

NA 119-01-03- AA N 2396

NA 119-01-03-02-19 AK N 258

Validierungsdokument

zu

DIN 38407-42

**„Bestimmung ausgewählter polyfluorierter
Verbindungen in Wasser – Verfahren mittels
Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und
massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS)
nach Fest-Flüssig-Extraktion (F42)**

Oktober 2011

Inhalt	Seite
1 Allgemeine Angaben zur Bearbeitung des Verfahrens	5
1.1 Beginn und Ende der Bearbeitung	5
1.2 Obmann und stellvertretender Obmann	5
1.3 Liste der Arbeitskreismitglieder und ständiger Gäste	5
2 Anwendungsbereich	7
2.1 Erfasste Parameter	7
2.2 Arbeitsbereich.....	8
3 Grundlagen des Verfahrens	8
4 Störungen	8
5 Reagenzien und Geräte	11
5.1 Materialien für die Festphasenextraktion	11
5.2 Herstellung von Bezugslösungen	11
5.3 Haltbarkeit von Stamm- und Bezugslösungen	11
5.4 Bezugsquellen für Referenzsubstanzen und Lösungen	12
5.5 HPLC-Säulen und chromatographische Bedingungen	12
5.6 Massenspektrometer	18
6 Probenahme und Probenvorbehandlung	19
6.1 Probenvorbehandlung	19
6.2 Lagerung von Proben	19
7 Durchführung	20
7.1 Festphasenextraktion und Aufarbeitung von Eluaten	20
7.2 Massenspektrometrische Messung	25
8 Ermittlung von Verfahrenskenndaten	27
8.1 Kalibrierverfahren	27
8.2 Kalibriersubstanzen	29
8.3 Kenndaten der Grundkalibrierung und Messbedingungen	30
9 Untersuchungen zur Richtigkeit und Präzision	35
9.1 Vergleichsuntersuchungen	35
9.2 Wiederfindungsraten	36
10 Robustheit	41
10.1 Extraktion	41
10.2 Massenspektrometrische Messung	41
11 Verfahrenskenndaten aus Ringversuchen	42
11.1 Durchführung	42
11.2 Herstellung der Ringversuchsproben	42
11.3 Angaben zur Analytik	43
11.4 Ergebnisse	44
11.5 Graphische Darstellung der Ergebnisse	49
12 Messunsicherheit	74
13 Auswertung	74
14 Literatur	77
15 Anhang	78

Bilder		Seite
Bild 1	PFC in handelsüblichen PTFE-Schläuchen	8
Bild 2	Wiederfindungsraten bei direkter Injektion von dotiertem Trinkwasser bei verschiedenen pH-Werten	9
Bild 3	Verluste durch Adsorption an die Gefäßwand	10
Bild 4	Wiederfindungsraten bei verschiedenen Volumenanteilen an Methanol in der Messlösung	10
Bild 5	Retention von PFBA an verschiedenen HPLC-Phasen	12
Bild 6	Relativer Response bei verschiedenen Eluenten	13
Bild 7	Einfluss verschiedener Eluente auf die Chromatographie	13
Bild 8	Chromatographische Trennung, Beispiel 1	14
Bild 9	Chromatographische Trennung, Beispiel 2	15
Bild 10	Chromatographische Trennung, Beispiel 3	16
Bild 11	Chromatographische Trennung, Beispiel 4	17
Bild 12	Chromatographische Trennung, Beispiel 5	18
Bild 13	Wiederfindungsraten bei Lagerung in Braunglasflaschen	19
Bild 14	Wiederfindungsraten bei Lagerung in pyrolysierten Braunglasflaschen	19
Bild 15	Wiederfindungsraten bei Lagerung in PP-Flaschen	20
Bild 16	Durchbruch von PFBA an verschiedenen Anionenaustauschern	20
Bild 17	Durchbruch von PFC aus dotiertem Abwasser in Gegenwart von Methanol	21
Bild 18	Beispiel für ein MS-Chromatogramm einer Probe mit verzweigten und unverzweigten Carbonsäuren	26
Bild 19	Beispiel für ein MS-Chromatogramm einer Probe mit verzweigten und unverzweigten Sulfonsäuren	26
Bild 20	Stabilität von Kalibrierungen, Beispiel	28
Bild 21	Prüfung auf Ionensuppression	41
Bild 22	Wiederfindungsraten der internen Standardsubstanzen	44
Bild 23	Anzahl von Ausreißerwerten je Labor	47
Bild 24	Anzahl von Ausreißern bei den Analyten	48
Bild 25	Anzahl von Ausreißern bei den Proben	48
Bild 26	Graphiken zu Probe 1 – Standardlösung	49
Bild 27	Graphiken zu Probe 2 – Trinkwasser	54
Bild 28	Graphiken zu Probe 3 – Grundwasser	59
Bild 29	Graphiken zu Probe 4 – Oberflächenwasser	64
Bild 30	Graphiken zu Probe 5 – behandeltes Abwasser	69
Bild 31	Chromatographische Trennung von PFOS-Isomeren	75
Bild 32	Zuordnung verzweigter PFOS-Isomere in Umweltproben, Beispiele	76

Tabellen	Seite	
Tabelle 1	Polyfluorierte Verbindungen, deren Bestimmung nach diesem Verfahren erprobt wurde	7
Tabelle 2	Erprobte Festphasenmaterialien	11
Tabelle 3	Beispiel für Bezugslösungen	11
Tabelle 4	Lieferanten von Referenzsubstanzen und Lösungen	12
Tabelle 5	Wiederfindungsraten von PFC bei verschiedenen Volumina an 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril beim Waschschrift 2	21
Tabelle 6	Wiederfindungsraten von PFC bei verschiedenen Volumina an Methanol beim Waschschrift 3	22
Tabelle 7	Beispiele für Arbeitsbedingungen der Festphasenextraktion	23
Tabelle 8	Massenübergänge der zu bestimmenden Substanzen	25
Tabelle 9	Beispiel für Fragmentierungen	25
Tabelle 10	Massenübergänge interner Standardsubstanzen und Beispiel für Fremdbezug	27
Tabelle 11	Ergebnisse für einen Kontrollstandard mit Anteilen verzweigter Isomere ...	29
Tabelle 12	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 1	30
Tabelle 13	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 2	31
Tabelle 14	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 3	32
Tabelle 15	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 4	33
Tabelle 16	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 5	34
Tabelle 17	Verfahrenskenndaten für die HPLC-MS/MS-Messung – Vergleichsuntersuchung – 1	35
Tabelle 18	Verfahrenskenndaten für die HPLC-MS/MS-Messung – Vergleichsuntersuchung – 2	35
Tabelle 19	Beispiele für Wiederfindungsraten aus Reinstwasser	37
Tabelle 20	Beispiele für Wiederfindungsraten aus Trinkwasser	38
Tabelle 21	Beispiele für Wiederfindungsraten aus Oberflächenwasser	39
Tabelle 22	Beispiele für Wiederfindungsraten aus behandeltem Abwasser (Kläranlagenabläufe)	40
Tabelle 23	Herkunft und Beschaffenheit der Ringversuchsproben	43
Tabelle 24	Sollwerte der Standardlösung und der aufgestockten Proben	43
Tabelle 25	Verfahrenskenndaten für die HPLC-MS/MS-Messung (Probe 1)	45
Tabelle 26	Verfahrenskenndaten für die Matrix Trinkwasser (Probe 2)	46
Tabelle 27	Verfahrenskenndaten für die Matrix Grundwasser (Probe 3)	46
Tabelle 28	Verfahrenskenndaten für die Matrix Oberflächenwasser (Probe 4)	46
Tabelle 29	Verfahrenskenndaten für die Matrix behandeltes Abwasser (Probe 5)	47
Tabelle 30	Erweiterte Messunsicherheit für die Matrix Trinkwasser	74
Tabelle 31	Relativer Anteil verzweigter Isomere, Beispiele	75
Tabelle 32	Fehlerabschätzung zur konventionellen Quantifizierungsmethode	76

1 Allgemeine Angaben zur Bearbeitung des Verfahrens

Das Verfahren DIN 38407-42 wurde erarbeitet im Arbeitskreis 19 des Normenausschusses Wasserwesen I-3 im Unterausschuss 2.

Das Verfahren ergänzt ISO 25101 um weitere perfluorierte, besonders um kurzkettenige Verbindungen und berücksichtigt das Vorkommen verzweigter Isomere bei der Quantifizierung. Ursachen von Störungen wurden aufgedeckt und Maßnahmen für ihre Vermeidung erarbeitet. Dadurch konnte die Genauigkeit des Verfahrens gegenüber ISO 25101 deutlich verbessert werden, was nicht zuletzt durch die Ergebnisse des Ringversuches widerspiegelt wird. Die Norm ist im Mai 2010 erschienen.

1.1 Beginn und Ende der Bearbeitung

Der Arbeitskreis wurde am 01.04.2008 gegründet. Die Normvorlage wurde in 6 Sitzungen erstellt und im März 2010 dem DIN NAW I,3 zur weiteren Veranlassung vorgelegt.

1.2 Obmann und stellvertretender Obmann

Herr Dipl.-Ing. Rolf Reupert Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW Fachbereich 64 Leibnizstraße 10 45659 Recklinghausen	Herr Dr. Dirk Skutlarek Universitätsklinikum Bonn Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit Sigmund-Freud-Str. 25 53105 Bonn
---	--

1.3 Liste der Arbeitskreismitglieder und ständiger Gäste

Herr Dipl.-Ing. Frank Brille Bergisches Wasser- und Umweltlabor der BTV-GmbH Schützenstr. 34 42281 Wuppertal	Frau LMChem. Petra Bröcking Hygiene-Institut des Ruhrgebietes Rotthauer Str. 19 45879 Gelsenkirchen
Herr Christoph Bruhn CURRENTA GmbH & Co. OHG Analytik Q 18 51368 Leverkusen	Herr Dipl.-Ing. H.-J. Dibowski Ruhrverband Chem. + Biol. Laboratorium Kronprinzenstr. 37 45128 Essen
Frau LMChem Heike Drinda Sofia GmbH Rudower Chaussee 29 12489 Berlin	Herr Michael Eißing WESSLING Laboratorien GmbH Oststr. 6 48341 Altenberge
Herr Dipl.-Ing. Stefan Frankenbach SGS Institut Fresenius GmbH Im Maisel 14 65232 Taunusstein Neuhof	Herr Dipl.-Ing. Stephan Fahrmayr Analytik Institut Rietzler GmbH Schnorrstraße 5a 90471 Nürnberg
Herr Rainer Fusenig Forschungsinstitut Hohenheim Prof. Dr. Juergen Mecheels GmbH & Co. KG Schloss Hohenstein 74357 Bönnigheim	Frau Dipl.-Ing. Carmen Hann Institut für Hygiene und Umwelt, HU 42 Marckmannstraße 129 b, Haus 6 20539 Hamburg
Herr Dr. Christian Kabbe Umweltbundesamt (UBA) Schichauweg 58 12307 Berlin	Herr Dr. Frank Th. Lange Technologiezentrum Wasser (TZW) Karlsruhe Abteilung Analytik Karlsruher Str. 84 76139 Karlsruhe

Herr Dr. Dieter Martens Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer Obere Langgasse 40 67346 Speyer	Frau Dr. Katri Mehrländer GBA - Gesellschaft für Bioanalytik Hamburg mbH Brekelbaumstr. 1 31789 Hameln
Herr Dr. Josef Müller Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME) Auf dem Aberg 1 57392 Schmallenberg	Frau Dr. Mirosława Peikert WESSLING Laboratorien GmbH Umweltanalytik Oststr. 6 48341 Altenberge
Herr Malte Petersen Eurofins/GfA-Gesellschaft für Arbeitsplatz- und Umweltanalytik mbH Neuländer Kamp 1 21079 Hamburg	Herr Dr. Christian Piechotta Bundesanstalt für Materialforschung und – prüfung (BAM) Richard-Willstätter-Str. 11 12489 Berlin
Frau Dr. Marlies Raudschus Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW Fachbereich 66 Leibnizstraße 10 45659 Recklinghausen	Frau Dipl.-Ing. Regina Respondek Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW Fachbereich 64 Leibnizstraße 10 45659 Recklinghausen
Herr Dr. Roland Rieger Labor Dr. Blasy – Dr. Busse GmbH Moosstr. 6a 82279 Eching	Herr Dr. Alexander Ruderisch Agrolab Labor GmbH Dr.-Pauling-Str. 3 84079 Bruckberg
Herr Dipl.-Chem. George Sawal Umweltbundesamt (UBA) FG II 2.5 Bismarckplatz 1 14193 Berlin	Herr Dr. Claus Schlett Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH Willy-Brandt-Allee 26 45891 Gelsenkirchen
Herr Dr. Christian Schmidt Campro Scientific GmbH Postfach 360265 10972 Berlin	Frau Dipl.-Ing. Iris Schmidt Labor Dr. Blasy – Dr. Busse GmbH Moosstr. 6a 82279 Eching
Herr Dr. Manfred Sengl Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU) Kaulbachstr. 37 80539 München	Herr Dr. Thorsten Stahl Landesbetrieb Hessisches Landeslabor Glarusstr. 6 65203 Wiesbaden
Herr Dr. Armin Trenkle Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg Neßlerstr. 23-31 76227 Karlsruhe	Frau Dr. Magdalena Ulman Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU) Kaulbachstr. 37 80539 München
Herr Dipl.-Ing. Ronny Wischer Umweltbundesamt (UBA) Schichauweg 58 12307 Berlin	Frau Dipl.-Ing. Anja Wobst IWU – Institut für Wasser- und Umweltanalytik GmbH An der Ohratalsperre 99885 Luisenthal
Herr Dr. Dietmar Wunderlich Umweltbundesamt (UBA) Schichauweg 58 12307 Berlin	

2 Anwendungsbereich

2.1 Erfasste Parameter

Tabelle 1 führt die für das Verfahren ausgewählten Polyfluoralkylverbindungen auf. Hierbei handelt es sich durchweg um perfluorierte Verbindungen.

Tabelle 1 – Polyfluorierte Verbindungen, deren Bestimmung nach diesem Verfahren erprobt wurde

Strukturformel	Substanzname, Abkürzung, Summenformel	Rel. molare Masse (g/mol)	CAS-RN
$F_3C-CF_2-CF_2-COOH$	Perfluorbutansäure PFBA $C_4HF_7O_2$	214,04	375-22-4
$F_3C-(CF_2)_2-CF_2-COOH$	Perfluorpentansäure PFPeA $C_5HF_9O_2$	264,04	2706-90-3
$F_3C-(CF_2)_3-CF_2-COOH$	Perfluorhexansäure PFHxA $C_6HF_{11}O_2$	314,05	307-24-4
$F_3C-(CF_2)_4-CF_2-COOH$	Perfluorheptansäure PFHpA $C_7HF_{13}O_2$	364,06	375-85-9
$F_3C-(CF_2)_5-CF_2-COOH$	Perfluoroctansäure PFOA $C_8HF_{15}O_2$	414,07	335-67-1
$F_3C-(CF_2)_6-CF_2-COOH$	Perfluorononansäure PFNA $C_9HF_{17}O_2$	464,07	375-95-1
$F_3C-(CF_2)_7-CF_2-COOH$	Perfluordecansäure PFDA $C_{10}HF_{19}O_2$	514,08	335-76-2
$F_3C-(CF_2)_2-CF_2-SO_3H$	Perfluorbutansulfonsäure PFBS $C_4HF_9O_3S$	300,09	375-73-5
$F_3C-(CF_2)_4-CF_2-SO_3H$	Perfluorhexansulfonsäure PFHxS $C_6HF_{13}O_3S$	400,11	355-46-4
$F_3C-(CF_2)_6-CF_2-SO_3H$	Perfluoroctansulfonsäure PFOS $C_8HF_{17}O_3S$	500,12	1763-23-1

Bei der technischen Herstellung von Perfluoralkylverbindungen durch elektrolytische Fluorierung von Kohlenwasserstoff-Ausgangsprodukten entstehen Isomerengemische. Neben den unverzweigten Isomeren können deswegen auch häufig verzweigte Isomere, insbesondere bei den Verbindungen PFOA, PFHxS und PFOS, in den zu untersuchenden Proben vorkommen.

Besonders bei PFOS können maßgebliche Anteile verzweigter Isomere in Umweltproben auftreten. Da die verzweigten Isomere chromatographisch nur teilweise voneinander getrennt werden können, legt das in dieser Norm beschriebene Verfahren eine Konvention zur Quantifizierung des Gesamtgehalts aller Isomere des jeweiligen Perfluoralkylsulfonats bzw. Perfluoralkylcarboxylats fest.

Die Anwendbarkeit des Verfahrens auf weitere, in Tabelle 1 nicht genannte Substanzen, wird nicht ausgeschlossen, sie muss jedoch im Einzelfall geprüft werden.

In Verbindung mit der Festphasenextraktion kann das Verfahren grundsätzlich um Stoffe erweitert werden, die eine acide funktionelle Gruppe im Molekül aufweisen, z. B. um die Stoffe Perfluorundecansäure (PFUnA), Perfluordodecansäure (PFDoA), Perfluorheptansulfonsäure (PFHpS), Perfluordecansulfonsäure (PFDS) und 1H,1H,2H,2H-Perfluoroctansulfonsäure (H4PFOS).

Telomeralkohole können dagegen nicht erfasst werden, da sie unter den vorgegebenen Bedingungen der Festphasenextraktion nicht angereichert werden.

2.2 Arbeitsbereich

Das Verfahren ist geeignet zur Bestimmung der in Tabelle 1 genannten PFC in Trink-, Grund- und Oberflächenwasser oberhalb Massenkonzentrationen von 0,01 µg/l und in behandeltem Abwasser ab Massenkonzentrationen oberhalb von 0,025 µg/l.

Die unteren Anwendungsgrenzen orientieren sich an dem gesundheitlichen Vorsorgewert (GOW) bzw. bei Abwasser an dem in einigen Bundesländern festgelegten Orientierungswert.

Die Anwendbarkeit des Verfahrens auf andere Wasserarten, z. B. unbehandeltes Abwasser, wird nicht ausgeschlossen, sie muss jedoch im Einzelfall geprüft werden.

3 Grundlagen des Verfahrens

Die Substanzen werden durch Festphasenextraktion an einem schwachen Anionenaustauscher auf Polymerbasis aus der unfiltrierten Wasserprobe angereichert. Die Festphasen werden mit Wasser und Lösemittel gewaschen und die adsorbierten Substanzen anschließend mit ammoniakhaltigem Methanol eluiert. Die Bestätigung und quantitative Bestimmung erfolgt durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS).

ANMERKUNG Verfahren mit direkter Injektion dürfen angewendet werden, wenn die Gleichwertigkeit zu dem genormten Verfahren nachgewiesen und dokumentiert wurde. Untersuchungen im Arbeitskreis haben gezeigt, dass bei Injektion rein wässriger Messlösungen hohe Verluste, insbesondere bei den Stoffen PFOS, PFNA und PFDA auftreten können.

4 Störungen

Störungen des Verfahrens können durch den Kontakt der Probe mit polytetrafluorethenhaltigen Materialien (PTFE = Polytetrafluorethen) verursacht werden. Vorzugsweise sind deshalb Materialien aus Glas, Stahl, PEEK (Polyetheretherketon), Polypropylen oder Polyethylen zu verwenden.

Bei HPLC-Geräten werden häufig Materialien aus PTFE verwendet, die zu Blindwerten bei den Perfluoralkylcarboxylaten, insbesondere bei PFOA, führen können (Bild 1). Diese Störungen treten besonders bei ungebrauchten Materialien auf. Typische Kontaminationsquellen sind z. B. Vakuumentgaser, Fritten und Schläuche sowie Pumpenkopfdichtungen.

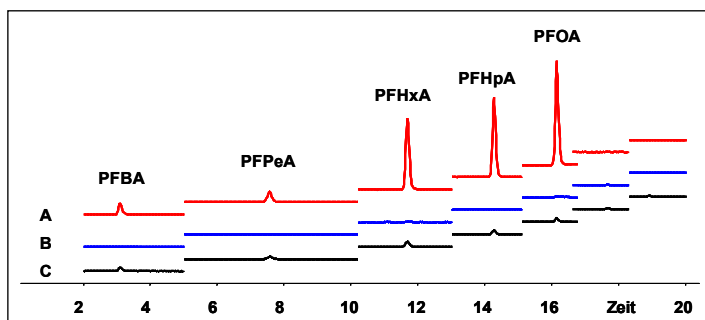


Bild 1 – PFC in handelsüblichen PTFE-Schläuchen

PTFE-Schlauch 160 mm x 3 mm x 1,5 mm (L x AD x ID),
extrahiert mit Methanol (1 ml),
Intensitäten normalisiert

A: übliche Qualität (ungebraucht)
B: hochreine Qualität

C: PFC-Standardlösung, $\rho_i = 0,25 \text{ ng/ml}$

Treten solche Störungen auf, kann z. B. die Entgasung der Eluenten durch die Verwendung von Helium anstelle von Vakuumentgasern erfolgen. Fritten und Schläuche aus PTFE sind durch solche aus Edelstahl oder PEEK zu ersetzen.

Pumpenkopfdichtungen können PTFE enthalten. Sie können über die gesamte Nutzungszeit Perfluoralkylcarboxylate abgeben, die am Kopf der Trennsäule angereichert und mit dem Lösemittelgradienten eluiert werden. Soweit verfügbar sind bei Auftreten dieser Störungen Pumpenkopfdichtungen aus Polyethylen zu verwenden.

Blindwerte aus dem HPLC-System können auch durch Verwendung von Adsorptionssäulen reduziert bzw. vermieden werden. Die Adsorptionssäulen sind vor dem Injektor in den Flussweg einzubauen, wodurch die Kontaminanten gegenüber den Analyten verzögert werden. Die Adsorptionssäulen sind so auszulegen, dass die Kontaminanten von den Analyten chromatographisch vollständig getrennt werden. Spezielle Adsorptionssäulen für die PFC-Analytik werden von einigen Geräteherstellern angeboten.

Weitere Störungen können bei den Stoffen PFNA, PFDA und PFOS auftreten, die sich durch geringere Wiederfindungsraten der Analyten bzw. der internen Standardsubstanzen zeigen. Die Ursachen für diese Störungen, die nicht in allen Laboratorien auftraten, konnten nicht vollständig geklärt werden. Festgestellt wurde, dass bei direkter Injektion von dotiertem Trinkwasser vergleichbare Störungen auftreten und das Ausmaß der Minderbefunde bei den vorgenannten Stoffen vom pH-Wert und der Beschaffenheit der Proben abhängig ist. Bei Reinstwasser waren die Minderbefunde geringer als bei Trinkwasser und diese geringer als bei Oberflächenwasser, wobei die Minderbefunde unter sauren Bedingungen jeweils am höchsten ausfielen (Bild 2). Teilweise konnten PFOS und PFDA bei direkter Injektion nicht mehr nachgewiesen werden.

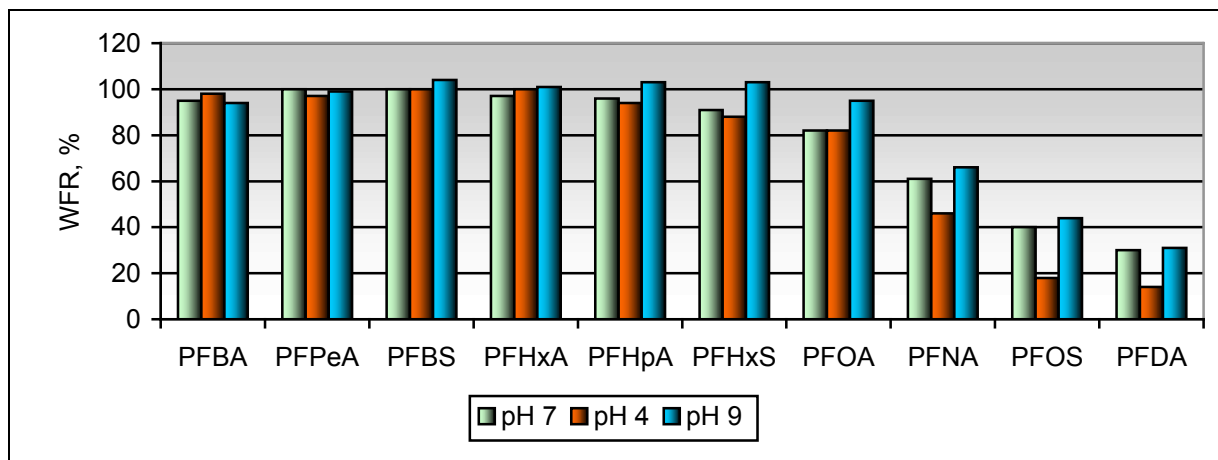


Bild 2 – Wiederfindungsraten bei direkter Injektion von dotiertem Trinkwasser bei verschiedenen pH-Werten

Aufstockung $\rho = 1 \mu\text{g/l}$, alle Ansätze in PP-Gefäßen, keine Lagerung

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Verfahren der direkten Injektion von Wasserproben im Arbeitskreis nicht weiter verfolgt.

Die Minderbefunde konnten zum Teil auf Verluste der Stoffe durch Adsorption an die Gefäßwand zurückgeführt werden. Bild 3 zeigt Wiederfindungsraten nach direkter Injektion von aufgestocktem Trinkwasser nach einwöchiger Lagerung bei etwa 5 °C in einem 50-ml-PP-Gefäß. Durch Ausspülen des entleerten Gefäßes mit 5 ml Methanol und Aufarbeitung der Waschlösung konnten bei PFDA bis zu 16 %, bei PFOS bis zu 10 % und bei PFNA bis zu 5 % der Aufstockung wiedergefunden werden. Weitere Ausspülungen mit Methanol ergaben

keine nennenswerten Befunde mehr. Untersuchungen mit Glasgefäßen führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

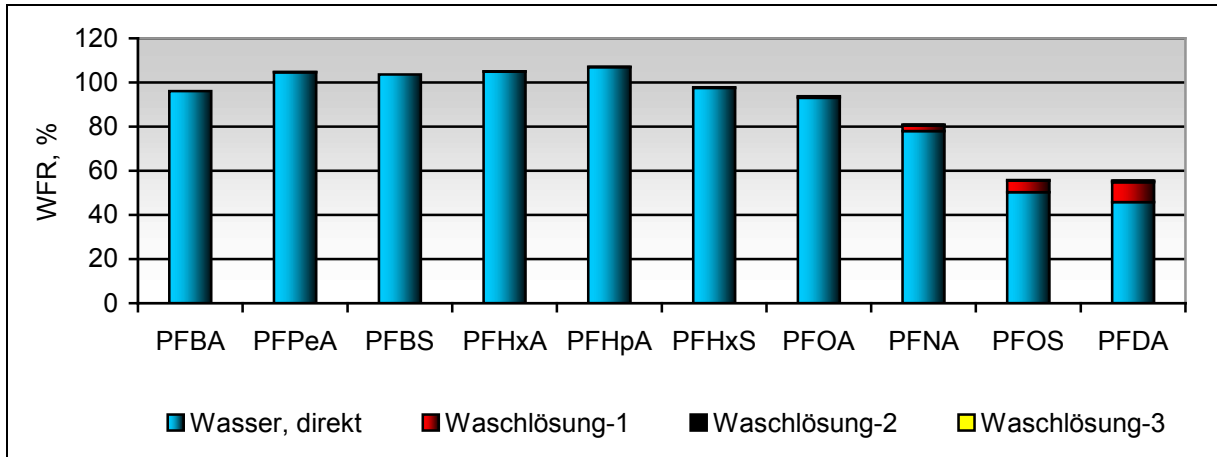


Bild 3 – Verluste durch Adsorption an die Gefäßwand

Die Verluste durch Adsorption an die Wand des Probenahmegefäßes erklären die beobachteten Minderbefunde jedoch nur zu einem relativ geringen Teil. Sie stehen nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Stabilitätsuntersuchungen und können weitgehend vermieden werden, wenn der Probe ein Volumenanteil von 5 % Methanol zugesetzt wird. Die Extraktion wird hierdurch nicht beeinträchtigt (Abschnitt 7.1).

Einen weitaus größeren Einfluss auf die Wiederfindungsraten der Stoffe PFNA, PFOS und PFDA hat der Volumenanteil an Methanol in der Lösung, die zur Aufnahme des trockenen Rückstands verwendet wird (Messlösung). Untersuchungen zur Folge muss der Volumenanteil an Methanol in der Messlösung mindestens 40 % betragen, um Minderbefunde bei den vorgenannten Stoffen zu vermeiden (Bild 4). Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei ebenfalls um Adsorptionseffekte handelt.

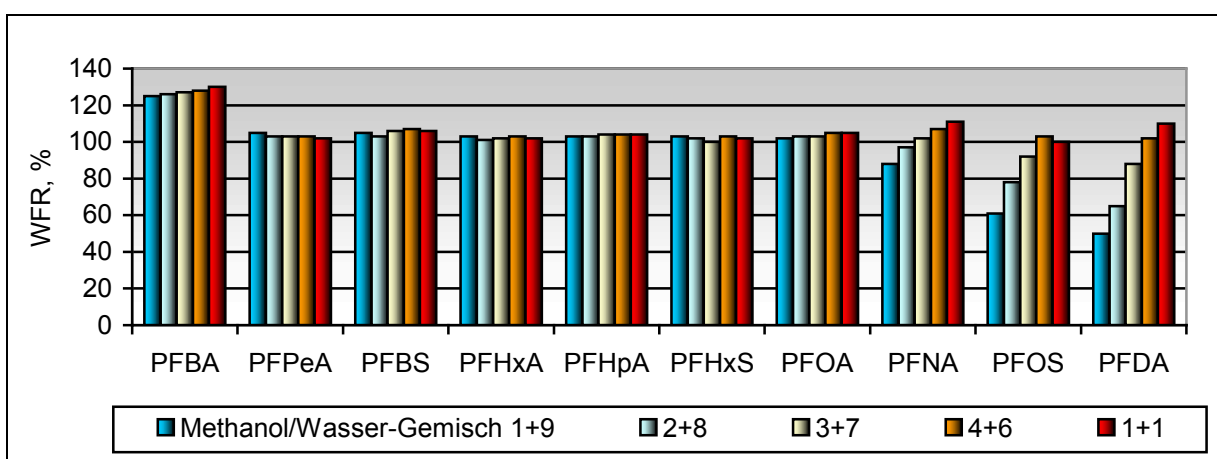


Bild 4 – Wiederfindungsraten bei verschiedenen Volumenanteilen an Methanol in der Messlösung

5 Reagenzien und Geräte

5.1 Materialien für die Festphasenextraktion

Für die Extraktion wurden ausschließlich schwache Anionenaustauscher auf Polymerbasis erprobt (Tabelle 2). Die bifunktionellen Wechselwirkungen dieser Materialien ermöglichen eine selektivere Anreicherung und Isolierung der Analyten als vergleichsweise nicht modifizierte Polymerphasen.

Tabelle 2 – Erprobte Festphasenmaterialien

Bezeichnung	Firma	Material, funktionelle Gruppe	$A_{\text{spez.}}$ m^2/g	V_p \AA	d_p μm	K_A meg/g
Strata-X-AW	Phenomenex	DVB, propylethylamin	800	85	33	0,6
Oasis WAX	Waters	N-Vinylpyrrolidone-DVB, - methylenpiperazine	830	80	30	0,6
Chromabond HR-XAW	Macherey- Nagel	DVB, aminoethylamin	900	60	45	0,6
			900	60	85	0,6

$A_{\text{spez.}}$: Spezifische Oberfläche; V_p Porengröße; d_p Partikeldurchmesser; K_A Ionenaustauscher-Kapazität

Die Materialien sind in Standard- und Widemouth-Kartuschen im Handel erhältlich.

5.2 Herstellung von Bezugslösungen

Tabelle 3 gibt ein Beispiel für die Herstellung von Bezugslösungen für eine Kalibrierung mit internem Standard über 8 Konzentrationsniveaus.

Tabelle 3 – Beispiel für Bezugslösungen

Bezugslösung $V = 10 \text{ ml}$		Stammlösung Referenzsubstanz $\rho_i = 0,5 \mu\text{g/ml}$	Stammlösung Interne Standardsubstanzen $\rho_i = 1 \mu\text{g/ml}$	Dotierlösung $\rho_i = 0,1 \mu\text{g/ml}$	$\rho_{iP}^{1)}$ $\mu\text{g/l}$	$\rho_{iP}^{1)}$ $\mu\text{g/l}$
ρ_i ng/ml	ρ_{iI} ng/ml	$\mu\text{l-Zugabe}$	$\mu\text{l-Zugabe}$	$\mu\text{l-Zugabe}$		
0,5	10	10	100	100	0,20	0,01
1	10	20	100	100	0,20	0,02
2,5	10	50	100	100	0,20	0,05
5	10	100	100	100	0,20	0,10
10	10	200	100	100	0,20	0,20
15	10	300	100	100	0,20	0,30
20	10	400	100	100	0,20	0,40
25	10	500	100	100	0,20	0,50

¹⁾ Massenkonzentrationen bei $V_P = 50 \text{ ml}$ und $V_M = 1 \text{ ml}$

5.3 Haltbarkeit von Stamm- und Bezugslösungen

Die Haltbarkeit der PFC-Standards in Lösung beträgt bei sachgemäßer Lagerung der ungeöffneten Ampullen laut Herstellerangaben mindestens zwei Jahre. Diese Aussage ist das Ergebnis von fortlaufenden Stabilitätsstudien des Herstellers für jeden einzelnen Standard in Form von kontinuierlichen GC/MS- und/oder LC/MS-Messungen von frisch hergestellten sowie von schon älteren Standardlösungen. In methanolhaltigen Lösungen kann eine Veresterung der PFC zu den Methylestern stattfinden. Zur Unterdrückung dieser Reaktion wird den Standardlösungen 1 mol equivalent Natriumhydroxid hinzugefügt.

5.4 Bezugsquellen für Referenzsubstanzen und Lösungen

Substanzen der Tabelle 1 werden als Reinsubstanzen, sowie als Lösungen und in Mischungen im Handel angeboten. Isotopenmarkierte interne Standardsubstanzen werden zurzeit ausschließlich in Lösungen angeboten.

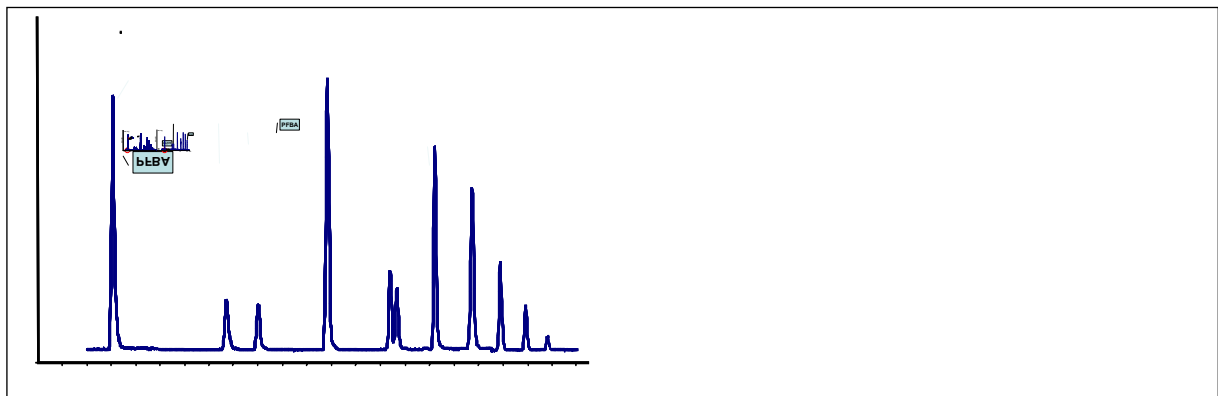
In Tabelle 4 sind einige Lieferanten für Referenzsubstanzen und Lösungen angegeben.

Tabelle 4 – Lieferanten von Referenzsubstanzen und Lösungen

Produkte	Lieferanten
Referenzsubstanzen, Gebinde von 5 ml – 5 g, Gehalt 97 – 99 %	1
Lösungen der Referenzsubstanzen (unverzweigt) in Methanol, z. B. $\rho_i = 50 \mu\text{g/ml}$	2, teilw. 3, 4, 5, 6
Mischungen von PFC in Methanol (Stammlösung), z. B. $\rho_i = 5 \mu\text{g/ml}$	2, 3, 5, 6
Isotopenmarkierte Standardsubstanzen, Lösungen in Methanol, z. B. $\rho_i = 50 \mu\text{g/ml}$	2, 3, 5
1 – Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstraße 5, 82024 Taufkirchen bei München 2 – Wellington Laboratories, Ontario, Canada 3 – Chiron AS, Trondheim, Norway 4 – LGC Standards GmbH, Mercatorstraße 51, 46485 Wesel 5 – Campro Scientific GmbH, Darser Str. 2A, 14167 Berlin 6 – Neochemia, Am Kümmerling 37a, Bodenheim / Mainz, Germany	

5.5 HPLC-Säulen und chromatographische Bedingungen

Zu bevorzugen sind HPLC-Säulen mit polar modifizierten RP-Materialien. Die zusätzlichen polaren Wechselwirkungen dieser Phasen ergeben meist höhere Retentionszeiten für PFBA. Hierdurch kann der Volumenanteil an Methanol bei den Anfangsbedingungen der Gradientenelution höher gewählt werden als bei klassischen hydrophoben RP-Phasen (Bild 5). Entsprechend höher kann auch der Volumenanteil an Methanol in der Messlösung sein, ohne dass zusätzliche Peakverbreiterung auftritt. Hierdurch können Störungen durch Adsorption verringert werden.



Zorbax Eclipse XDB-C18, 3,5 μm , 100 x 2 mm	Synergi Fusion-RP, 2,5 μm , 100 x 2 mm
--	---

Bild 5 – Retention von PFBA an verschiedenen HPLC-Phasen

Bei beiden Säulen gleiche chromatographische Bedingungen:
 Eluent A: 5 mmol Ammoniumacetat in Wasser // Eluent B: 0,05 % Essigsäure in Methanol
 Gradient: 35 % B nach 95 % B in 20 min, linear

Eine vollständige Trennung der Substanzen ist nicht unbedingt notwendig, da sich die Massenübergänge ausreichend voneinander unterscheiden. In der Praxis werden die Verbindungen trotzdem meistens weitgehend voneinander getrennt, was ohne zusätzlichen Aufwand möglich ist. Schwieriger ist nur die Trennung zwischen PFNA und PFOS.

Die höchsten Responsewerte werden unter sauren Bedingungen, z.B. mit Essigsäure erhalten (Bild 6). Dieser Vorteil ist jedoch häufig nicht nutzbar, da durch zusätzliche Peakverbreiterung die gewonnene Empfindlichkeit verloren geht (Bild 7).

