

NA 119-01-03 AA N 2397
NA 119-01-03-02-19 AK N 259

Validierungsdokument

zu

DIN 38414-14

**„Bestimmung ausgewählter polyfluorierter
Verbindungen in Schlamm, Kompost und Boden –
Verfahren mittels Hochleistungs-
Flüssigkeitschromatographie und
massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS)
(S14)**

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	10
5.1 Festphasenmaterialien für die Reinigung von Extrakten	10
5.2 Herstellung von Bezugslösungen	10
5.3 Haltbarkeit von Stamm- und Bezugslösungen	10
5.4 Bezugsquellen für Referenzsubstanzen und Lösungen	11
5.5 HPLC-Säulen und chromatographische Bedingungen	11
5.6 Massenspektrometer	17
6 Durchführung	18
6.1 Probenvorbereitung	18
6.2 Extraktion	20
6.3 Reinigung von Extrakten	22
6.4 Massenspektrometrische Messung	24
7 Ermittlung von Verfahrenskenndaten	26
7.1 Kalibrierverfahren	26
7.2 Kalibriersubstanzen	27
7.3 Kenndaten der Grundkalibrierung und Messbedingungen	28
8 Untersuchungen zur Richtigkeit und Präzision	32
9 Robustheit	36
9.1 Extraktion	36
9.2 Reinigung der Extrakte	36
9.3 Massenspektrometrische Messung	36
10 Verfahrenskenndaten aus Ringversuchen	37
10.1 Durchführung	37
10.2 Herstellung der Ringversuchsproben	37
10.3 Angaben zur Analytik	38
10.4 Ergebnisse	39
10.5 Graphische Darstellung der Ergebnisse des Ringversuchs	44
11 Auswertung	61
12 Literatur	64
13 Anhang	65

Bilder	Seite
Bild 1 PFC in handelsüblichen PTFE-Schläuchen	8
Bild 2 Wiederfindungsraten bei verschiedenen Volumenanteilen an Methanol in der Messlösung	9
Bild 3 Retention von PFBA an verschiedenen HPLC-Phasen	11
Bild 4 Relativer Response bei verschiedenen Eluenten	12
Bild 5 Einfluss verschiedener Eluente auf die Chromatographie	12
Bild 6 Chromatographische Trennung, Beispiel 1	13
Bild 7 Chromatographische Trennung, Beispiel 2	13
Bild 8 Chromatographische Trennung, Beispiel 3	13
Bild 9 Chromatographische Trennung, Beispiel 4	13
Bild 10 Chromatographische Trennung, Beispiel 5	13
Bild 11 Extraktionsausbeute bei Trocknung von Klärschlämmen in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Extraktionsverfahren	18
Bild 12 Homogenität der Prüfprobe bei Korngrößen < 250 µm	19
Bild 13 Homogenität der Prüfprobe bei Korngrößen < 2 mm	19
Bild 14 PFC-Ausbeuten mit verschiedenen Extraktionsmitteln und -methoden am Beispiel einer Klärschlammprobe	20
Bild 15 PFC-Ausbeuten mit verschiedenen Extraktionsmitteln und -methoden am Beispiel einer Bodenprobe	21
Bild 16 Extraktionsausbeuten bei mehrstufiger Ultraschallextraktion mit Methanol	21
Bild 17 Relative Extraktionsausbeuten bei Mikrowellenextraktion	22
Bild 18 Beispiel für ein MS-Chromatogramm einer Probe mit verzweigten und unverzweigten Carbonsäuren	25
Bild 19 Beispiel für ein MS-Chromatogramm einer Probe mit verzweigten und unverzweigten Sulfonsäuren	25
Bild 20 Stabilität von Kalibrierungen, Beispiel	27
Bild 21 Wiederholstandardabweichung bei Untersuchungen zur Homogenität der Ringversuchsproben	38
Bild 22 Wiederfindungsraten interner Standardsubstanzen	39
Bild 23 Vergleichsvariationskoeffizienten für die HPLC-MS/MS-Messung (Standardlösung)	41
Bild 24 Übersicht zu Ausreißern und nicht erfüllten Vorgaben für interne Standardsubstanzen	43
Bild 25 Graphiken zu Probe 1 – Standardlösung	44
Bild 26 Graphiken zu Probe 2 – Klärschlamm	49
Bild 27 Graphiken zu Probe 3 – Boden	53
Bild 28 Graphiken zu Probe 4 – Futtermittel (Grassilage)	57
Bild 29 Chromatographische Trennung von PFOS-Isomeren	62
Bild 30 Zuordnung verzweigter PFOS-Isomere in Umweltproben, Beispiele	62

Tabellen		Seite
Tabelle 1	Polyfluorierte Verbindungen, deren Bestimmung nach diesem Verfahren erprobt wurde	7
Tabelle 2	Erprobte Festphasenmaterialien	10
Tabelle 3	Beispiel für Bezugslösungen	10
Tabelle 4	Lieferanten von Referenzsubstanzen und Lösungen	11
Tabelle 5	Durchbruch von PFC bei der Reinigung matrixreicher Proben	23
Tabelle 6	Massenübergänge der zu bestimmenden Substanzen	24
Tabelle 7	Beispiel für Fragmentierungen	24
Tabelle 8	Massenübergänge interner Standardsubstanzen und Beispiel für Fremdbezug	26
Tabelle 9	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 1	28
Tabelle 10	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 2	29
Tabelle 11	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 3	30
Tabelle 12	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 4	31
Tabelle 13	Kenndaten und Messbedingungen, Beispiel 5	32
Tabelle 14	Beispiele für Wiederfindungsraten aus Boden und Gewässersediment	33
Tabelle 15	Beispiele für Wiederfindungsraten aus Klärschlamm	34
Tabelle 16	Beispiele für Wiederfindungsraten aus Kompost	35
Tabelle 17	Verfahrenskenndaten für die HPLC-MS/MS-Messung (Probe 1)	40
Tabelle 18	Verfahrenskenndaten für die Matrix Klärschlamm (Probe 2)	41
Tabelle 19	Verfahrenskenndaten für die Matrix Boden (Probe 3)	42
Tabelle 20	Verfahrenskenndaten für die Matrix Grassilage/Futtermittel (Probe 4)	42
Tabelle 21	Relativer Anteil verzweigter Isomere, Beispiele	61
Tabelle 22	Fehlerabschätzung zur konventionellen Quantifizierungsmethode	63

1 Allgemeine Angaben zur Bearbeitung des Verfahrens

Das Verfahren DIN 38414-14 wurde erarbeitet im Arbeitskreis 19 des Normenausschusses Wasserwesen I-3 im Unterausschuss 2. Anlass für das Verfahren war die bevorstehende Novellierung der Klärschlammverordnung, bei der eine Beschränkung für die Stoffe PFOA und PFOS im Gespräch ist. In der Düngemittelverordnung (DüMV) vom 20.12.2008 wurde für die Summe von PFOA und PFOS bereits ein Höchstgehalt (0,1 mg/kg TM) festgelegt.

1.1 Beginn und Ende der Bearbeitung

Der Arbeitskreis wurde am 01.04.2008 mit dem Auftrag, ein Verfahren für die Bestimmung von PFC in Wasser zu erarbeiten, gegründet. Auf der 3. Sitzung des Arbeitskreises, am 15.12.2008 wurde der Auftrag um ein zusätzliches Verfahren für die Bestimmung dieser Stoffe in Klärschlamm und Boden erweitert. Diese Arbeiten, die zuständigkeithalber im AK 52 des NA 119-01-02-02 (Abfall- und Bodenuntersuchungen) durchgeführt werden sollten, wurden wegen der gleichen messtechnischen Grundlage damit dem AK19 zugewiesen.

Die Normvorlage wurde in 5 Sitzungen erstellt und im August 2010 dem DIN NAW I,3 zur weiteren Veranlassung vorgelegt. Die Norm DIN 38414-14 ist im August 2011 erschienen.

1.2 Obmann und stellvertretender Obmann

Herr Dipl.-Ing. Rolf Reupert Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW 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 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. Stephan Fahrmayr Analytik Institut Rietzler GmbH Schnorrstraße 5a 90471 Nürnberg
Frau Sandy Falk Landesbetrieb Hessisches Landeslabor Glarusstr. 6 65203 Wiesbaden	Herr Dipl.-Ing. Stefan Frankenbach SGS Institut Fresenius GmbH Im Maisel 14 65232 Taunusstein Neuhof
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. Martin Kowall Campro Scientific GmbH Darser Str. 2a 14167 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 Grafschaft/Hochsauerland	Frau Dr. Miroslawa 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 NRW Fachbereich 66 Leibnizstraße 10 45659 Recklinghausen	Frau Dipl.-Ing. Regina Respondek Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW Fachbereich 64 Leibnizstraße 10 45659 Recklinghausen
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. Florian Seidel SGS Institut Fresenius GmbH Im Maisel 14 65232 Taunusstein Neuhof	Herr Dr. Claus Schlett Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH Willy-Brandt-Allee 26 45891 Gelsenkirchen
Herr Dr. Christian Schmidt Dionex GmbH Am Wörtzgarten 10 65510 Idstein	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

Für das Verfahren DIN 38414-14 wurden die gleichen Perfluoralkylverbindungen ausgewählt wie für die Untersuchung von Wasserproben nach DIN 38407-42 (Tabelle 1). Höhere Homologe wurden bei der Validierung des Verfahrens nicht berücksichtigt, da sie gegenüber den ausgewählten Stoffen bislang nicht auffällig waren.

