie-oplossing wordt voor elke fluorverbinding de kleinste meetbare concentratie bepaald, gedefinieerd als:

$$DL(\text{instr}) = 3 * RG * \text{conc} / PH$$

met

DL(instr)	de instrumentele detectielimiet in ng/ml
RG	de "peak-to-peak" ruishoogte aan de voet van de chromatogrampiek van de fluorverbinding
PH	de piekhoogte van de fluorverbinding
conc	concentratie van de fluorverbinding in de kalibratie-oplossing in ng/ml



De aldus bekomen DL(instr) mogen niet groter zijn dan de minimale waarden noodzakelijk voor het bekomen van de gevraagde rapporteergrenzen.

### 7.3 PROCEDUREBLANCO

Bij elke analysereeks wordt blancowater met de bovenstaande procedure opgewerkt en gemeten. M.b.t. de blancobijdrage worden volgende regels gehanteerd:

- voor monsterwaarden groter dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan 10%
- voor monsterwaarden kleiner dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan de helft van de rapporteergrens.

### 7.4 CONTROLE VAN DE GELDIGHEID VAN DE KALIBRATIEVERGELIJKING

Vlak na de kalibratiestandaarden, op het einde van de meetreeks en om de 12 injecties worden de **twee** QC meetstandaarden geïnjecteerd en de concentraties worden bepaald a.h.v. de kalibratievergelijking. De berekende concentraties worden genoteerd in de respectievelijke controlekaarten van de QC standaarden en moeten binnen de aangegeven grenzen vallen.

### 7.5 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  $^{13}\text{C}$ -gemerkte fluorverbindingen minimaal 30 % en maximaal 200% te bedragen.

### 7.6 CONTROLEMONSTER

In elke analysereeks wordt een controlemonster meegenomen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van blancowater gedopeerd met fluorverbindingen in een concentratie relevant voor het beoogde toepassingsgebied (**bv. 20 ng/l voor drink- en oppervlaktewater en 1000 ng/l voor afvalwater**).

De terugvindingen worden genoteerd op de respectievelijke controlekaart van het controlemonster en dienen gelegen te zijn tussen de controlegrenzen van deze kaarten.

## 8 RAPPORTERING

Voor rapportering worden de gehalten afgerond tot op twee beduidende cijfers.

Vermeld op het verslag ev. vastgestelde afwijkingen.

Streefwaarden voor de rapporteergrenzen zijn 10 ng/l voor drink-, grond- en oppervlaktewater en ~~100~~ 20 ng/l voor afvalwater

## 9 REFERENTIES

~~ISO 25101:2009: Water quality — Determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) — Method for unfiltered samples using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry~~

ISO 21675:2019: Water quality — Determination of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in water — Method using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)