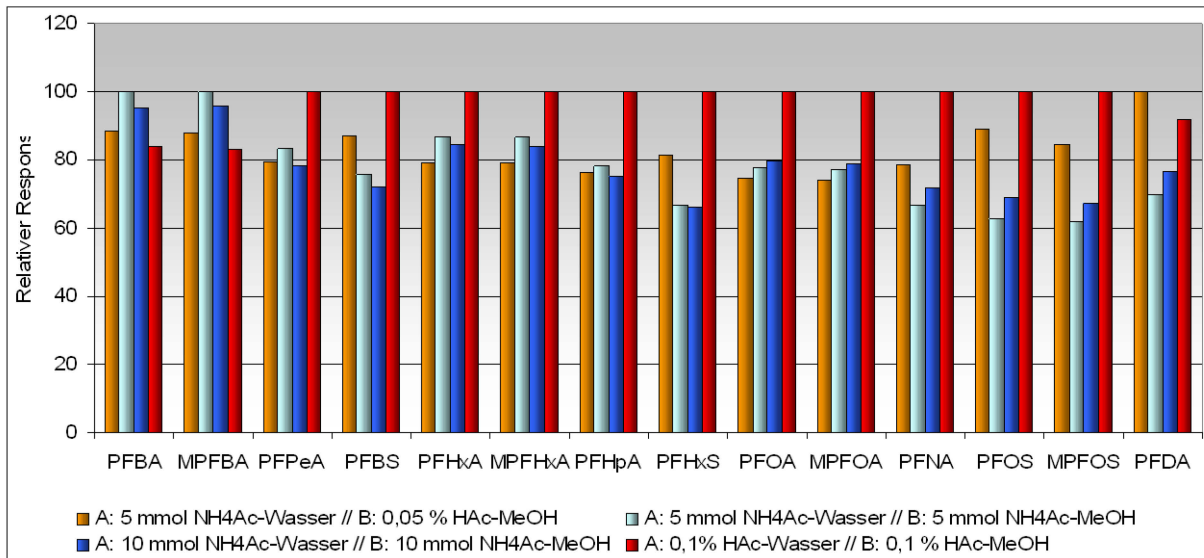


Bild 6 – Relativer Response bei verschiedenen Eluenten

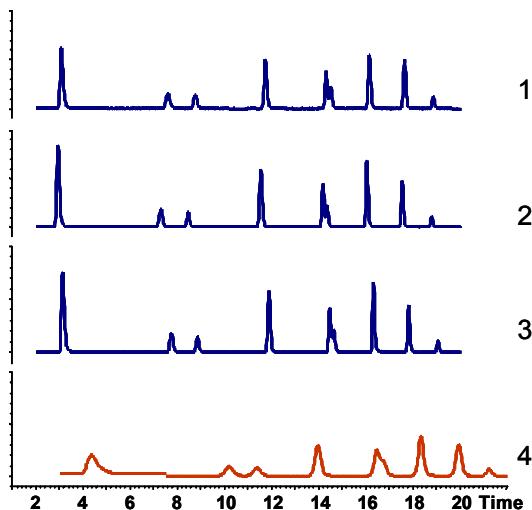


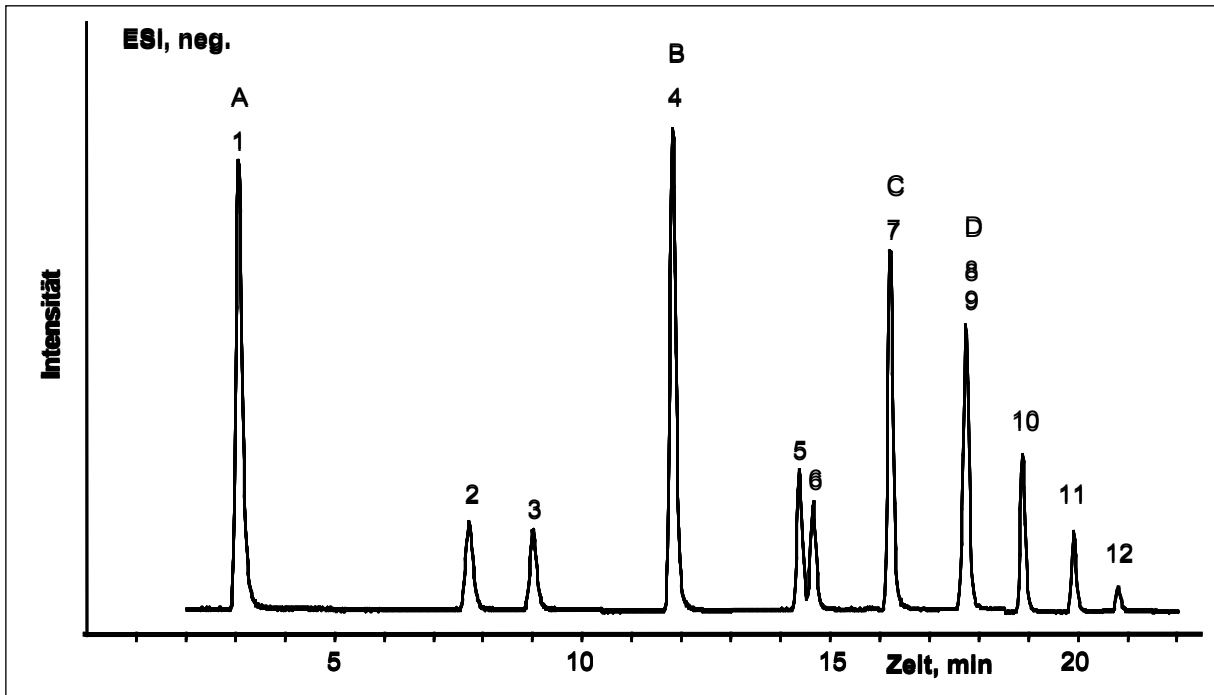
Bild 7 – Einfluss verschiedener Eluente auf die Chromatographie

- 1) A: 5 mmol NH₄Ac-Wasser // B: 0,05 % HAC-MeOH
- 2) A: 5 mmol NH₄Ac-Wasser // B: 5 mmol NH₄Ac-MeOH
- 3) A: 10 mmol NH₄Ac-Wasser // B: 10 mmol NH₄Ac-MeOH
- 4) A: 0,1 % HAC-Wasser // B: 0,1 % HAC-MeOH

Bei allen Eluenten, Gradient: 35 % B nach 95 % B in 20 min, linear

Üblicherweise werden mit Wasser und Methanol in Gegenwart von Ammoniumacetat und gegebenenfalls Essigsäure optimale Bedingungen für Chromatographie und Detektion erhalten. Ein Einfluss der Pufferkonzentration auf eine mögliche Ionensuppression konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Die Bilder 8 – 12 geben Beispiele für Bedingungen zur chromatographischen Trennung.

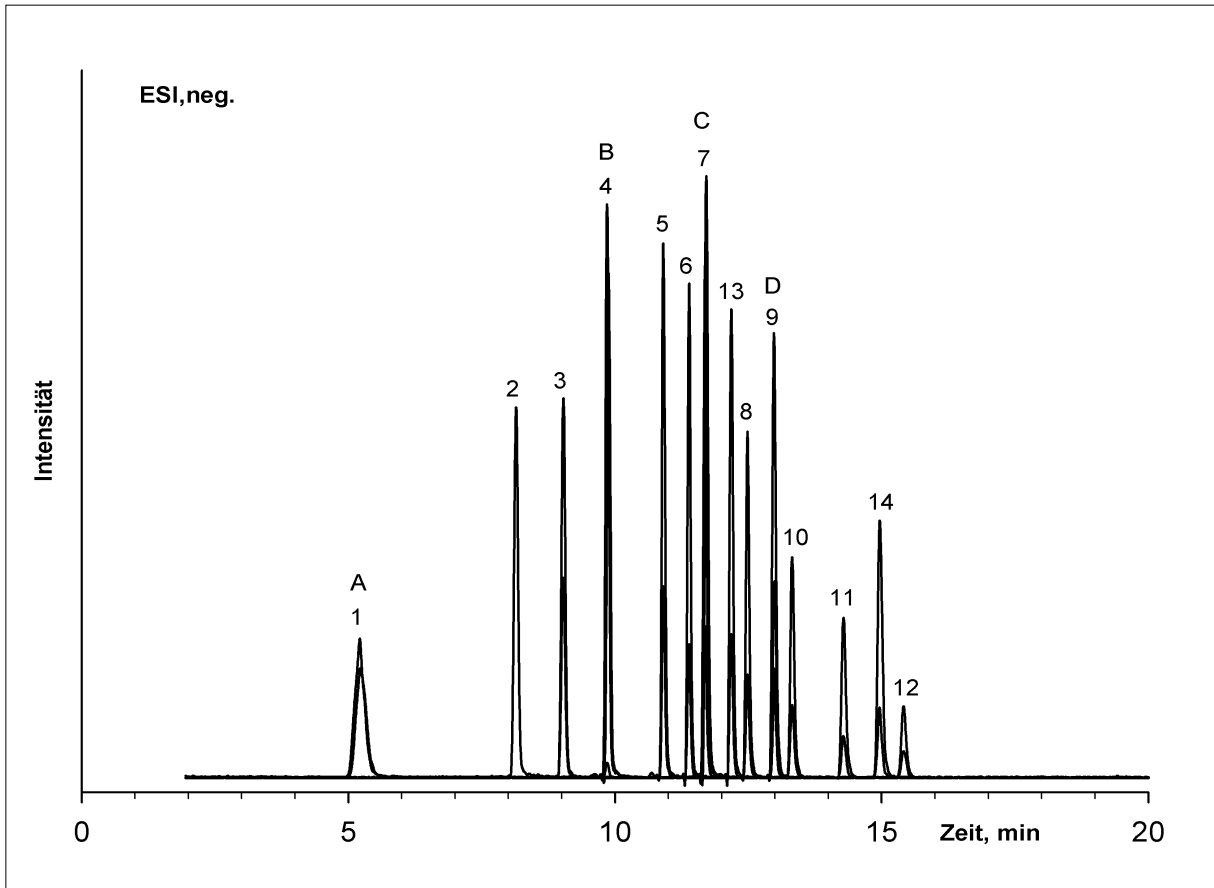


Trennsäule: Zorbax Eclipse XDB-C18, 3,5 μm , 100 mm x 2 mm, mit Vorsäule Synergi Fusion-RP, 4 μm , 4 mm x 2 mm
 Injektion: 20 μl PFC-Standard, $\rho_i = 1 \text{ ng/ml}$
 Mobile Phase: A: 5 mmol Ammoniumacetat in Wasser
 B: 0,05 % Essigsäure in Methanol
 Gradient: 35 % B nach 95 % B in 20 min, linear
 Durchfluss: 0,25 ml/min
 Säulentemperatur: 40 °C
 Druck: 115 bar bei Anfangsbedingungen

Peak-Nummer:

1 PFBA, 2 PFPeA, 3 PFBS, 4 PFHxA, 5 PFHpA, 6 PFHxS, 7 PFOA, 8 PFNA, 9 PFOS, 10 PFDA
 A $^{13}\text{C}_4$ PFBA, B $^{13}\text{C}_2$ PFHxA, C $^{13}\text{C}_4$ PFOA, D $^{13}\text{C}_4$ PFOS
 Zusätzlich im Chromatogramm: 11 Perfluorundecansäure (PFUnA), 12 Perfluordodecansäure (PFDoA)

Bild 8 – Chromatographische Trennung, Beispiel 1

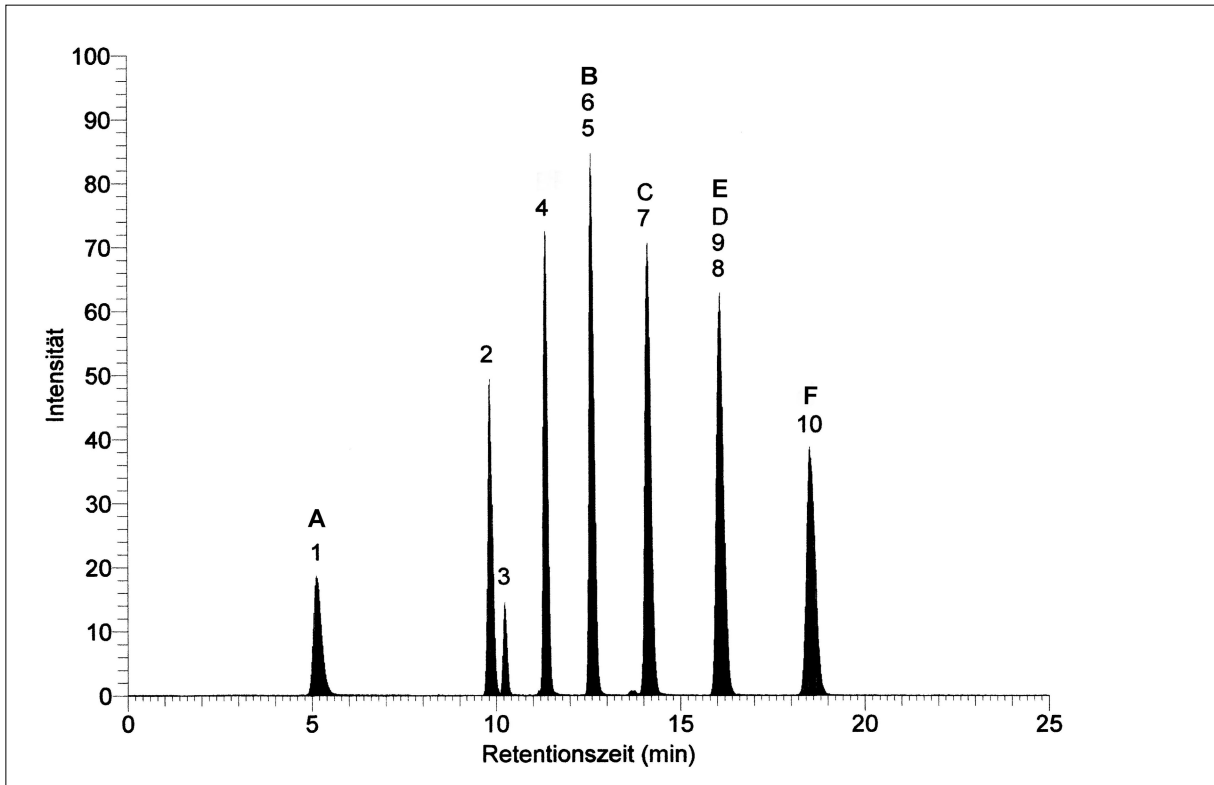


Trennsäule: Nucleodur C₁₈ Pyramid, 3 µm, 125 mm x 2 mm, mit Vorsäule Synergi Max-RP, 4 µm, 4 mm x 2 mm
 Injektion: 10 µl PFC-Standard, $\rho_i = 10$ ng/ml
 Mobile Phase: A: 10 mmol Ammoniumacetat in Wasser-Methanol 75:25
 B: 10 mmol Ammoniumacetat in Acetonitril-Methanol 75:25
 Gradient: 0 % B nach 30 % B in 5 min, linear
 30 % B nach 55 % B in 8 min, linear
 55 % B nach 80 % B in 19 min, linear
 Durchfluss: 0,3 ml/min
 Säulentemperatur: 50 °C
 Druck: 175 bar, bei Anfangsbedingungen

Peak-Nummer:

Siehe Bild 8, zusätzlich im Chromatogramm 13 Perfluorheptansulfonsäure (PFHpS), 14 Perfluordecansulfonsäure (PFDS)

Bild 9 – Chromatographische Trennung, Beispiel 2



Trennsäule: Synergi Fusion-RP, 4 μm , 100 mm x 2 mm,
mit Vorsäule Synergi Fusion, 4 μm , 4 mm x 2 mm

Injektion: 20 μl PFC-Standard, $\rho_i = 100 \text{ ng/ml}$

Mobile Phase: A: 2 mmol Ammoniumacetat, 0,1 % Essigsäure in Methanol,
B: 2 mmol Ammoniumacetat, 0,1 % Essigsäure in Wasser/Methanol (90/10)

Gradient: 0 min 25 % A
4 min 25 % A
7 min 60 % A
20 min 70 % A
20,5 min 30 % A
25 min 30 % A

Durchfluss: 0,2 ml/min

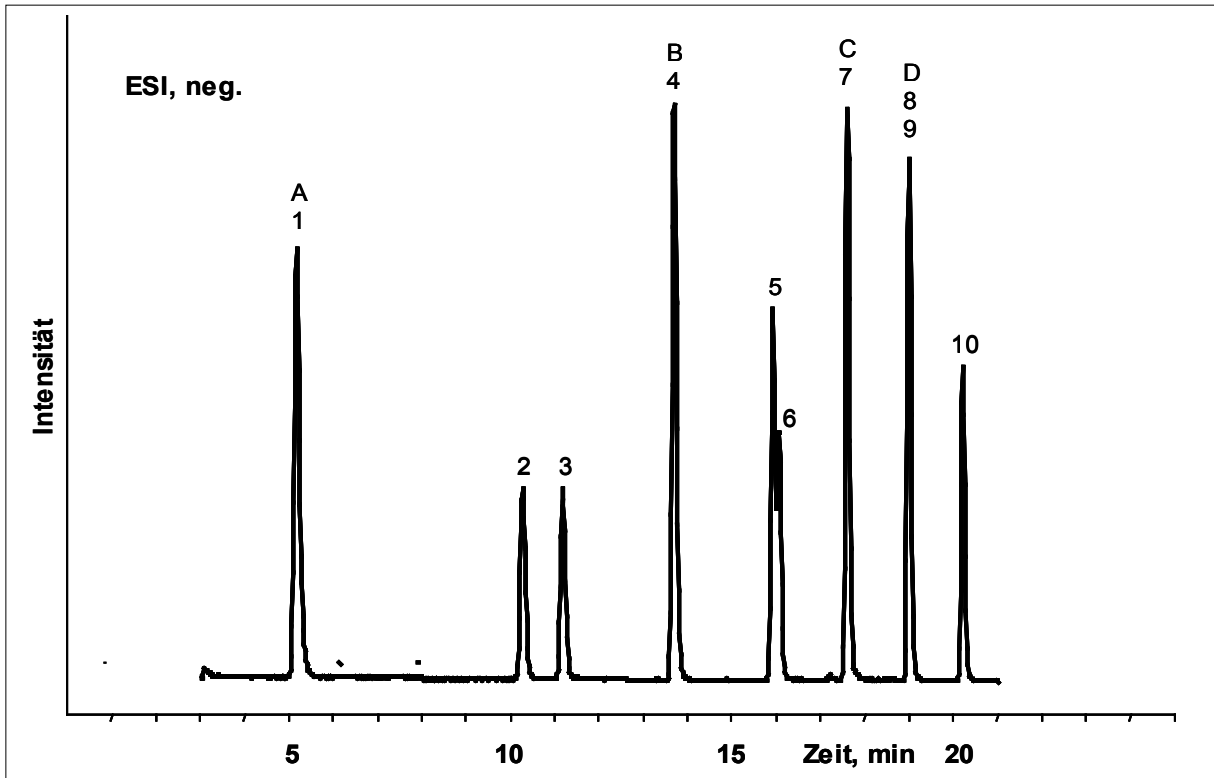
Säulentemperatur: 50 °C

Druck: 55 bar bei Anfangsbedingungen

Peak-Nummer:

Siehe Bild 8, zusätzlich im Chromatogramm E $^{13}\text{C}_5$ PFNA, F $^{13}\text{C}_2$ PFDA

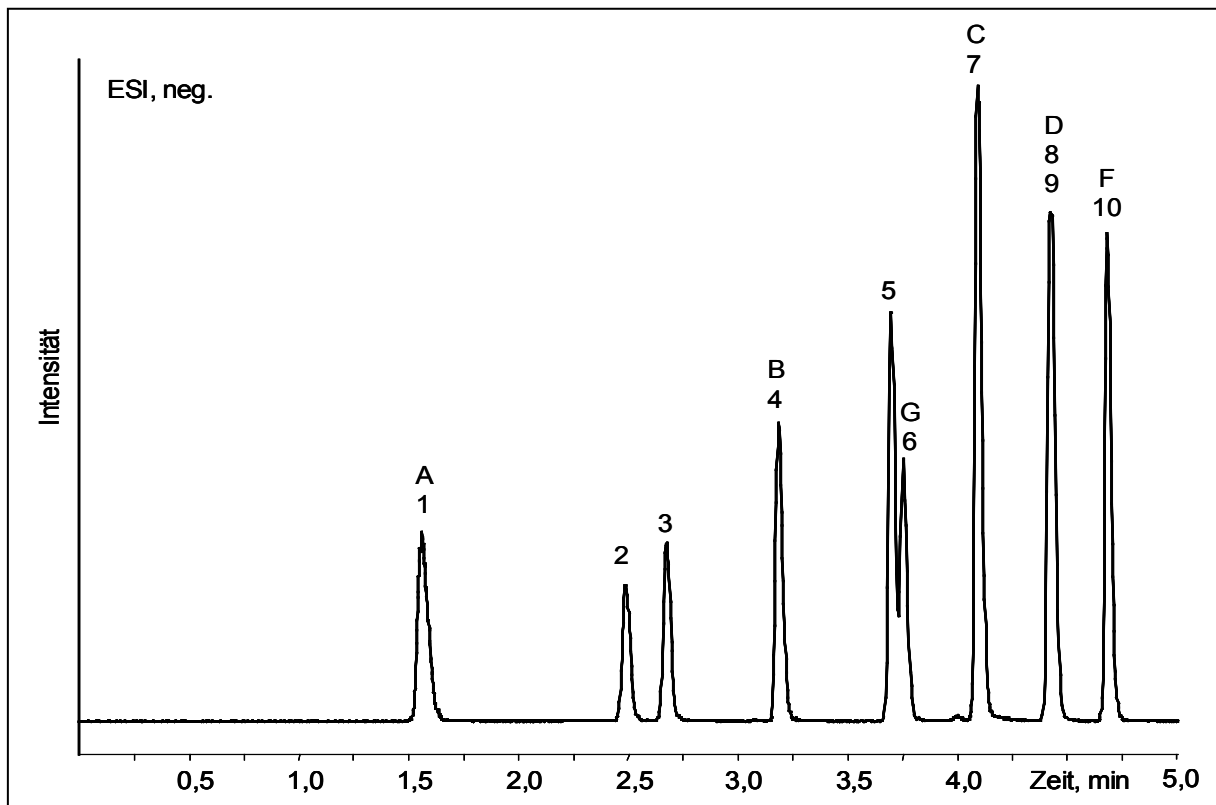
Bild 10 – Chromatographische Trennung, Beispiel 3



Trennsäule: Synergi Fusion-RP, 2,5 μm , 100 mm x 2 mm,
mit Vorsäule Synergi Fusion-RP, 4 μm , 4 mm x 2 mm
Injektion: 20 μl PFC-Standard, $\rho_i = 1 \text{ ng/ml}$
Mobile Phase: A: 5 mmol Ammoniumacetat in Wasser
B: 0,05 % Essigsäure in Methanol
Gradient: 35 % B nach 95 % B in 20 min, linear
Durchfluss: 0,25 ml/min
Säulentemperatur: 40 °C
Druck: 202 bar bei Anfangsbedingungen

Peak-Nummer:
Siehe Bild 8

Bild 11 – Chromatographische Trennung, Beispiel 4



Trennsäule: Aquity UPLC-BEH-Shield RP18, 1,7 μm , 100 mm x 2,1 mm
 Injektion: 20 μl PFC-Standard, $\rho_i = 10 \text{ ng/ml}$
 Mobile Phase: A: 2 mmol Ammoniumacetat in Wasser
 B: 2 mmol Ammoniumacetat in Methanol
 Gradient: 0 - 0,5 min 30 % B
 0,5 - 5 min 30 % B nach 90 % B, linear
 Durchfluss: 0,5 ml/min
 Säulentemperatur: 50 $^{\circ}\text{C}$
 Druck: 720 bar bei Anfangsbedingungen

Peak-Nummer:

Siehe Bild 8, zusätzlich im Chromatogramm F $^{13}\text{C}_2$ PFDA, G $^{18}\text{O}_2$ PFHxS

Bild 12 – Chromatographische Trennung, Beispiel 5

5.6 Massenspektrometer

Bei der Validierung des Analysenverfahrens kamen folgende Massenspektrometer zum Einsatz:

API 2000, 3000, 3200 QTrap, 4000, 4000 QTrap; Firma AB SCIEX Germany GmbH
 Quattro Micro, TQD, XEVO TQ; Firma Waters GmbH
 Agilent 6410, Varian 1200L; Firma Agilent Technologies Deutschland GmbH
 Quantum Access, Quantum Ultra TSQ; Firma Thermo Fisher Scientific
 Ionics EP10+; Firma Ionics Mass Spectrometry Group, Canada

6 Probenahme und Probenvorbereitung

Für die Probenahme sind Flaschen aus Glas oder aus Polypropylen geeignet (siehe 6.2).

6.1 Probenvorbehandlung

Entgegen ISO 25101 wird der Probe kein Natriumthiosulfat zugesetzt. Im Rahmen der Validierung des Analysenverfahrens waren keine Verluste auffallend, die auf Oxidation der Analyten hingewiesen hätten.

Die Proben werden unfiltriert untersucht. Der pH-Wert sollte im Bereich von 6 - 8 liegen und ist gegebenenfalls einzustellen.

6.2 Lagerung von Proben

Die Stabilität von Proben bei der Lagerung im Kühlschrank bei etwa 4 °C wurde mit demineralisiertem Wasser und Trinkwasser auf den Konzentrationsniveaus von 50 ng/l untersucht.

Die Bilder 13 - 15 zeigen, dass bei Lagerung in Braunglasflaschen (Volumen 1000 ml), in pyrolysierten Braunglasflaschen (Volumen 1000 ml) und in PP-Flaschen (Volumen 250 ml) über einen Zeitraum von 14 Tagen keine signifikanten Verluste bei den Analyten auftreten. Die nach 14-tägiger Lagerung etwas geringeren Wiederfindungsraten für PFDA dürften der Adsorption an der Gefäßwand zuzuschreiben sein. Unabhängig von dem Probengefäß fielen die Verluste bei Trinkwasser dabei etwas höher aus als bei demineralisiertem Wasser.

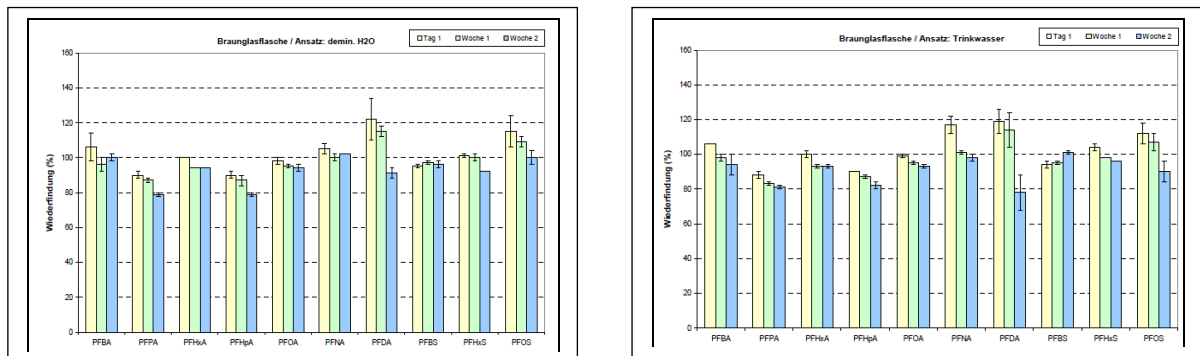


Bild 13 – Wiederfindungsraten bei Lagerung in Braunglasflaschen

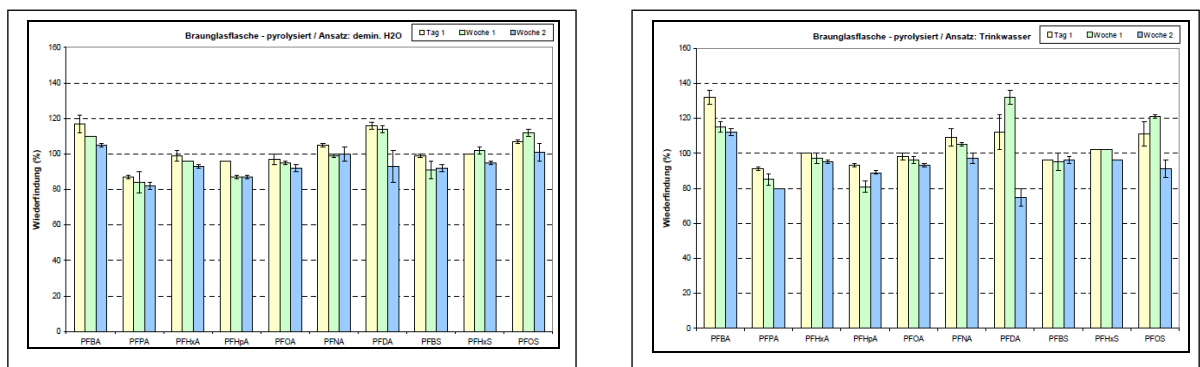


Bild 14 – Wiederfindungsraten bei Lagerung in pyrolysierten Braunglasflaschen

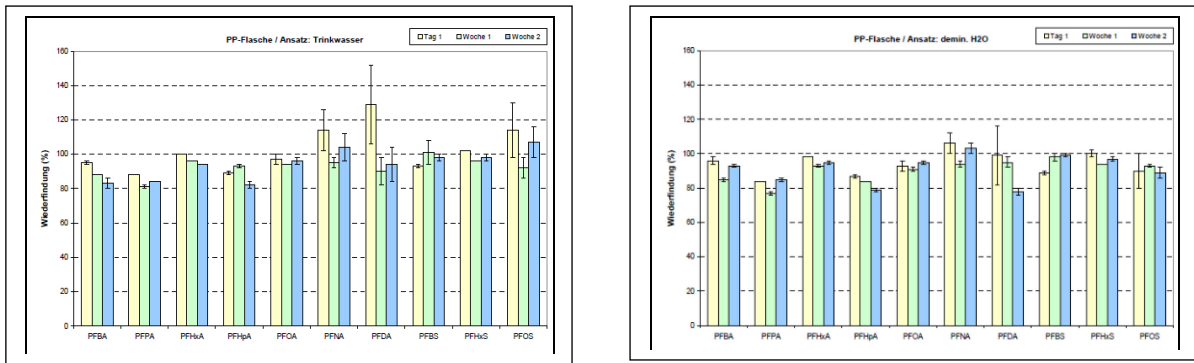


Bild 15 – Wiederfindungsraten bei Lagerung in PP-Flaschen

Vergleichbare Ergebnisse wurden von einem zweiten Labor bei Lagerung dotierter Proben ($\rho = 100 \text{ ng/l}$) über einen Zeitraum von 4 Wochen erhalten.

7 Durchführung

7.1 Festphasenextraktion und Aufarbeitung von Eluaten

Für die Festphasenextraktion wird die Verwendung eines schwachen Anionenaustauschers vorgeschrieben. Dabei ist die Durchführung der Extraktion weitestgehend festgelegt.

Die zur Anreicherung erforderliche Masse des Festphasenmaterials wurde in Durchbruchversuchen mit dotiertem Abwasser ermittelt. Erwartungsgemäß bricht PFBA als erste Substanz durch. Bild 16 zeigt den Durchbruchverlauf an zwei verschiedenen Phasen.

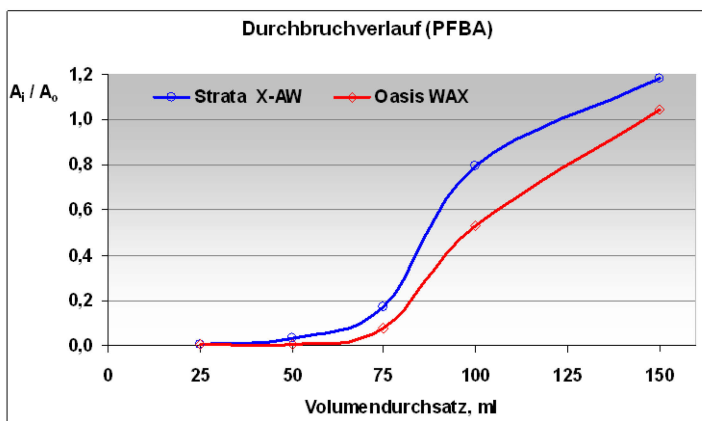


Bild 16 – Durchbruch von PFBA an verschiedenen Anionenaustauschern

Probe: Abwasser, aufgestockt mit den Analyten mit $5 \mu\text{g/l}$
 Sorbensmassen: jeweils 60 mg, 3-ml-Kartuschen
 Konditionierung: 2 ml 0,1 % NH_3 in Methanol, 2 ml Methanol, 2 ml Wasser

A_i Peakfläche von PFBA im Ablauf
 A_0 Peakfläche von PFBA im Zulauf

Für die Anreicherung der Analyten aus einem Probevolumen von 50 ml ist nach den Ergebnissen eine Sorbensmasse von 60 mg ausreichend. Hieraus ergibt sich ein Phasenverhältnis ($m_s/V_P = 1,2 \text{ mg/ml}$).

Das Verfahren wurde für Probenvolumina von 10 - 50 ml erprobt. Mit Durchbruchversuchen aufgestockter Abwässer wurde nachgewiesen, dass das Phasenverhältnis auch für höher belastete Proben ausreichend ist. Zur Reduzierung von Verlusten durch Adsorption an der Gefäßwandung kann die Probe mit einem Volumenanteil von 5 % Methanol versetzt werden, ohne dass die Substanzen durchbrechen. Erwartungsgemäß setzt der Durchbruch von PFBA dabei etwas früher ein, hat aber noch keinen signifikanten Einfluss auf die Wiederfindungsrate. Bei den übrigen Stoffen konnte unter diesen Bedingungen bis zu einem Probendurchsatz von 150 ml kein Durchbruch festgestellt werden (Bild 17). Dieses Ergebnis

wurde von zwei Laboren bei unterschiedlicher Arbeitsweise und mit verschiedenen Abwasserproben bestätigt.

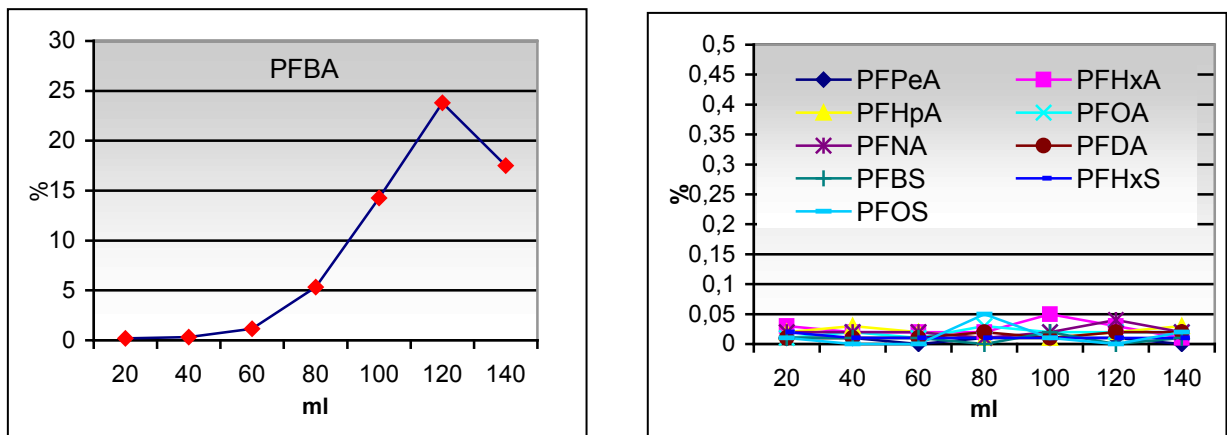


Bild 17 – Durchbruch von PFC aus dotiertem Abwasser in Gegenwart von Methanol

Probe: Behandeltes Abwasser, Volumenanteil Methanol 5 %, dotiert mit jeweils 0,5 µg/l
Festphasenmaterial: Strata X-AW 60 mg, 3-ml-Kartusche

Bei der Durchführung der Extraktion hat sich die alkalische Konditionierung des Festphasenmaterials mit methanolischem Ammoniak als robuster erwiesen, als die saure Konditionierung mit Ameisensäure, bei der auch die Probe sauer eingestellt werden muss. Bei diesen Bedingungen können sich höhere Verluste durch Sorption an Gefäßwänden ergeben.

Die Festphasenextraktion ermöglicht drei Waschschritte, wodurch ein hoher Anteil an Begleitstoffen abgetrennt wird. Die Robustheit der Waschschritte wurde durch Variation der Volumina geprüft.

Die Untersuchungen ergaben, dass sowohl das Volumen der Ameisensäure-Aceton-Acetonitril-Mischung, als auch das Volumen an Methanol erhöht werden können, ohne dass die Analyten eluiert werden (Tabellen 5 und 6). Bei Bedarf können diese Möglichkeiten für eine weitere Aufreinigung der Messlösung genutzt werden.

Weiterhin wurde festgestellt, dass auf die Gegenwart der Ameisensäure in der Aceton-Acetonitril-Mischung nicht verzichtet werden kann, da sonst Verluste bei den Sulfonaten auftreten können. Die Konzentration der Ameisensäure hatte im Bereich von 0,2 % bis 3 % keinen Einfluss auf die Wiederfindungsraten.

PFC	Volumen = 2 ml		Volumen = 4 ml	
	MW (%)	s (n = 5)	MW (%)	s (n = 5)
PFBA	105	3,2	105	3,2
PFPeA	102	2,8	102	2,8
PFHxA	104	2,1	106	2,4
PFHpA	108	3,9	104	2,1
PFOA	100	0,8	99	2,3
PFNA	94	2,6	91	2,6
PFDA	107	7,7	103	5,2
PFBS	100	5,6	104	5,1
PFHxS	108	3,2	100	1,2
PFOS	99	6,5	92	5,0

Tabelle 5 – Wiederfindungsraten von PFC bei verschiedenen Volumina an 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril beim Waschschritt 2

Sorbens: Strata-X-AW, 60 mg, 3-ml-Kartusche
Probe: 50 ml Trinkwasser, dotiert (0,1 µg/l)
Waschen 1: 2 ml Wasser
Waschen 2: siehe Tabelle
Waschen 3: 2 ml Methanol
Elution: 2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol

MW: Mittelwert, in %
s: Standardabweichung, in %

Tabelle 6 – Wiederfindungsraten von PFC bei verschiedenen Volumina an Methanol beim Waschschrift 3

PFC	Volumen = 2 ml		Volumen = 4 ml		Volumen = 6 ml	
	MW (%)	s (n = 5)	MW (%)	s (n = 5)	MW (%)	s (n = 5)
PFBA	103	3,5	106	3,5	103	3,5
PFPeA	101	2,6	103	2,1	101	2,6
PFHxA	101	1,8	100	0,8	101	1,8
PFHpA	109	7,2	110	1,0	103	3,2
PFOA	99	0,9	99	1,4	100	4,4
PFNA	91	5,0	96	1,6	87	3,7
PFDA	109	8,1	109	2,4	109	4,0
PFBS	109	3,7	99	3,0	98	3,3
PFHxS	100	1,5	97	3,2	97	3,9
PFOS	99	8,5	93	5,9	89	7,5

Sorbens: Strata-X-AW, 60 mg, 3-ml-Kartusche

Probe: 50 ml Trinkwasser, dotiert (0,1 µg/l)

Waschen 1: 2 ml Wasser

Waschen 2: 2 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1

Waschen 3: siehe Tabelle

Elution: 2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol

MW: Mittelwert, in %

s: Standardabweichung, in %

Die Desorption der Analyten erfolgt mit Methanol in Gegenwart von Ammoniak, stufenweise oder unter Einhaltung von Einwirkzeiten, wobei die Notwendigkeit dieser Arbeitsweisen nicht geprüft wurde. Der Volumenanteil an Ammoniak hatte im Bereich von 0,025 % bis 0,1 % keinen Einfluß auf die Wiederfindungsraten.

Die Eluate können ohne Verluste bei den Analyten zur Trockene eingeeengt werden. Bei den meisten Anwendungen erfolgte dieser Arbeitsschritt durch Abblasen des Lösemittels mit Stickstoff in temperierten Vorrichtungen, häufig bei 40 °C. Die Wiederfindungsraten sind dabei nicht abhängig von der Dauer des Prozesses.

Bei der Verwendung von Rotationsverdampfern traten in einigen Fällen erhebliche Blindwerte auf, die auf das in diesen Geräten üblicherweise verwendete Dichtungsmaterial zurückzuführen sind.

Bei der Aufnahme des trockenen Rückstandes können Verluste bei den Analyten durch Sorption entstehen, wenn der Volumenanteil an Methanol in der Aufnahmelösung zu gering ist (siehe 4).

Als unproblematisch erwies sich dagegen die Klarfiltration der Messlösung, bei der keine Verluste der Analyten nachweisbar waren.

Tabelle 7 gibt Beispiele für Arbeitsbedingungen der Festphasenextraktion.