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
$F_3C-(CF_2)_6-CF_2-COOH$	Perfluornonansäure 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 Reinigung der Extrakte 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), Perfluordodecansulfonsäure (PFDoS) und 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctansulfonsäure (H4PFOS).

Telomeralkohole können dagegen nicht erfasst werden, da sie unter den vorgegebenen Bedingungen der Extraktreinigung nicht angereichert werden. Diese Einschränkungen bestehen nicht, wenn auf die Reinigung des Extraktes verzichtet werden kann.

2.2 Arbeitsbereich

Das Verfahren ist geeignet zur Bestimmung der in Tabelle 1 genannten PFC in Gewässersediment, Klärschlamm, Kompost und Boden oberhalb Massenanteilen von 10 µg/kg Trockenmasse (m_T). Es wurde im Ringversuch erfolgreich auch für Futtermittel (Grassilage) getestet.

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

Die untere Anwendungsgrenze des Verfahrens orientiert sich an dem Summenwert für PFOA und PFOS in Klärschlamm (100 µg/kg m_T), der bei landwirtschaftlicher Nutzung in einigen Bundesländern nicht überschritten werden darf.

3 Grundlagen des Verfahrens

Die Substanzen werden durch ultraschallunterstützte Extraktion mit Methanol aus der trockenen, homogenisierten Probe extrahiert. Der Extrakt wird mit Wasser verdünnt bzw. durch Festphasenextraktion an einem schwachen Anionenaustauscher gereinigt. Die Bestätigung und quantitative Bestimmung erfolgt durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS).

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).

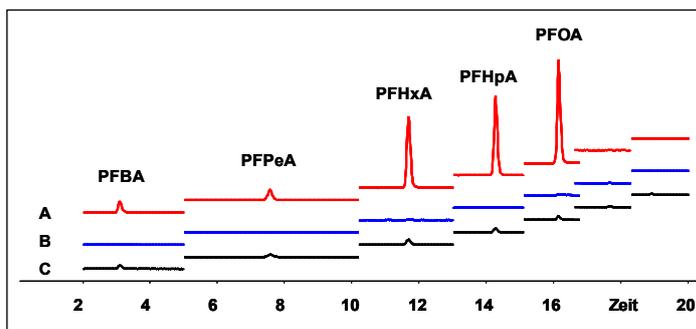


Bild 1 – PFC in handelsüblichen PTFE-Schläuchen

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, $\rho_1 = 0,25$ ng/ml

Diese Störungen treten besonders bei ungebrauchten Materialien auf. Typische Kontaminationsquellen sind z. B. Vakuumentgaser, Fritten und Schläuche sowie Pumpenkopfdichtungen.

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.

Um Minderbefunde bei den Stoffen PFNA, PFDA und PFOS zu vermeiden, muss der Volumenanteil an Methanol in der Messlösung mindestens 40 % betragen (Bild 2), unabhängig davon, ob der Extrakt gereinigt wird oder nicht.

Bei der Analyse von ungereinigten Extrakten mit hohem Gehalt an organischen Kohlenstoff, z.B. Klärschlamm, können Störungen durch Verschiebung der Retentionszeiten auftreten. Gefärbte Extrakte sollten grundsätzlich gereinigt werden.

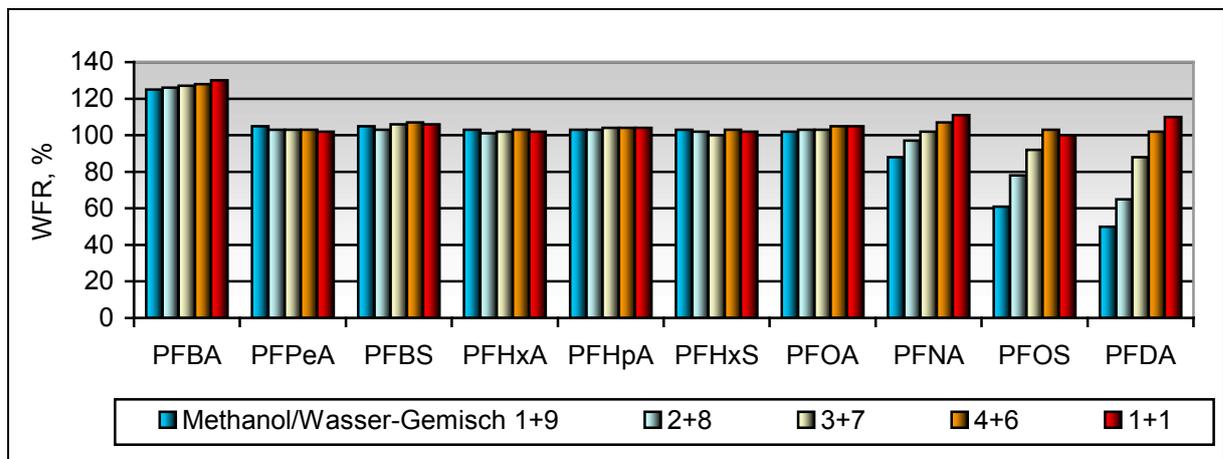


Bild 2 – Wiederfindungsraten bei verschiedenen Volumenanteilen an Methanol in der Messlösung

5 Reagenzien und Geräte

5.1 Festphasenmaterialien für die Reinigung von Extrakten

Für die Reinigung von Extrakten 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	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 $\rho_i = 0,5 \mu\text{g/ml}$	Stamm- und Dotierlösung Interne Standards $\rho_i = 1 \mu\text{g/ml}$	$\omega_{iP}^{1)}$ $\mu\text{g/kg } m_T$	$\omega_{iP}^{1)}$ $\mu\text{g/kg } m_T$
ρ_i ng/ml	ρ_{ii} ng/ml	$\mu\text{l-Zugabe}$	$\mu\text{l-Zugabe}$		
0,5	10	10	100	100	10
1	10	20	100	100	20
2,5	10	50	100	100	50
5	10	100	100	100	100
10	10	200	100	100	200
15	10	300	100	100	300
20	10	400	100	100	400
25	10	500	100	100	500

¹⁾ Massenkonzentrationen bei $m_P = 1 \text{ g}$, $V_E = 10 \text{ ml}$, $V_T = 0,5 \text{ ml}$ 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 PFCs 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.

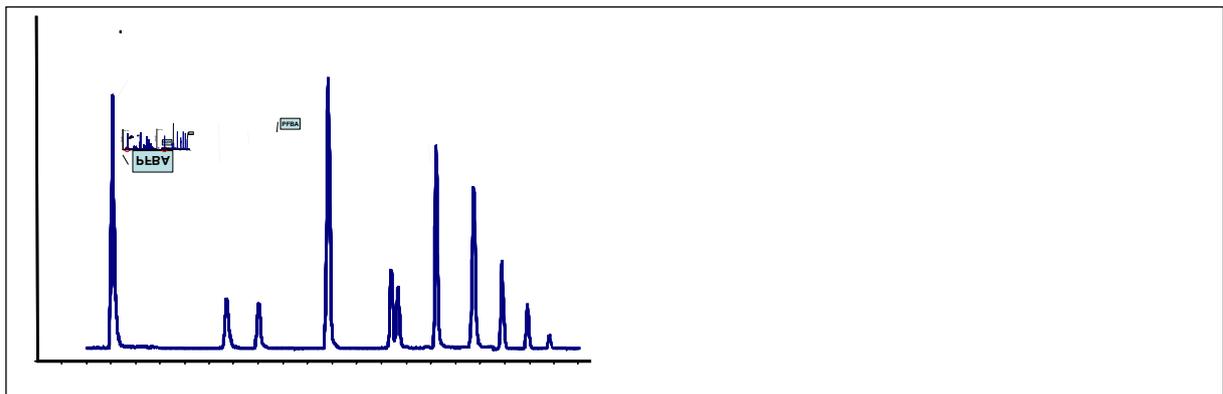
In Tabelle 4 sind einige Lieferanten für Referenzsubstanzen und Lösungen angegeben.

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 – Neochema, 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 3). Entsprechend höher kann auch der Volumenanteil an Methanol in der Messlösung sein, ohne dass zusätzliche Peakverbreiterung auftritt. Durch den höheren Anteil an Methanol 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 3 – 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 4). Dieser Vorteil ist jedoch häufig nicht nutzbar, da durch zusätzliche Peakverbreiterung die gewonnene Empfindlichkeit verloren geht (Bild 5).