Tabelle 7 – Beispiele für Arbeitsbedingungen der Festphasenextraktion

Beispiel 1	
Sorbens:	Strata-X-AW, 200 mg, 6-ml-Kartusche
Konditionierung:	8 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, 4 ml Methanol, 4 ml Wasser
Probe:	pH 7 - 8, versetzt mit 2 ml Methanol, Fluss etwa 2,5 ml/min
Waschen 1:	4 ml Wasser
Waschen 2:	4 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1
Waschen 3:	4 ml Methanol
Trocknung:	keine
Elution:	8 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol
Aufarbeitung:	Einengen zur Trockene mit Stickstoff bei 40 °C, Rückstand lösen in 500 µl Methanol-Wasser 1:1

Beispiel 2	
Sorbens:	Strata-X-AW, 60 mg, 3-ml-Kartusche
Konditionierung:	2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, 2 ml Methanol, 2 ml Wasser
Probe:	pH 7 - 8
Waschen 1:	2 ml Wasser
Waschen 2:	2 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1
Waschen 3:	2 ml Methanol
Trocknung:	keine
Elution:	2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, Einwirkzeit 5 min
Aufarbeitung:	Einengen zur Trockene mit Stickstoff bei 45 °C, Rückstand lösen in 1 ml Methanol-Wasser 4:6

Beispiel 3	
Sorbens:	Strata-X-AW, 60 mg, 3-ml-Kartusche
Konditionierung:	2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, 2 ml Methanol, 2 ml Wasser
Probe:	pH 7-8
Waschen 1:	2 ml Wasser
Waschen 2:	2 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1
Waschen 3:	2 ml Methanol
Trocknung:	keine
Elution:	3 x 800 µl 0,1% Ammoniak in Methanol, Einwirkzeit je 5 min
Aufarbeitung:	Einengen zur Trockene mit Stickstoff, Rückstand lösen in 1 ml Methanol-Wasser 1:1

Beispiel 4	
Sorbens:	Chromabond HR-XAW, 60 mg, 3-ml-Kartusche
Konditionierung:	2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, 2 ml Methanol, 2 ml Wasser
Probe:	pH 7 - 8
Waschen 1:	2 ml Wasser
Waschen 2:	2 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1
Waschen 3:	2 ml Methanol
Trocknung:	keine
Elution:	3 x 0,8 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol
Aufarbeitung:	Einengen zur Trockene mit Stickstoff bei 40 °C, Rückstand lösen in 0,5 ml Methanol-Wasser 6:4

Tabelle 7 fortgesetzt:

Beispiel 5	
Sorbens:	Strata-X-AW, 60 mg, 3-ml-Kartusche
Konditionierung:	2 x 2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, 2 ml Methanol, 2 x 2 ml Wasser
Probe:	pH 7 - 8, versetzt mit 2 ml Methanol, Fluss etwa 2,5 ml/min
Waschen 1:	2 ml Wasser
Waschen 2:	2 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1
Waschen 3:	2 ml Methanol
Trocknung:	keine
Elution:	2 x 2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, Einwirkzeit 5 min
Aufarbeitung:	Einengen zur Trockene mit Stickstoff bei 45 °C, Rückstand lösen in 1 ml Methanol-Wasser-NH ₃ 50:50:0,02

Beispiel 6	
Sorbens:	Oasis WAX, 60 mg, 3-ml-Kartusche
Konditionierung:	4 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, 4 ml Methanol, 4 ml Wasser
Probe:	versetzt mit 2 ml Methanol
Waschen 1:	4 ml Wasser
Waschen 2:	4 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1
Waschen 3:	4 ml Methanol
Trocknung:	keine
Elution:	2 x 4 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol
Aufarbeitung:	Einengen zur Trockene mit Stickstoff bei 40 °C, Rückstand lösen in 500 µl Methanol, 500 µl Wasser zufügen

Beispiel 7	
Sorbens:	Strata-X-AW, 60 mg, 3-ml-Kartusche
Konditionierung:	2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, 2 ml Methanol, 2 ml Wasser
Probe:	pH 7 - 8
Waschen 1:	2 ml Wasser
Waschen 2:	2 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1
Waschen 3:	2 ml Methanol
Trocknung:	keine
Elution:	3 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, Einwirkzeit 4 min
Aufarbeitung:	Einengen zur Trockene mit Stickstoff bei 40 °C, Rückstand lösen in 0,5 ml Methanol-Wasser 1:1

Beispiel 8	
Sorbens:	Strata-X-AW, 200 mg, 6-ml-Kartusche
Konditionierung:	2 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol, 2 ml Methanol, 4 ml Wasser
Probe:	pH 7 - 8
Waschen 1:	2 ml Wasser
Waschen 2:	2 ml 1 % Ameisensäure in Aceton-Acetonitril 1:1
Waschen 3:	2 ml Methanol
Trocknung:	keine
Elution:	2 x 3 ml 0,1 % Ammoniak in Methanol
Aufarbeitung:	Einengen zur Trockene mit Stickstoff bei 40 °C, Rückstand lösen in 0,5 ml Methanol-Wasser 7:3

Die Festphasenmaterialien Strata-X-AW, Oasis WAX und Chromabond HR-XAW sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Die Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch das DIN.

7.2 Massenspektrometrische Messung

Die in Tabelle 8 angegebenen Massenübergänge für die zu bestimmenden Substanzen wurden mit Tandem-Massenspektrometern und Elektro-Spray-Ionisation (ESI) an Geräten verschiedener Hersteller ermittelt. Da geringe Abweichungen vorkommen können, sind die jeweils optimalen m/z -Werte möglichst unter den Bedingungen der Chromatographie zu ermitteln (vgl. Tabellen 12 - 16).

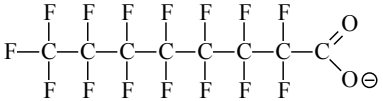
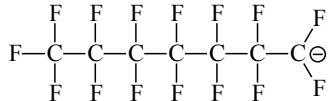
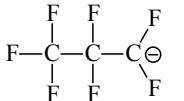
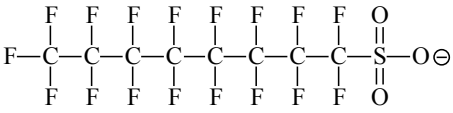
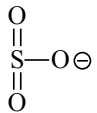
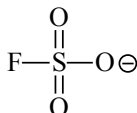
Tabelle 8 – Massenübergänge der zu bestimmenden Substanzen

Substanz	ESI-Modus	Quantifizierung		Absicherung
		Vorläufer-Ion m/z^a	1. Produkt-Ion m/z	2. Produkt-Ion m/z
PFBA	negativ	213	169	—
PFPeA	negativ	263	219	119
PFHxA	negativ	313	269	119
PFHpA	negativ	363	319	169
PFOA	negativ	413	369	169
PFNA	negativ	463	419	219
PFDA	negativ	513	469	219
PFBS	negativ	299	80	99
PFHxS	negativ	399	80	99
PFOS	negativ	499	80	99

^a Masse zu Ladung

Tabelle 9 zeigt typische Fragmentierungen am Beispiel von PFOA und PFOS.

Tabelle 9 – Beispiel für Fragmentierungen

Substanz	Vorläufer-Ion	1. Produkt-Ion	2. Produkt-Ion
PFOA	 m/z 412,97	 m/z 368,98	 m/z 168,99
PFOS	 m/z 498,93	 m/z 79,96	 m/z 98,96

Für PFBA wird nur ein Produkt-Ion erhalten und bei den Stoffen PFPeA und PFHxA ist die Intensität des 2. Produkt-Ions für eine Absicherung zu gering.

Bei der Untersuchung von Proben können Störungen einzelner Massenübergänge auftreten, die es erforderlich machen, das 2. Produkt-Ion zur Quantifizierung heranzuziehen. Diese Störungen treten gelegentlich bei der Untersuchung von behandeltem Abwasser auf.

Die Messung sollte so optimiert werden, dass jeder Peak mit mindestens 12 Datenpunkten registriert wird. Durch eine zu geringe Anzahl an Datenpunkten kann bei niedrigen Flächen- bzw. Höhenwerten die Reproduzierbarkeit beeinträchtigt werden. Je nach Rechenmethode kann eine zu geringe Anzahl an Datenpunkten außerdem zu einem unverhältnismäßig hohen Verlust an Signalintensität führen [1].

Wenn mit Zeitfenstern gearbeitet wird, ist sicherzustellen, dass verzweigte Isomere der einzelnen Analyte erfasst werden. Die verzweigten Isomere eluieren meist unmittelbar vor der unverzweigten Verbindung und treten insbesondere bei den Verbindungen PFOA, PFHxS und PFOS auf. Bei PFOS werden mehrere verzweigte Isomere detektiert.

Bilder 18 und 19 zeigen beispielhaft die Lage verzweigter Isomere im Chromatogramm.

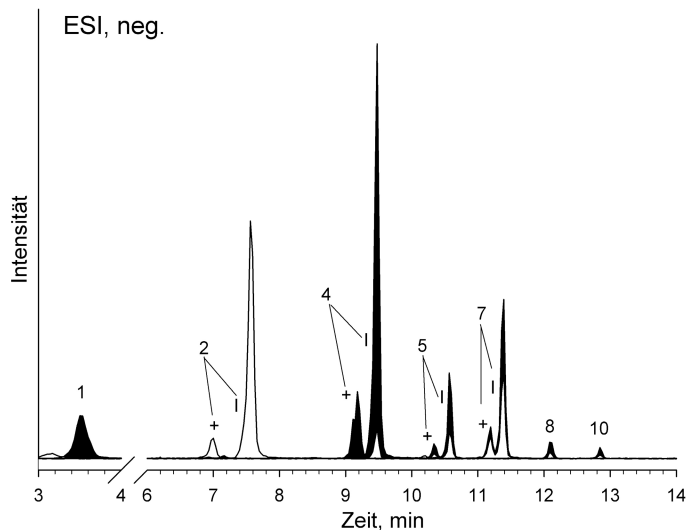


Bild 18 – Beispiel für ein MS-Chromatogramm einer Probe mit verzweigten und unverzweigten Carbonsäuren

Peak-Nummer siehe Legende zu Bild 8, + verzweigte Isomere, I unverzweigte Isomere

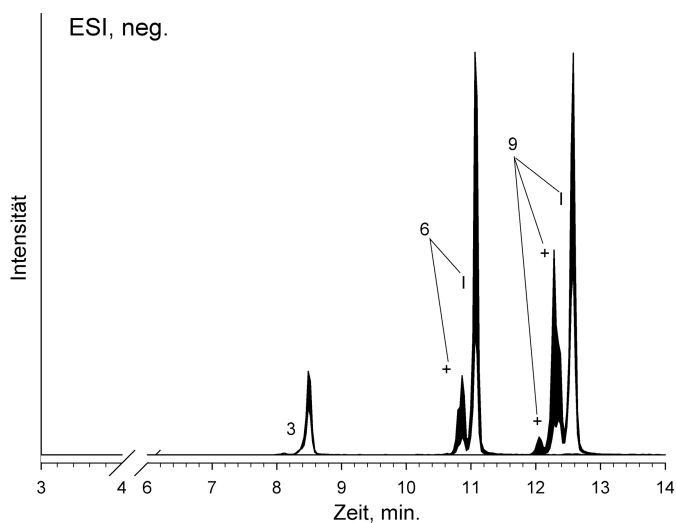


Bild 19 – Beispiel für ein MS-Chromatogramm einer Probe mit verzweigten und unverzweigten Sulfonsäuren

Peak-Nummer siehe Legende zu Bild 8, + verzweigte Isomere, I unverzweigte Isomere

8 Ermittlung von Verfahrenskenndaten

8.1 Kalibrierverfahren

Nach der Norm ist für die Untersuchung von Proben ausschließlich die interne Standardisierung zulässig. Dabei müssen mindestens für die Stoffe PFBA, PFHxA, PFOA und PFOS entsprechende ¹³C-markierte Verbindungen als interne Standards eingesetzt werden. Stoffe, für die kein eigener interner Standard eingesetzt wird oder verfügbar ist, dürfen auf andere interne Standards bezogen werden, sofern die Wiederfindungsraten der Analyten im gleichen Bereich liegen, wie die der internen Standards (Tabelle 10). Diese Anforderung ist jedoch nicht immer erfüllt, so dass sich grundsätzlich die Verwendung weiterer interner Standards, besonders für Stoffe, die regelmäßig vorgefunden werden, empfiehlt.

Tabelle 10 – Massenübergänge interner Standardsubstanzen und Beispiel für Fremdbezug

Substanz	Relative molare Masse	ESI-Modus	Vorläufer-Ion <i>m/z</i>	Produkt-Ionen <i>m/z</i>	Zuordnung nach DIN 38407-42
¹³ C ₄ -PFBA	218,01	negativ	217	172	PFBA
¹³ C ₅ -PFPeA	269,01	negativ	268	223	
¹³ C ₂ -PFHxA	316,04	negativ	315	270 / 119	PFHxA, PFPeA, PFBS, PFHxS
¹³ C ₃ -PFHxS	403,07	negativ	402	99	
¹⁸ O ₂ -PFHxS	404,09	negativ	403	103	
¹³ C ₄ -PFHpA	368,03	negativ	367	322	
¹³ C ₄ -PFOA	418,04	negativ	417	372 / 169	PFOA, PFHpA, PFNA, PFDA
¹³ C ₄ -PFOS	504,10	negativ	503	80 / 99	PFOS
¹³ C ₅ -PFNA	469,04	negativ	468	423 / 223 / 219	
¹³ C ₂ -PFDA	516,07	negativ	515	470 / 220 / 219	

Die erhältlichen Standards der Sulfonate liegen als Natriumsalz vor.

Die Anwendung des Verfahrens hat gezeigt, dass es nicht grundsätzlich notwendig ist, die Kalibrierung des Messsystems mit jeder Untersuchungsserie neu zu erstellen.

Bild 20 gibt die Peakflächen bzw. die Flächenverhältnisse am Beispiel einiger PFC von insgesamt 24 Kalibrierungen unter Routinebedingungen wieder und zeigt, dass die Responsewerte nur wenig schwanken. Dies gilt in jedem Fall für das Flächenverhältnis bei den Analyten aber auch meistens für die absoluten Peakflächen der internen Standards. Solange die Anforderungen hinsichtlich der Genauigkeit nach Abschnitt 11.4 der Norm erfüllt sind, kann eine vorhandene Kalibrierung weiter verwendet werden.

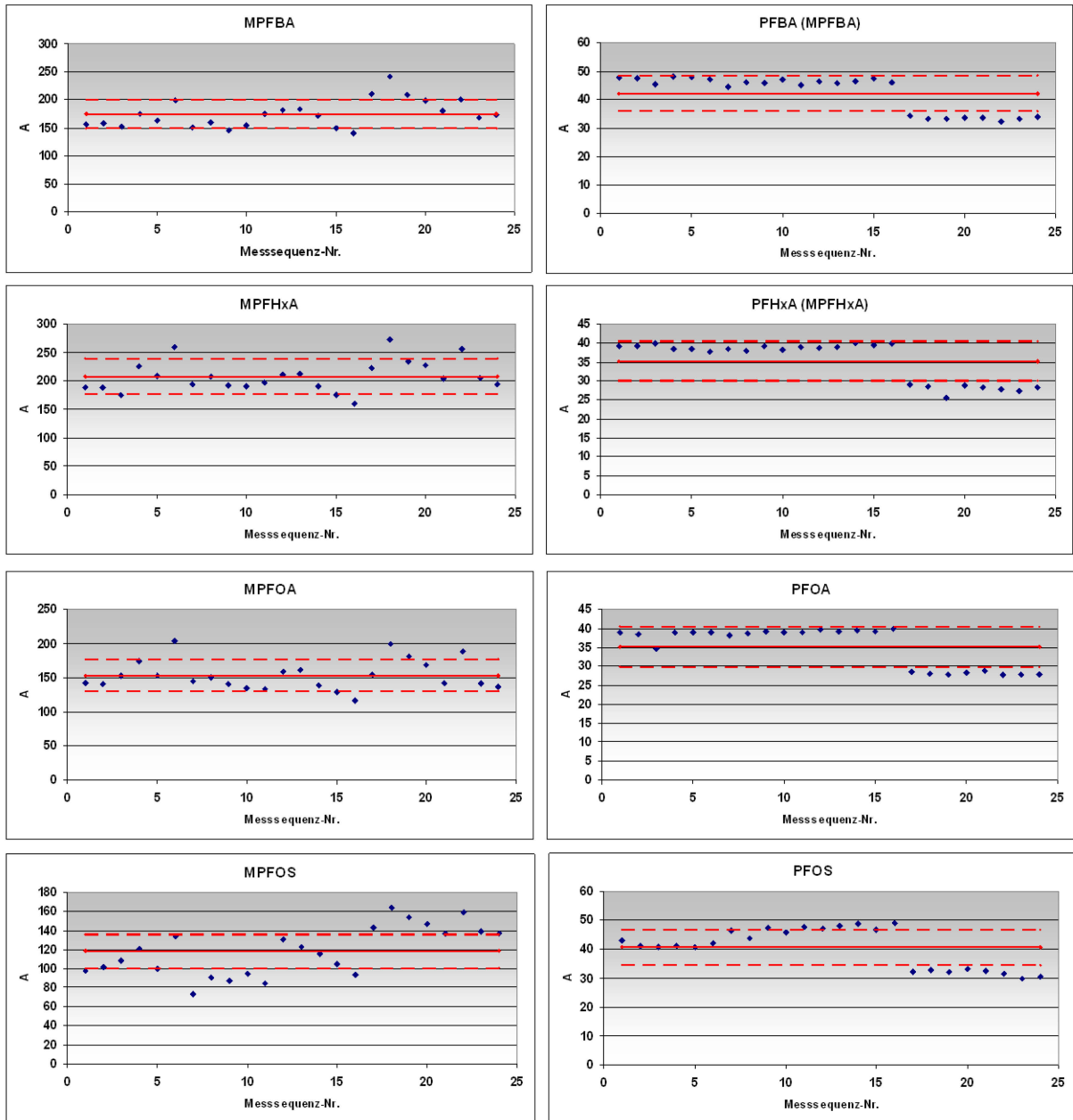


Bild 20 – Stabilität von Kalibrierungen, Beispiel

Messesequenzen mit durchschnittlich 30-40 Umweltproben und üblicher Reinigung des MS-Gerätes, Messbedingungen siehe Tabelle 16

8.2 Kalibriersubstanzen

Für die Kalibrierung dürfen nach der Norm nur unverzweigte PFC eingesetzt werden, die für die Sulfonate zurzeit nur als Lösungen kommerziell erhältlich sind.

Tabelle 4 nennt Bezugsquellen für Reinsubstanzen und Lösungen, Tabelle 3 gibt ein Beispiel für die Herstellung von Bezugslösungen wieder.

Die Richtigkeit dieser Lösungen und die Genauigkeit der Kalibrierung sind mit einem unabhängigen Standard zu prüfen, der neben den unverzweigten auch verzweigte Isomere enthält. Ein solcher Standard ist im Handel verfügbar und wurde im Rahmen des Ringversuches zum Verfahren DIN 38414-14 untersucht. Tabelle 11 gibt die Ergebnisse wieder. Der Standard enthält verzweigte Isomere bei den Substanzen PFHxS und PFOS.

Tabelle 11 – Ergebnisse für einen Kontrollstandard mit Anteilen verzweigter Isomere ¹⁾

Substanz	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>o</i>	\bar{x}	<i>X</i>	η	<i>s_R</i>	<i>C_{V,R}</i>	<i>s_f</i>	<i>C_{V,f}</i>
PFBA	19	76	5,0	91,6	100	91,6	9,63	10,5	2,09	2,3
PFPeA	19	76	5,0	88,7	101	87,9	10,61	12,0	2,27	2,6
PFHxA	18	72	5,3	98,6	102	96,7	11,10	11,3	2,22	2,3
PFHpA	20	80	0,0	88,7	102	87,0	11,49	12,9	2,96	3,3
PFOA	19	76	5,0	94,5	101	93,6	10,49	11,1	2,87	3,0
PFNA	18	72	10,0	98,9	99,4	99,5	14,03	14,2	2,71	2,7
PFDA	17	68	10,5	95,9	102	94,0	12,19	12,7	3,62	3,8
PFBS	19	76	5,0	96,1	99,6	96,5	11,02	11,5	3,54	3,7
PFHxS	19	76	0,0	100,0	100	100,0	12,77	12,8	2,84	2,8
PFOS	18	72	10,0	96,3	99,6	96,7	19,84	20,6	2,48	2,6

¹⁾ aus Ringversuch zu Verfahren DIN 38414-14

Legende:

<i>l</i>	Anzahl der Laboratorien nach Ausreißereliminierung
<i>n</i>	Anzahl der Analysenergebnisse nach Ausreißereliminierung
<i>o</i>	Ausreißeranteil in %
\bar{x}	Gesamtmittelwert aller Analysenergebnisse (ohne Ausreißer) in ng/ml
<i>X</i>	Sollwert in ng/ml
η	Wiederfindungsrate in %
<i>s_R</i>	Vergleichsstandardabweichung in ng/ml
<i>C_{V,R}</i>	Vergleichsvariationskoeffizient in %
<i>s_f</i>	Wiederholstandardabweichung in ng/ml
<i>C_{V,f}</i>	Wiederholvariationskoeffizient in %

8.3 Kenndaten der Grundkalibrierung und Messbedingungen

Tabellen 12 - 16 zeigen beispielhaft Kenndaten der Grundkalibrierung, die mit verschiedenen Messgeräten erzielt wurden. Die Messbedingungen sind jeweils angegeben.

Tabelle 12 – Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 1

Kalibrierbereich: 0,5 - 5 ng/ml
 Anzahl Konzentrationsniveaus: 10
 Messung/Niveau: 10 oben und unten, sonst eine Messung

Stoffname	m/z	b	a	r	s _{x0}	v _{x0}	CV _{r(UAG)}	CV _{r(OAG)}	S/N	s _{RT}
PFBA	213 > 169	189016	49237	0,9986	0,0836	3,0	4,8	3,0	5	0,01
PFPeA	263 > 219	318253	7273	0,9981	0,1006	3,7	8,3	2,4	8	0,01
PFHxA	313 > 269	283988	9617	0,9988	0,0790	2,9	6,9	3,3	10	0,01
PFHpA	363 > 319	432019	90351	0,9983	0,0943	3,4	4,4	2,8	11	0,01
PFOA	413 > 369	426772	43635	0,9977	0,1101	4,0	3,9	2,7	21	0,01
PFNA	463 > 419	426774	45531	0,9983	0,0951	3,5	5,2	4,2	24	0,01
PFDA	513 > 469	408732	-6842	0,9972	0,1197	4,4	9,5	2,7	24	0,01
PFBS	299 > 80	58337	29062	0,9928	0,1944	7,1	7,3	1,7	20	0,01
PFHxS	399 > 80	39536	2264	0,9972	0,1204	4,4	10,9	3,5	325	0,01
PFOS	499 > 80	21370	-5287	0,9959	0,1450	5,2	6,0	3,0	280	0,01
MPFBA	217 > 172	1792249	0	-	0,0231	2,6	-	2,1	-	0,01
MPFHxA	315 > 270	3458214	0	-	0,0213	2,4	-	1,3	-	0,01
MPFOA	421 > 376	5127197	0	-	0,0251	2,8	-	3,0	-	0,01
MPFOS	503 > 80	215570	0	-	0,0220	2,4	-	2,9	-	0,01
Messgerät	HPLC-System 1100 (Entgaser, binäre Pumpe, thermost. Probengeber, Säulenofen), TSQ Quantum Discovery Max									
Säule	Phenomenex Fusion-RP 4 mm x 2 mm // Phenomenex Fusion-RP 4 µm (100 mm x 2 mm)									
Injektion	20 µl									
Eluent	A: Wasser (5 % Methanol, 2 mmol Ammoniumacetat, 0,1 % Essigsäure) B: Methanol (2 mmol Ammoniumacetat, 0,1 % Essigsäure) 0 - 4 min 25 % A // 4 - 7 min 60 % A // 7 - 12 min 80 % A // 12 - 12,5 min 80 % A // 12,5 - 13 min 25 % A, 13 - 20 min 25 % A									
Fluss	0,3 ml/min									
Temp.	50 °C									
Druck	bei Anfangsbedingungen 94 bar, bei Endbedingungen 75 bar									
Detektion	MRM-Mode, ESI neg., Ion Transfer Capillary Temp.: 270 °C, Sheathgas 70, Spray Voltage: 3000 V, Stossgasdruck (Argon): 1,5 mTorr									
b	Steigung, in ml/ng									
a	Achsenabschnitt, Flächenwert									
r	Korrelationskoeffizient									
s _{x0}	Verfahrensstandardabweichung, in ng/ml									
v _{x0}	Rel. Verfahrensstandardabweichung, in %									
CV _{r(UAG)}	Wiederholstandardabweichung an der unteren Arbeitsbereichsgrenze (n=8), in %									
CV _{r(OAG)}	Wiederholstandardabweichung an der oberen Arbeitsbereichsgrenze (n=10), in %									
S/N	Verhältnis des Signals zum Rauschen (Peak to Peak) an der unteren Anwendungsgrenze									
s _{RT}	Standardabweichung der Retentionszeiten (n=10), in min									

Tabelle 13 – Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 2

Kalibrierbereich: 1 - 10 ng/ml
 Anzahl Konzentrationsniveaus: 10
 Messung/Niveau: 1

Stoffname	m/z	b	a	r	s _{x0}	v _{x0}	CV _{r(UAG)}	CV _{r(OAG)}	S/N	s _{RT}
PFBA	212,9 > 169,0	15297	966	0,9984	0,1820	3,3	6,4	2,0	45	0,01
PFPeA	262,9 > 219,0	19617	-1232	0,9975	0,2286	4,2	6,6	2,2	68	0,01
PFHxA	312,6 > 269,0	22028	1146	0,9989	0,1526	2,8	2,8	2,1	143	0,01
PFHpA	363,0 > 319,0	21207	1744	0,9973	0,2347	4,3	6,1	2,0	149	0,01
PFOA	412,9 > 369,0	20737	1699	0,9976	0,2214	4,0	2,7	2,1	173	0,01
PFNA	462,9 > 419,0	15768	1355	0,9975	0,2254	4,1	3,6	1,9	151	0,01
PFDA	512,9 > 469,0	10288	1591	0,9969	0,2529	4,6	5,5	2,7	106	0,01
PFBS	298,8 > 79,9	23250	3994	0,9989	0,1353	2,8	5,7	2,2	123	0,01
PFHxS	398,6 > 80,0	15431	-961	0,9973	0,2235	4,3	2,3	2,2	133	0,01
PFOS	498,5 > 79,9	11886	294	0,9989	0,1435	2,7	7,0	2,3	132	0,01
MPFBA	217,0 > 172,0	16579	0	-	0,3550	3,6	-	3,0	-	0,01
MPFHxA	315,0 > 270,0	23376	0	-	0,3303	3,3	-	2,5	-	0,01
MPFOA	416,9 > 372,1	22505	0	-	0,4527	4,5	-	3,7	-	0,01
MPFOS	502,9 > 80,1	25691	0	-	0,3267	3,3	-	2,8	-	0,01
Messgerät	HPLC-System 1100 (Entgaser, binäre Pumpe, Probengeber, Säulenthermostat), MS/MS-Triplequad (API 2000)									
Säule	Phenomenex Max-RP 4 mm x 2,0 mm // MN NUCLEODUR C18 Pyramid 3 µm (125 mm x 2,0 mm)									
Injektion	10 µl									
Eluent	A: 10 mmol Ammoniumacetat/Wasser-Methanol (75/25, v/v) B: 10 mmol Ammoniumacetat/Acetonitril-Methanol (75/25, v/v) 0 - 5 min: 0 V % B nach 30 V % B, linear 5 - 8 min: 30 V % B nach 55 V % B, linear 8 - 19 min: 55 V % B nach 80 V % B, linear Posttime: 12 min 0 V % B, isokratisch									
Fluss	0,30 ml/min									
Temp.	50 °C, beidseitig, Wärmeaustauscher: 3 µl									
Druck	bei Anfangsbedingungen: 179 bar, bei Endbedingungen: 93 bar									
Detektion	MRM-Modus: Elektrospray Ionisierung (ESI) Ionspray Voltage: -1500 V // Curtain Gas (N ₂): 40 psi // Nebulizer Gas (N ₂): 60 psi // Heater Gas (N ₂): 70 psi // Interface Heater: on // Heater Temp: 400 °C // CAD Gas (N ₂): 3,5 x 10 ⁻⁵ Torr Auflösung Q1: Unit, Ion Energy: - 1,7 V // Auflösung Q3: Unit, Ion Energy: - 4,0 V Multiplifier-Spannung: 2200 V, Detektor-Spannung: 175 V									
b	Steigung, in ml/ng									
a	Achsenabschnitt, Flächenwert									
r	Korrelationskoeffizient									
s _{x0}	Verfahrensstandardabweichung, in ng/ml									
v _{x0}	Rel. Verfahrensstandardabweichung, in %									
CV _{r(UAG)}	Wiederholstandardabweichung an der unteren Arbeitsbereichsgrenze (n=8), in %									
CV _{r(OAG)}	Wiederholstandardabweichung an der oberen Arbeitsbereichsgrenze (n=10), in %									
S/N	Verhältnis des Signals zum Rauschen (Peak to Peak) an der unteren Anwendungsgrenze									
s _{RT}	Standardabweichung der Retentionszeiten (n=10), in min									

Tabelle 14 – Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 3

Kalibrierbereich: 0,1 - 25 ng/ml
 Anzahl Konzentrationsniveaus: 8
 Messung/Niveau: 1

Stoffname	m/z	b	a	r	S _{x0}	V _{x0}	CV _{r(UAG)}	CV _{r(OAG)}	S/N	S _{RT}
PFBA	213 > 169	42665	1345	0,9956	-	3,52	7,0	4,8	45	0,0208
PFPeA	263 > 219	43159	1266	0,9965	-	4,25	5,3	2,4	70	0,0241
PFHxA	313 > 269	47254	4361	0,9950	-	3,82	4,5	3,1	100	0,0260
PFHpA	363 > 319	36199	563	0,9965	-	3,41	5,9	4,5	80	0,0273
PFOA	413 > 369	20757	1694	0,9999	-	2,00	3,9	2,3	80	0,0284
PFNA	463 > 419	26552	532	0,9939	-	2,45	5,0	7,1	100	0,0292
PFDA	513 > 469	15229	1242	0,9932	-	4,28	3,7	4,2	100	0,0301
PFBS	299 > 80	103077	3320	0,9999	-	3,99	3,6	1,1	90	0,0242
PFHxS	399 > 80	63760	32	0,9996	-	2,28	7,8	2,2	100	0,0178
PFOS	499 > 80	52219	280	0,9976	-	0,67	2,3	0,7	110	0,0291
MPFBA	217 > 172	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0208
MPFHxA	315 > 270	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0260
MPFOA	421 > 376	9844	1249	0,9942	-	6,6	10,0	5,4	-	0,0282
MPFOS	503 > 80	42098	-2814	0,9992	-	7,0	3,5	3,1	-	0,0291
Messgerät	HPLC-System 1200 + MS/MS API 4000									
Säule	Agilent Zorbax XDB C8 5µ; 150 mm x 4,6 mm									
Injektion	5 µl									
Eluent	A: 2 mmol NH ₄ Ac; 0,1 % Ameisensäure; B: Methanol 30 % nach 85 % B in 21 min									
Fluss	0,35 ml/min									
Temp.	25 °C									
Druck	-									
Detektion	scan type: MRM, polarity: ESI negativ, ion source: turbo spray; drying gas: 150 °C; 35 psi, collision gas: 2 mTorr									
b	Steigung, in ml/ng									
a	Achsenabschnitt, Flächenwert									
r	Korrelationskoeffizient									
S _{x0}	Verfahrensstandardabweichung, in ng/ml									
V _{x0}	Rel. Verfahrensstandardabweichung, in %									
CV _{r(UAG)}	Wiederholstandardabweichung an der unteren Arbeitsbereichsgrenze (n=6), in %									
CV _{r(OAG)}	Wiederholstandardabweichung an der oberen Arbeitsbereichsgrenze (n=6), in %									
S/N	Verhältnis des Signals zum Rauschen (Peak to Peak) an der unteren Anwendungsgrenze									
S _{RT}	Standardabweichung der Retentionszeiten (n=10), in min									

Tabelle 15 – Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 4

Kalibrierbereich: 0,5 - 5 ng/ml
 Anzahl Konzentrationsniveaus: 10
 Messung/Niveau: 3

Stoffname	m/z	b	a	r	s _{x0}	v _{x0}	CV _{r(UAG)}	CV _{r(OAG)}	S/N	s _{RT}
PFBA	212,9 > 168,9	3722	159	0,9998	0,0329	1,2	3,6	1,4	101	0,00
PFPeA	262,8 > 218,9	2708	179	0,9997	0,0400	1,5	6,6	3,4	81	0,00
PFHxA	312,9 > 268,9	3254	-38	0,9994	0,0551	2,0	3,9	0,6	361	0,01
PFHpA	362,9 > 318,8	4098	497	0,9998	0,0293	1,1	5,9	1,2	417	0,01
PFOA	413,0 > 368,8	2610	199	0,9998	0,0268	1,1	2,3	0,9	162	0,01
PFNA	462,9 > 418,8	2712	309	0,9993	0,0590	2,1	7,0	1,7	102	0,01
PFDA	512,9 > 468,8	3113	-138	0,9992	0,0652	2,4	6,8	0,8	140	0,01
PFBS	298,9 > 79,9	3527	258	0,9992	0,0554	2,3	7,4	1,4	124	0,00
PFHxS	398,9 > 79,9	3689	79	0,9997	0,0369	1,4	5,0	0,7	84	0,02
PFOS	498,9 > 79,9	2435	128	0,9993	0,0569	2,2	6,9	0,4	61	0,01
MPFBA	217,0 > 171,9	3334	0	-	0,1480	2,2	-	3,7	-	0,00
MPFHxA	315,0 > 269,8	4751	0	-	0,0600	1,3	-	3,8	-	0,01
MPFOA	421,1 > 375,9	2411	0	-	0,1270	5,3	-	2,6	-	0,01
MPFOS	502,9 > 79,9	3086	0	-	0,0530	5,0	-	1,7	-	0,01
Messgerät	Waters UPLC Acquity (Entgaser, binäre Pumpe, Sample Manager, Column Manager) MS/MS-Triplequad (Waters Acquity TQ Detector)									
Säule	Waters Acquity UPLC BEH 1,7µm, 2,1 mm x 100 mm; Waters Acquity HSS T3 1,8 µm, 2,1 mm x 150 mm									
Injektion	50 µl									
Eluent	A: 5 mmol Ammoniumacetat/Wasser // B: 5 mmol Ammoniumacetat/Methanol Methode 1: 40 % B nach 95 % B in 2 min, 95 % B bis 3,5 min Methode 2 (PFOA/PFOS): 75 % B nach 90 % B in 2 min									
Fluss	0,3 ml/min									
Temp.	40 °C, beidseitig									
Druck	bei Anfangsbedingungen: 11360 psi, bei Endbedingungen: 6390 psi bei Anfangsbedingungen: 10620 psi, bei Endbedingungen: 8560 psi									
Detektion	MRM-Modus: Elektrospray Ionisierung (ESI) Kapillarspannung: 3,6 kV // Extraktor: 3 V // RF-Linse: 0,2 V // Quell-Temperatur: 120 °C Cone-Gas: 50 L N ₂ /h // Desolvation Temperatur: 450 °C // Desolvation Gas: 900 L N ₂ /h Auflösung LM1/HM1 15 // Ion Energy 1: 0,5 Entrance Kollisionszelle: 50 // Exit Kollisionszelle: 50,00 Auflösung LM2/HM2 15 // Ion Energy 2: 4 Multipliiert-Spannung: 621 V									
b	Steigung, in ml/ng									
a	Achsenabschnitt, Flächenwert									
r	Korrelationskoeffizient									
s _{x0}	Verfahrensstandardabweichung, in ng/ml									
v _{x0}	Rel. Verfahrensstandardabweichung, in %									
CV _{r(UAG)}	Wiederholstandardabweichung an der unteren Arbeitsbereichsgrenze (n=6), in %									
CV _{r(OAG)}	Wiederholstandardabweichung an der oberen Arbeitsbereichsgrenze (n=6), in %									
S/N	Verhältnis des Signals zum Rauschen (Peak to Peak) an der unteren Anwendungsgrenze									
s _{RT}	Standardabweichung der Retentionszeiten (n=6), in min									

Tabelle 16 – Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 5

Kalibrierbereich: 0,1 - 5 ng/ml
 Anzahl Konzentrationsniveaus: 5
 Messung/Niveau: 2

Stoffname	m/z	b	a	r	s _{x0}	v _{x0}	CV _{r(UAG)}	CV _{r(OAG)}	S/N	s _{RT}
PFBA	216,6 > 168,4	9446	170	0,9998	0,0239	1,4	1,1	1,0	37	0,00
PFPeA	262,5 > 218,7	8068	-25	0,9995	0,0436	2,5	2,3	1,1	16	0,00
PFHxA	312,6 > 268,8	9254	35	0,9995	0,0442	2,5	1,3	1,1	100	0,00
PFHpA	362,6 > 318,7	9585	-98	0,9994	0,0488	2,8	2,1	1,4	75	0,00
PFOA	412,5 > 368,9	7296	-34	0,9994	0,0511	2,9	2,1	1,6	60	0,01
PFNA	462,6 > 418,6	6559	-102	0,9979	0,0940	5,3	3,3	3,0	80	0,00
PFDA	512,7 > 468,6	6888	-811	0,9897	0,2084	11,8	2,3	4,7	100	0,00
PFBS	298,6 > 79,5	4926	-66	0,9990	0,0570	3,7	0,7	1,8	100	0,01
PFHxS	398,6 > 79,5	5084	-70	0,9997	0,0468	2,8	1,7	1,0	110	0,01
PFOS	498,3 > 79,9	5475	-383	0,9975	0,1376	8,1	2,8	2,9	130	0,00
MPFBA	216,6 > 172,0	8757	0	-	0,0610	2,7	-	0,8	-	0,00
MPFHxA	314,6 > 269,8	9698	0	-	0,0564	2,5	-	1,2	-	0,01
MPFOA	416,5 > 371,9	8548	0	-	0,0883	3,9	-	1,9	-	0,00
MPFOS	502,1 > 79,9	5014	0	-	0,1528	6,7	-	2,2	-	0,00
Messgerät	HPLC-System 1100 (Entgaser, binäre Pumpe, Probengeber, Säulenthermostat), MS/MS-Triplequad (Quattro Micro)									
Säule	Phenomenex Fusion-RP 4 mm x 2,0 mm // Zorbax Eclipse XDB-C18 3,5 µm (100 mm x 2,1 mm)									
Injektion	20 µl									
Eluent	A: 5 mmol Ammoniumacetat/Wasser // B: 0,05 V % Essigsäure/Methanol									
Fluss	0,25 ml/min									
Temp.	40 °C, beidseitig, Wärmeaustauscher: 3 µl									
Druck	bei Anfangsbedingungen: 118 bar, bei Endbedingungen: 63 bar									
Detektion	MRM-Modus: Elektrospray Ionisierung (ESI) Kapillarspannung: 0,8 V // Extraktor: 1,0 V // RF Lens: 0,0 V // Quell-Temperatur: 120 °C Cone Gas: 50 L N ₂ /h // Desolvation Temperatur: 400 °C // Desolvation Gas: 800 L N ₂ /h Auflösung LM1/HM1: 12,0, Ion Energy 1: 0,5 Entrance Kollisionszelle: -1; Exit Kollisionszelle: 2 Auflösung LM2/HM2: 10,0; Ion Energy 2: 2,0 Multiplier-Spannung: 650 V									
b	Steigung, in ml/ng									
a	Achsenabschnitt, Flächenwert									
r	Korrelationskoeffizient									
s _{x0}	Verfahrensstandardabweichung, in ng/ml									
v _{x0}	Rel. Verfahrensstandardabweichung, in %									
CV _{r(UAG)}	Wiederholstandardabweichung an der unteren Arbeitsbereichsgrenze (n=6), in %									
CV _{r(OAG)}	Wiederholstandardabweichung an der oberen Arbeitsbereichsgrenze (n=6), in %									
S/N	Verhältnis des Signals zum Rauschen (Peak to Peak) an der unteren Anwendungsgrenze									
s _{RT}	Standardabweichung der Retentionszeiten (n=6), in min									

9 Untersuchungen zur Richtigkeit und Präzision

9.1 Vergleichsuntersuchungen

Im Rahmen der Validierung des Analysenverfahrens wurden zwei Vergleichsuntersuchungen an verschiedenen Standardmaterialien im Arbeitskreis durchgeführt.