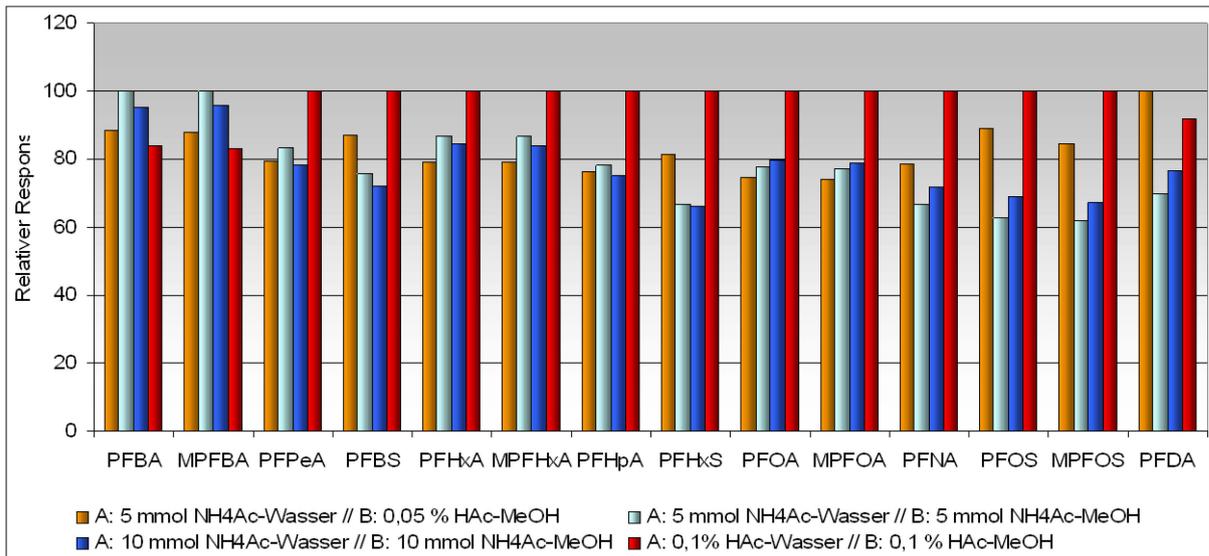


Bild 4 – Relativer Response bei verschiedenen Eluenten

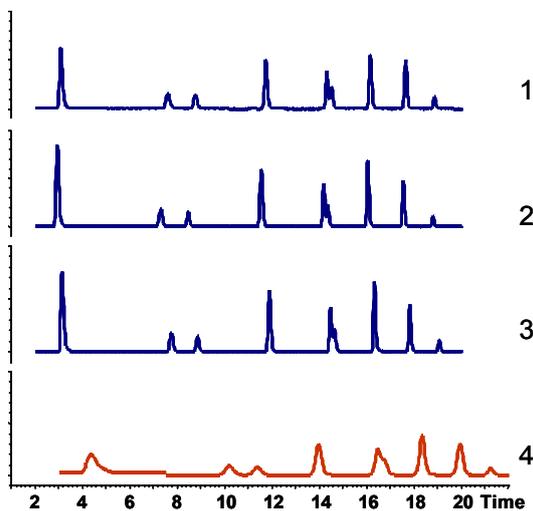


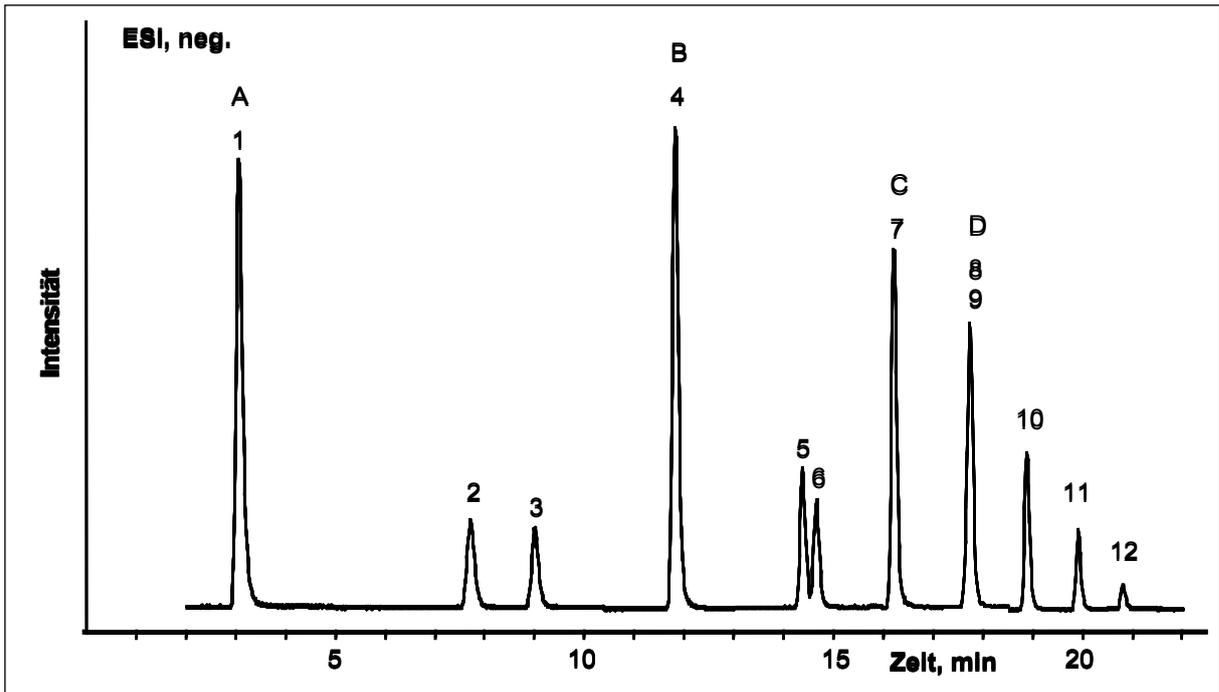
Bild 5 – Einfluss verschiedener Eluente auf die Chromatographie

- 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 mM 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 6 - 10 geben Beispiele für chromatographische Bedingungen.

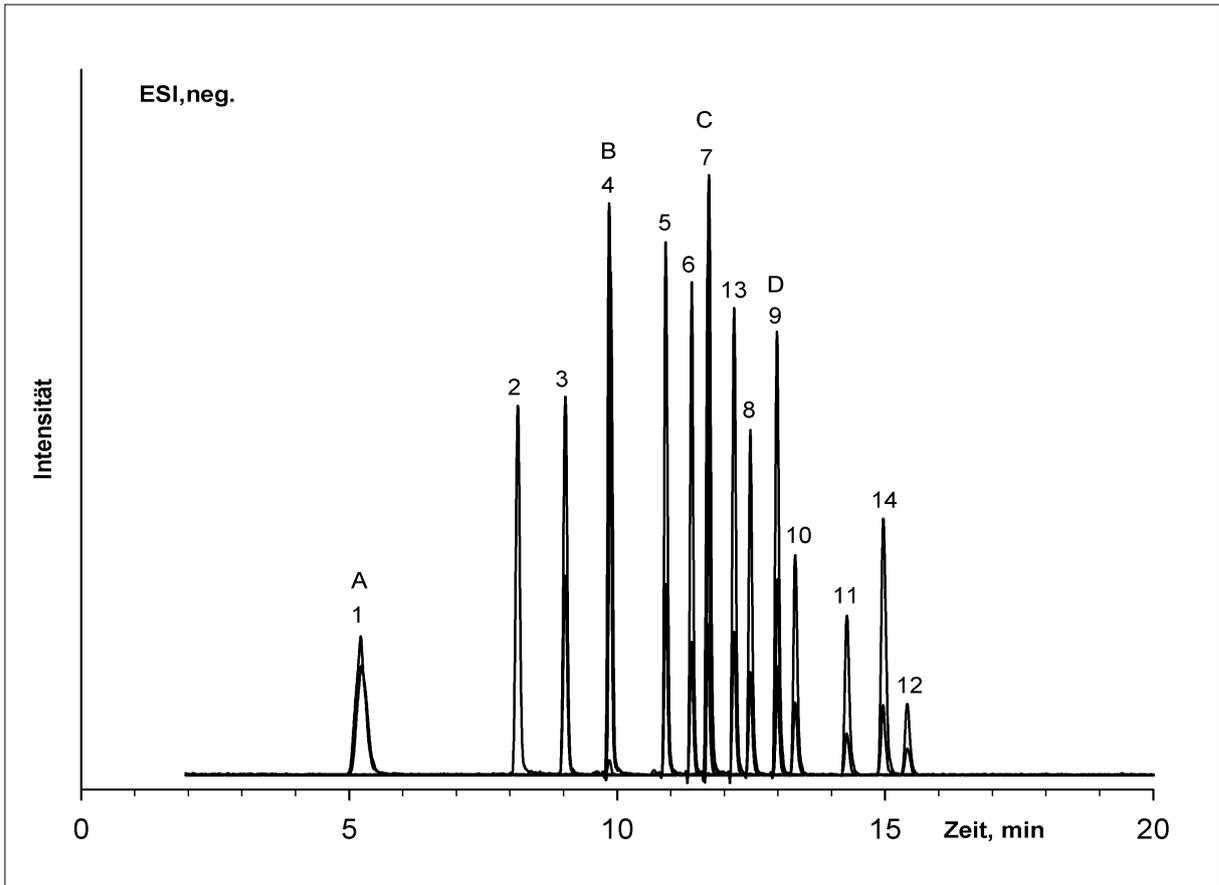


Trennsäule: Zorbax Eclipse XDB-C18, 3,5 μm , 100 mm x 2 mm, mit Vorsäule Synergi Fusion-RP, 4 μm , 4 mm x 2 mm
 Injektion: 20 μl PFC-Standard, $\rho_i = 1 \text{ ng/ml}$
 Mobile Phase: A: 5 mmol Ammoniumacetat in Wasser
 B: 0,05 % Essigsäure in Methanol
 Gradient: 35 % B nach 95 % B in 20 min, linear
 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 6 – Chromatographische Trennung, Beispiel 1