Bei der ersten Untersuchung wurde eine aus den Einzelstoffen durch Einwaage selbst hergestellte Standardlösung untersucht. Die Massenkonzentrationen der Lösung lagen in einem Bereich von 2 µg/ml – 9 µg/ml. Die Stoffe PFHxS und PFOS kamen in dieser Lösung als unverzweigte und verzweigte Isomere vor.

Die zweite Untersuchung erfolgte an einer Lösung, die dem Arbeitskreis für die Validierung des Verfahrens von der Firma Wellington bereit gestellt wurde. In dieser Lösung lagen die Massenkonzentrationen deutlich niedriger (0,1 µg/ml – 0,5 µg/ml).

Die Vergleichsuntersuchungen wurden nach DIN 38402-42 bzw. DIN/ISO 5725-2 ausgewertet. Von jedem Labor wurden 4 parallele Messungen durchgeführt.

Tabellen 17 und 18 zeigen die Ergebnisse.

Tabelle 17 – Verfahrenskennndaten für die HPLC-MS/MS-Messung – Vergleichsuntersuchung – 1

Substanzen	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>n</i> _{AP} %	<i>x</i> µg/ml	<i>x</i> _{ref} µg/ml	<i>η</i> %	<i>s</i> _R µg/ml	<i>CV</i> _R %	<i>s</i> _r µg/ml	<i>CV</i> _r %	
PFBA	15	59	6,3	3,40	4,0	85,0	0,698	20,5	0,096	2,8	
PFPA	16	63	0	5,35	6,5	82,3	0,794	14,8	0,182	3,4	
PFHxA	14	55	12,7	4,12	5,0	82,4	0,662	16,1	0,111	2,7	
PFHpA	15	57	6,6	1,50	2,0	75,0	0,354	23,8	0,062	4,2	
PFOA	16	63	0	7,97	8,0	99,6	1,042	12,6	0,224	2,7	
PFNA	14	55	9,8	2,61	3,0	87,0	0,652	25,0	0,092	3,5	
PFDA	15	59	6,3	6,96	9,0	77,3	1,486	21,3	0,358	5,1	
PFBS	15	59	6,3	5,44	5,0	109	0,736	13,5	0,181	3,3	
PFHxS	14	55	12,7	7,63	7,0	109	1,067	14,0	0,162	2,1	
PFOS	14	55	9,8	3,42	3,0	114	0,864	25,2	0,126	3,7	
<i>l</i>	Anzahl der Labore					<i>η</i>	Wiederfindung in %				
<i>n</i>	Anzahl der Messungen					<i>s</i> _R	Vergleichsstandardabweichung				
<i>n</i> _{AP}	Ausreißeranteil in %					<i>CV</i> _R	Vergleichsvariationskoeffizient				
<i>x</i>	Gesamtmittelwert					<i>s</i> _r	Wiederholstandardabweichung				
<i>x</i> _{ref}	konventionell richtiger Wert					<i>CV</i> _r	Wiederholvariationskoeffizient				
Probe: PFC-Lösung in Methanol (Herstellung durch Einwaage)											

Bei der ersten Untersuchung fallen die Wiederfindungsraten meist zu niedrig aus und die Vergleichsvariationskoeffizienten sind für den reinen Messschritt mit Werten über 20 % deutlich zu hoch (Tabelle 17). Die Vermutung von Störungen durch Mizellare Effekte bei der Herstellung von Verdünnungen aufgrund der relativ hohen Massenkonzentrationen wurde durch die zweite Vergleichsuntersuchung nicht bestätigt. Hierbei fallen die Wiederfindungsraten zwar deutlich besser aus, die Vergleichsvariationskoeffizienten liegen aber im gleichen Bereich (Tabelle 18).

Besonders auffallend sind die für die Untersuchung einer Standardlösung relativ hohen Anteile an Ausreißern, die meistens auf zu hohe Streuungen bei den Parallelmessungen zurückzuführen sind (Ausreißer vom Typ C). Die hohen Streuungen weisen auf nicht optimale Messbedingungen, z.B. durch Verschmutzung des Massenspektrometers, hin.

Tabelle 18 – Verfahrenskennndaten für die HPLC-MS/MS-Messung – Vergleichsuntersuchung – 2

Parameter	<i>l</i>	<i>n</i>	n_{AP} %	<i>x</i> µg/ml	x_{ref} µg/ml	η %	s_R µg/ml	CV_R %	s_r µg/ml	CV_r %	
PFBA	23	92	0	0,373	0,400	93,4	0,070	18,63	0,009	2,37	
PFPA	23	92	0	0,100	0,100	100	0,019	18,69	0,004	4,18	
PFHxA	23	92	0	0,198	0,200	99,0	0,045	22,91	0,006	3,15	
PFHpA	20	80	13,0	0,050	0,050	100	0,011	22,58	0,002	4,12	
PFOA	21	84	8,7	0,507	0,500	101	0,070	13,86	0,019	3,67	
PFNA	22	88	4,3	0,192	0,200	96,0	0,048	24,80	0,008	4,24	
PFDA	21	83	9,8	0,102	0,100	102	0,038	37,83	0,005	5,02	
PFBS	22	88	4,3	0,170	0,180	94,4	0,019	10,95	0,006	3,58	
PFHxS	22	88	4,3	0,088	0,090	97,8	0,014	15,88	0,004	4,96	
PFOS	22	88	4,3	0,368	0,380	96,8	0,071	19,24	0,011	3,06	
<i>l</i>	Anzahl der Labore					η	Wiederfindung in %				
<i>n</i>	Anzahl der Einzelwerte					s_R	Vergleichsstandardabweichung				
n_{AP}	Ausreißeranteil in %					CV_R	Vergleichsvariationskoeffizient				
<i>x</i>	Gesamtmittelwert					s_r	Wiederholstandardabweichung				
x_{ref}	konventionell richtiger Wert					CV_r	Wiederholvariationskoeffizient				
Probe: PFC-Mixture in Methanol, DIN-AK19-PFC, Lot Nr. 10/20/08, Wellington Laboratories											

9.2 Wiederfindungsraten

Tabellen 19 – 22 geben Wiederfindungsraten für die verschiedenen Anwendungsbereiche des Verfahrens wieder. Die Wiederfindungsraten wurden in verschiedenen Laboren ermittelt. Die hierbei eingesetzten Probevolumina richteten sich jeweils nach der Empfindlichkeit des verwendeten Massenspektrometers. Die Arbeitsbedingungen sind im Einzelnen in Tabelle 7 aufgeführt. Alle Wiederfindungsraten wurden durch externe Standardauswertung ohne weitere Korrektur ermittelt. Hierbei wurden Befunde an PFC in den Originalproben jeweils berücksichtigt.

Die Vorgaben bezüglich der Wiederfindungsraten der internen Standards (50 % bis 150 %) werden bis auf wenige Ausnahmen eingehalten.

Tabelle 19 – Beispiele für Wiederfindungsraten aus Reinstwasser ¹⁾

Labor	1		2		3		3		3		4	
Arbeitsbedingungen	Tabelle 7 Beispiel 1		Tabelle 7 Beispiel 2		Tabelle 7 Beispiel 3		Tabelle 7 Beispiel 3		Tabelle 7 Beispiel 3		Tabelle 7 Beispiel 4	
V _P (ml)	50		10		20		20		10		20	
N (µg/l)	0,1		0,1		0,01		0,1		0,1		0,1	
n	4		4		4		4		4		10	
Stoffe	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s
PFBA	97,6	2,5	98,1	1,8	109	8,3	104	6,4	99,8	4,0	91	8,1
PFPeA	94,1	2,7	94,8	1,6	96,0	10,9	105	4,6	104	2,2	116	6,6
PFHxA	92,1	4,1	96,5	1,7	94,2	3,7	101	7,5	101	2,2	114	5,1
PFHpA	90,8	5,2	97,3	2,2	112	8,0	108	6,9	105	1,9	90	9,8
PFOA	90,7	3,0	99,7	5,7	102	8,1	109	2,7	105	2,8	83	6,6
PFNA	92,9	3,3	104	9,9	95,9	7,8	105	8,2	105	2,6	104	3,5
PFDA	85,3	4,9	96,3	11,2	77,0	9,0	78,6	1,5	91,8	2,2	77	7,7
PFBS	101	2,5	97,6	1,7	102	11,8	103	3,3	103	3,0	78	6,3
PFHxS	103	3,2	97,2	1,4	95,4	9,3	102	5,5	101	0,6	87	4,1
PFOS	97,0	4,0	94,9	3,7	92,1	2,0	104	10,3	97,5	3,1	83	3,9
PFUnA ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	7,4
PFDoA ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58	4,7
PFDoS ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	8,2
¹³ C ₄ -PFBA	88,7	3,7	97,7	1,5	74,9	5,9	86,0	3,6	99,8	4,1	84	6,0
¹³ C ₂ -PFHxA	86,6	3,7	95,1	1,1	95,0	5,4	88,9	10,6	107	1,5	89	6,6
¹³ C ₄ -PFOA	91,3	2,2	97,0	5,1	95,6	9,7	87,1	5,4	103	2,6	88	5,6
¹³ C ₄ -PFOS	81,7	2,4	90,6	6,5	86,6	4,3	93,6	4,0	92,7	2,7	88	3,2
V _P	Probenvolumen, in ml											
N	Konzentrationsniveau, Aufstockung in µg/l											
n	Anzahl der parallelen Analysen über das Gesamtverfahren auf dem Konzentrationsniveau N											
A _i	mittlere Wiederfindungsrate für die Substanz i auf dem Konzentrationsniveau N, in %											
s	Standardabweichung der Wiederfindungsrate, in %											
¹⁾	Wasser nach 7.1 der Norm											
²⁾	Zusätzlich im Analysenverfahren: PFUnA (Perfluorundecansäure), PFDoA (Perfluordodecansäure), PFDoS (Perfluordodecansulfonsäure)											

Tabelle 20 – Beispiele für Wiederfindungsraten aus Trinkwasser

Labor	1		1		1		2		3		3	
Arbeitsbedingungen	Tabelle 7 Beispiel 1		Tabelle 7 Beispiel 1		Tabelle 7 Beispiel 5		Tabelle 7 Beispiel 2		Tabelle 7 Beispiel 3		Tabelle 7 Beispiel 3	
Analysenwerte Probe	pH = 8,3 TOC = 0,8 mg/l γ = 28 mS/m GH = 5,5 °dH				pH = 7,6 TOC = 0,3 mg/l γ = 44 mS/m GH = 14,9 °dH		pH = 7,3 TOC = 1,3 mg/l γ = 67 mS/m GH = 12 °dH		pH = 8,3 TOC = 0,9 mg/l γ = 19 mS/m GH = 3,8 °dH			
V _P (ml)	50		50		50		10		20		20	
N (µg/l)	0,01		0,1		0,1		0,1		0,01		0,1	
n	4		4		4		4		4		4	
Stoffe	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s
PFBA	119	0,4	97,7	4,1	98,1	1,4	96,1	3,3	93,2	2,2	112	2,2
PFPeA	91,5	0,2	98,7	2,5	94,1	2,5	92,7	0,6	82,4	8,0	107	2,7
PFHxA	109	0,2	98,3	3,4	91,5	4,5	92,4	1,3	83,4	3,4	101	5,2
PFHpA	94,9	0,3	101	3,5	95,0	1,5	93,5	3,1	97,4	11,6	110	3,1
PFOA	120	0,6	105	3,5	95,0	2,9	97,3	6,2	96,6	7,2	109	1,5
PFNA	99,7	0,5	95,0	4,1	93,6	6,7	94,8	5,2	90,8	4,6	93,9	4,7
PFDA	81,8	0,2	82,6	7,0	85,3	6,8	77,0	4,4	57,6	9,5	68,1	3,2
PFBS	123	0,5	98,5	3,4	100	1,5	94,8	2,4	87,5	11,5	102	1,3
PFHxS	131	0,6	100	3,8	103	2,7	93,2	1,4	84,4	2,6	103	2,4
PFOS	98,7	0,2	86,9	6,4	82,9	2,8	77,5	3,3	83,1	7,6	96,8	2,8
¹³ C ₄ -PFBA	95,8	4,5	93,4	5,8	109	1,7	97,3	1,8	78,8	13,1	99,7	7,3
¹³ C ₂ -PFHxA	95,6	4,1	93,3	2,2	106	3,3	94,4	1,3	88,2	12,5	101	5,0
¹³ C ₄ -PFOA	97,2	5,9	95,1	4,7	105	4,2	98,2	3,9	88,1	7,4	93,3	4,2
¹³ C ₄ -PFOS	77,5	4,5	76,1	6,0	85,9	3,8	77,1	5,3	86,6	7,5	88,2	7,4
V _P	Probevolumen, in ml											
N	Konzentrationsniveau, Aufstockung in µg/l											
n	Anzahl der parallelen Analysen über das Gesamtverfahren auf dem Konzentrationsniveau N											
A _i	mittlere Wiederfindungsrate für die Substanz i auf dem Konzentrationsniveau N, in %											
s	Standardabweichung der Wiederfindungsrate, in %											

Tabelle 21 – Beispiele für Wiederfindungsraten aus Oberflächenwasser

Labor	1		2		2		5		5		9	
Arbeitsbedingungen	Tabelle 7 Beispiel 1		Tabelle 7 Beispiel 2		Tabelle 7 Beispiel 2		Tabelle 7 Beispiel 6		Tabelle 7 Beispiel 6		Tabelle 7 Beispiel 1	
Gewässer	Swist Bonn		Rhein Düsseldorf		Lippe Wesel		Ruhr Witten		Steuer Haltern		Wupper Opladen	
Analysenwerte Probe	pH = 8,5 $\gamma = 69 \text{ mS/m}$		pH = 8,0 TOC = 3,1 mg/l $\gamma = 63 \text{ mS/m}$ GH = 13 °dH		pH = 8,0 TOC = 8,6 mg/l $\gamma = 165 \text{ mS/m}$ GH = 21 °dH		pH = 7,7 TOC = 3,2 mg/l $\gamma = 41 \text{ mS/m}$		pH = 7,8 $\gamma = 66,7 \text{ mS/m}$		pH = 7,9 TOC = 3,1 mg/l $\gamma = 49 \text{ mS/m}$ GH = 7,3°dH	
V _P (ml)	50		10		10		50		50		50	
N (µg/l)	0,1		0,1		0,1		0,1		0,1		0,1	
n	4		3		4		3		3		2	
Stoffe	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s
PFBA	99,2	1,4	102	6,9	111	2,8	78,7	3,5	78,7	0,6	92,1	0,0
PFPeA	94,3	2,1	93,9	3,7	101	2,2	87,7	4,2	93,0	1,0	96,6	0,0
PFHxA	98,0	1,1	91,3	2,8	103	1,7	92,0	4,4	94,0	1,0	99,1	0,5
PFHpA	96,3	2,5	91,1	2,4	100	0,9	87,0	3,5	87,0	1,0	102	0,3
PFOA	97,9	2,1	96,1	2,9	102	1,2	85,3	3,0	76,7	1,9	103	0,2
PFNA	93,2	3,9	80,6	3,9	83,9	4,4	80,3	3,1	60,3	2,5	95,0	0,5
PFDA	81,9	5,8	57,2	4,6	52,9	8,4	65,0	6,2	39,3	3,5	88,0	0,0
PFBS	103	1,4	93,3	4,0	87,5	1,4	95,0	2,6	98,0	1,7	99,1	0,0
PFHxS	99,2	1,9	92,4	2,2	94,3	1,4	90,0	3,6	90,0	3,5	98,4	0,7
PFOS	82,2	4,6	81,1	6,4	59,3	6,0	64,2	3,6	41,7	2,3	91,2	1,8
¹³ C ₄ -PFBA	99,8	6,4	99,2	3,6	107	2,4	74,7	4,2	73,7	1,5	97,5	0,2
¹³ C ₂ -PFHxA	94,7	6,6	90,8	2,3	102	1,7	87,7	4,2	88,7	1,5	98,8	1,5
¹³ C ₄ -PFOA	97,1	5,2	96,0	3,2	101	1,2	85,3	3,0	76,0	1,6	100	1,3
¹³ C ₄ -PFOS	77,4	5,0	71,0	6,0	63,3	6,5	65,2	4,2	40,0	2,6	89,9	1,8
¹³ C ₅ -PFNA	-	-	-	-	89,3	2,9	-	-	-	-	94,0	5,0
¹³ C ₂ -PFDA	-	-	-	-	57,1	8,2	63,3	5,9	36,0	4,0	89,1	0,8
¹⁸ O ₂ -PFHxS	-	-	-	-	-	-	88,0	2,6	86,7	1,5	100	1,5
V _P	Probenvolumen, in ml											
N	Konzentrationsniveau, Aufstockung in µg/l											
n	Anzahl der parallelen Analysen über das Gesamtverfahren auf dem Konzentrationsniveau N											
A _i	mittlere Wiederfindungsrate für die Substanz i auf dem Konzentrationsniveau N, in %											
s	Standardabweichung der Wiederfindungsrate, in %											

Tabelle 22 – Beispiele für Wiederfindungsraten aus behandeltem Abwasser (Kläranlagenabläufe)

Labor	1		2		3		6		7		8	
Arbeitsbedingungen	Tabelle 7 Beispiel 1		Tabelle 7 Beispiel 2		Tabelle 7 Beispiel 3		Tabelle 7 Beispiel 2		Tabelle 7 Beispiel 7		Tabelle 7 Beispiel 7	
Analysenwerte Probe	pH = 7,7 TOC = 6,8 mg/l γ = 99,6 mS/m		pH = 8,1 TOC = 147 mg/l γ = 233 mS/m GH = 23 °dH		pH = 7,3 TOC = 14,2 mg/l γ = 71 mS/m GH = 0,5 °dH		pH = 7,5 TOC = 8,4 mg/l γ = 51 mS/m		nicht vorhanden		nicht vorhanden	
V _P (ml)	50		10		20		45		50		50	
N (µg/l)	0,10		0,10		0,10		0,20		0,15		0,10	
n	5		3		3		4		5		4	
Stoffe	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s
PFBA	97,1	3,3	96	7,0	91,7	3,5	83	5,9	99,8	1,9	88	1
PFPeA	93,3	2,7	89	5,7	91,6	0,8	101	5,4	104	1,4	84	4
PFHxA	90,8	1,9	100	6,8	90,6	1,9	105	2,4	95,8	1,1	98	2
PFHpA	95,0	2,7	105	5,7	96,3	0,6	103	6,6	106	3,3	102	3
PFOA	98,8	3,4	107	5,0	97,3	1,4	99	5,8	103	1,7	100	6
PFNA	88,0	4,1	102	1,5	97,7	2,1	100	6,6	99,2	2,9	107	4
PFDA	78,2	7,3	92	2,3	95,6	2,3	84	5,3	98,1	1,0	102	3
PFBS	103	2,3	99	1,9	87,8	2,4	86	3,5	109	2,3	84	4
PFHxS	100	1,7	85	4,7	94,3	1,2	92	6,8	103	4,4	81	3
PFOS	75,9	7,4	67	2,5	93,6	3,1	74	6,9	105	1,9	103	10
¹³ C ₄ -PFBA	99,7	-	101	4,5	86,9	1,8	78	6,8	101	4,9	87	2
¹³ C ₂ -PFHxA	101	-	104	5,4	88,4	0,5	89	3,6	98,4	1,4	96	2
¹³ C ₄ -PFOA	97,2	-	105	3,7	91,7	1,8	95	4,8	94,7	1,3	77	5
¹³ C ₄ -PFOS	74,3	-	63	3,5	92,4	2,2	71	3,4	98,2	3,8	125	11
¹³ C ₅ -PFNA	-	-	106	3,2	-	-	84	3,4	96,5	2,5	127	18
¹³ C ₂ -PFDA	-	-	86	0,9	-	-	90	6,4	98,1	1,0	116	5
¹⁸ O ₂ -PFHxS	-	-	-	-	-	-	91	6,9	-	-	86	5
V _P	Probevolumen, in ml											
N	Konzentrationsniveau, Aufstockung in µg/L											
n	Anzahl der parallelen Analysen über das Gesamtverfahren auf dem Konzentrationsniveau N											
A _i	mittlere Wiederfindungsrate für die Substanz i auf dem Konzentrationsniveau N, in %											
s	Standardabweichung der Wiederfindungsrate, in %											
¹)	Zusätzlich im Analysenverfahren											

10 Robustheit

Die hohe Selektivität des Extraktionsverfahrens wirkt sich positiv bei der massenspektrometrischen Detektion aus, die bei den üblichen Proben nur wenig durch Ionensuppression gestört wird. Geringere Wiederfindungsraten der internen Standards und der Analyten können besonders bei den Stoffen PFNA, PFOS und PFDA auftreten. Diese Störungen können von Labor zu Labor unterschiedlich ausfallen und konnten im Rahmen der Validierung nicht vollständig abgestellt werden (siehe Abschnitt 4).

10.1 Extraktion

Die für die Extraktion maßgeblichen Einflussgrößen, wie Phasenverhältnis, Volumenanteil Methanol in der Probe, Volumina bei Waschschritten und Elution, wurden systematisch untersucht und die Arbeitsweise so festgelegt, dass genügend Abstand zu den Grenzbereichen besteht (Abschnitt 7.1).

10.2 Massenspektrometrische Messung

Die Prüfung wurde bei den Stoffen PFOS und PFDA durchgeführt, bei denen die Wiederfindungsraten gelegentlich niedriger ausfallen können. Hierzu wurde kontinuierlich eine Lösung von PFOS bzw. PFDA nach der Säule über ein T-Stück in den Eluenten infundiert. Unter diesen Bedingungen wurden verschiedene Extrakte, u.a. von stark salzhaltigen Oberflächengewässern, analysiert. Dabei konnte weder bei PFOS noch bei PFDA im Elutionsbereich der Stoffe eine Verringerung der Intensität des Grundsignals festgestellt werden, so dass sich kein Hinweis auf Ionensuppression ergibt.

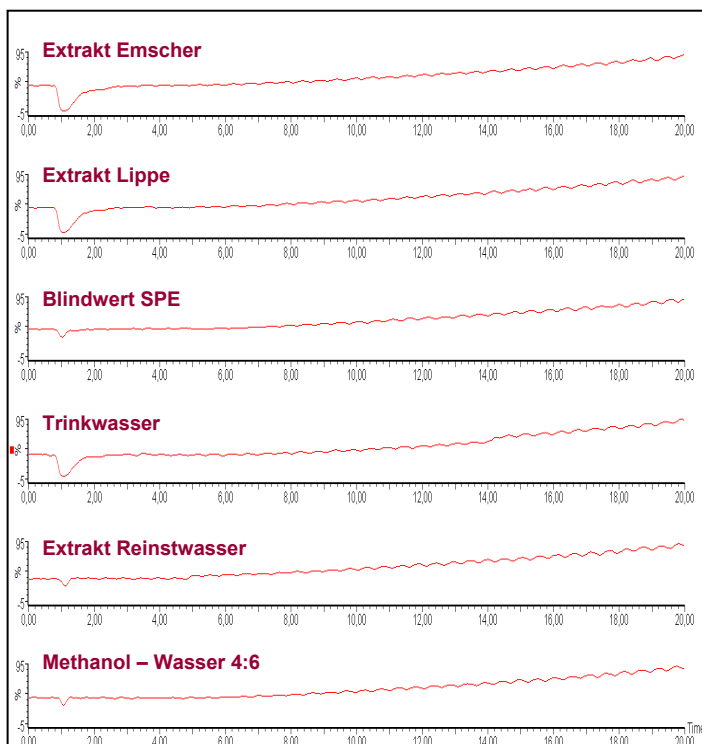


Bild 21 – Prüfung auf Ionensuppression

Säule: Zorbax Eclipse XDB-C18, 3,5 μm , 100 mm x 2 mm, mit Vorsäule Synergi Fusion-RP, 4 μm , 4 mm x 2 mm
Eluent A: 5 mmol NH_4AC -Wasser
Eluent B: 0,05 % Essigsäure in Methanol
Gradient: 35 % B nach 95 % B in 20 min, linear
Fluss: 0,25 ml/min
Temperatur: 40 °C
Injektionsvolumen: jeweils 20 μl
Infusion: ρ (PFOS) = 50 ng/ml
Fluss: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$

Detektion: ESI-MS/MS,

11 Verfahrenskenndaten aus Ringversuchen

11.1 Durchführung

Der Validierungsringversuch zu DIN 38407-42 wurde im Zeitraum vom 13.01.2010 bis 02.02.2010 arbeitskreisintern an 5 Proben durchgeführt:

Probe 1: Standardlösung in Methanol

Probe 2: Trinkwasser, aufgestockt mit den Analyten

Probe 3: Grundwasser, aufgestockt mit den Analyten

Probe 4: Oberflächenwasser, aufgestockt mit den Analyten

Probe 5: Behandeltes Abwasser, aufgestockt mit den Analyten

In jeder Probe waren die folgenden Verbindungen mit jeweils 3 parallelen Messungen bzw. Analysen quantitativ zu bestimmen:

Perfluorbutansäure (PFBA), Perfluorpentansäure (PFPeA), Perfluorhexansäure (PFHxA), Perfluorheptansäure (PFHpA), Perfluoroctansäure (PFOA), Perfluornonansäure (PFNA), Perfluordecansäure (PFDA), Perfluorbutansulfonsäure (PFBS), Perfluorhexansulfonsäure (PFHxS), Perfluoroctansulfonsäure (PFOS).

An der Untersuchung haben 21 Laboratorien teilgenommen, wovon 18 Laboratorien Ergebnisse abgegeben haben.

11.2 Herstellung der Ringversuchsproben

Zur Herstellung der Ringversuchsproben wurden zwei Standardlösungen (A, B) der Firma Wellington Laboratories verwendet (Anlage). Diese Lösungen wurden speziell für den Ringversuch hergestellt. Die Richtigkeit der Massenkonzentrationen der zu bestimmenden PFC in den Lösungen wurde mit einer unabhängigen Standardlösung geprüft und im Bereich der angegebenen Richtigkeit von $\pm 5\%$ bestätigt.

Die Herstellung der Probe 1 erfolgte durch Verdünnung der Lösung A mit Methanol. Die Probe wurde in 1,5-ml-CERTAN-Flaschen abgefüllt und die Flaschen zur Kontrolle der Dichtung ausgewogen. Bei der Rückwaage der Flaschen durch die Teilnehmer ergaben sich in keinem Fall Abweichungen von $> 1\%$ des Prüfgewichtes, so dass Veränderungen der Lösung während des Transportes ausgeschlossen werden können.

Tabelle 23 enthält Angaben zur Herkunft und Beschaffenheit der Ringversuchsproben 2 - 5. Die Originalproben wurden mit 6 parallelen Analysen beim Ringversuchsausrichter auf die Anwesenheit von PFC untersucht. Die Untersuchungen ergaben bei einzelnen PFC Befunde an bzw. oberhalb der Bestimmungsgrenze (0,003 $\mu\text{g/l}$), die bei den Sollwerten berücksichtigt wurden. Bei der Abwasserprobe wurde die Vorbelastung durch ein zweites Labor abgesichert.

Die Proben 2 - 5 wurden in 1000-ml-Glasflaschen mit PE-Schraubverschluss und PE-Dichtung abgefüllt und verschickt.

Tabelle 24 gibt die Sollwerte für die aufgestockten Proben wieder, wobei die Vorbelastungen berücksichtigt sind. Die mit der Dotierung eingestellten Massenkonzentrationen entsprechen den realen Anforderungen der jeweiligen Anwendungsbereiche und liegen teilweise nur wenig oberhalb der unteren Anwendungsgrenze des Verfahrens. Die Summen für

PFOA/PFOS liegen unterhalb bzw. im Bereich des gesundheitlichen Vorsorgewertes (GOW) bzw. bei Abwasser im Bereich des Orientierungswertes einiger Bundesländer.

Tabelle 23 – Herkunft und Beschaffenheit der Ringversuchsproben

	Einheit	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
Probenahme		11.01.2010	10.01.2010	07.01.2010	08.01.2010
pH-Wert		7,94	7,66	8,05	7,74
TOC	mg/l	< 0,5	1,16	4,79	10,3
TNb	mg/l	2,96	< 0,5	3,79	12,1
Leitfähigkeit	mS/m	61	84	52	241
Wasserhärte	°dH	13	25	12	19
Eisen	mg/l	0,026	1,546	1,138	0,263
Mangan	mg/l	0,0012	1,483	0,127	0,203
Calcium	mg/l	75	150	67	110,6
Magnesium	mg/l	12	16	9,8	15
Chlorid	mg/l	59,7	22,4	54,4	468
Sulfat	mg/l	54,8	136	40,3	233
PFBA	µg/l	0,0572	0,0032	0,0067	0,0455
PFPeA	µg/l	0,0037	< 0,0030	< 0,0030	0,0081
PFHxA	µg/l	< 0,0030	< 0,0030	< 0,0030	0,0106
PFHpA	µg/l	< 0,0030	< 0,0030	< 0,0030	0,0060
PFOA	µg/l	< 0,0030	< 0,0030	0,0040	0,0206
PFNA	µg/l	< 0,0030	< 0,0030	< 0,0030	0,0031
PFDA	µg/l	< 0,0030	< 0,0030	< 0,0030	0,0038
PFBS	µg/l	0,0082	< 0,0030	0,0272	0,0162
PFHxS	µg/l	< 0,0030	< 0,0030	< 0,0030	< 0,0030
PFOS	µg/l	0,0030	0,0030	0,0090	0,0208
<i>Probe 2: Trinkwasser, Düsseldorf</i>					
<i>Probe 3: Oberflächennahes Grundwasser, Neuss</i>					
<i>Probe 4: Oberflächenwasser, Rhein, Düsseldorf</i>					
<i>Probe 5: Kläranlagenablauf, Düsseldorf Süd</i>					

Tabelle 24 – Sollwerte der Standardlösung und der aufgestockten Proben

Substanzen	Probe 1 µg/l	Probe 2 µg/l	Probe 3 µg/l	Probe 4 µg/l	Probe 5 µg/l
PFBA	100	0,0858	0,1143	0,1317	0,3312
PFPeA	60	0,0180	0,0667	0,0750	0,1796
PFHxA	20	0,0143	0,0222	0,0250	0,0677
PFHpA	50	0,0286	0,0556	0,0625	0,1488
PFOA	30	0,0143	0,0333	0,0415	0,1063
PFNA	80	0,0429	0,0889	0,1000	0,2317
PFDA	90	0,0286	0,1000	0,1125	0,2609
PFBS	70	0,0462	0,0687	0,1045	0,1928
PFHxS	20	0,0134	0,0211	0,0238	0,0543
PFOS	40	0,0304	0,0455	0,0568	0,1300
Summe (PFOA, PFOS)		0,0447	0,0788	0,0983	0,2363

11.3 Angaben zur Analytik

Zur Extraktion der PFC wurde meistens Strata X-AW verwendet. Nur in drei Fällen kamen andere Festphasenmaterialien (Oasis WAX, Chromabond HR-XAW) zum Einsatz. Die Sorbensmasse betrug überwiegend 60 mg und entsprach den Anforderungen für ein Probenvolumen von 50 ml, das von den meisten Teilnehmern eingesetzt wurde. Vereinzelt wurden auch Kartuschen mit 200 mg Material verwendet, die für dieses Probenvolumen

überdimensioniert sind. Die Anreicherungsfaktoren lagen im Bereich von 10 - 200, vorwiegend wurde um den Faktor 100 angereichert.

Für die chromatographische Trennung wurden häufiger Säulen mit bifunktionaler Selektivität (hydrophil/hydrophob) eingesetzt als die sonst üblichen RP-C18-Phasen. Dabei dominierte die Verwendung von Methanol/Wasser-Gradienten in Gegenwart von Acetatpuffer. Die Injektionsvolumina lagen in einem Bereich von 5 - 100 µl.

Insgesamt kamen 13 verschiedene Tandemmassenspektrometer von 6 verschiedenen Herstellern zum Einsatz. Ein Einfluss der Arbeitsweise, die bei allen Teilnehmern den normativen Vorgaben entsprach, oder des Gerätetyps auf die Ergebnisse konnte nicht festgestellt werden.

Neben den geforderten isotopenmarkierten Standards für PFBA, PFHxA, PFOA und PFOS wurden bei mehr als der Hälfte der Teilnehmer zusätzlich auch entsprechende Standardsubstanzen für PFNA, PFDA und PFHxS für die Quantifizierung verwendet.

11.4 Ergebnisse

11.4.1 Wiederfindungsraten von internen Standardsubstanzen

Bild 22 zeigt die Wiederfindungsraten der verwendeten internen Standardsubstanzen für die Proben 2 - 5 der einzelnen Laboratorien. Nach der Norm müssen die Wiederfindungsraten bei der Untersuchung von Proben in einem Bereich von 50 % - 150 % liegen. Diese Anforderung wurde bei insgesamt 9 Mittelwerten (5 x PFBA, 3 x PFDA und 1 x PFOS) nicht erfüllt. Die entsprechenden Einzelwerte der Laboratorien konnten deshalb bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

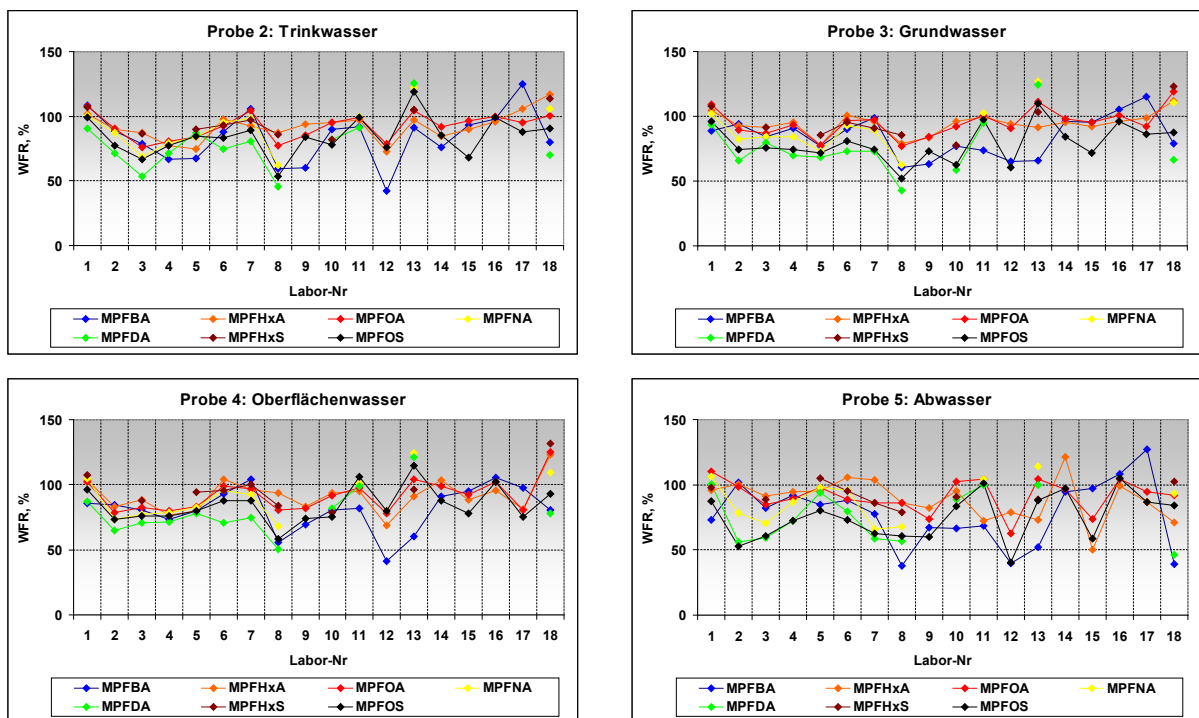


Bild 22 – Wiederfindungsraten der internen Standardsubstanzen

11.4.2 Verfahrenskennndaten

Der Ringversuch wurde ausgewertet nach DIN 38402-42 bzw. DIN/ISO 5725-2. Die Tabellen 25 - 29 geben die Verfahrenskennndaten wieder.

Die Verfahrenskennndaten zeigen, dass der Ringversuch mit wenigen Ausnahmen für alle 5 Proben zufriedenstellend ausgefallen ist.

Die für die HPLC-MS/MS-Messung ermittelten Vergleichsvariationskoeffizienten liegen in einem Bereich von 6,3 % (PFNA) - 13,2 % (PFHpA). Dabei sind Werte von < 10 % als gut und bis zu 15 % als noch akzeptabel zu bewerten (Tabelle 25). Die Wiederfindungsraten und die Wiederholvariationskoeffizienten sind durchweg zufriedenstellend. Auffallend ist der Ausreißeranteil, der für die Untersuchung eines Standards bei einigen Substanzen grundsätzlich zu hoch ausfällt.

Tabelle 25 – Verfahrenskennndaten für die HPLC-MS/MS-Messung (Probe 1)

Substanz	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>n</i> _{AP}	\bar{x}	<i>x</i> _{soll}	<i>η</i>	<i>s</i> _R	<i>CV</i> _R	<i>s</i> _r	<i>CV</i> _r
PFBA	18	54	0,0	0,1030	0,1000	103,1	0,01099	10,7	0,00388	3,8
PFPeA	17	51	5,6	0,0577	0,0600	96,2	0,00573	9,9	0,00318	5,5
PFHxA	16	48	11,1	0,0202	0,0200	100,8	0,00130	6,4	0,00076	3,8
PFHpA	18	54	0,0	0,0502	0,0500	100,4	0,00661	13,2	0,00265	5,3
PFOA	18	54	0,0	0,0320	0,0300	106,7	0,00369	11,5	0,00105	3,3
PFNA	16	48	11,1	0,0788	0,0800	98,5	0,00494	6,3	0,00197	2,5
PFDA	15	45	16,7	0,0862	0,0900	95,8	0,00683	7,9	0,00251	2,9
PFBS	17	51	5,6	0,0633	0,0618	102,4	0,00549	8,7	0,00179	2,8
PFHxS	14	42	17,6	0,0195	0,0190	102,6	0,00145	7,4	0,00041	2,1
PFOS	17	51	5,6	0,0395	0,0382	103,4	0,00471	11,9	0,00113	2,9

<i>l</i>	Anzahl der Laboratorien nach Ausreißereliminierung
<i>n</i>	Anzahl der Analysergebnisse nach Ausreißereliminierung
<i>n</i> _{AP}	Ausreißeranteil in %
\bar{x}	Gesamtmittelwert aller ausreißerfreien Analysenwerte im Ringversuch in µg/ml (Probe 1) bzw. µg/l (Proben 2 bis 5)
<i>x</i> _{soll}	Sollwert in µg/ml (Probe 1) bzw. µg/l (Proben 2 bis 4)
<i>η</i>	Wiederfindungsrate in %
<i>s</i> _R	Vergleichsstandardabweichung in µg/ml bzw. µg/l
<i>CV</i> _R	Vergleichsvariationskoeffizient in %
<i>s</i> _r	Wiederholstandardabweichung in µg/ml bzw. µg/l
<i>CV</i> _r	Wiederholvariationskoeffizient in %

Infolge der Probenvorbereitung fallen die Vergleichsvariationskoeffizienten bei der Probe 2 erwartungsgemäß höher aus als bei der Probe 1. Tabelle 26 zeigt, dass die Werte meist unter 20 % liegen, was angesichts der geringen Massenkonzentrationen bemerkenswert ist. Für die höheren Vergleichsvariationskoeffizienten bei PFDA, PFBS und PFOS gibt es zunächst keine Erklärung. Auffallend sind hier die zum Teil höheren Wiederholstandardabweichungen, die auf eine zu hohe Streuung der Einzelwerte bei der MS/MS-Messung schließen lassen. Die Wiederfindungsraten sind mit wenigen Ausnahmen zufriedenstellend. Für die geringere Wiederfindungsrate von PFDA dürften Verluste durch Sorption an der Gefäßwandung verantwortlich sein. Für den Überbefund bei PFBS können die Messunsicherheit der Vorbelastung oder Blindwerte/Peaküberlagerung mögliche Erklärungen sein.

Tabelle 26 – Verfahrenskennndaten für die Matrix Trinkwasser (Probe 2)

Substanz	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>n</i> _{AP}	\bar{x}	<i>x</i> _{soll}	<i>η</i>	<i>s</i> _R	<i>CV</i> _R	<i>s</i> _f	<i>CV</i> _f
PFBA	15	45	11,8	0,0886	0,0858	103,3	0,00956	10,8	0,00438	4,9
PFPeA	17	51	5,6	0,0169	0,0180	94,2	0,00290	17,1	0,00114	6,7
PFHxA	18	54	0,0	0,0157	0,0143	110,0	0,00221	14,1	0,00081	5,1
PFHpA	16	48	11,1	0,0275	0,0286	96,0	0,00385	14,0	0,00217	7,9
PFOA	17	51	5,6	0,0145	0,0143	101,6	0,00239	16,5	0,00104	7,1
PFNA	16	48	11,1	0,0419	0,0429	97,6	0,00395	9,4	0,00194	4,6
PFDA	17	51	0,0	0,0264	0,0286	92,3	0,00731	27,7	0,00344	13,0
PFBS	16	48	11,1	0,0549	0,0462	118,8	0,01498	27,3	0,00235	4,3
PFHxS	16	48	11,1	0,0142	0,0134	106,0	0,00224	15,7	0,00086	6,0
PFOS	17	51	5,6	0,0293	0,0304	96,2	0,00675	23,1	0,00411	14,0

Legende siehe Tabelle 25

Zufriedenstellend sind auch die Vergleichsvariationskoeffizienten für die Matrix Grundwasser (Tabelle 27) und Oberflächenwasser (Tabelle 28), die abgesehen von PFDA unter 20 % liegen. Beide Proben zeigten einen ungewöhnlich hohen Anteil an Schwebstoffen, der vermutlich für die geringeren Wiederfindungsraten der Stoffe PFDA, PFNA und PFOS verantwortlich ist. Für diese Stoffe konnten im Rahmen der Validierung Verluste durch Sorption an die Gefäßwand nachgewiesen werden, die bei PFDA bis zu 15 % betragen können.

Der hohe Ausreißeranteil bei PFBA von 23 % in der Probe 4 ist eine Folge der hohen Streuungen der Einzelwerte, die das Gesamtbild des Ringversuches etwas trüben.

Tabelle 27 – Verfahrenskennndaten für die Matrix Grundwasser (Probe 3)

Substanz	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>n</i> _{AP}	\bar{x}	<i>x</i> _{soll}	<i>η</i>	<i>s</i> _R	<i>CV</i> _R	<i>s</i> _f	<i>CV</i> _f
PFBA	18	54	0,0	0,1152	0,1143	100,8	0,01122	9,7	0,00513	4,5
PFPeA	15	45	16,7	0,0646	0,0667	96,8	0,00931	14,4	0,00212	3,3
PFHxA	16	48	11,1	0,0221	0,0222	99,6	0,00283	12,8	0,00088	4,0
PFHpA	15	45	16,7	0,0524	0,0556	94,2	0,00764	14,6	0,00239	4,6
PFOA	17	51	5,6	0,0352	0,0333	105,8	0,00592	16,8	0,00143	4,1
PFNA	17	51	5,6	0,0824	0,0889	92,7	0,00830	10,1	0,00398	4,8
PFDA	17	51	0,0	0,0857	0,1000	85,7	0,02196	25,6	0,00736	8,6
PFBS	17	51	5,6	0,0757	0,0687	110,2	0,01250	16,5	0,00599	7,9
PFHxS	17	51	5,6	0,0217	0,0211	103,0	0,00319	14,7	0,00157	7,2
PFOS	17	51	5,6	0,0428	0,0455	94,1	0,00720	16,8	0,00262	6,1

Legende siehe Tabelle 25

Tabelle 28 – Verfahrenskennndaten für die Matrix Oberflächenwasser (Probe 4)

Substanz	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>n</i> _{AP}	\bar{x}	<i>x</i> _{soll}	<i>η</i>	<i>s</i> _R	<i>CV</i> _R	<i>s</i> _f	<i>CV</i> _f
PFBA	13	39	23,5	0,1284	0,1317	97,5	0,01296	10,1	0,00262	2,0
PFPeA	18	54	0,0	0,0729	0,0750	97,2	0,01297	17,8	0,00397	5,4
PFHxA	18	54	0,0	0,0266	0,0250	106,3	0,00305	11,5	0,00114	4,3
PFHpA	16	48	11,1	0,0604	0,0625	96,7	0,00816	13,5	0,00178	3,0
PFOA	15	45	16,7	0,0407	0,0415	98,1	0,00567	13,9	0,00101	2,5
PFNA	16	48	11,1	0,0929	0,1000	92,9	0,01020	11,0	0,00336	3,6
PFDA	15	45	16,7	0,0921	0,1125	81,9	0,01873	20,3	0,00436	4,7
PFBS	15	45	16,7	0,1063	0,1045	101,7	0,01837	17,3	0,00383	3,6
PFHxS	18	54	0,0	0,0277	0,0238	116,4	0,00536	19,3	0,00253	9,1
PFOS	18	54	0,0	0,0529	0,0568	93,2	0,00993	18,8	0,00348	6,6

Legende siehe Tabelle 25

Tabelle 29 gibt die Verfahrenskenndaten für die Probe 5 des Ringversuches (behandeltes Abwasser) wieder.

Insgesamt gesehen sind die Vergleichsvariationskoeffizienten für die Matrix Abwasser zufriedenstellend. Der höhere Wert für PFBS ist auf Störungen durch Begleitstoffe zurückzuführen, die bei einigen Laboren, wahrscheinlich abhängig von den chromatographischen Bedingungen, auftraten. In diesen Fällen musste zur Quantifizierung der weniger empfindliche, zweite Massenübergang herangezogen werden. Des Weiteren auffallend sind die geringeren Wiederfindungsraten bei den Stoffen PFNA, PFDA und PFOS, die größtenteils auf Sorption zurückzuführen sein sollten.

Tabelle 29 - Verfahrenskenndaten für die Matrix behandeltes Abwasser (Probe 5)

Substanz	<i>l</i>	<i>n</i>	n_{AP}	\bar{x}	x_{soll}	η	s_R	CV_R	s_f	CV_f
PFBA	15	45	0,0	0,3279	0,3312	99,0	0,03543	10,8	0,02118	6,5
PFPeA	16	48	11,1	0,1696	0,1796	94,4	0,04820	28,4	0,00582	3,4
PFHxA	15	45	16,7	0,0657	0,0677	97,1	0,00579	8,8	0,00147	2,2
PFHpA	15	45	16,7	0,1410	0,1488	94,7	0,02676	19,0	0,00579	4,1
PFOA	16	48	11,1	0,0988	0,1063	92,9	0,01229	12,4	0,00328	3,3
PFNA	17	51	5,6	0,2066	0,2317	89,2	0,02865	13,9	0,00965	4,7
PFDA	15	45	11,8	0,2153	0,2609	82,5	0,05185	24,1	0,01176	5,5
PFBS	17	51	5,6	0,2125	0,1928	110,2	0,06747	31,7	0,00941	4,4
PFHxS	17	51	5,6	0,0592	0,0543	108,9	0,01113	18,8	0,00324	5,5
PFOS	15	45	11,8	0,1172	0,1300	90,2	0,01660	14,2	0,00520	4,4

Legende siehe Tabelle 25

Bild 23 zeigt, dass die Ausreißeranteile hauptsächlich von Ausreißern des Typs C (zu hohe laborinterne Standardabweichung der Einzelwerte) geprägt werden und diese Ausreißer im Wesentlichen bei 4 Laboratorien auftreten. Sie sind weder für das Verfahren typisch und kaum substanzspezifisch, wie aus Bild 24 hervorgeht. Der Einfluss von Matrix kann hierfür nicht allein ausschlaggebend sein, da der Ausreißeranteil dieses Typs bereits bei der Standardlösung auffallend ist (Bild 25). Vielmehr ist zu vermuten, dass die hohen laborinternen Wiederholstandardabweichungen auf nicht optimale Konditionen des Massenspektrometers, z. B. wegen Verschmutzung, zurückzuführen sind.

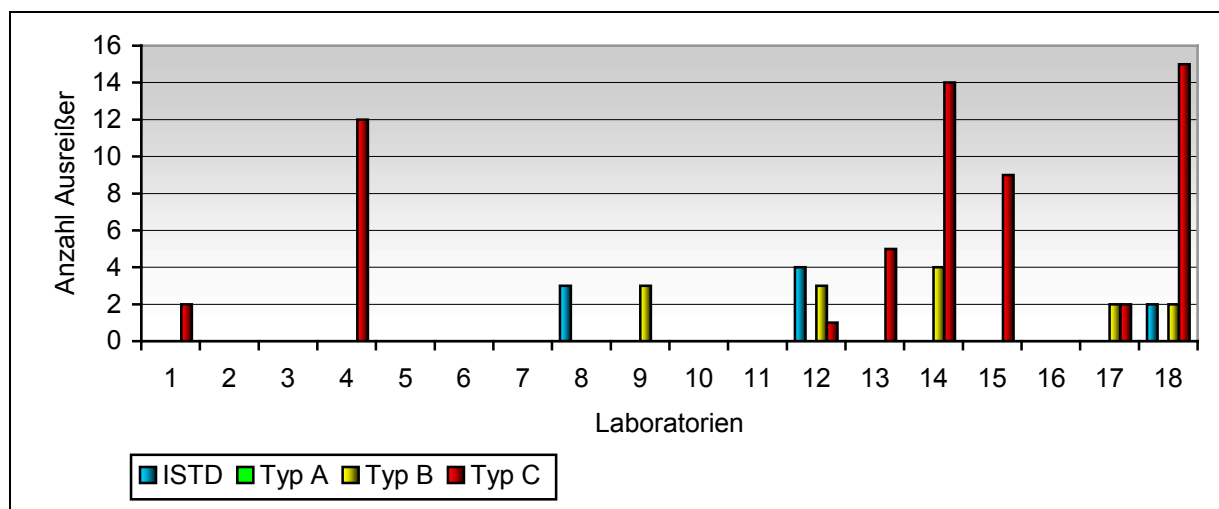


Bild 23 – Anzahl von Ausreißerwerten je Labor

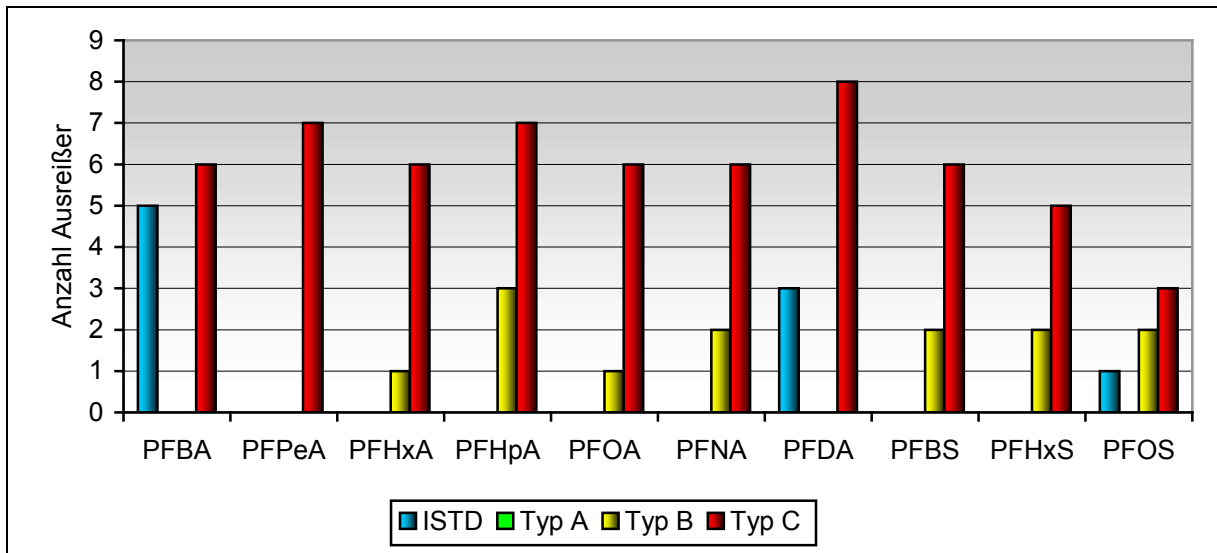


Bild 24 – Anzahl von Ausreißern bei Analyten

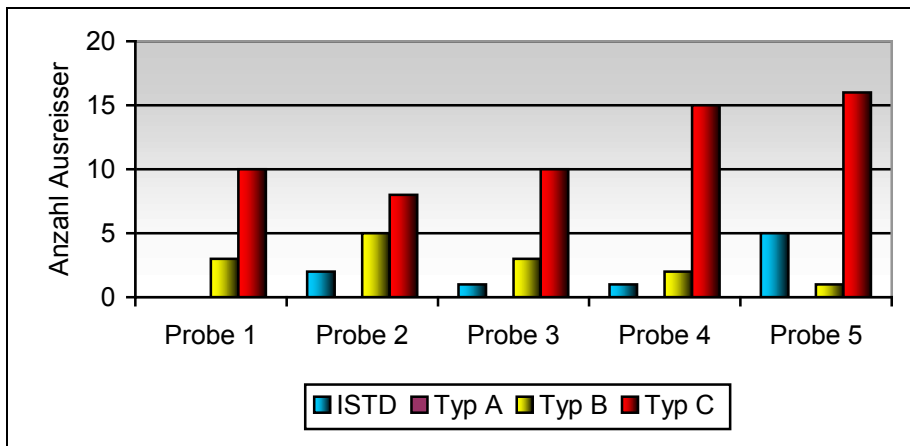


Bild 25 – Anzahl von Ausreißern bei Proben

Das häufige Auftreten von Ausreißern des Typs C könnte damit zusammenhängen, dass nur drei Parallelbestimmungen durchgeführt wurden. Bei einer Anzahl von vier Parallelbestimmungen fällt der Test auf Ausreißer Typ A (abweichender Einzelwert eines Labors) häufiger signifikant aus, da die berechnete Laborstandardabweichung einen kleineren Wert annimmt. Allerdings werden Ausreißer vom Typ A auch dann nur erkannt, wenn die übrigen Einzelwerte relativ dicht beieinander liegen, wie z.B. bei den Ergebnissen von Labor 04 in Bild 26.9.

11.5 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Ausreißerwerte sind in den Graphiken kenntlich gemacht.