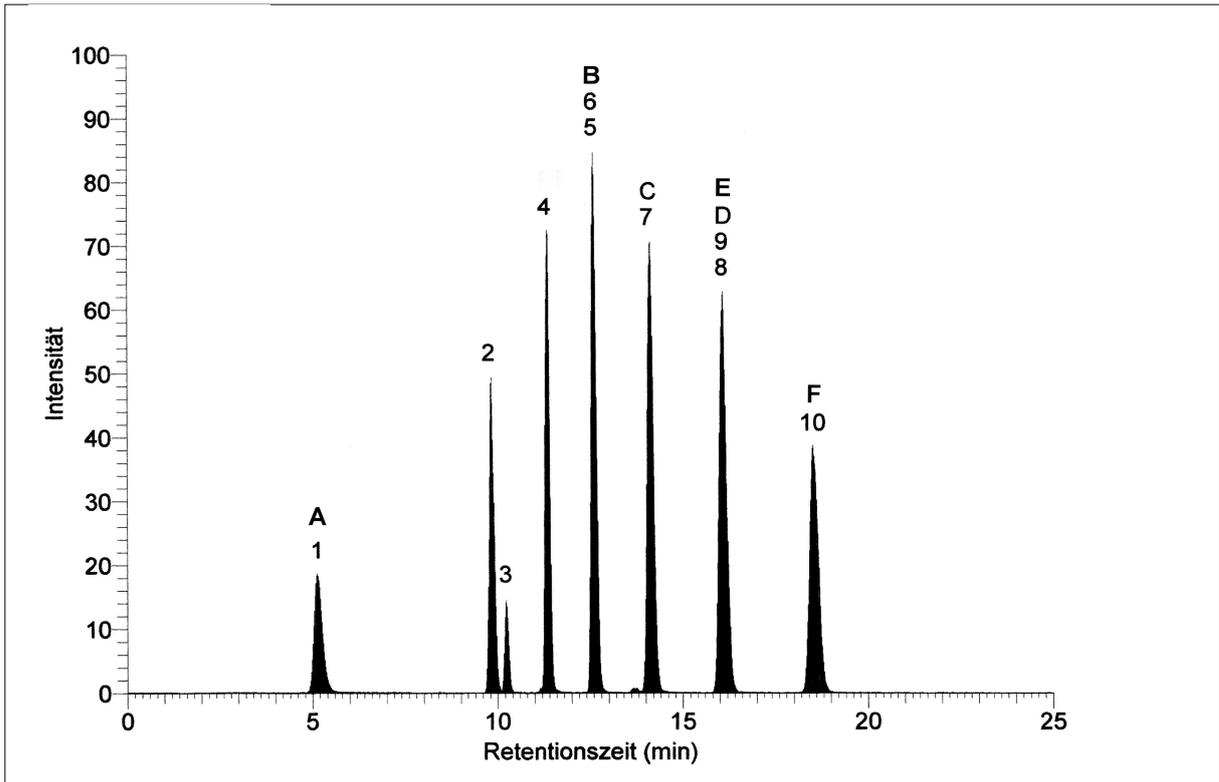


Trennsäule: Nucleodur C₁₈ Pyramid, 3 µm, 125 mm x 2 mm, mit Vorsäule Synergi Max-RP, 4 µm, 4 mm x 2 mm
 Injektion: 10 µl PFC-Standard, $\rho_i = 10$ ng/ml
 Mobile Phase: A: 10 mmol Ammoniumacetat in Wasser-Methanol 75:25
 B: 10 mmol Ammoniumacetat in Acetonitril-Methanol 75:25
 Gradient: 0 % B nach 30 % 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 6, zusätzlich im Chromatogramm 13 Perfluorheptansulfonsäure (PFHpS), 14 Perfluordecansulfonsäure (PFDS)

Bild 7 – 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

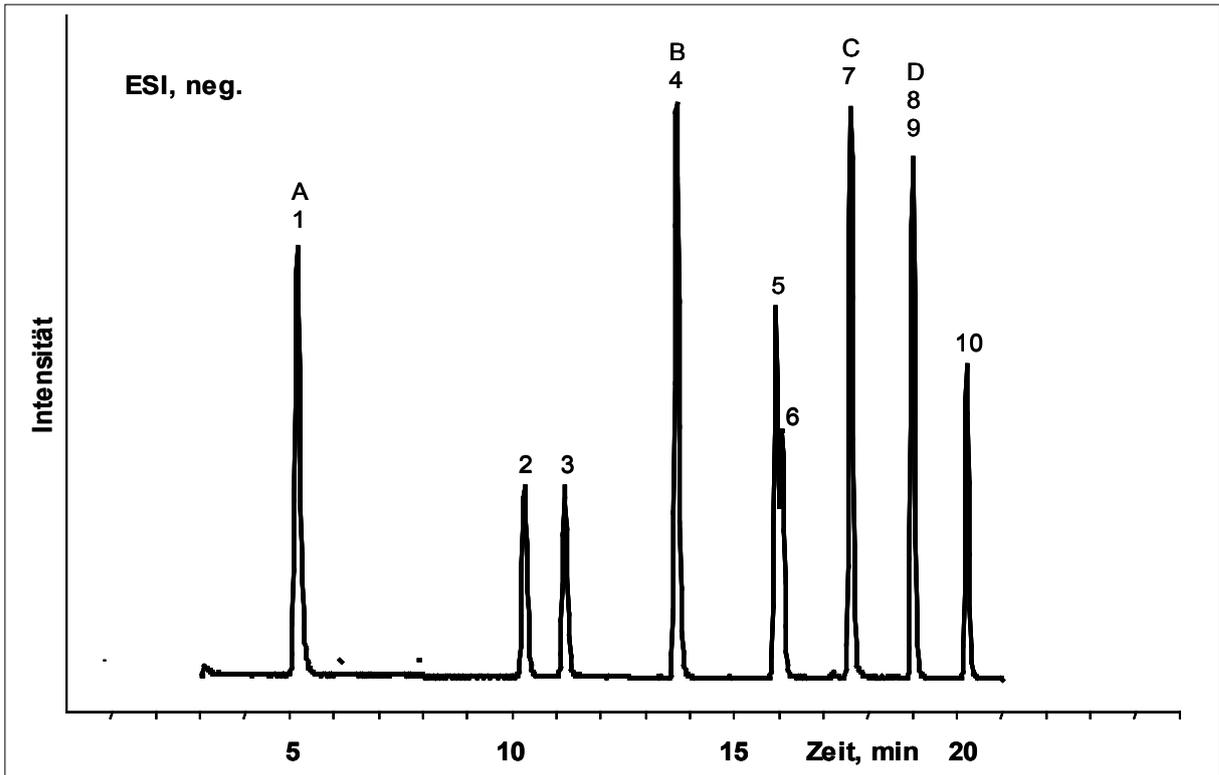
Säulentemperatur: 50 °C

Druck: 55 bar bei Anfangsbedingungen

Peak-Nummer:

Siehe Bild 6, zusätzlich im Chromatogramm E $^{13}\text{C}_5$ PFNA, F $^{13}\text{C}_2$ PFDA

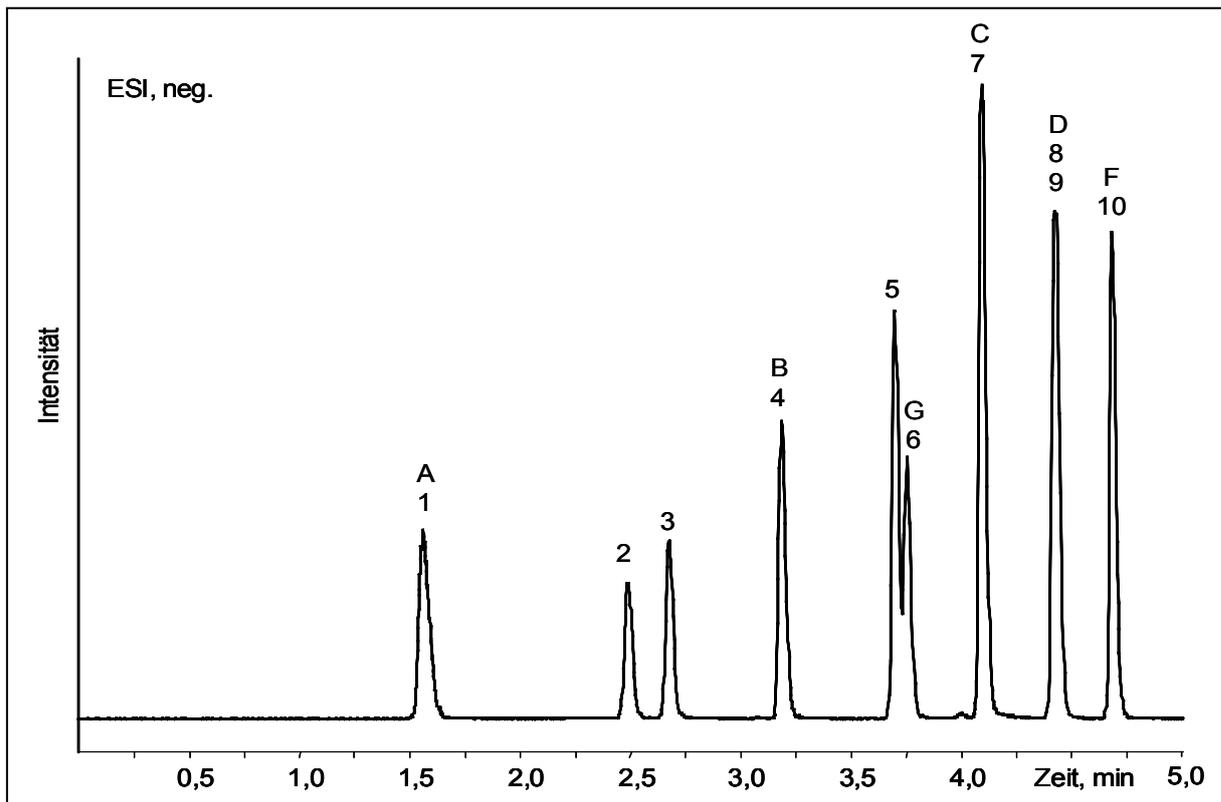
Bild 8 – Chromatographische Trennung, Beispiel 3



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 6

Bild 9 – 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 °C
 Druck: 720 bar bei Anfangsbedingungen

Peak-Nummer:

Siehe Bild 6, zusätzlich im Chromatogramm F $^{13}\text{C}_2$ PFDA, G $^{18}\text{O}_2$ PFHxS

Bild 10 – 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 Durchführung

6.1 Probenvorbereitung

6.1.1 Trocknung

Proben mit höherem Wassergehalt, z.B. Klärschlamm und Gewässersediment, sind vorzugsweise durch Gefriertrocknung zu trocknen. Alternativ hierzu kann die Trocknung auch bei 40 °C erfolgen, obgleich dies mit einem wesentlich höheren Zeitaufwand verbunden ist. Hinweise, wonach bei Trocknung von Klärschlämmen durch Zuführung von Wärme, besonders bei höheren Temperaturen, Verluste bei PFOS bis zu 40 % auftreten können, konnten nicht bestätigt werden. Die Versuche wurden durchgeführt mit verschiedenen Klärschlämmen, wobei teilweise Rückstellproben aus länderübergreifenden Ringversuchen verwendet wurden (Bild 11).

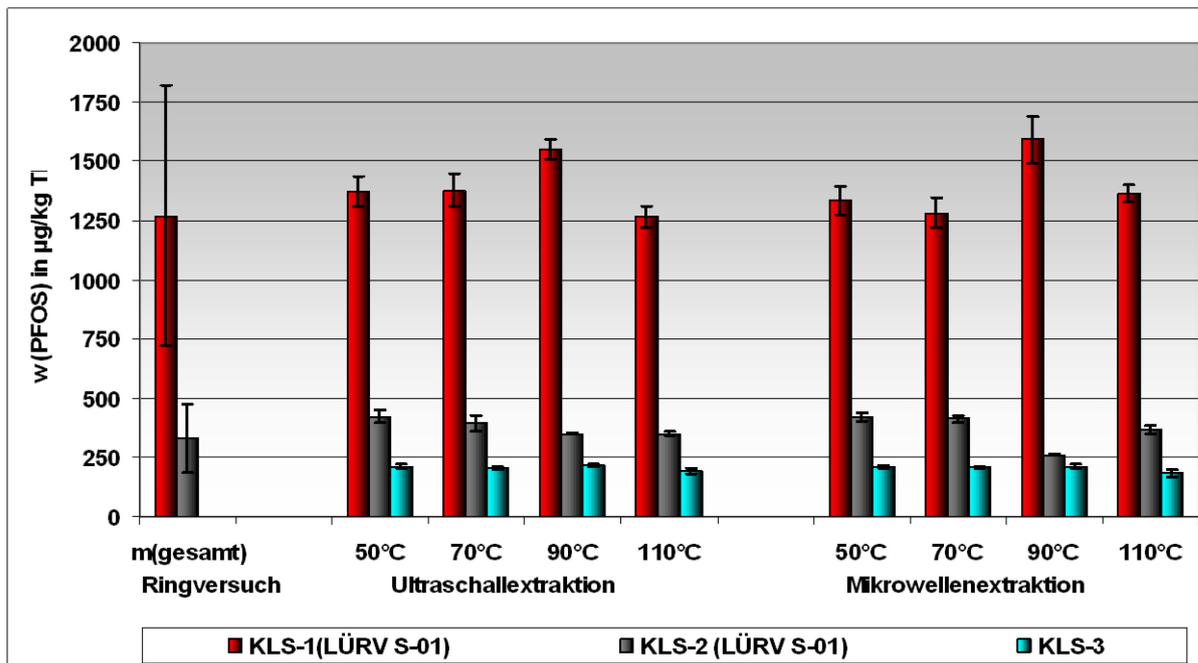


Bild 11 – Extraktionsausbeute bei Trocknung von Klärschlämmen in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Extraktionsverfahren

Alle Versuche mit 4 parallelen Ansätzen

Wassergehalte des Originalschlammes: KLS-1 w = 83 %, KLS-2 w = 83 %, KLS-3 w = 70 %

Arbeitsbedingungen:

Trocknung: 20-35 g Probe offen in einer Glasschale 24 Stunden im Trockenschrank (50 °C – 110 °C) trocknen, in Kugelmühle zerkleinern und auf 250 µm sieben.

Ultraschallextraktion: 0,5 g, 10 ml Methanol, 40 °C, gelegentliches Schütteln

Mikrowellenextraktion: 0,5 g, 10 ml Methanol, Rührfunktion eingeschaltet (Stufe 2), 10 min lineares Aufheizen auf 100 °C, 20 min Extraktion bei 100 °C

Die gute Übereinstimmung der Extraktionsausbeuten zwischen der recht milden Ultraschallextraktion und der energiereichen Mikrowellenextraktion zeigt darüber hinaus, dass die Trocknung der Schlämme bei höheren Temperaturen sich nicht nachteilig auf die Extrahierbarkeit von PFOS auswirkt.

6.1.2 Homogenisierung

Zur weiteren Homogenisierung ist es erforderlich, die trockene Probe mit einer Analysenmühle so weit zu zerkleinern, dass 95 % des Mahlgutes ein Sieb der Maschenweite von 250 µm passieren können. Unter diesen Bedingungen werden homogene Prüfproben erhalten, aus denen repräsentative Teilproben für die Analytik entnommen werden können (Bild 12).

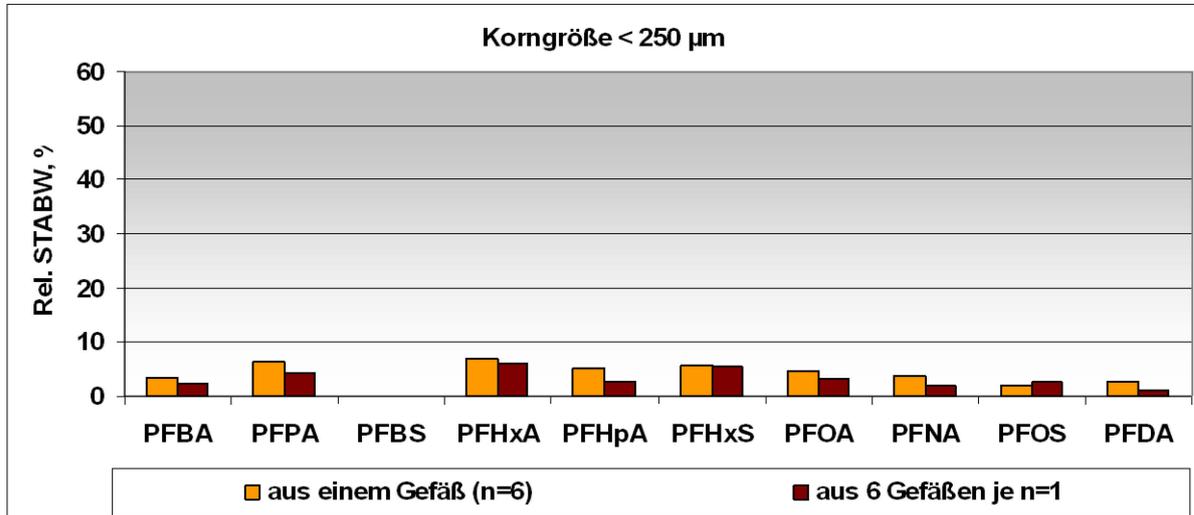


Bild 12 – Homogenität der Prüfprobe bei Korngrößen < 250 µm

Kontaminierte Bodenprobe, mittlere Massenanteile in µg/kg TM (im Batch): PFBA (32), PFPeA (24), PFHxA (71), PFHpA (148), PFHxS (11), PFOA (2800), PFNA (11), PFOS (6800), PFDA (41).