11.5.1 Graphiken zu Probe 1 – Standardlösung

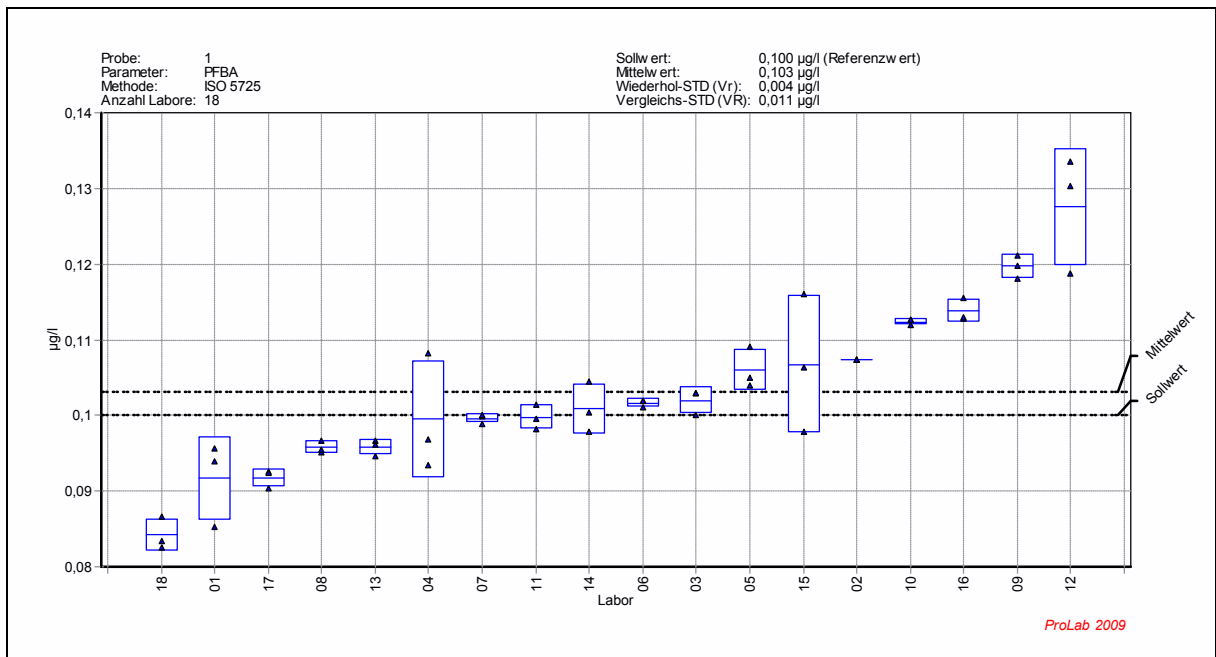


Bild 26.1 – PFBA, Probe 1

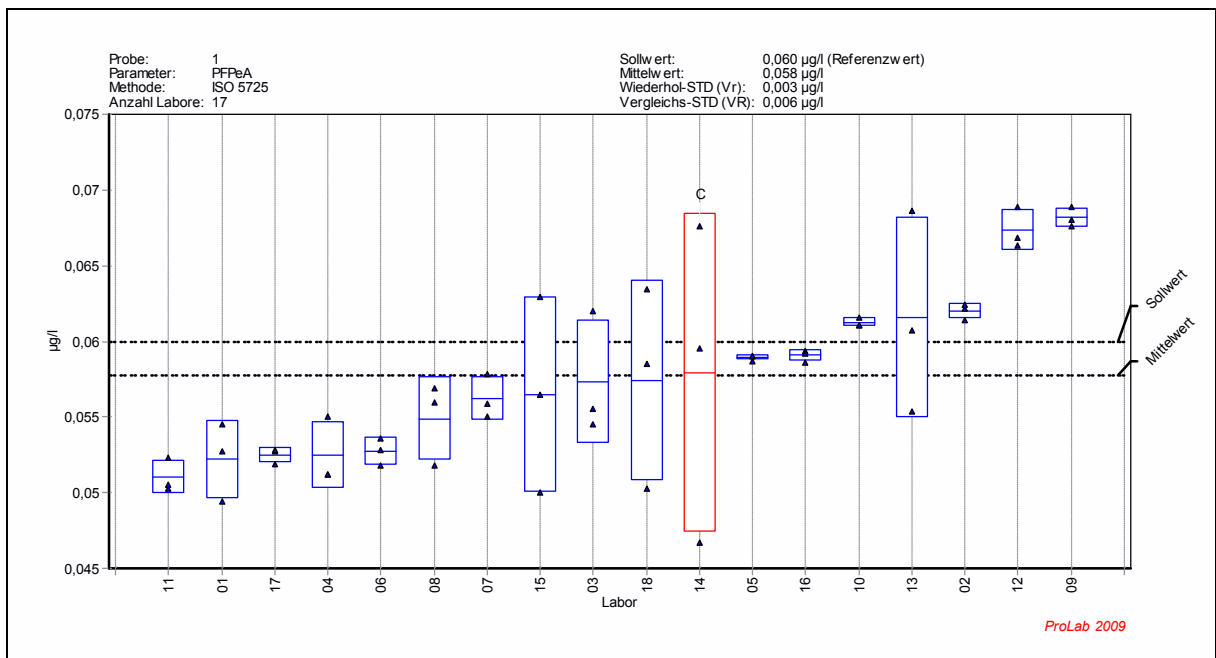


Bild 26.2 – PFPeA, Probe 1

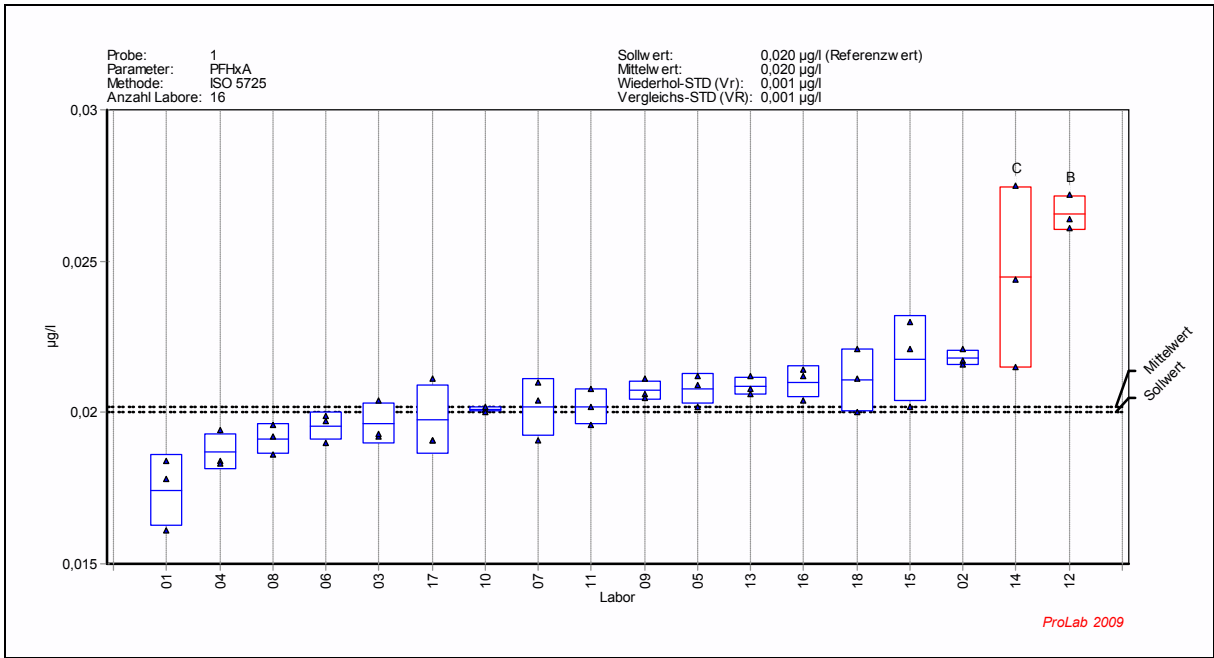


Bild 26.3 – PFHxA, Probe 1

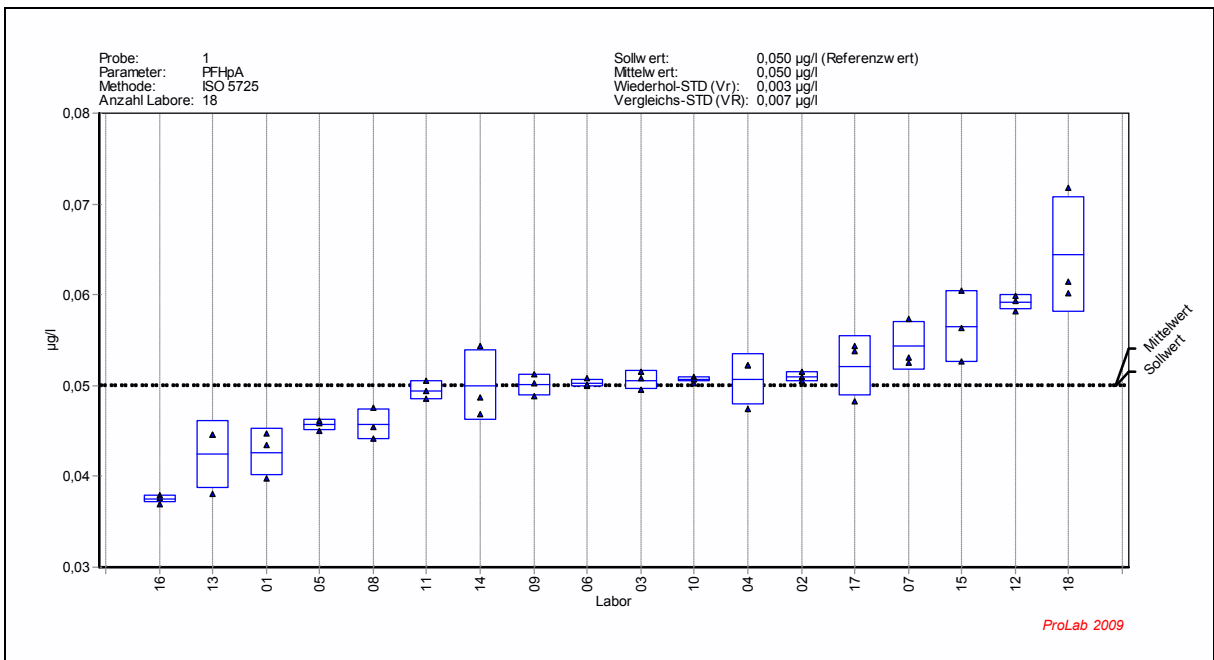


Bild 26.4 – PFHpA, Probe 1

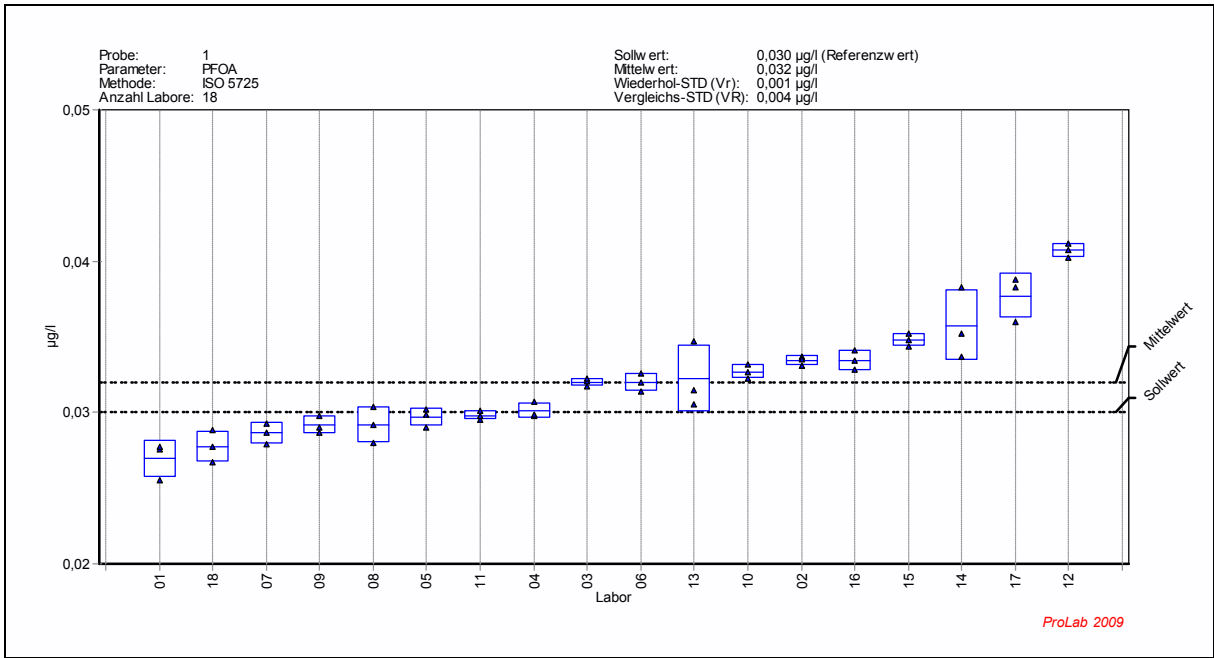


Bild 26.5 – PFOA, Probe 1

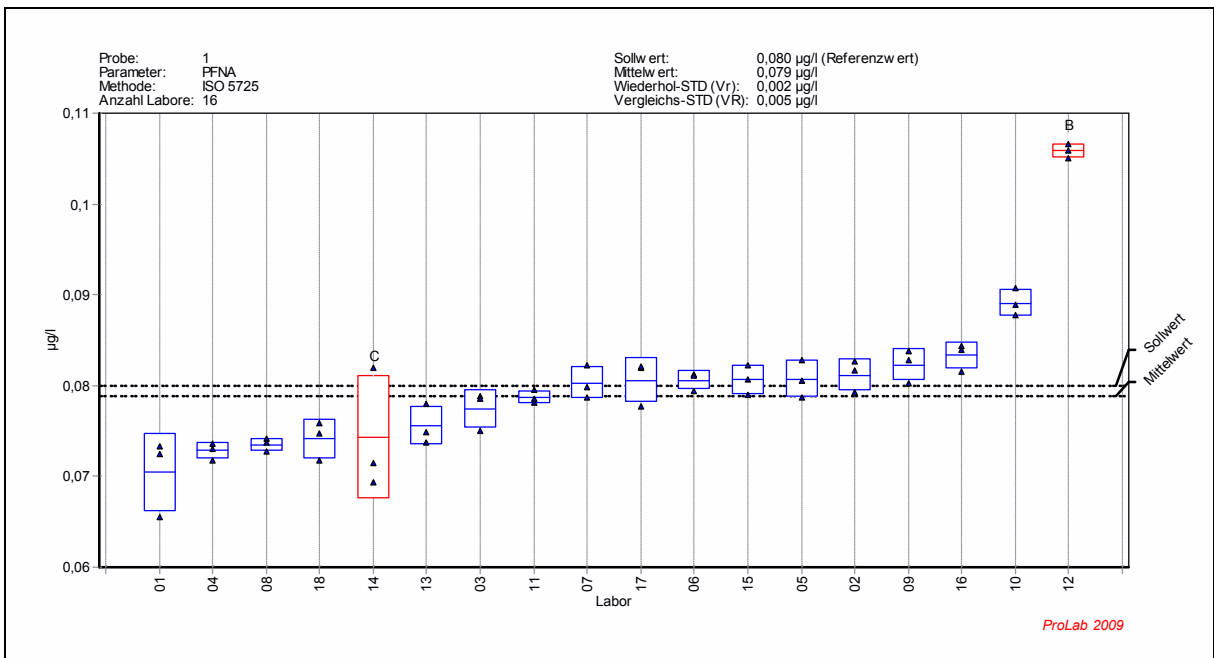


Bild 26.6 – PFNA, Probe 1

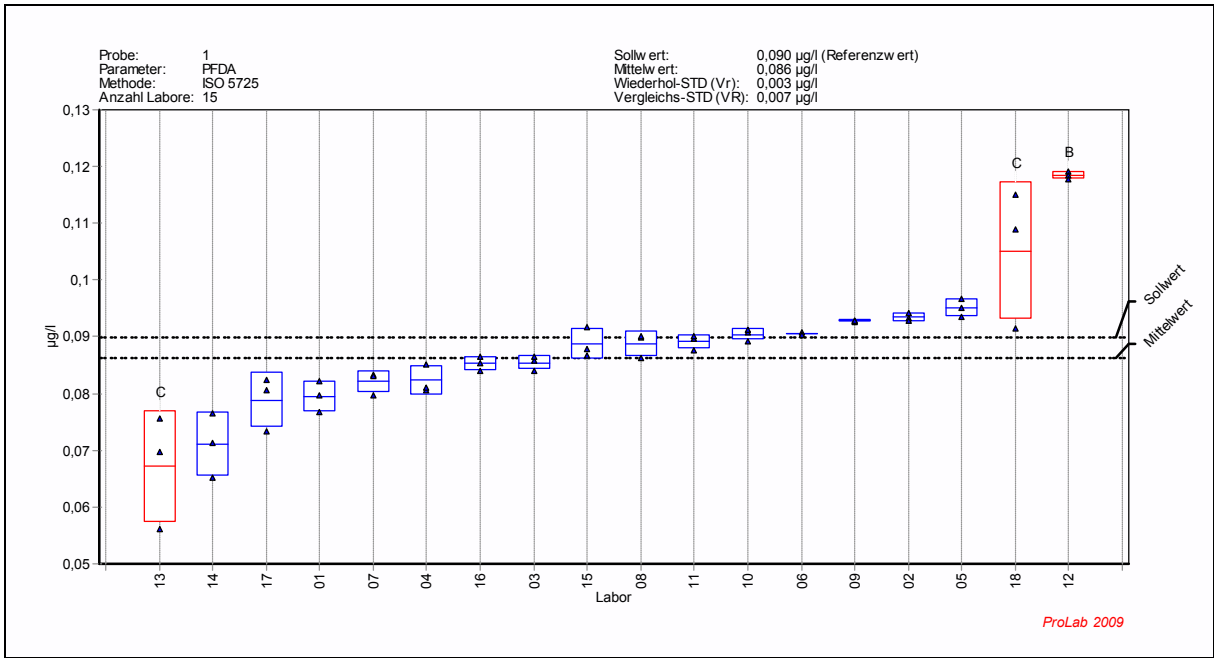


Bild 26.7 – PFDA, Probe 1

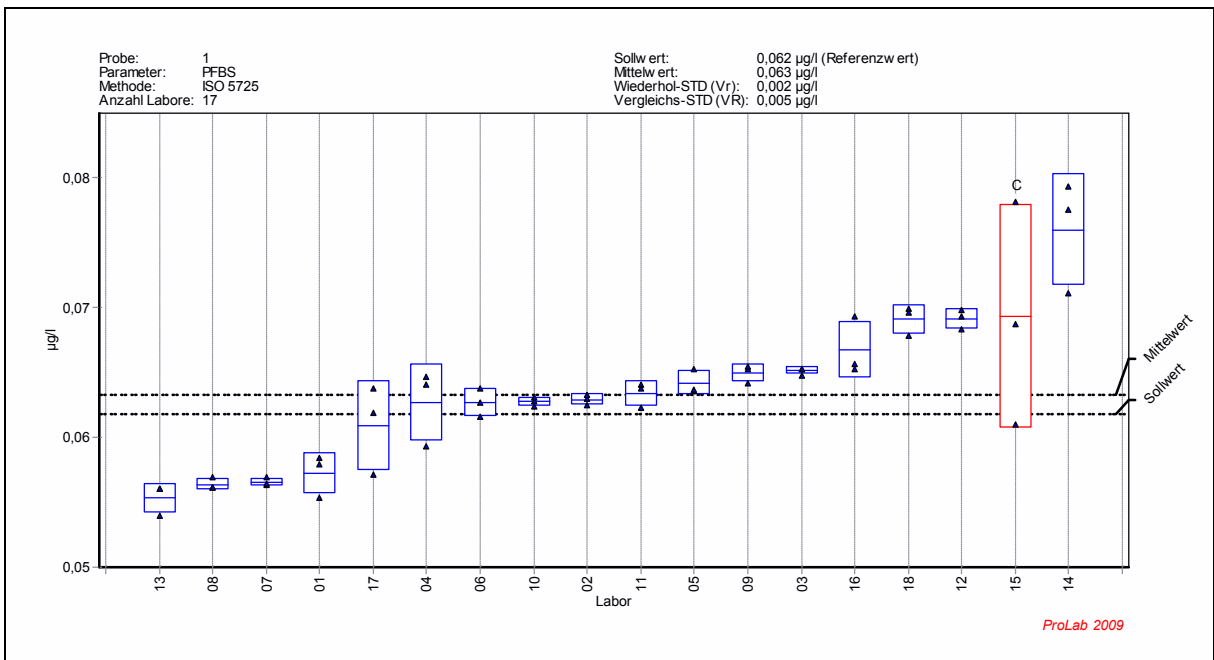


Bild 26.8 – PFBS, Probe 1

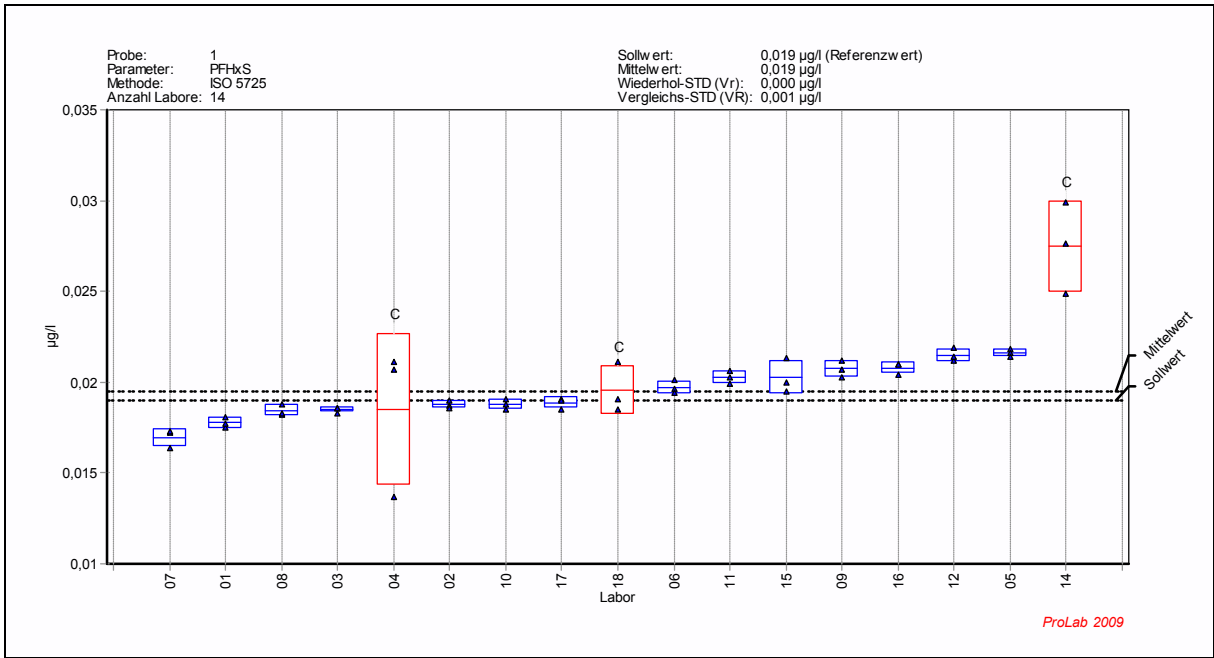


Bild 26.9 – PFHxS, Probe 1

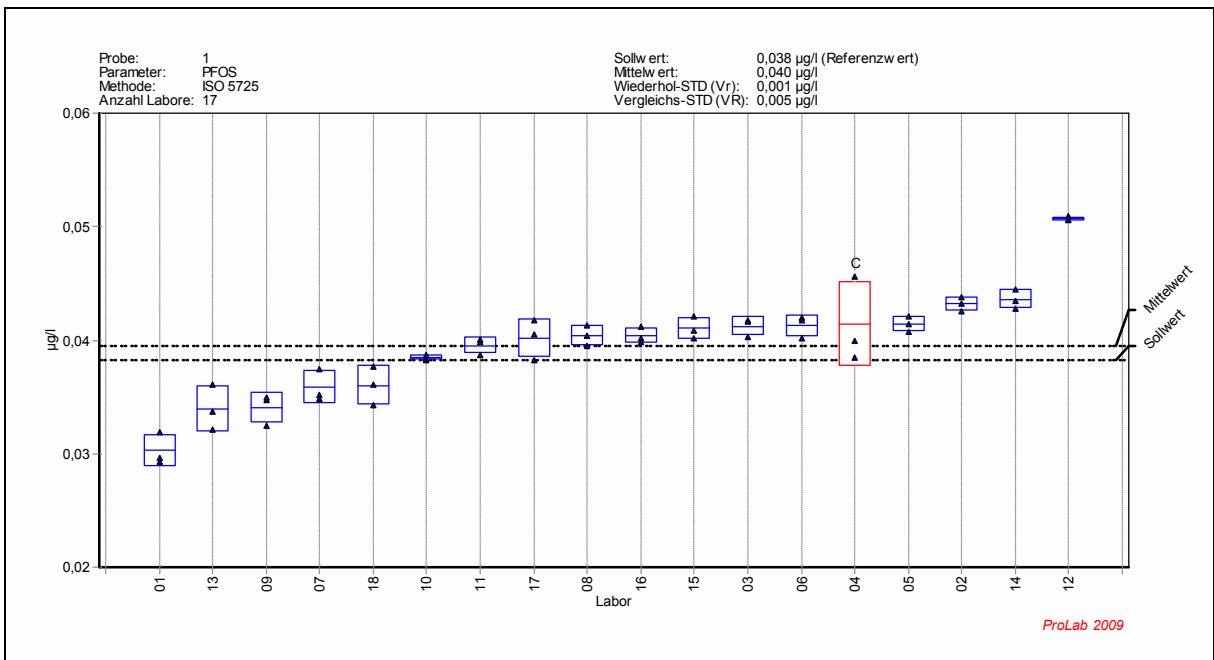


Bild 26.10 – PFOS, Probe 1

11.5.2 Graphiken zu Probe 2 – Trinkwasser

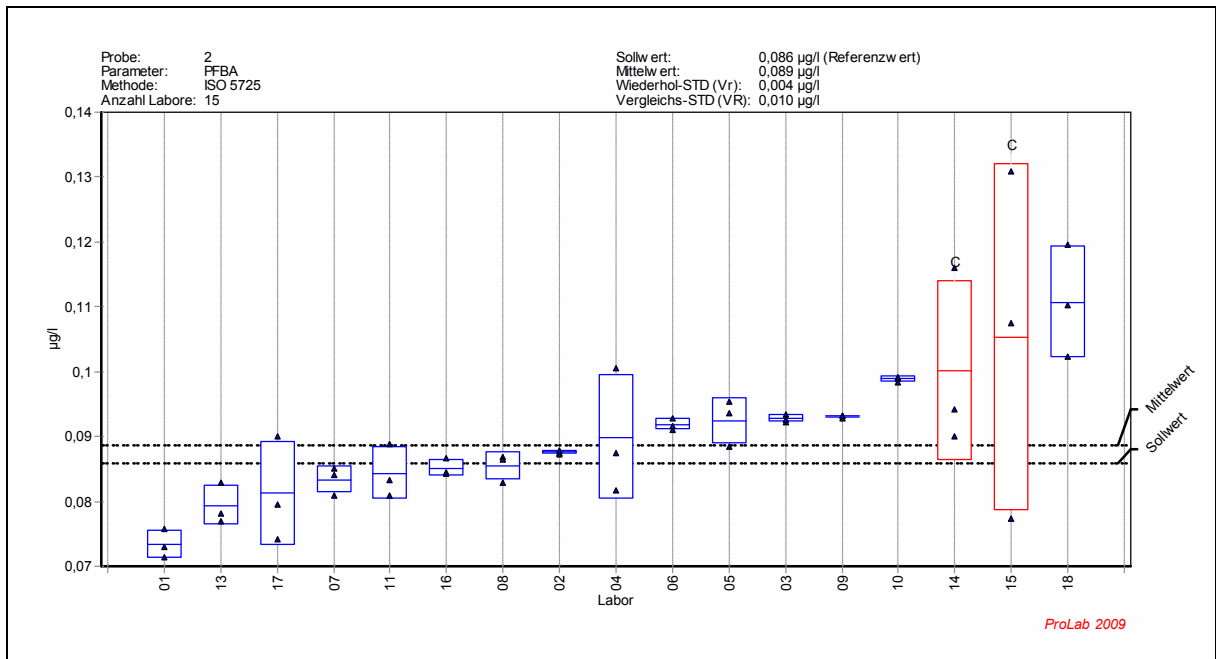


Bild 27.1 – PFBA, Probe 2

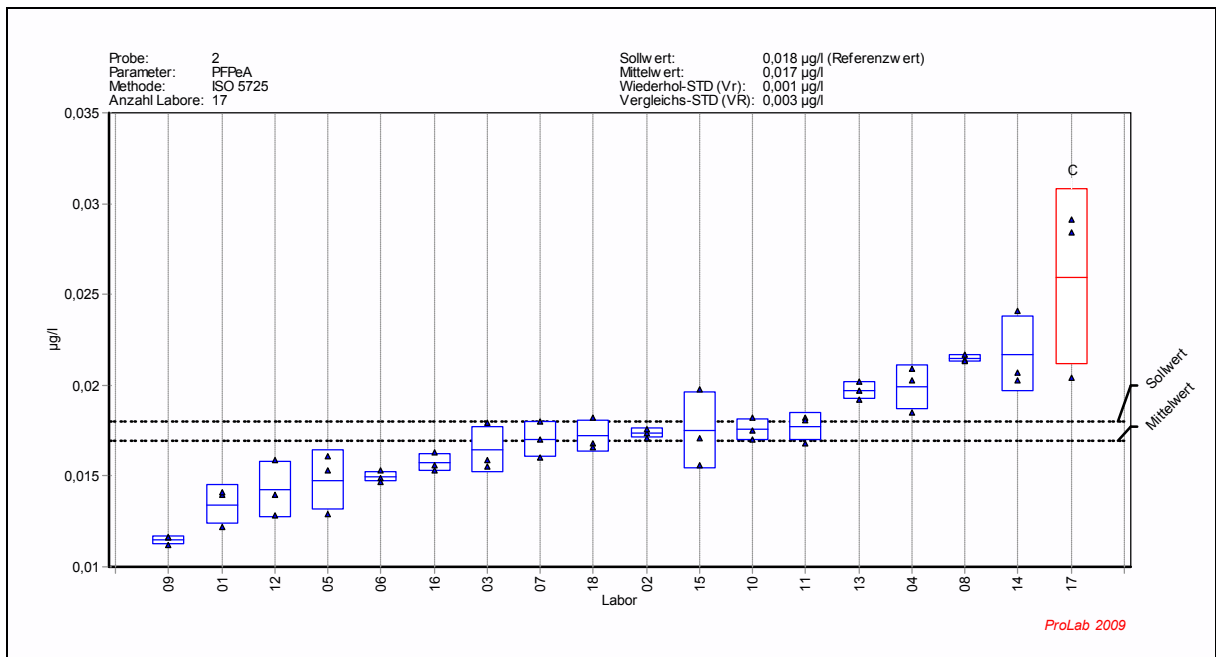


Bild 27.2 – PFPeA, Probe 2

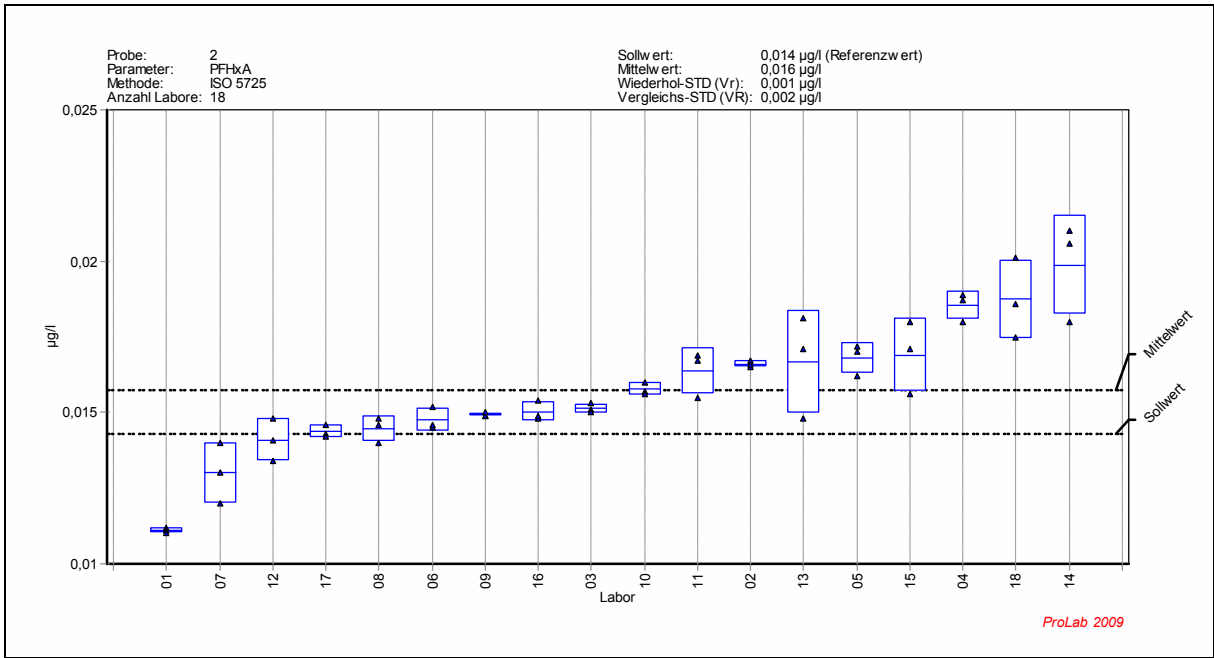


Bild 27.3 – PFHxA, Probe 2

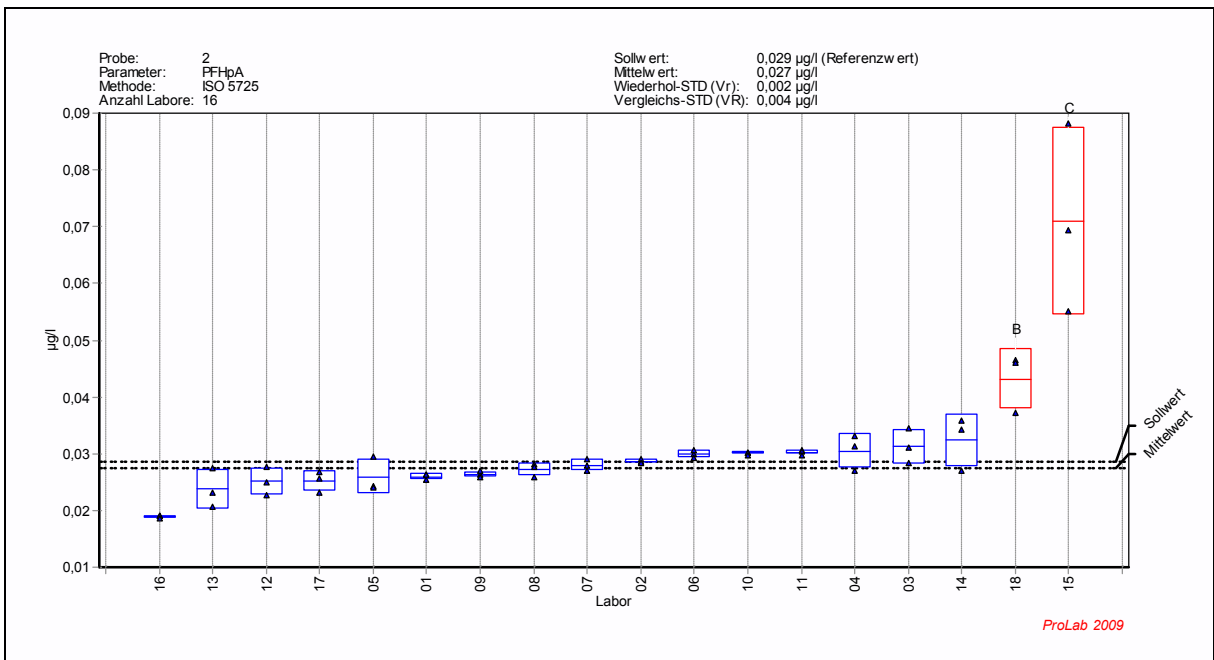


Bild 27.4 – PFHpA, Probe 2

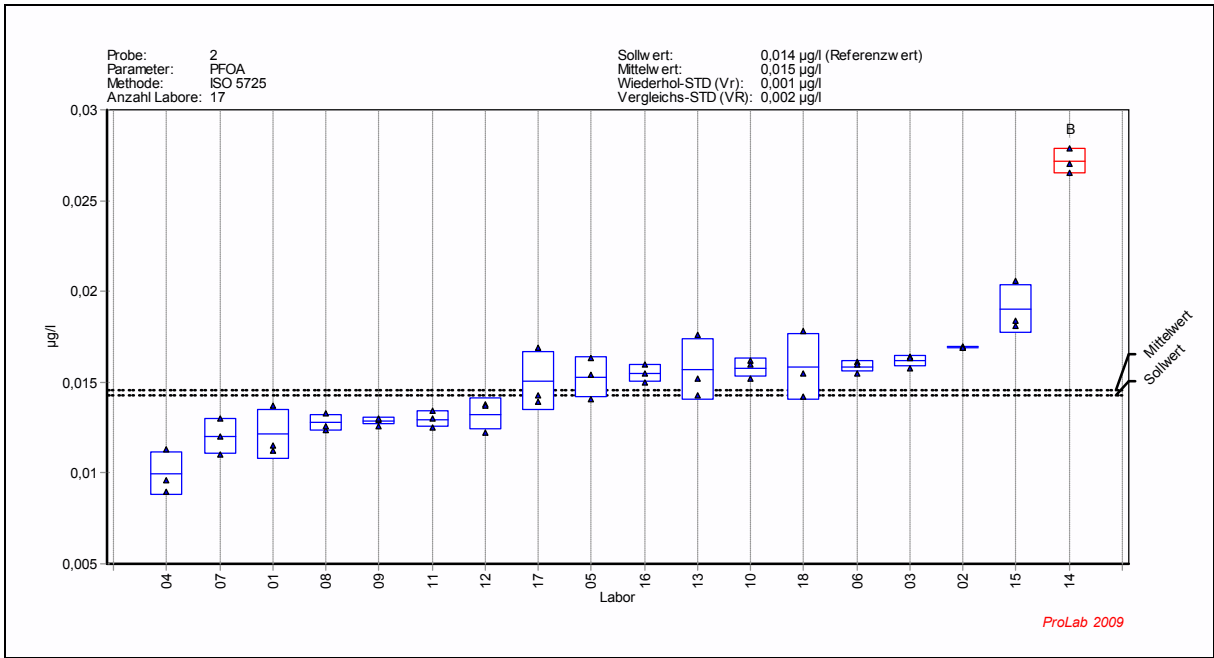


Bild 27.5 – PFOA, Probe 2

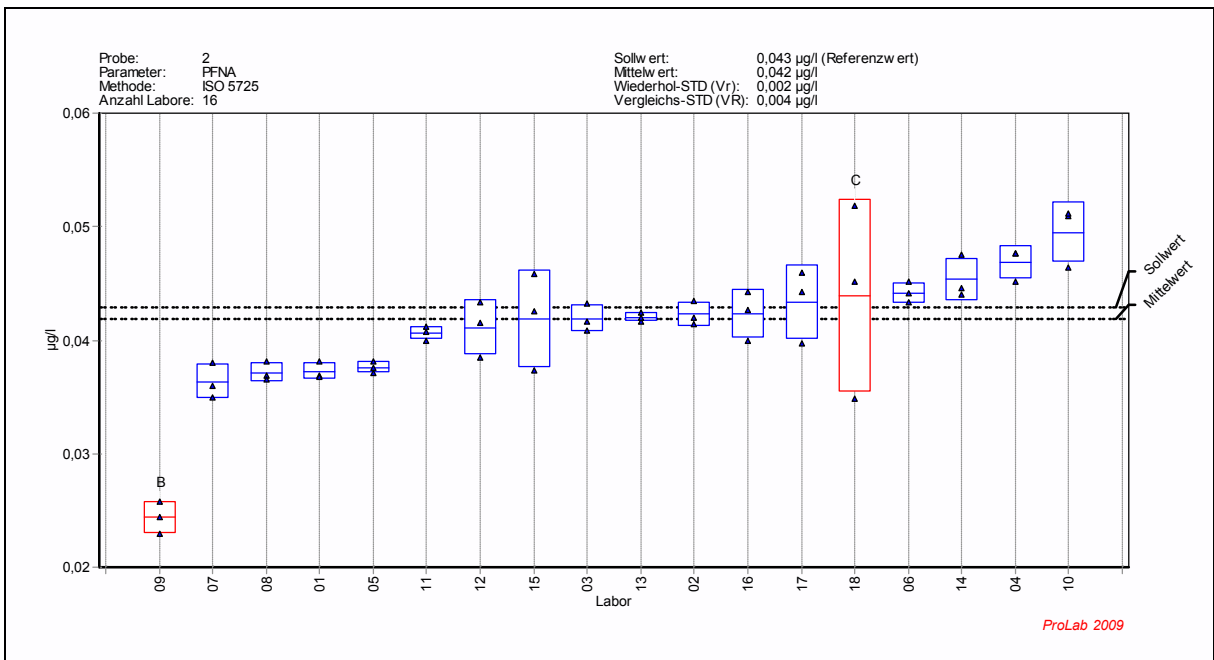


Bild 27.6 – PFNA, Probe 2

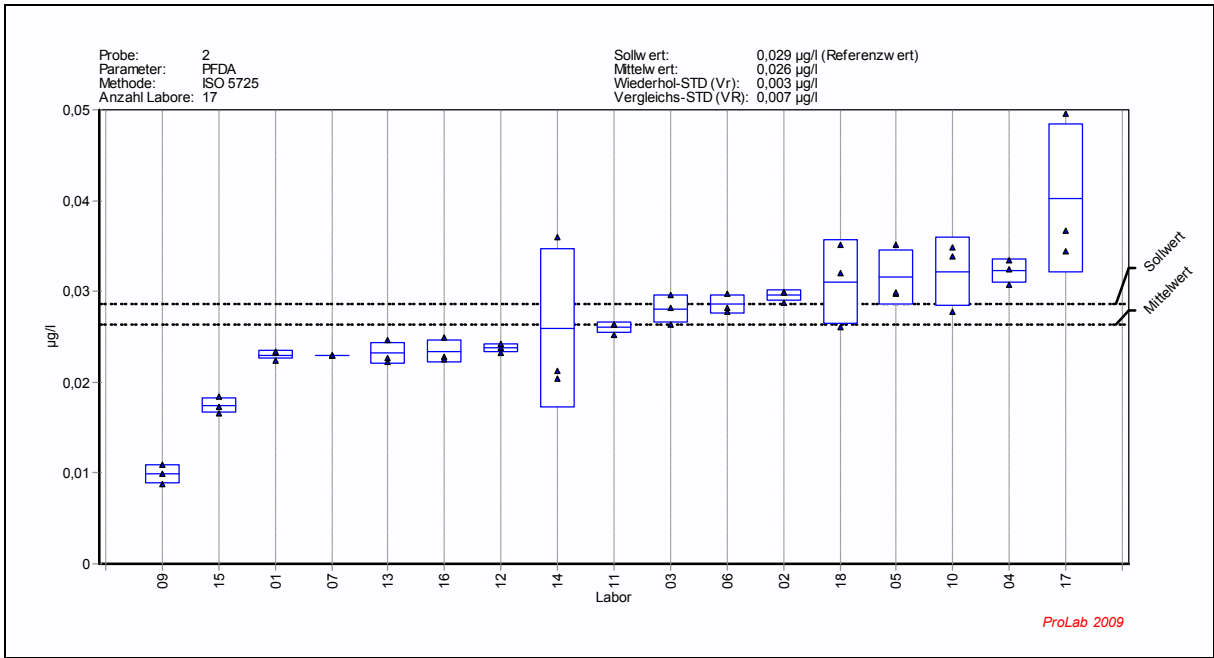


Bild 27.7 – PFDA, Probe 2

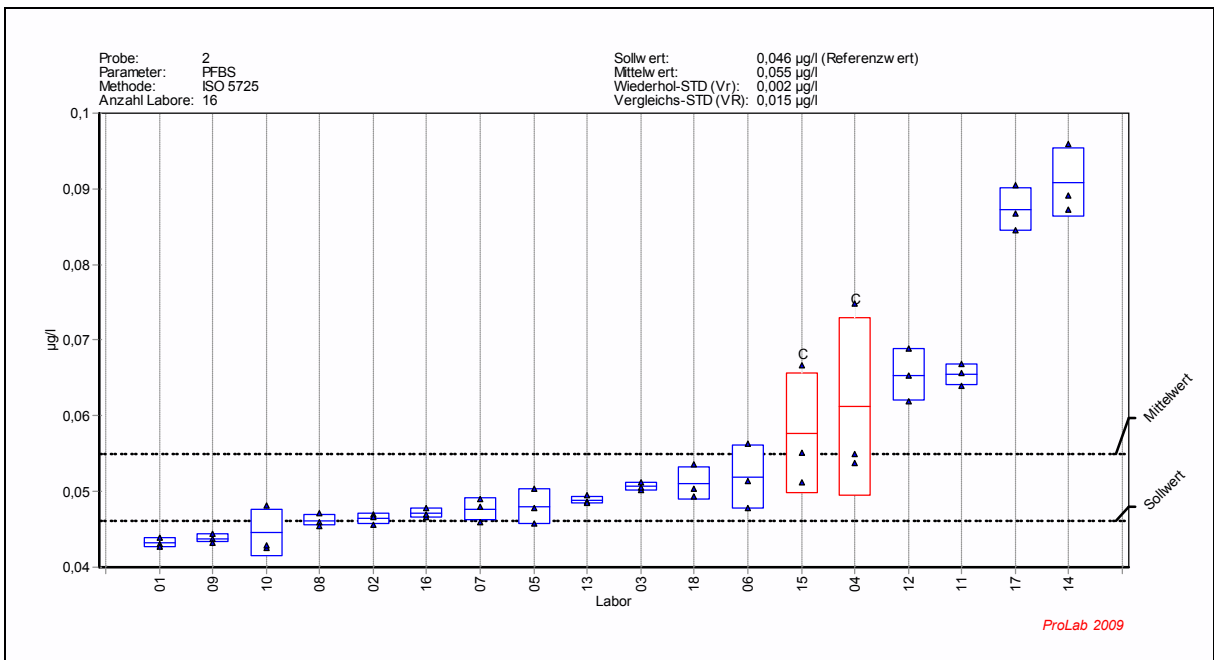


Bild 27.8 – PFBS, Probe 2

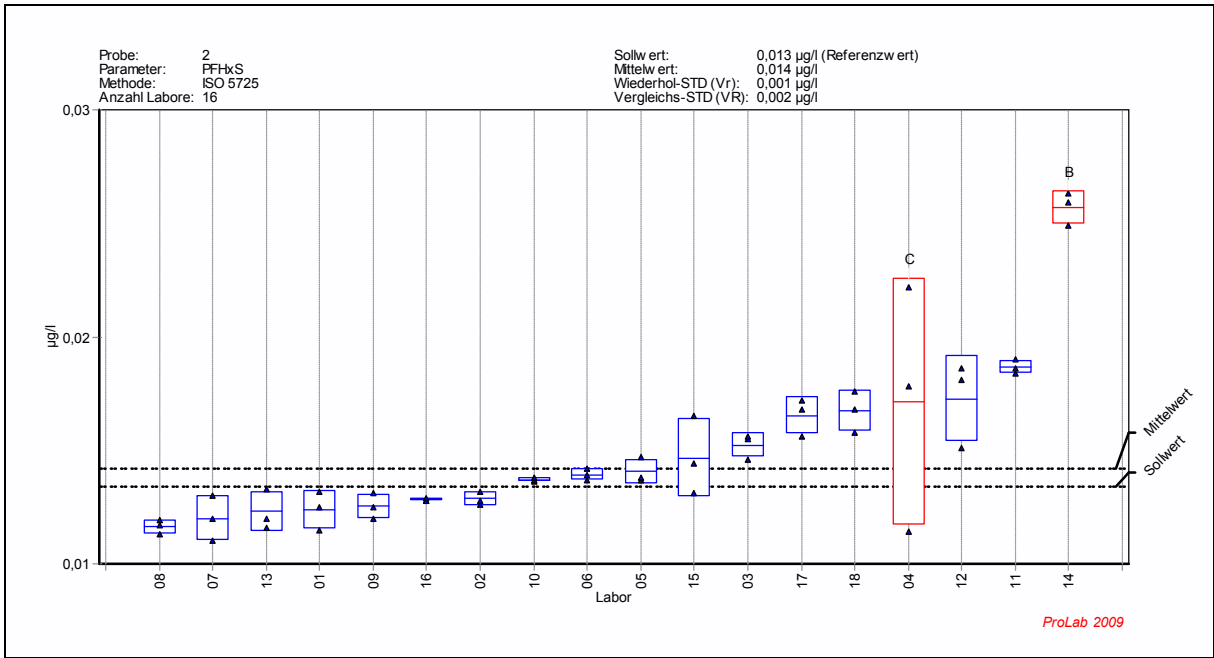


Bild 27.9 – PFHxS, Probe 2

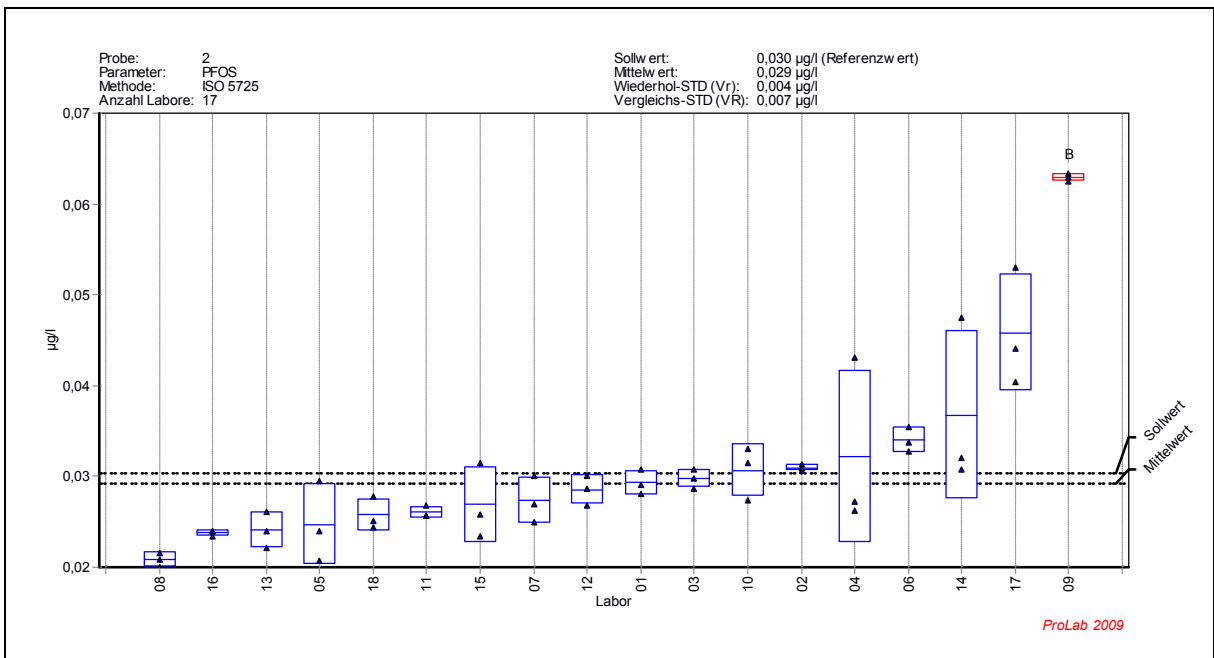


Bild 27.10 – PFOS, Probe 2

11.5.3 Graphiken zu Probe 3 – Grundwasser

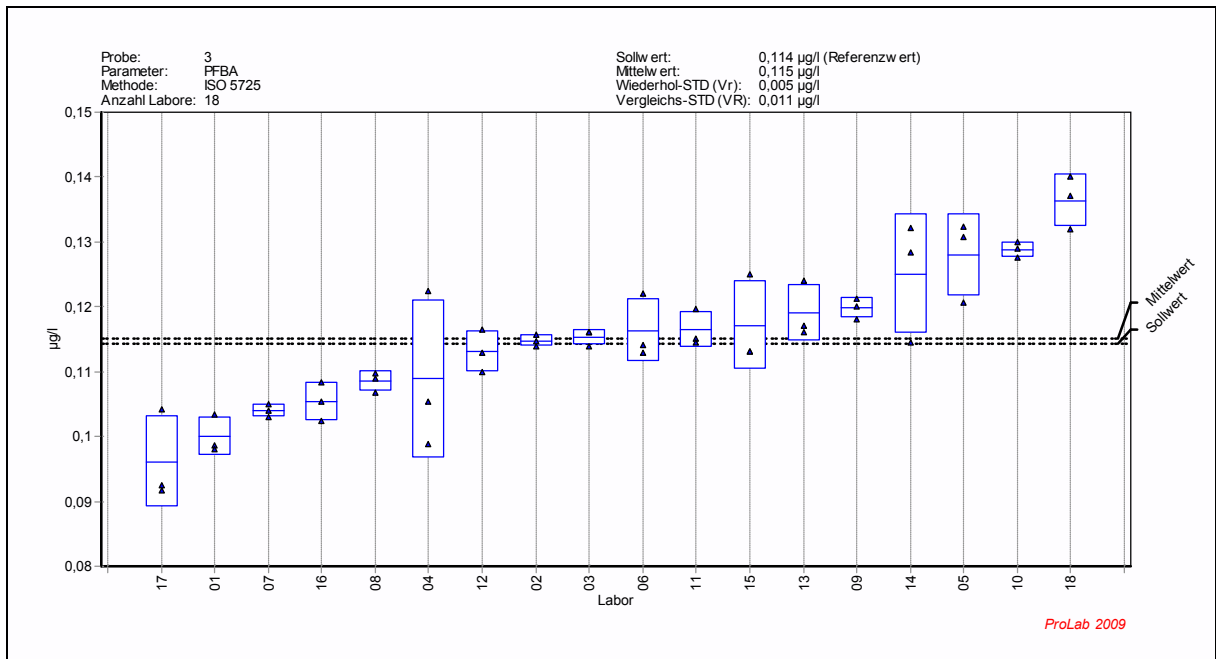


Bild 28.1 – PFBA, Probe 3

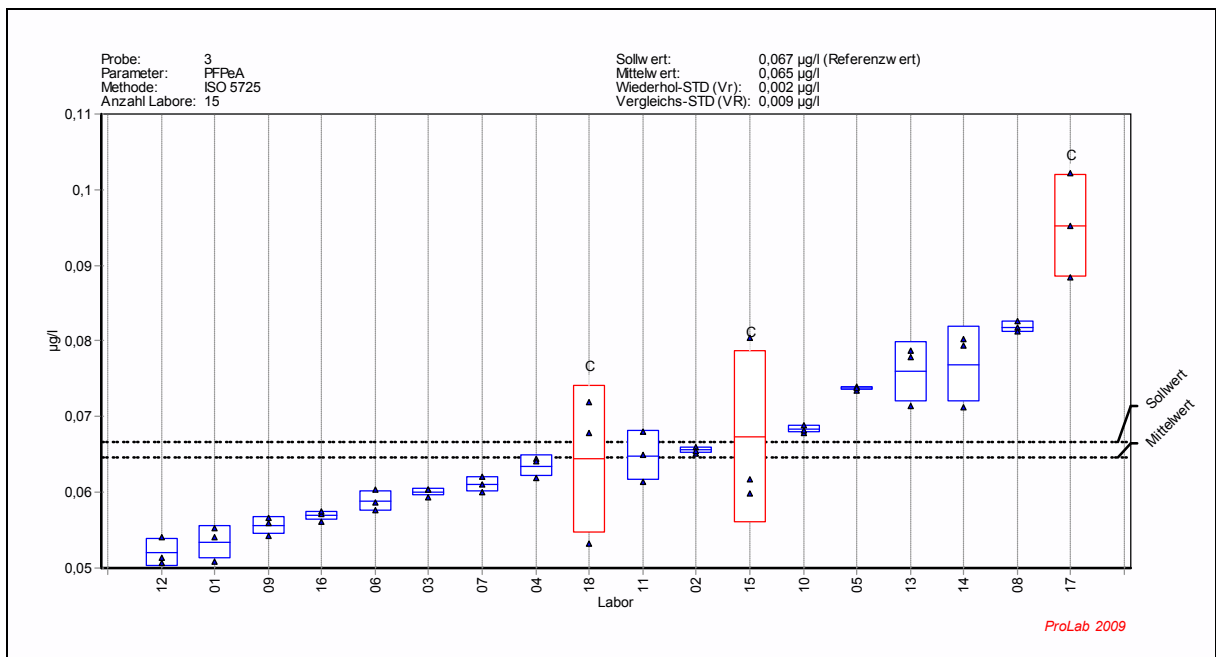


Bild 28.2 – PFPeA, Probe 3

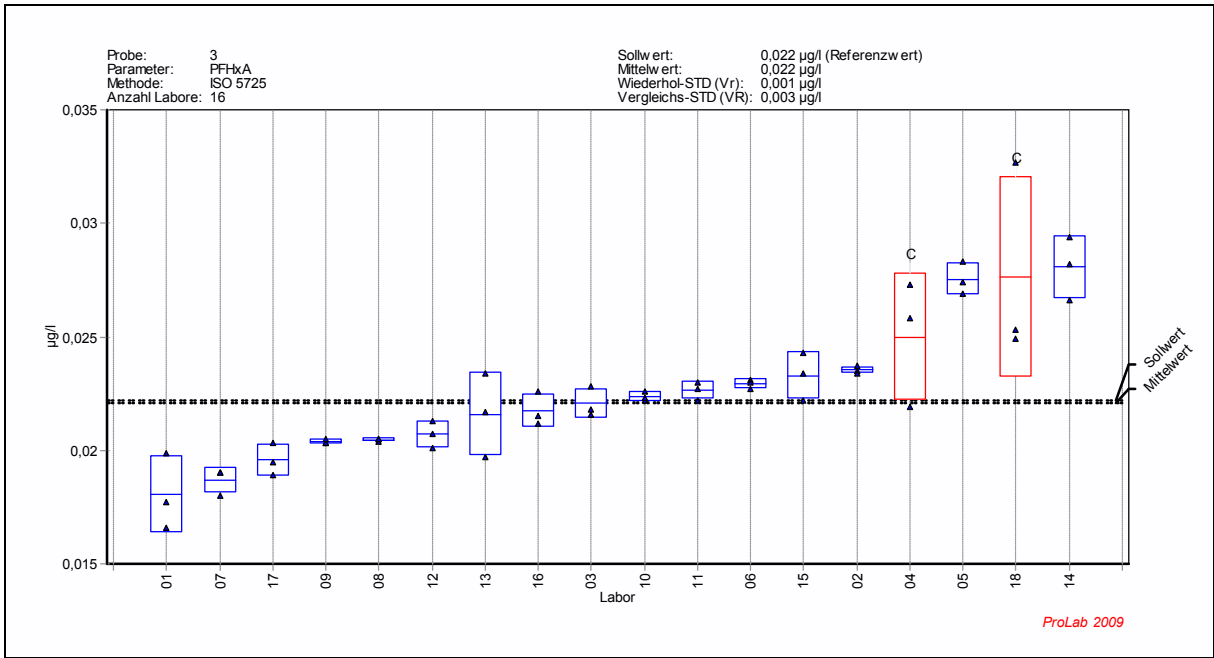


Bild 28.3 – PFHxA, Probe 3

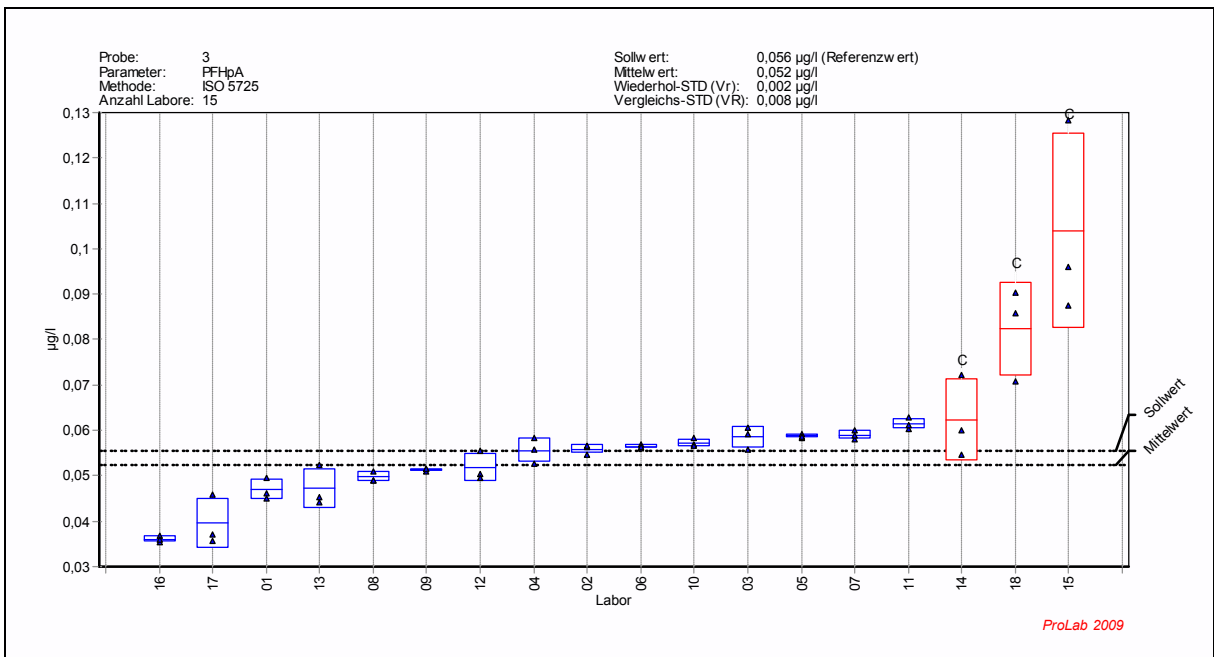


Bild 28.4 – PFHpA, Probe 3

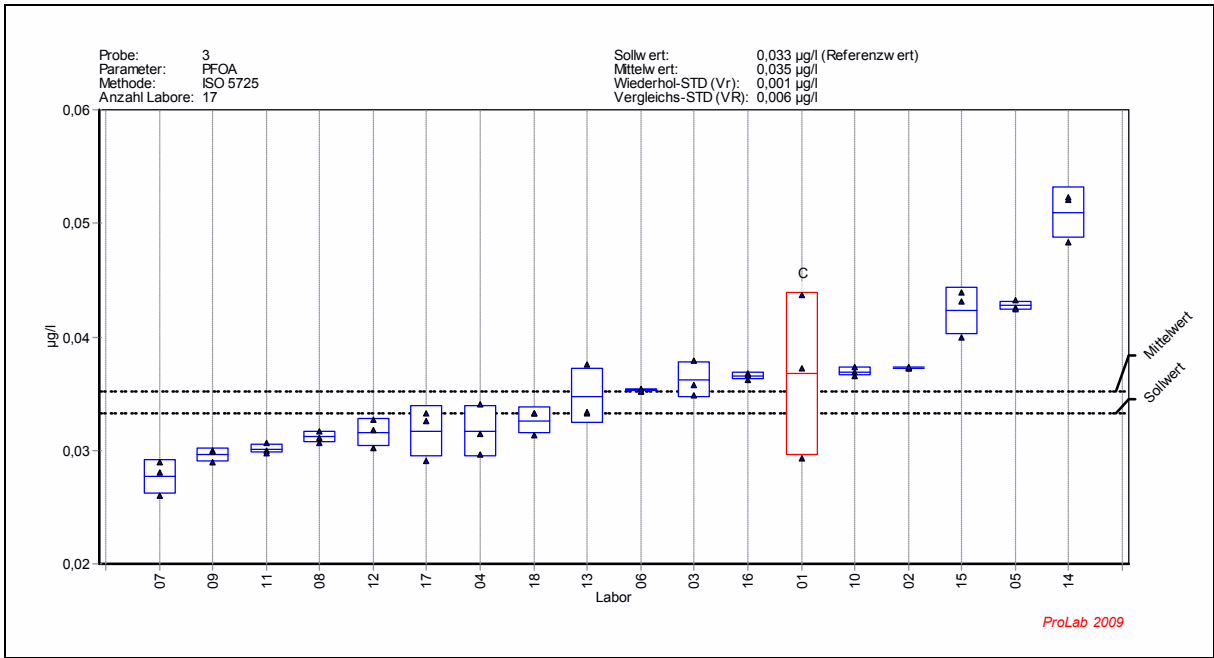


Bild 28.5 – PFOA, Probe 3

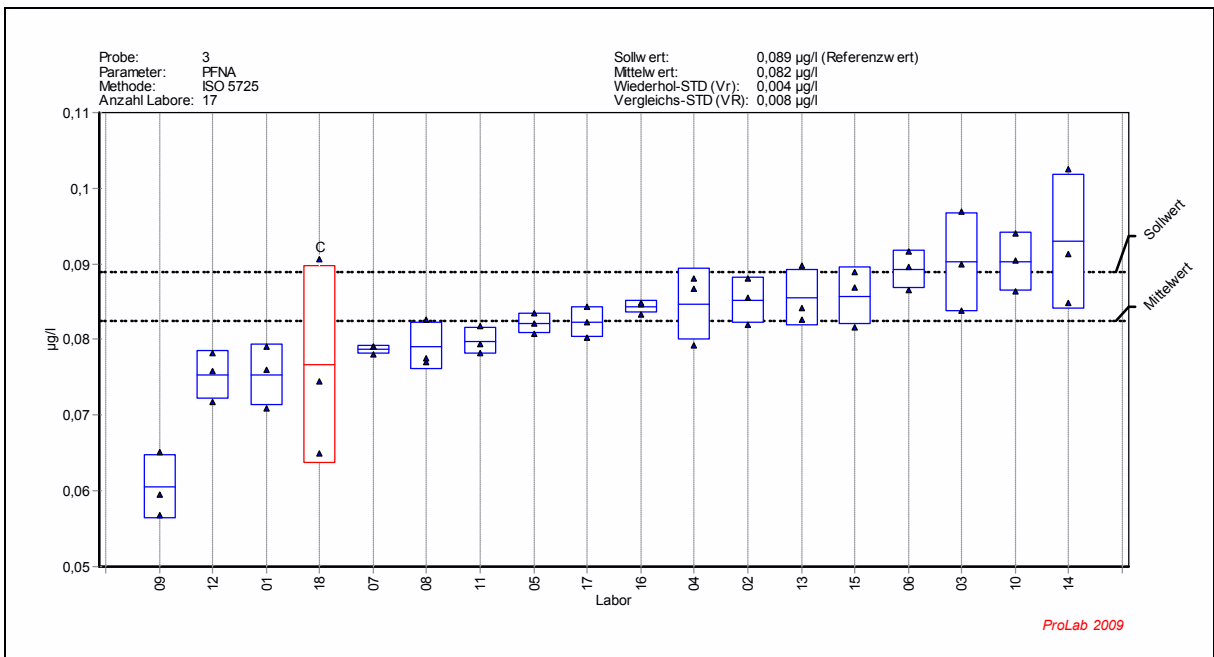


Bild 28.6 – PFNA, Probe 3

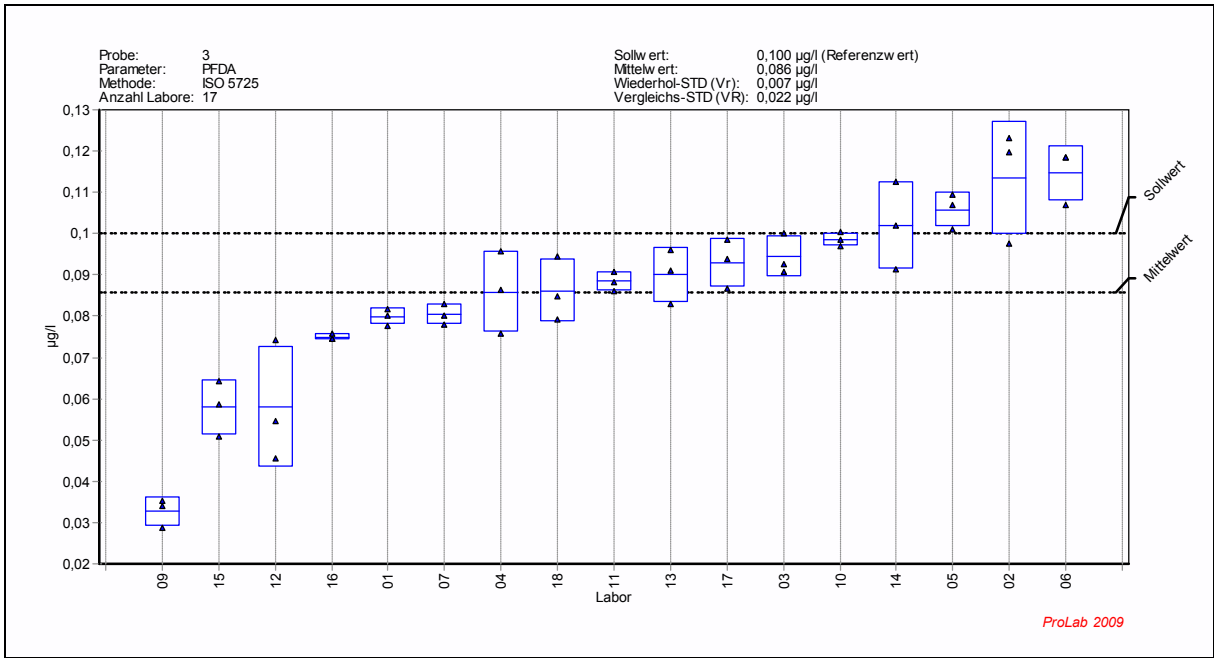


Bild 28.7 – PFDA, Probe 3

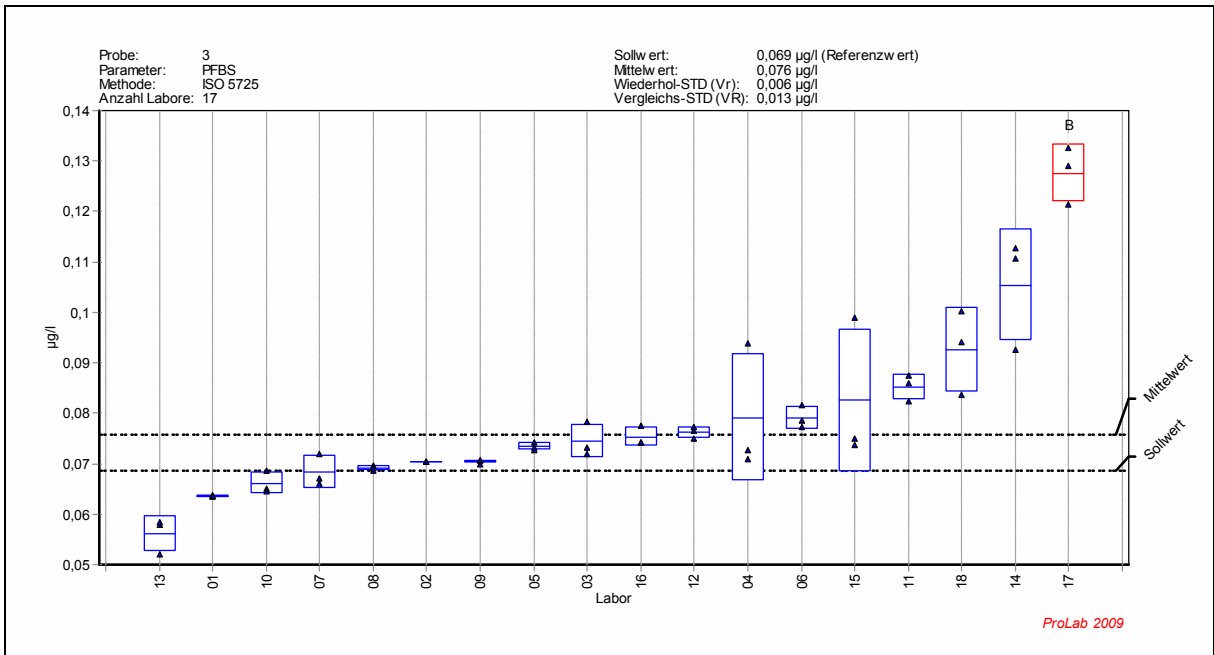


Bild 28.8 – PFBS, Probe 3

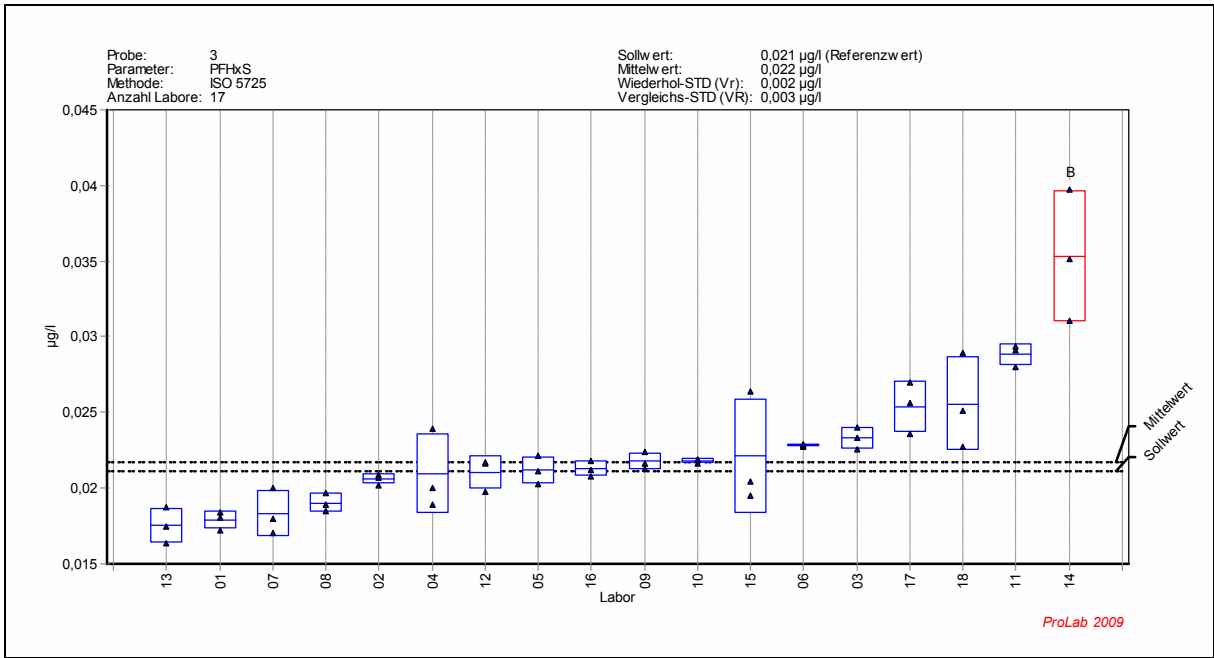


Bild 28.9 – PFHxS, Probe 3

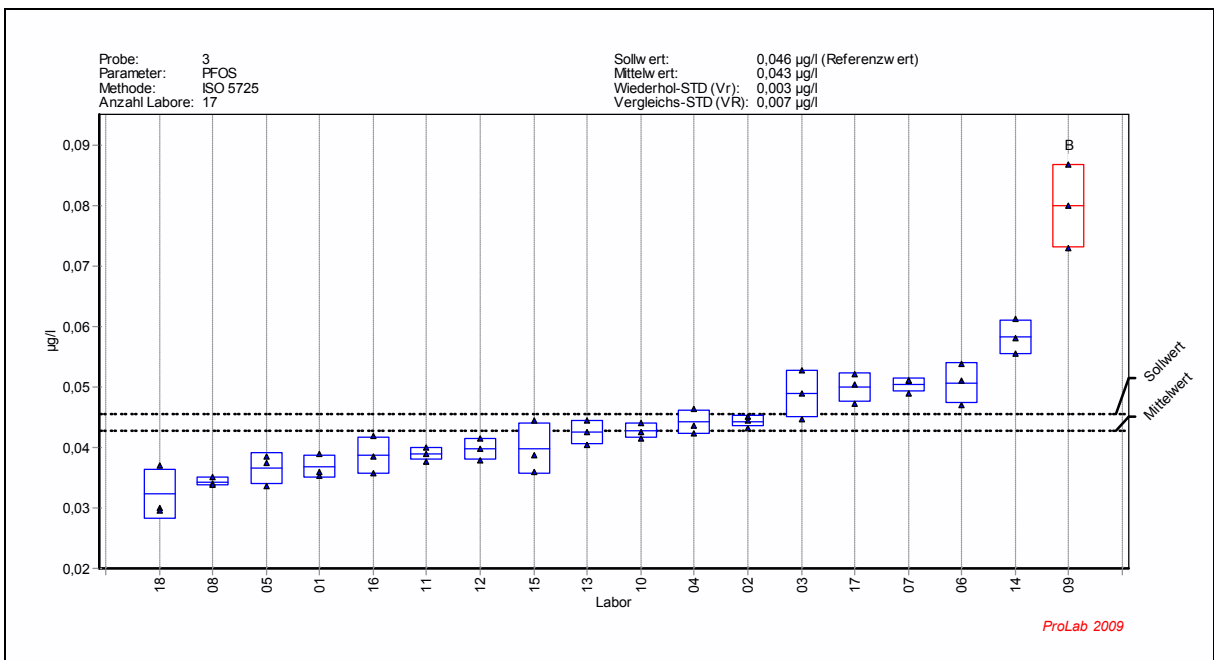


Bild 28.10 – PFOS, Probe 3

11.5.4 Graphiken zu Probe 4 - Oberflächenwasser

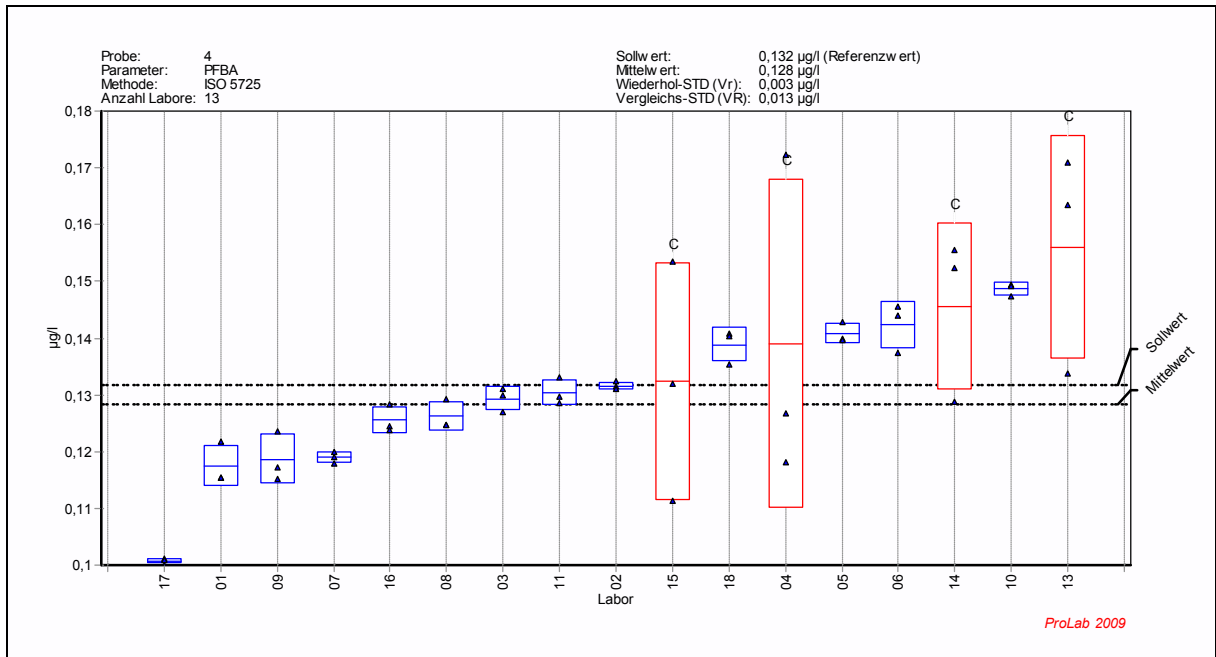


Bild 29.1 – PFBA, Probe 4

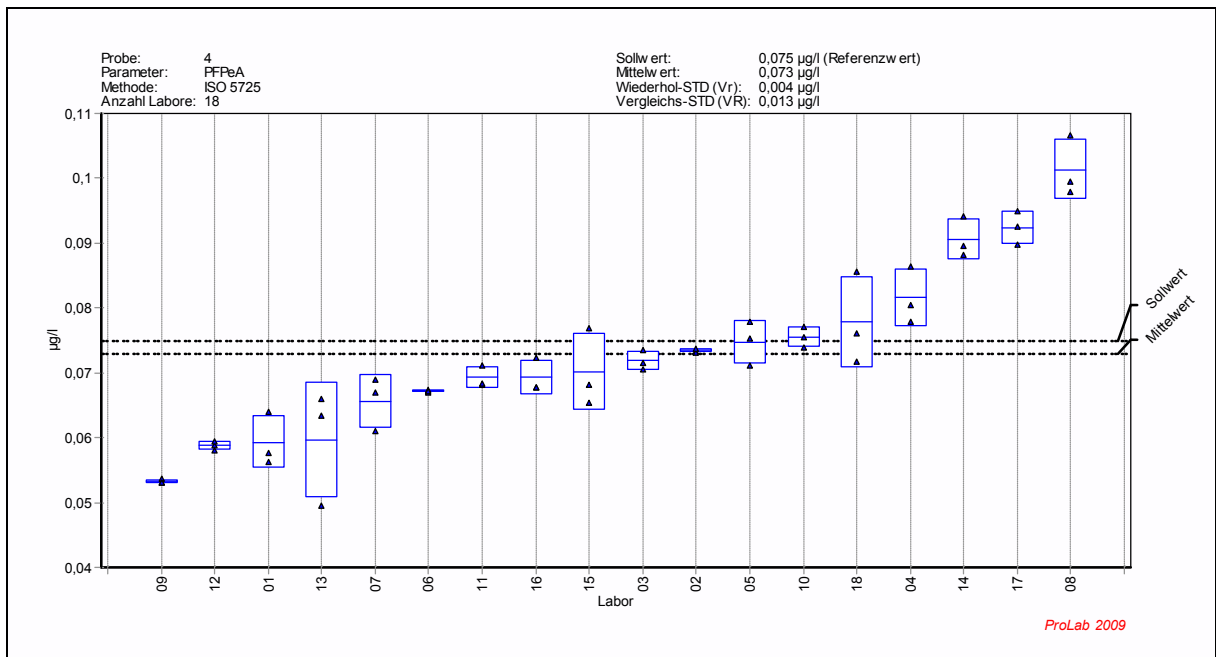


Bild 29.2 – PFPeA, Probe 4

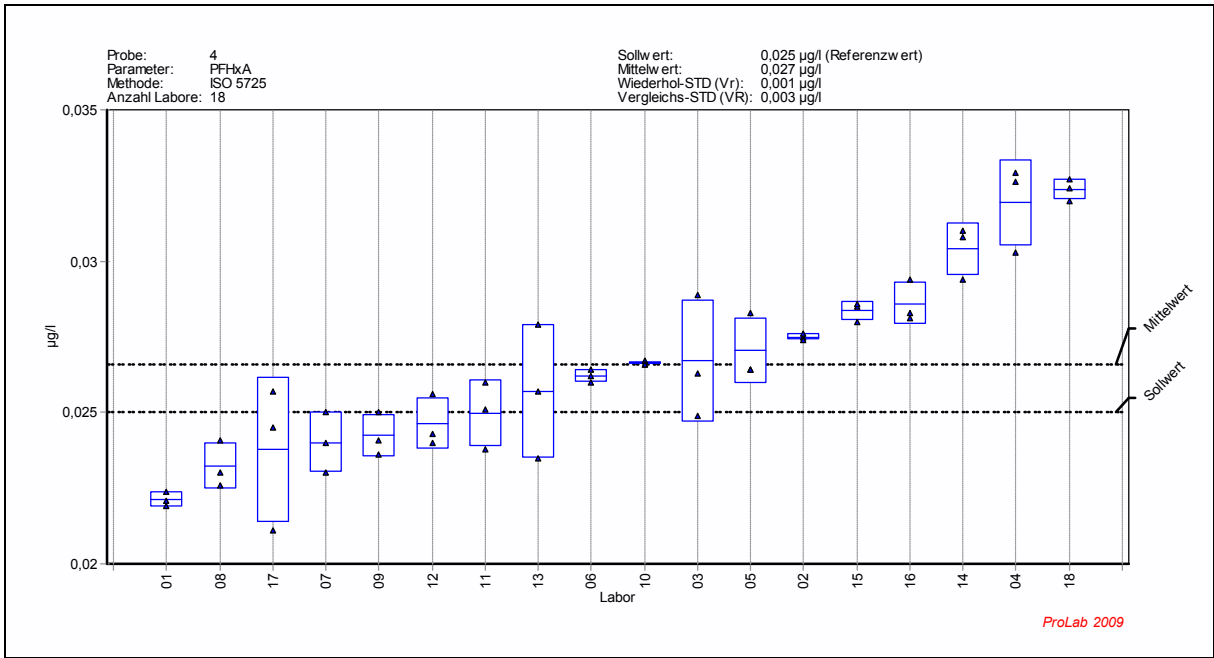


Bild 29.3 – PFHxA, Probe 4

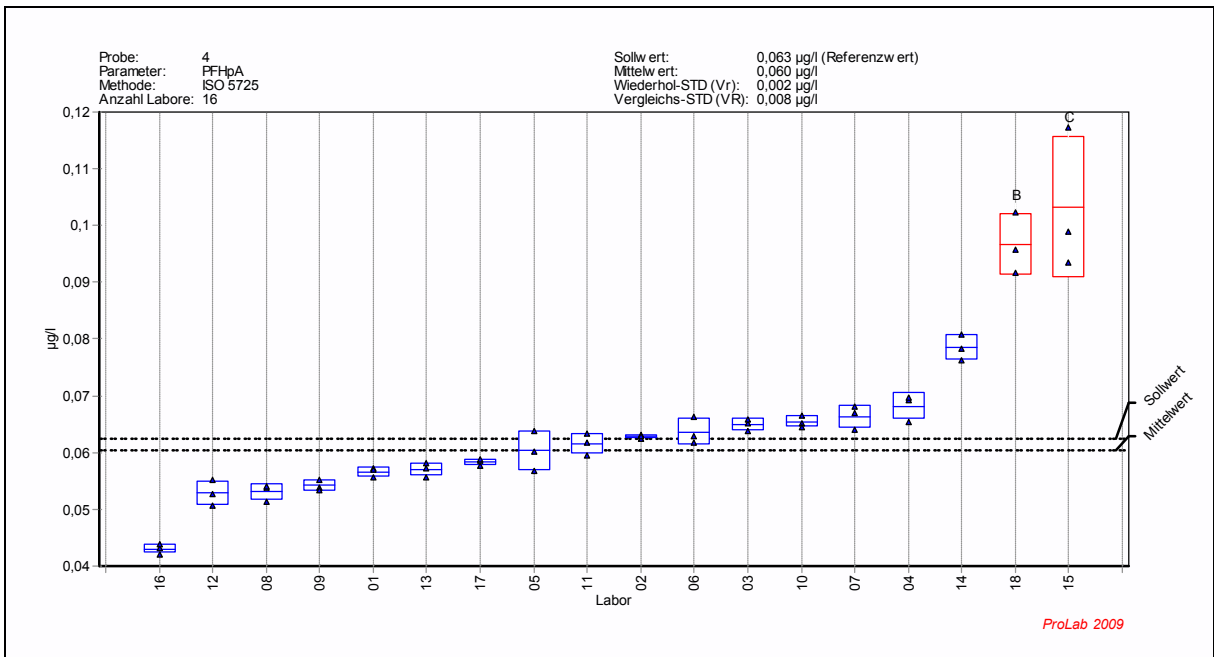


Bild 29.4 – PFHpA, Probe 4

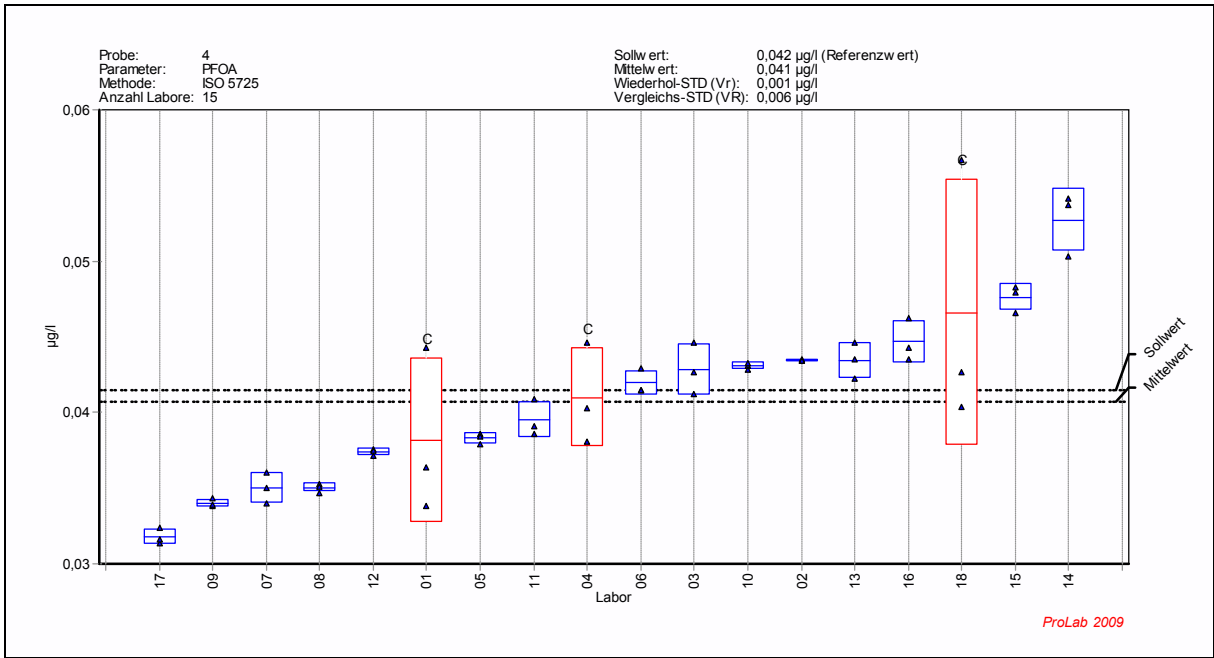


Bild 29.5 – PFOA, Probe 4

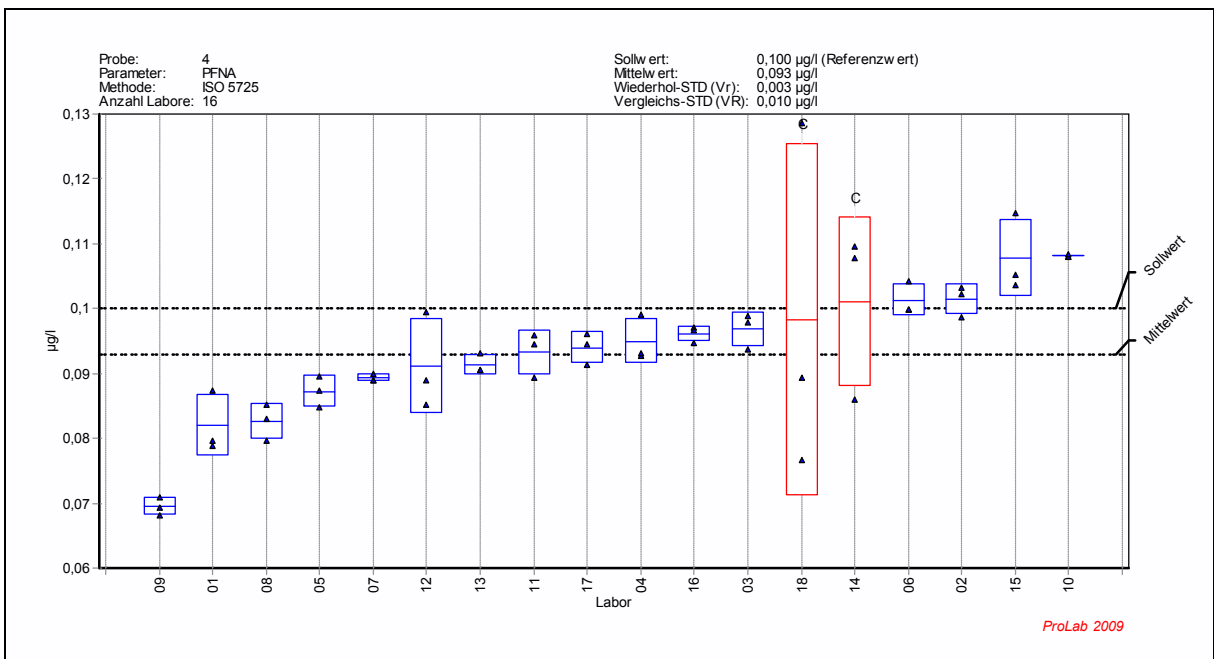


Bild 29.6 – PFNA, Probe 4

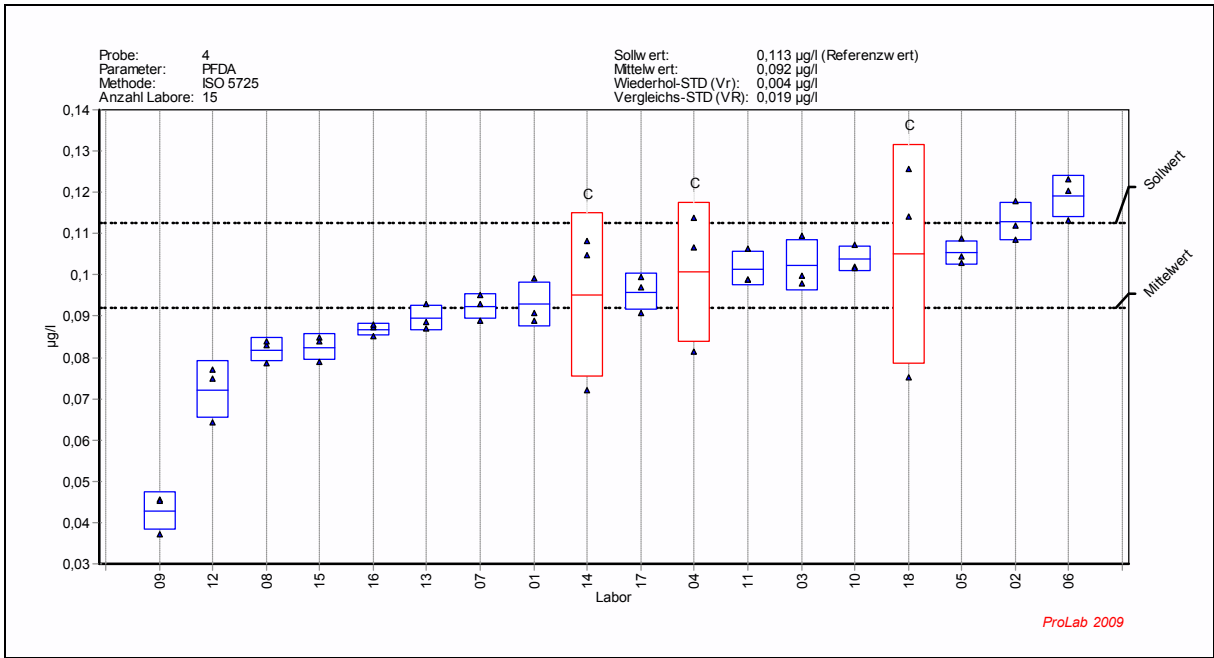


Bild 29.7 – PFDA, Probe 4

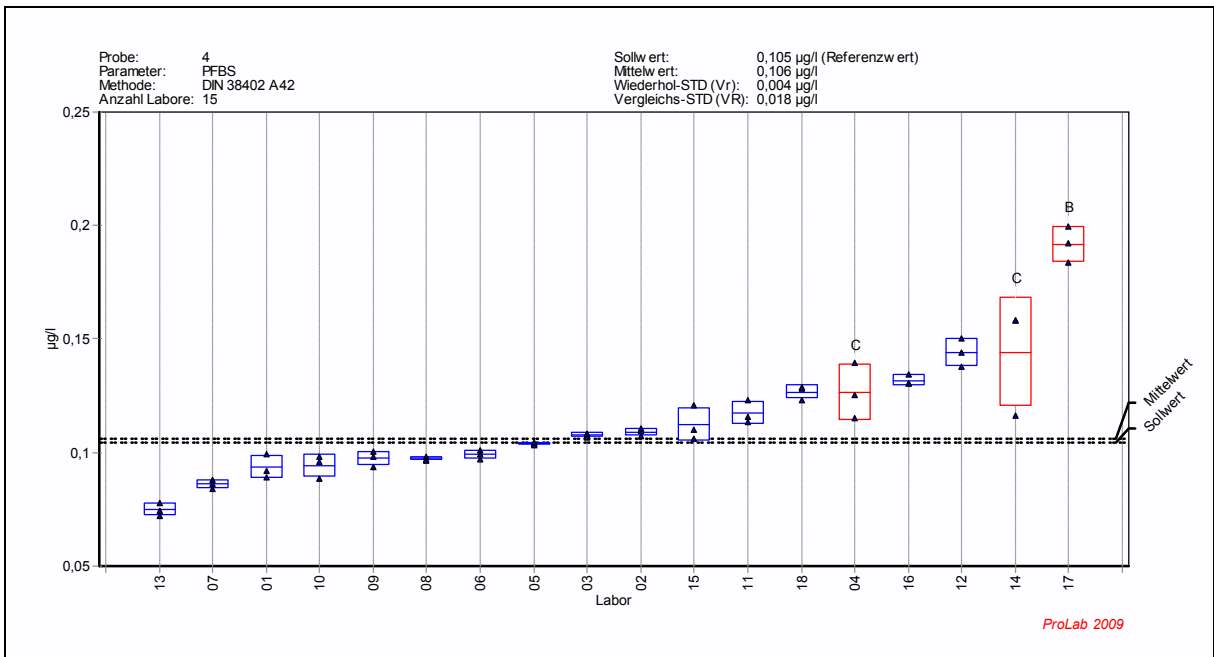


Bild 29.8 – PFBS, Probe 4

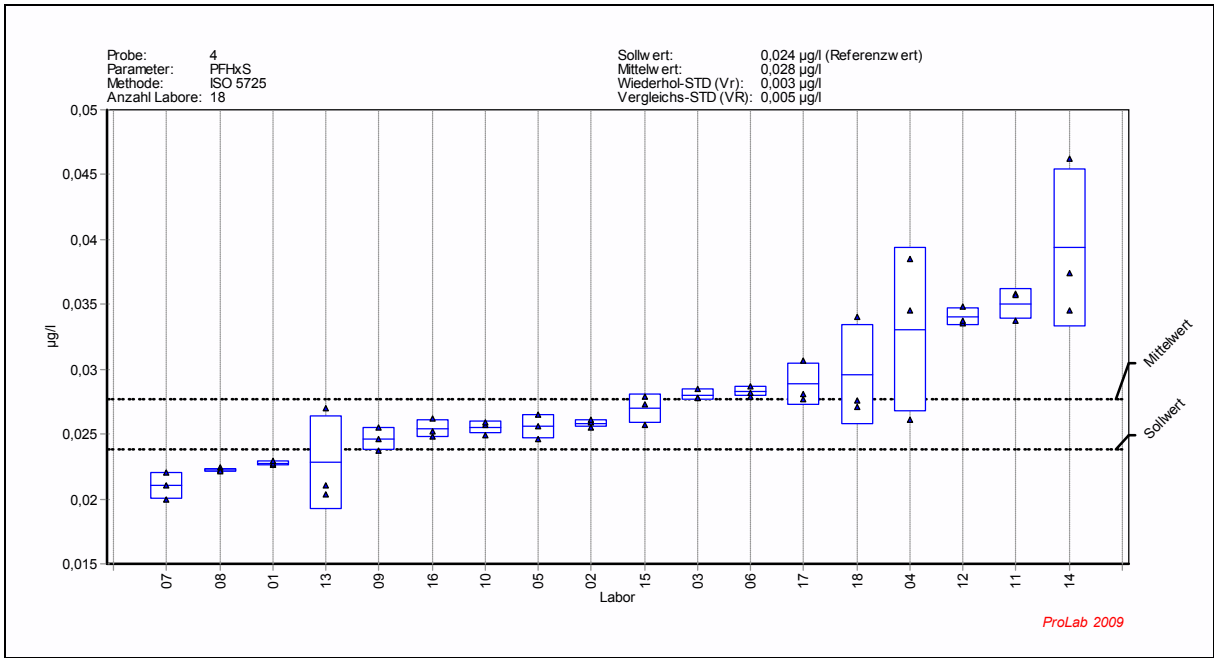


Bild 29.9 – PFHxS, Probe 4

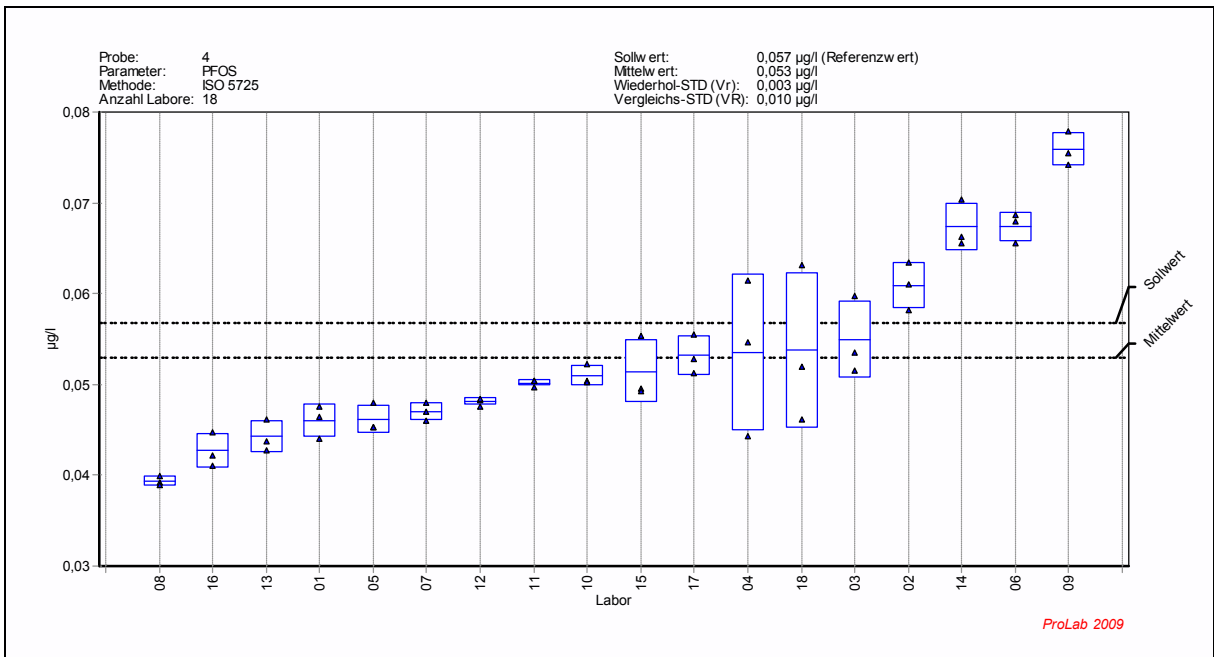


Bild 29.10 – PFOS, Probe 4

11.5.5 Graphiken zu Probe 5 – behandeltes Abwasser

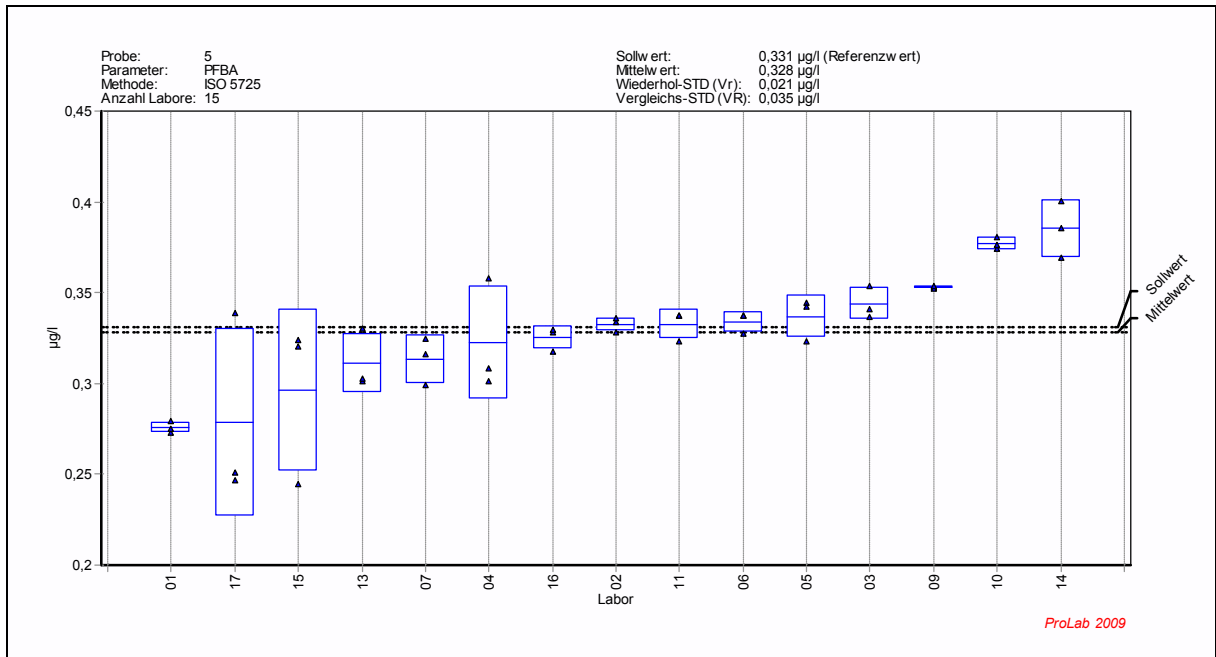


Bild 30.1 – PFBA, Probe 5

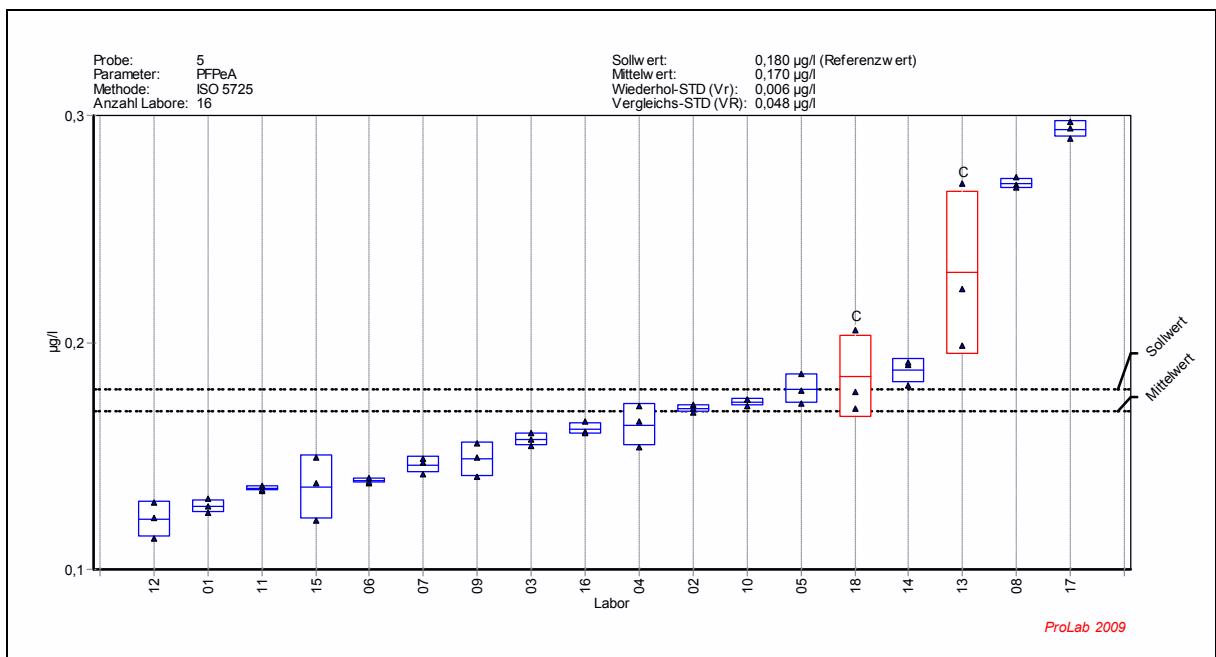


Bild 30.2 – PFPeA, Probe 5

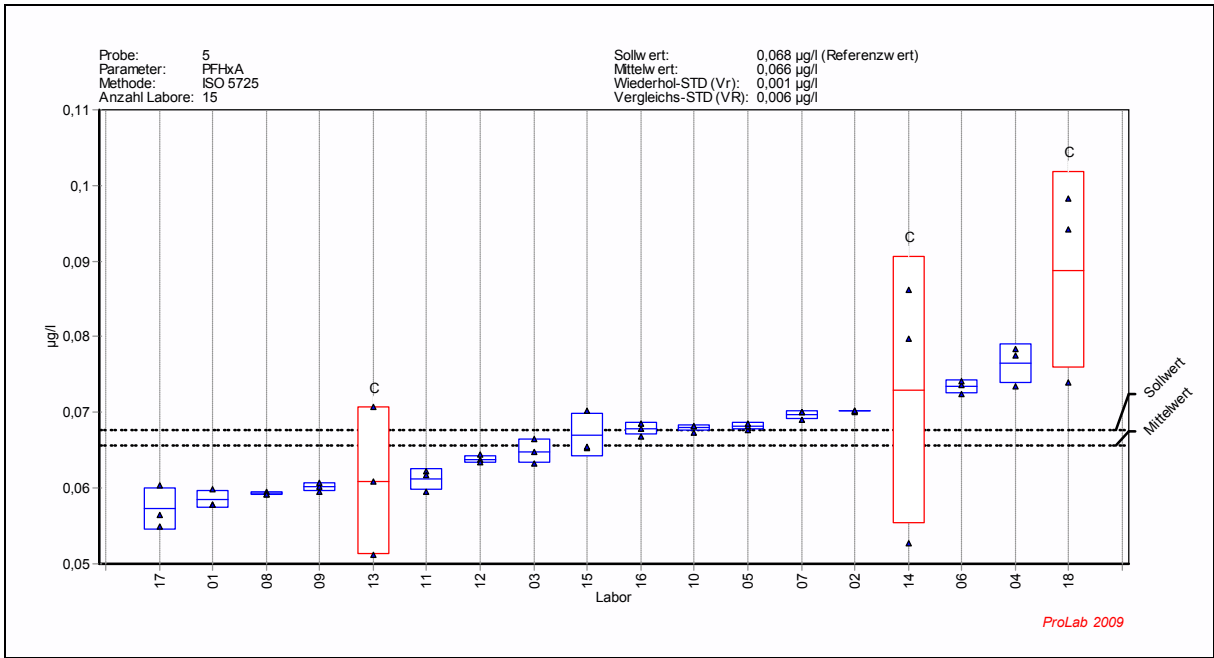


Bild 30.3 – PFHxA, Probe 5

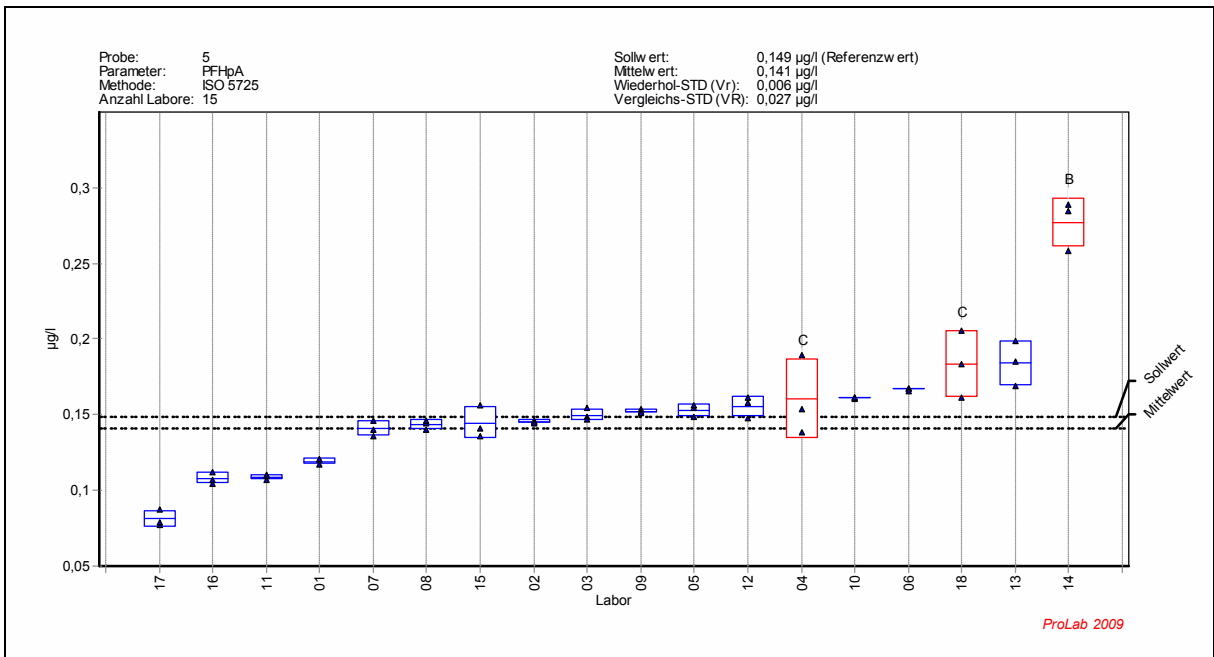


Bild 30.4 – PFHpA, Probe 5

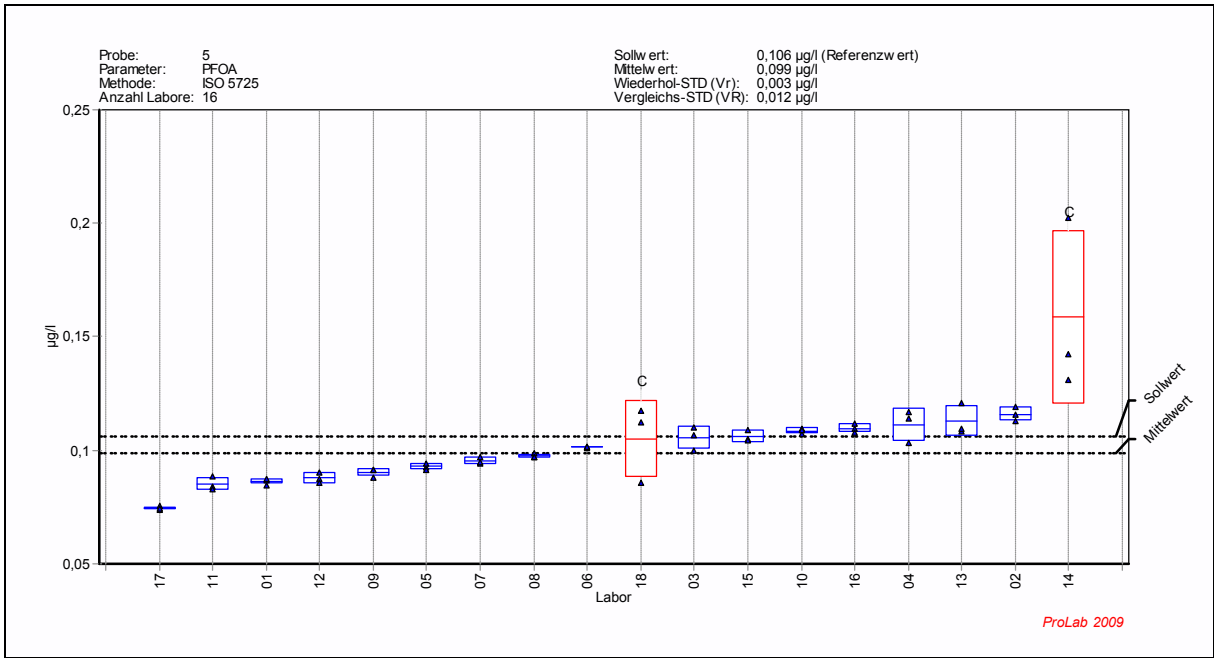


Bild 30.5 – PFOA, Probe 5

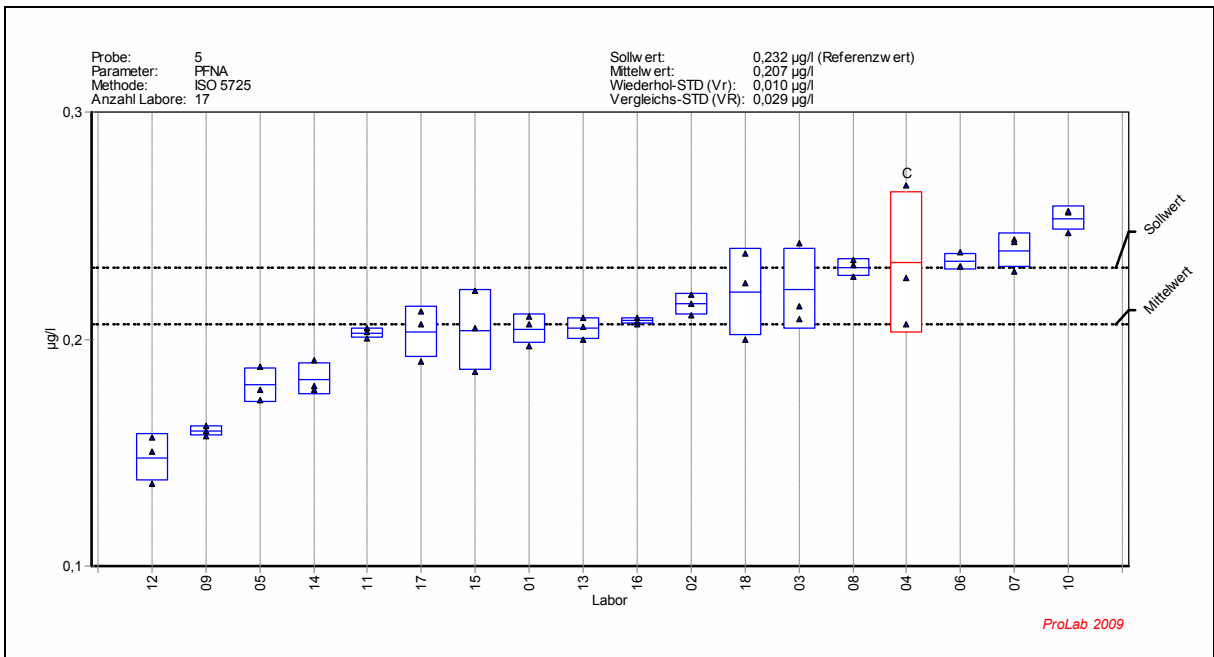


Bild 30.6 – PFNA, Probe 5

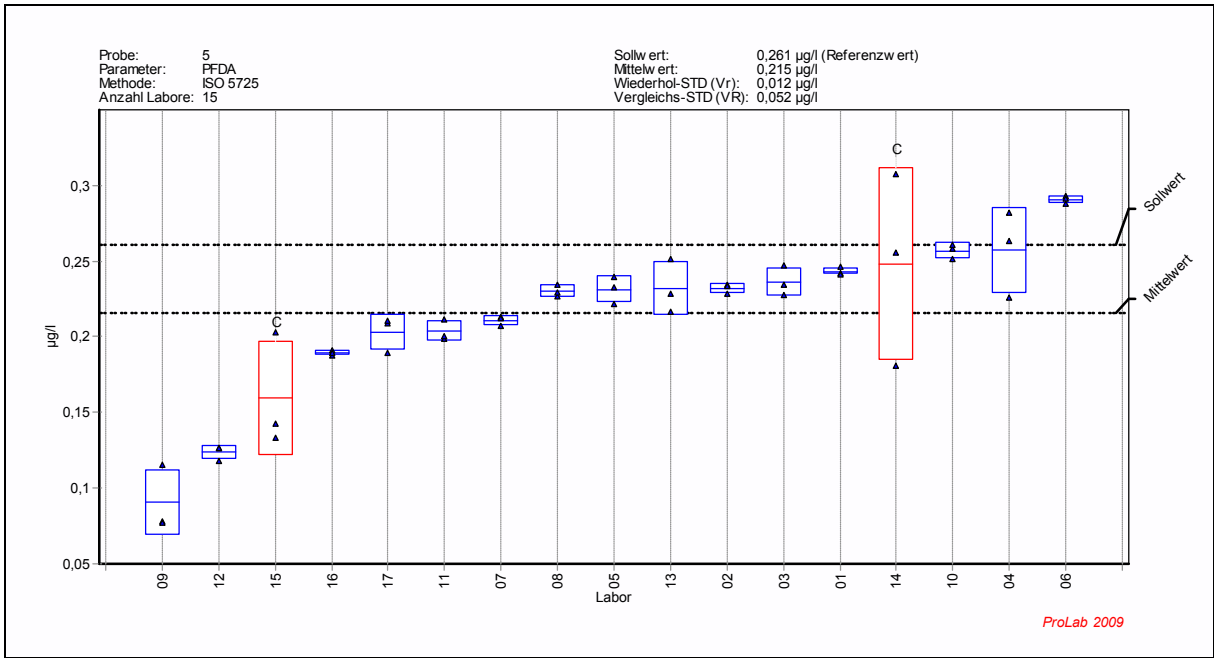


Bild 30.7 – PFDA, Probe 5

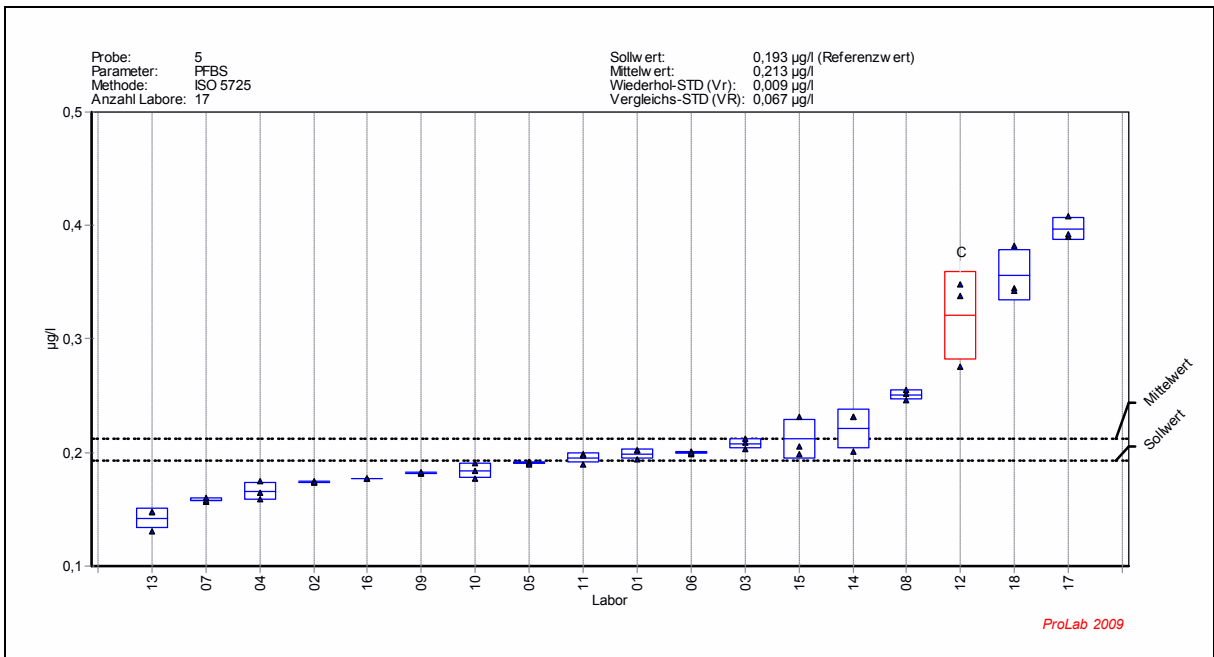


Bild 30.8 – PFBS, Probe 5

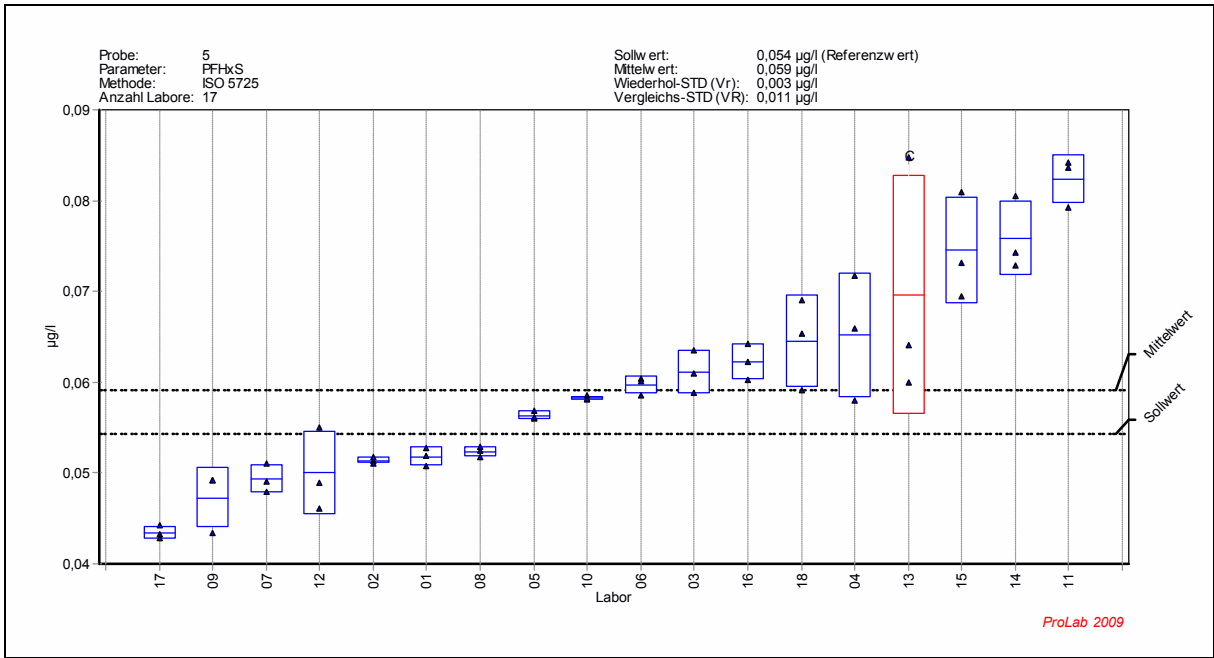


Bild 30.9 – PFHxS, Probe 5

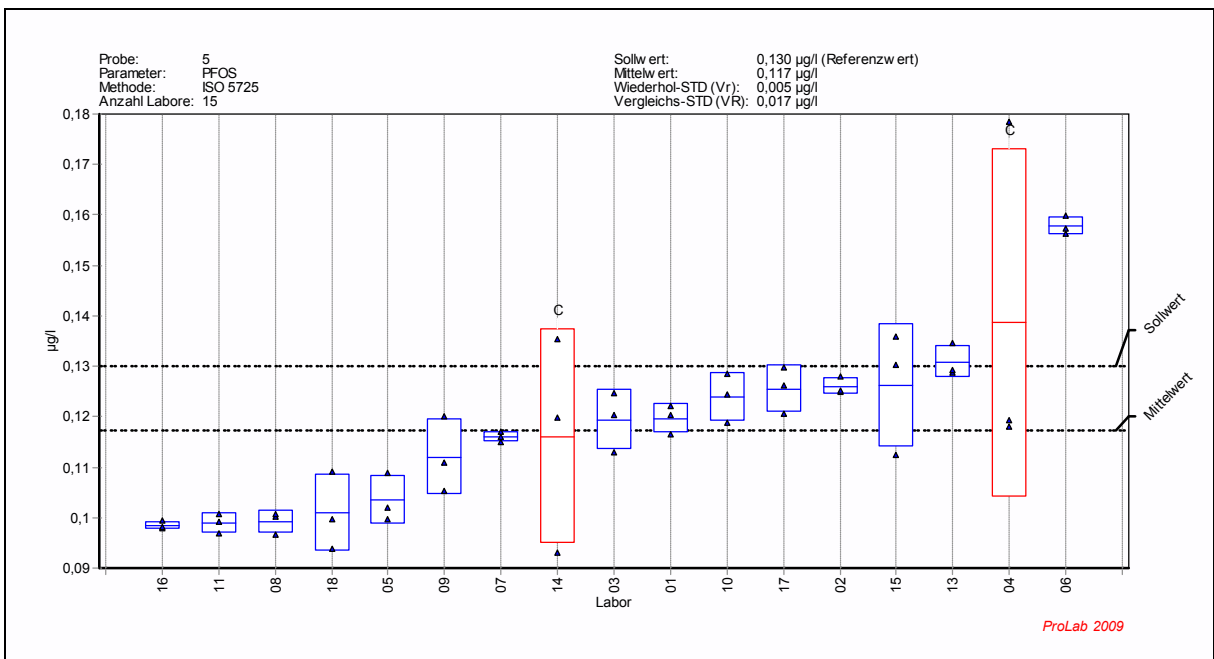


Bild 30.10 – PFOS, Probe 5

12 Messunsicherheit

Die Messunsicherheit wurde für die Matrix Trinkwasser aus Wiederfindungsraten nach DEV A0-4 ermittelt (Tabelle 30).

Hierzu wurde jeweils täglich eine aufgestockte Trinkwasserprobe an insgesamt 15 Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die Aufstockung erfolgte durch Zugabe einer Standardlösung und betrug jeweils 100 ng/l. Die Unsicherheit der Massenkonzentration der PFC in der Standardlösung wurde nach den Angaben des Herstellers mit $\pm 5\%$ bei der Berechnung der Messunsicherheit berücksichtigt.

Tabelle 30 – Erweiterte Messunsicherheit für die Matrix Trinkwasser

PFC	X ng/l	s ng/l	n	U_{Rw}	bias	U_{bias}	u	U	U %
PFBA	96,9	2,414	15	0,02491	-0,03067	0,06001	0,06497	0,12994	13