Die Aufarbeitung der gleichen Probe gem. BBodSchV ergab bei der Analyse zwischen einzelnen Gebinden Standardabweichungen bis zu 50 %.

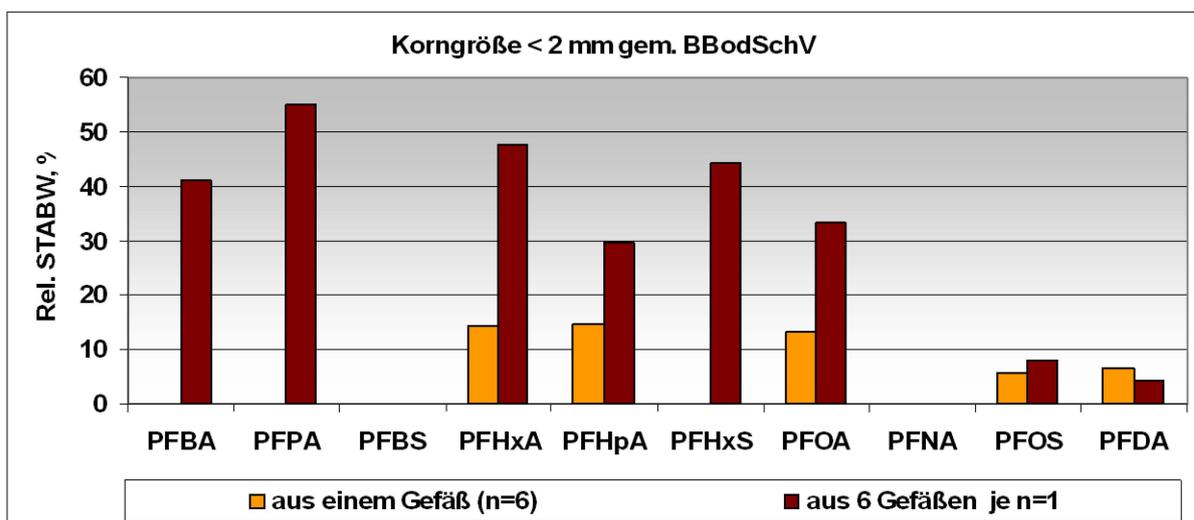


Bild 13 – Homogenität der Prüfprobe bei Korngrößen < 2 mm

Probe siehe Legende zu Bild 12

ANMERKUNG Die Untersuchungen zur Homogenität wurden im Rahmen der Vorbereitungen zum Länderübergreifenden Ringversuch LÜBRV-S 01 - PFT in Boden - im März 2009 durchgeführt.

6.2 Extraktion

Zur Abschätzung der Extraktionsausbeuten des Verfahrens wurden eine belastete Klärschlamm- und eine kontaminierte Bodenprobe über 72 h mit Methanol im Soxhlet extrahiert. Bei den Proben handelte es sich um Rückstellproben aus länderübergreifenden Ringversuchen. Die nach Soxhletextraktion ermittelten Massenanteile für die einzelnen PFC wurden als maximal extrahierbare Stoffmengen angenommen und die mit den verschiedenen Extraktionsmitteln und -verfahren ermittelten Werte relativ hierauf bezogen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 3 parallelen Analysen mit Standardabweichung (Bilder 14 und 15). Zu Vergleichszwecken sind die Gesamtmittelwerte und die Vergleichsstandardabweichungen, die für diese Proben in den Ringversuchen ermittelt wurden, dargestellt.

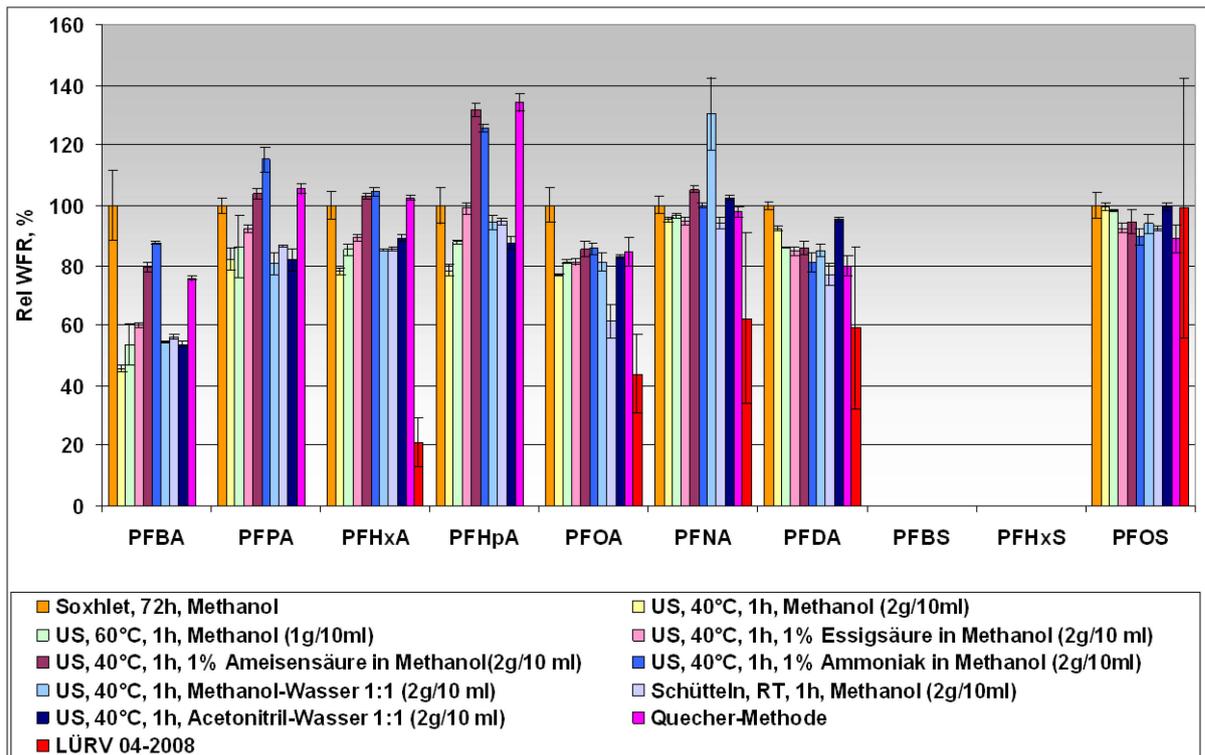


Bild 14 – PFC-Ausbeuten mit verschiedenen Extraktionsmitteln und -methoden am Beispiel einer Klärschlammprobe

Gesamtmittelwerte des LÜR V 04-2008, alle Massenanteile in $\mu\text{g}/\text{kg m}_T$: PFBA (56), PFPA (22), PFHxA (83), PFHpA (30), PFOA (490), PFNA (83), PFDA (810), PFBS (<10), PFHxS (<10), PFOS (340)

Bilder 14 und 15 zeigen, dass die Ausbeuten der Soxhlet-Extraktion mit dem Verfahren der Ultraschallextraktion meist nicht erreicht werden. Dies wird besonders deutlich bei den Carboxylaten in der Bodenprobe (Bild 15). Weitgehend unabhängig vom Extraktionsmittel und den Bedingungen werden z. B. bei PFBA nur 60 % der Ausbeute der Soxhlet-Extraktion erzielt. Mit zunehmender Kettenlänge fällt die Wiederfindungsrate etwas günstiger aus und erreicht mit Methanol als Extraktionsmittel für PFOA etwa 80 %. Die Wiederfindungsraten der Schüttelextraktion und der Quecher-Methode liegen bei der Bodenprobe meist niedriger als die der Ultraschallextraktion.

Im Vergleich etwas günstiger fallen die Ergebnisse für die Klärschlammprobe aus. Für PFOS wird bei beiden Proben weitgehend unabhängig von den Extraktionsbedingungen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Soxhlet-Extraktion erzielt.

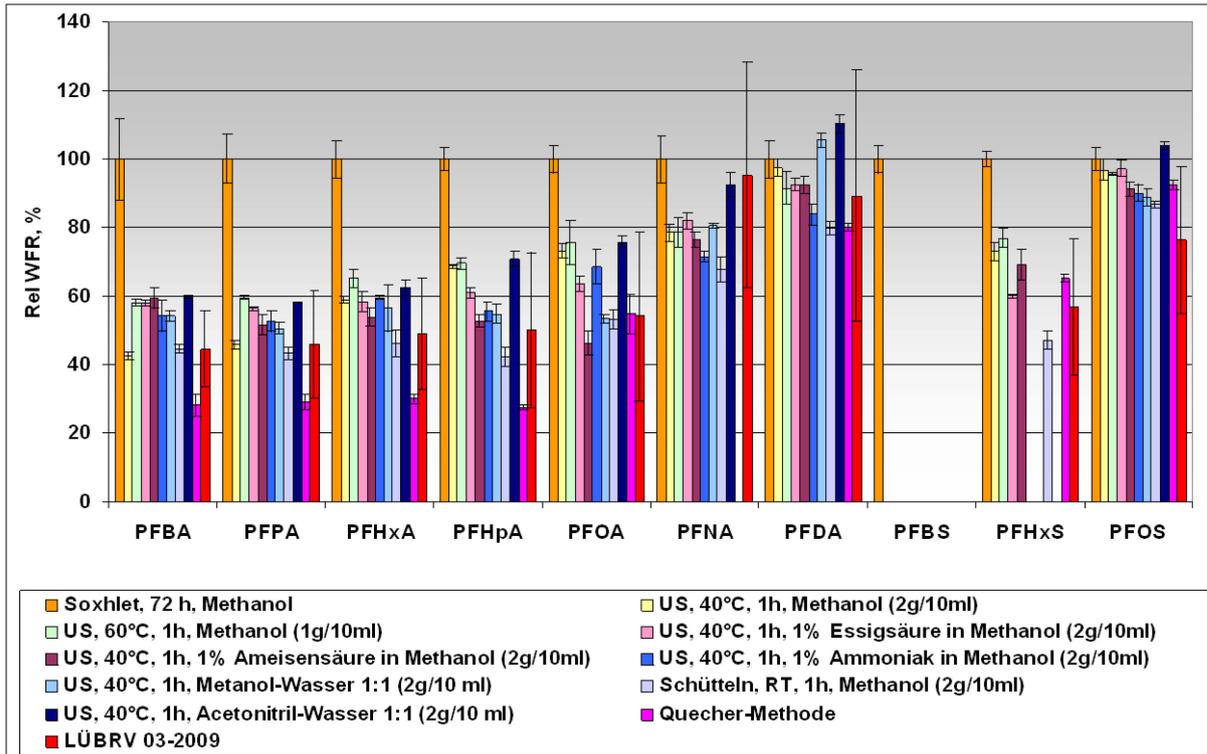


Bild 15 – PFC-Ausbeuten mit verschiedenen Extraktionsmitteln und -methoden am Beispiel einer Bodenprobe

Gesamtmittelwerte des LÜBRV 03-2009, alle Massenanteile in µg/kg m_T: PFBA (72), PFPA (52), PFHxA (120), PFHpA (240), PFOA (3500), PFNA (14), PFDA (40), PFBS (<10), PFHxS (20), PFOS (6020)

Auch durch mehrstufige, ultraschallunterstützte Extraktion mit Methanol können die Wiederfindungsraten bei den kurzkettigen Caboxylaten nicht wesentlich erhöht werden (Bild 16). Andererseits nimmt der Aufwand für die Durchführung der Extraktion deutlich zu und das Volumen des Extraktes, gegebenenfalls nach Aufkonzentrierung, muss zusätzlich ermittelt werden, womit weitere Arbeitsschritte hinzukommen.

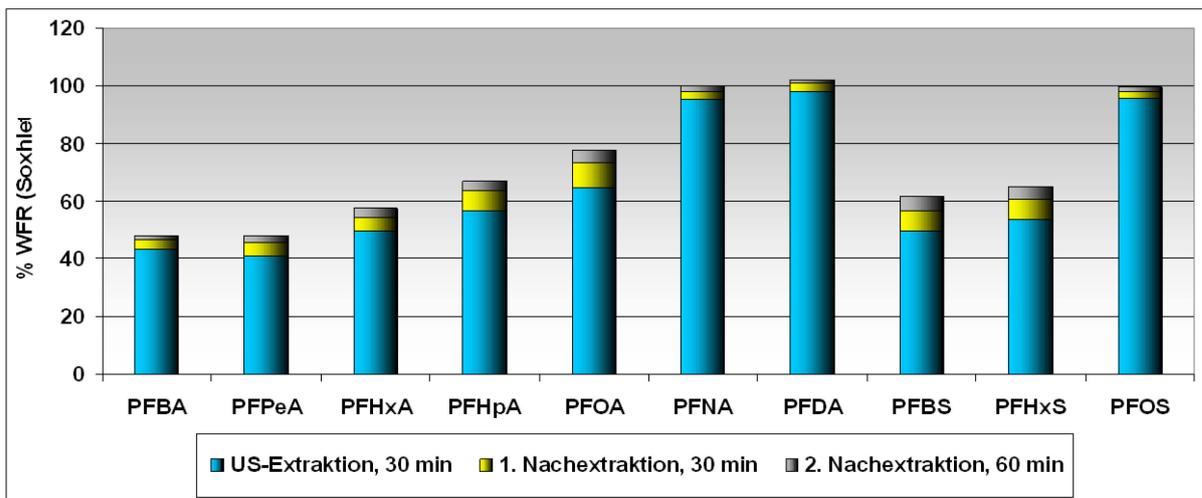


Bild 16 – Extraktionsausbeuten bei mehrstufiger Ultraschallextraktion mit Methanol

Bodenprobe: LÜBRV 03-2009

Die Untersuchungen wurden unabhängig von einem anderen Labor durchgeführt und beziehen sich in diesem Fall auf eine 12-stündige Soxhletextraktion, die mit den Werten der 72-stündigen Extraktion (Legende zu Bild 15) gut übereinstimmt.

Im Vergleich zur Ultraschallextraktion höhere Extraktionsausbeuten, besonders bei den kurzkettigen Carboxylaten, werden bei Anwendung der Mikrowellenextraktion erzielt (Bild 17). Voraussetzung hierfür ist, dass die Probe während der Extraktion gerührt wird, was bei den meisten Geräten standardmäßig jedoch nicht möglich ist. Wegen des relativ geringen Verbreitungsgrades solcher Geräte wurde diese Extraktionstechnik im Arbeitskreis nicht weiter verfolgt.

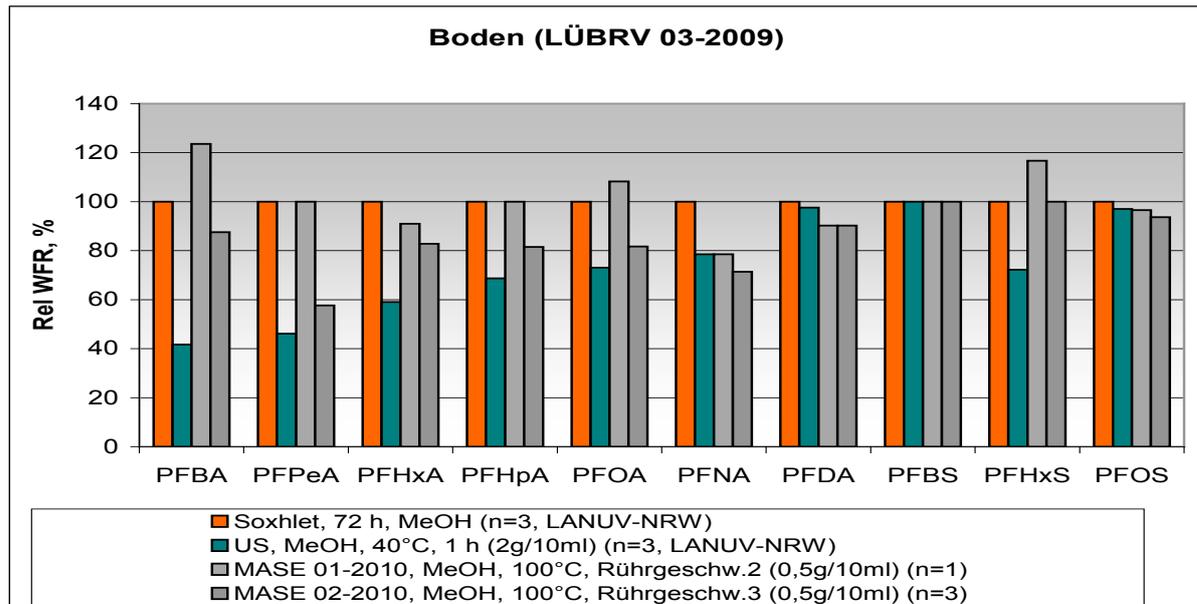


Bild 17 – Relative Extraktionsausbeuten bei Mikrowellenextraktion

Aus praktischen Gründen wurde an der einfachen Ultraschallextraktion mit Methanol bei 40 °C festgehalten, die dabei auftretenden Minderbefunde bei den kurzkettigen PFC, besonders bei der Extraktion von Boden, wurden in Kauf genommen. Die Wiederfindungsraten für PFOA sind mit etwa 80 % akzeptabel, und für PFOS kann von einer quantitativen Extraktion ausgegangen werden.