PFPA	98,9	2,134	15	0,02158	-0,01133	0,05243	0,0567	0,11339	11
PFBS	92,1	3,918	15	0,04256	-0,07933	0,09624	0,10523	0,21045	21
PFHxA	98,1	1,387	15	0,01415	-0,01949	0,05414	0,05596	0,11193	11
PFHpA	95,1	2,167	15	0,02278	-0,04867	0,07073	0,0743	0,14861	15
PFHxS	92,6	2,823	15	0,03049	-0,074	0,09064	0,09563	0,19127	19
PFOA	95,7	2,574	15	0,02688	-0,04264	0,06712	0,0723	0,14461	14
PFNA	95,7	4,148	15	0,04333	-0,04267	0,06932	0,08175	0,1635	16
PFOS	91,5	4,257	15	0,04651	-0,08467	0,10113	0,11131	0,22262	22
PFDA	95,1	4,779	15	0,05023	-0,04867	0,0743	0,08969	0,17937	18
X	Mittlere Wiederfindungsrate, in ng/l								
S	Standardabweichung, in ng/l								
n	Anzahl der Wiederfindungsraten								
U_{Rw} , bias, U_{bias}	Berechnungsgrößen nach DEV A0-4								
U	Erweiterte Messunsicherheit in %, Erweiterungsfaktor F=2								

13 Auswertung

Bei der Auswertung wird jeweils die gesamte Peakfläche aller detektierten Isomere eines Analyten ermittelt und über die Kalibrierung der entsprechenden unverzweigten Komponente ausgewertet.

Diese Regelung wurde vereinbart, um die verzweigten Isomere bei der Quantifizierung zu berücksichtigen, da ihre Anteile besonders bei PFOS maßgeblich sein können und eine chromatographische Trennung aller Isomere unter den üblichen Bedingungen nicht möglich ist. Hinzu kommt, dass die notwendigen Reinsubstanzen für die Kalibrierung für die meisten Isomere nicht zur Verfügung stehen.

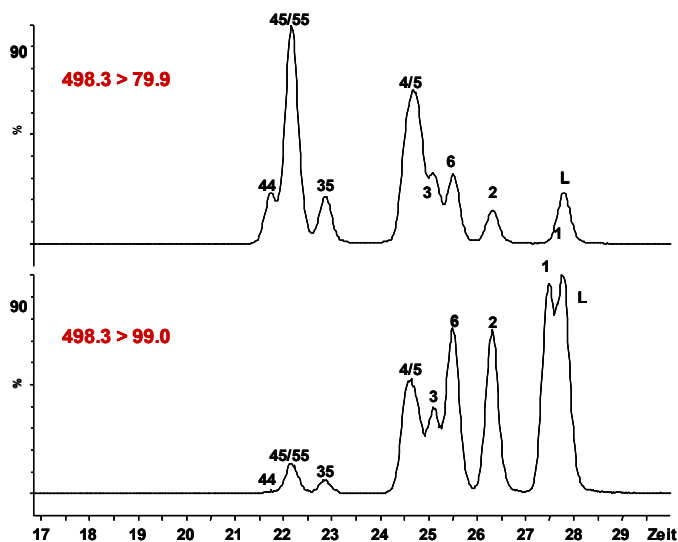
Tabelle 31 zeigt am Beispiel einiger typischer Proben, dass die Peakflächen der verzweigten Isomere bei PFOS durchaus in der Größenordnung der unverzweigten Komponente und zum Teil darüber liegen können. Bei den übrigen Stoffen ist der Anteil an verzweigten Isomeren deutlich geringer.

Tabelle 31 – Relativer Anteil verzweigter Isomere, Beispiele

Probe	PFBA	PFPA	PFBS	PFHxA	PFHpA	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA
	+ / I (%)	+ / I (%)	+ / I (%)	+ / I (%)	+ / I (%)	+ / I (%)	+ / I (%)	+ / I (%)	+ / I (%)	+ / I (%)
OFW 1	-	-	-	11	12	21	10	-	94	-
OFW 2	-	-	0,8	12	16	30	18	-	155	-
OFW 3	-	-	0,6	12	16	23	12	-	206	-
OFW 4	-	-	4,6	9	8	35	8	-	68	-
OFW 5	-	-	7,3	11	13	34	11	-	107	-
OFW 6	-	-	7,7	12	14	24	13	-	115	-
OFW 7	-	-	0,7	13	16	25	15	-	114	-
OFW 8	-	-	0,7	18	15	24	16	-	169	-
OFW 9	-	-	0,7	11	10	30	12	-	123	-
Abwasser 1	-	-	1,9	10	18	30	10	-	62	-
Abwasser 2	-	-	24,5	6	11	17	8	-	62	-
Abwasser 3	-	-	-	6	17,6	-	12	-	61	-

OFW Oberflächenwasser
+ verzweigte Isomere, I unverzweigte Isomere

Bild 31 gibt die chromatographische Trennung von PFOS-Isomeren für beide Massenübergänge wieder und zeigt, dass auch unter optimierten Bedingungen keine vollständige Trennung der Isomere gelingt. Weiterhin wird deutlich, dass die Responsefaktoren der verschiedenen Isomere sich erheblich voneinander unterscheiden und dass diesbezüglich auch große Unterschiede zwischen den beiden Massenübergängen bestehen.

**Bild 31 – Chromatographische Trennung von PFOS-Isomeren**

Arbeitsbedingungen: Säule Zorbax Eclipse XDB-C18, 3,5 µm, 100 mm x 2 mm, Vorsäule Synergi Fusion-RP, 4 µm, 4 mm x 2 mm; $V_{inj} = 20 \mu l$, PFOS-Mixture mit je 5 ng/ml in MeOH; A: 5 mmol NH_4Ac /Wasser // B: 0,05 % HAc/MeOH, Gradient: 50 % B nach 65 % B in 30 min, linear; Fluss 0,25 ml/min, Temperatur 40 °C
Peak-Nr.: (L) n-Perfluoroctansulfonsäure, (1) 1-Methyl-perfluorheptansulfonsäure, (2) 2-Methyl-perfluorheptansulfonsäure, (6) 6-Methyl-perfluorheptansulfonsäure, (3) 3-Methyl-perfluorheptansulfonsäure,

(4) 4-Methyl-perfluorheptansulfonsäure, (5) 5-Methyl-perfluorheptansulfonsäure, (35) 3,5-Dimethyl-perfluorhexansulfonsäure, (45) 4,5-Dimethyl-perfluorhexansulfonsäure, (55) 5,5-Dimethyl-perfluorhexansulfonsäure, (44) 4,4-Dimethyl-perfluorhexansulfonsäure

Untersuchungen haben ergeben, dass in den üblichen Umweltproben neben dem unverzweigten PFOS hauptsächlich 6-Methylperfluorheptansulfonsäure und die Isomere 4- und 5-Methylperfluorheptansulfonsäure vorkommen. Die Dimethylverbindungen spielen beim PFOS dagegen so gut wie keine Rolle (Bild 32).

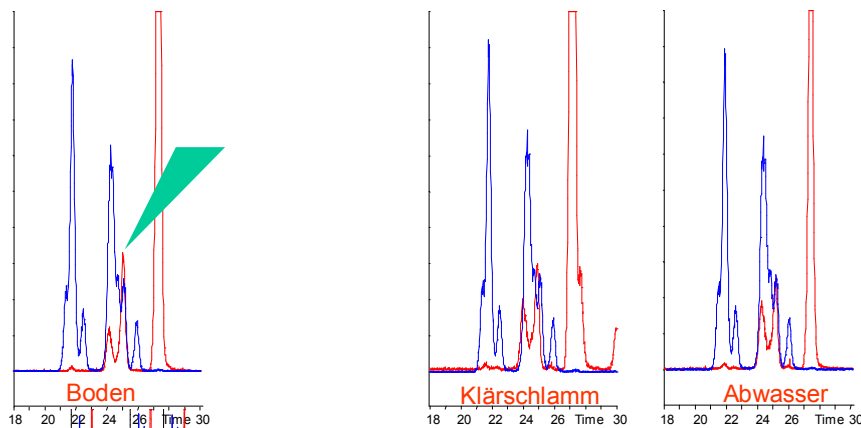


Bild 32 – Zuordnung verzweigter PFOS-Isomere in Umweltproben, Beispiele

Um den Fehler der konventionellen Auswertemethode abschätzen zu können, wurde für die Isomere 6-Methylperfluorheptansulfonsäure und für die Summe von 4-Methyl- und 5-Methylperfluorheptansulfonsäure unter den speziellen chromatographischen Bedingungen (Bild 31) für beide Massenübergänge jeweils eine Kalibrierung durchgeführt. Auf dieser Grundlage wurden einige typische Umweltproben untersucht und mit den Ergebnissen der konventionellen Auswertemethode verglichen.

Tabelle 32 zeigt, dass die Abweichungen der konventionellen Auswertemethode sich in Grenzen halten. Entsprechend den Responsefaktoren werden für den Massenübergang m/z 499 > m/z 99 eine geringfügige Unterbestimmung und für den Massenübergang m/z 499 > m/z 80 eine Überbestimmung erhalten. Diese Abweichungen werden für geringer eingeschätzt als die Nichteinbeziehung der verzweigten PFC.

Tabelle 32 – Fehlerabschätzung zur konventionellen Quantifizierungsmethode

Kalibrierverfahren, Massenübergang m/z 499 > 99		Abwasser $\mu\text{g/l}$	Klärschlamm $\mu\text{g/kg m}_T$	Boden $\mu\text{g/kg m}_T$
Kalibrierung der unverzweigten Komponente	n-PFOS	283	313	5313
	(+)-PFOS	41	16	497
	Summe Isomere	324	329	5800
Kalibrierung der Isomere	4 MHPs + 5MHPs	19	7	140
	6 MHPs	41	15	498
	Summe Isomere	343	335	5951
Vergleich	Abweichung, %	- 6	- 2	- 3
Kalibrierverfahren, Massenübergang m/z 499 > 80		Abwasser $\mu\text{g/l}$	Klärschlamm $\mu\text{g/kg m}_T$	Boden $\mu\text{g/kg m}_T$
Kalibrierung der unverzweigten Komponente	n-PFOS	283	333	5199
	(+)-PFOS	101	39	1013
	Summe Isomere	384	372	6212
Kalibrierung der Isomere	4 MHPs + 5MHPs	22	7	154
	6 MHPs	41	15	545
	Summe Isomere	346	355	5898
Vergleich	Abweichung, %	10	5	5

14 Literatur

[1] Validierungsdokument zu DIN 38407-35

DIN 38407-42 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung-
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F) – Teil 42: Bestimmung ausgewählter polyfluorierter
Verbindungen (PFC) in Wasser – Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und
massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) nach Fest-Flüssig-Extraktion (F42)

DIN 38414-14 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung-
Schlamm und Sedimente (Gruppe S) – Teil 14: Bestimmung ausgewählter polyfluorierter
Verbindungen (PFC) in Schlamm, Kompost und Boden – Verfahren mittels Hochleistungs-
Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) (S14)

DEV A0-4 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung -
Leitfaden zur Abschätzung der Messunsicherheit aus Validierungsdaten

15 Anhang

Tabelle A1: Ausgangslösung A zur Herstellung der Ringversuchsproben

Table A: PFC Solution A; Components and Concentrations ($\pm 5\%$ in methanol)*

Name	Abbreviation	Structure	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Peak Assignment in Figure 1
Perfluoro-n-butyric acid	PFBA		5.00		A
Perfluoro-n-pentanoic acid	PFPeA		3.00		B
Perfluoro-n-hexanoic acid	PFHxA		1.00		D
Perfluoro-n-heptanoic acid	PFHpA		2.50		E
Perfluoro-n-octanoic acid	PFOA		1.50		G
Perfluoro-n-nonanoic acid	PFNA		4.00		H
Perfluoro-n-decanoic acid	PFDA		4.50		J
Name	Abbreviation	Structure	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Peak Assignment in Figure 1
Potassium perfluoro-1-butanesulfonate	L-PFBS		3.50	3.09	C
Sodium perfluoro-1-hexanesulfonate	L-PFHxS		1.00	0.95	F
Sodium perfluoro-1-octanesulfonate	L-PFOS		2.00	1.91	I

* Maximum combined relative uncertainty of weights and volumes
 All weights and volumes are traceable to ASTM
 Contains NaOH to prevent conversion of the carboxylic acids to their corresponding methyl esters

Certified By:

B.G. Chittim

Date: 12/14/2009

Wellington Laboratories Inc., 345 Southgate Dr. Guelph ON N1G 3M5 CANADA

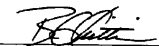
Form#: 13
Rev0, 2003-01PFC Solution A-120809 (2 of 4)
rev0

Tabelle A2: Ausgangslösung B zur Herstellung der Ringversuchsproben

Table A: PFC Solution B; Components and Concentrations (± 5% in methanol)*

Name	Abbreviation	Structure	Concentration (µg/ml)		Peak Assignment in Figure 1
			as the salt	as the anion	
Perfluoro-n-butanoic acid	PFBA		1.00		A
Perfluoro-n-pentanoic acid	PFPeA		0.50		B
Perfluoro-n-hexanoic acid	PFHxA		0.50		D
Perfluoro-n-heptanoic acid	PFHpA		1.00		E
Perfluoro-n-octanoic acid	PFOA		0.50		G
Perfluoro-n-nonanoic acid	PFNA		1.50		H
Perfluoro-n-decanoic acid	PFDA		1.00		J
Potassium perfluoro-1-butanefluorobutanesulfonate	L-PFBS		1.50	1.33	C
Sodium perfluoro-1-hexanesulfonate	L-PFHxS		0.50	0.47	F
Sodium perfluoro-1-octanesulfonate	L-PFOS		1.00	0.96	I

* Maximum combined relative uncertainty of weights and volumes
 All weights and volumes are traceable to ASTM
 Contains NaOH to prevent conversion of the carboxylic acids to their corresponding methyl esters

Certified By:  Date: 12/14/2009
 B.G. Chittim

Wellington Laboratories Inc., 345 Southgate Dr. Guelph ON N1G 3M5 CANADA