6.3 Reinigung von Extrakten

Nach der Norm können farblose und klare Extrakte ohne weitere Reinigung analysiert werden. Hierzu ist ein Teilvolumen des Extraktes mit Wasser zu verdünnen, wobei der Anteil an Methanol nicht unter 40 % liegen darf (siehe Abschnitt 4). Fallen die Wiederfindungsraten der internen Standards bei der direkten Analyse zu gering aus, muss der Extrakt gereinigt werden. Um Störungen zu vermeiden, sollte die Reinigung grundsätzlich dann erfolgen, wenn farbige oder trübe Extrakte vorliegen. Dies ist meistens bei Klärschlamm, Kompost und Gewässersediment der Fall.

Die Reinigung erfolgt durch Festphasenextraktion unter Verwendung eines schwachen Anionenaustauschers auf Polymerbasis, der sauer konditioniert und mit einem sauer gestellten Extrakt beladen wird. Bei einer Sorbensmasse von 60 mg und einem Volumenanteil des Extraktes von 50 % darf das Probevolumen bis zu 2 ml betragen. Die Waschlösungen und deren Volumina entsprechen dem Extraktionsverfahren nach DIN 38407-42. Tabelle 5 zeigt, dass unter diesen Bedingungen selbst bei hochdotierten, matrixreichen Proben der Durchbruch der Analyten bei den Waschschrritten vernachlässigbar ausfällt.

Tabelle 5 – Durchbruch von PFC bei der Reinigung matrixreicher Proben

PFC	Durchbruch (%) bezogen auf die Dotierung																			
	Boden-1, RV				Hafensediment				Maissilage				Klärschlamm industriell				Klärschlamm kommunal			
Ablauf	P	W1	W2	W3	P	W1	W2	W3	P	W1	W2	W3	P	W1	W2	W3	P	W1	W2	W3
PFBA	<1	<1	2,9	<1	<1	<1	2,9	<1	<1	<1	2,6	<1	<1	<1	3,4	<1	<1	<1	2,5	<1
PFPeA	n.n.	n.n.	1,5	n.n.	n.n.	n.n.	1,5	n.n.	n.n.	n.n.	1,3	n.n.	n.n.	n.n.	1,7	n.n.	n.n.	n.n.	1,3	n.n.
PFHxA	<1	<1	1,7	<1	<1	<1	1,7	<1	<1	<1	1,6	<1	<1	<1	2,1	<1	<1	<1	1,9	<1
PFHpA	n.n.	n.n.	1,5	n.n.	n.n.	n.n.	1,5	n.n.	n.n.	n.n.	1,6	n.n.	n.n.	n.n.	2,6	n.n.	n.n.	n.n.	2,1	n.n.
PFOA	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2,4	<1	<1	<1	2,6	<1
PFNA	n.n.	n.n.	1,3	n.n.	n.n.	n.n.	1,3	n.n.	n.n.	n.n.	2,8	n.n.	n.n.	n.n.	3,6	n.n.	n.n.	n.n.	3,5	n.n.
PFDA	<1	<1	1,2	<1	<1	<1	1,2	<1	<1	<1	2,9	<1	<1	<1	4,4	<1	<1	<1	4,1	<1
PFBS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
PFHxS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
PFOS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Probenvorbereitung: Von der gefriergetrockneten, homogenisierten Feststoffprobe 2 g mit 10 ml Methanol 1 Stunde im Ultraschallbad bei 40 °C extrahieren. Von dem Extrakt 1 ml abnehmen und den Extrakt mit 20 µl PFC-Standardlösung in Methanol ($\rho_i = 25 \mu\text{g/ml}$) dotieren (Matrixanteil 0,2 g). Die Massenkonzentration im Extrakt beträgt 0,5 µg/ml, der Massenanteil an PFC 2,5 mg/kg m_T (ohne Berücksichtigung der Vorbelastung).

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

Konditionierung: 2 ml 0,1% Ameisensäure in Methanol; 2 ml Methanol; 2 ml Wasser

Probe (P): Methanol-Extrakt (1 ml) mit Wasser auf 2 ml aufgefüllt und mit Ameisensäure sauer gestellt (0,1%), Methanol-Wasser 1:1

Waschen: 2 ml Wasser (W1) ; 2 ml Aceton-Acetonitril-Ameisensäure 50:50:1 (W2) ; 2 ml Methanol (W3)

Aufarbeitung: Ablauf von der Probenaufgabe und Waschlösungen getrennt auffangen und jeweils 10 µl entnehmen und zu 1 ml ISTD-Lösung geben.

Alternativ zu dieser Arbeitsweise kann die Reinigung von Extrakten nach Verdünnung mit Wasser analog dem Extraktionsverfahren nach DIN 38407-42 erfolgen. Der Volumenanteil an Methanol darf bei einem Gesamtvolumen von 50 ml dabei 5 % nicht überschreiten. Hinsichtlich der Robustheit des Verfahrens wird auf das Validierungsdokument zu DIN 38407-42 verwiesen.

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. 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.

6.4 Massenspektrometrische Messung

Die in Tabelle 6 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 9 - 13).

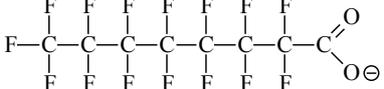
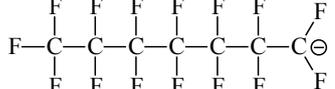
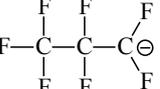
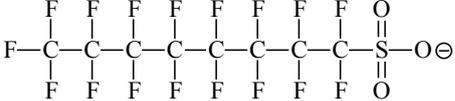
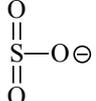
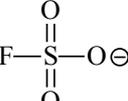
Tabelle 6 – Massenübergänge der zu bestimmenden Substanzen

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 7 zeigt typische Fragmentierungen am Beispiel von PFOA und PFOS.

Tabelle 7 – 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.

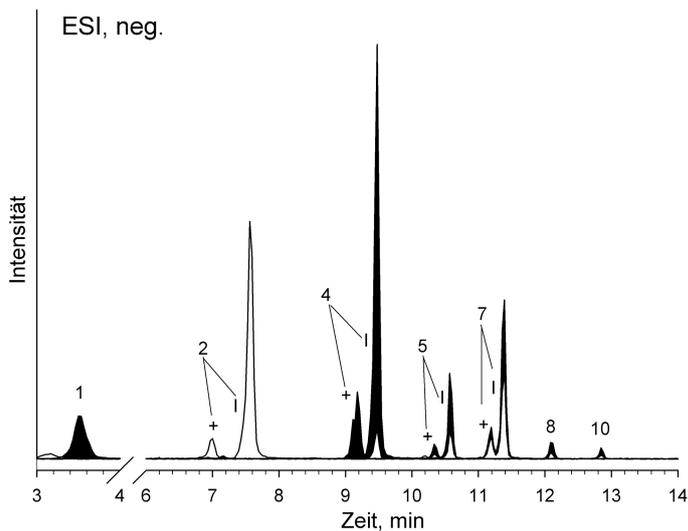


Bild 18 – Beispiel für ein MS-Chromatogramm einer Probe mit verzweigten und unverzweigten Carbonsäuren

Peak-Nummer siehe Legende zu Bild 6, + verzweigte Isomere, I unverzweigte Isomere

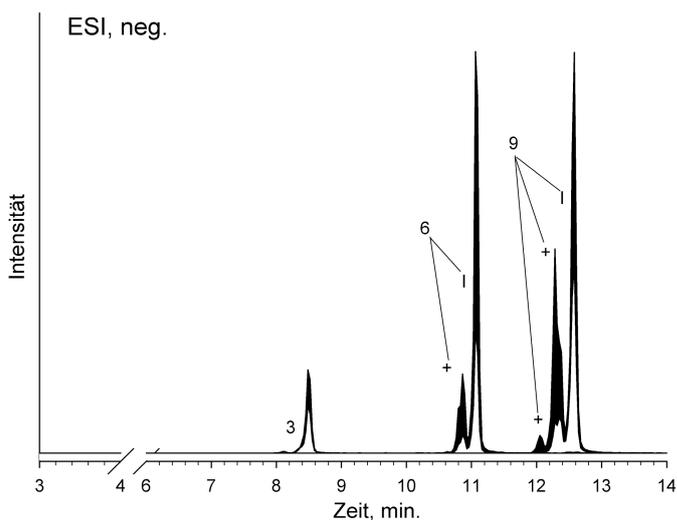


Bild 19 – Beispiel für ein MS-Chromatogramm einer Probe mit verzweigten und unverzweigten Sulfonsäuren

Peak-Nummer siehe Legende zu Bild 6, + verzweigte Isomere, I unverzweigte Isomere

7 Ermittlung von Verfahrenskenndaten

7.1 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 8). 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 8 – 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 38414-14
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.

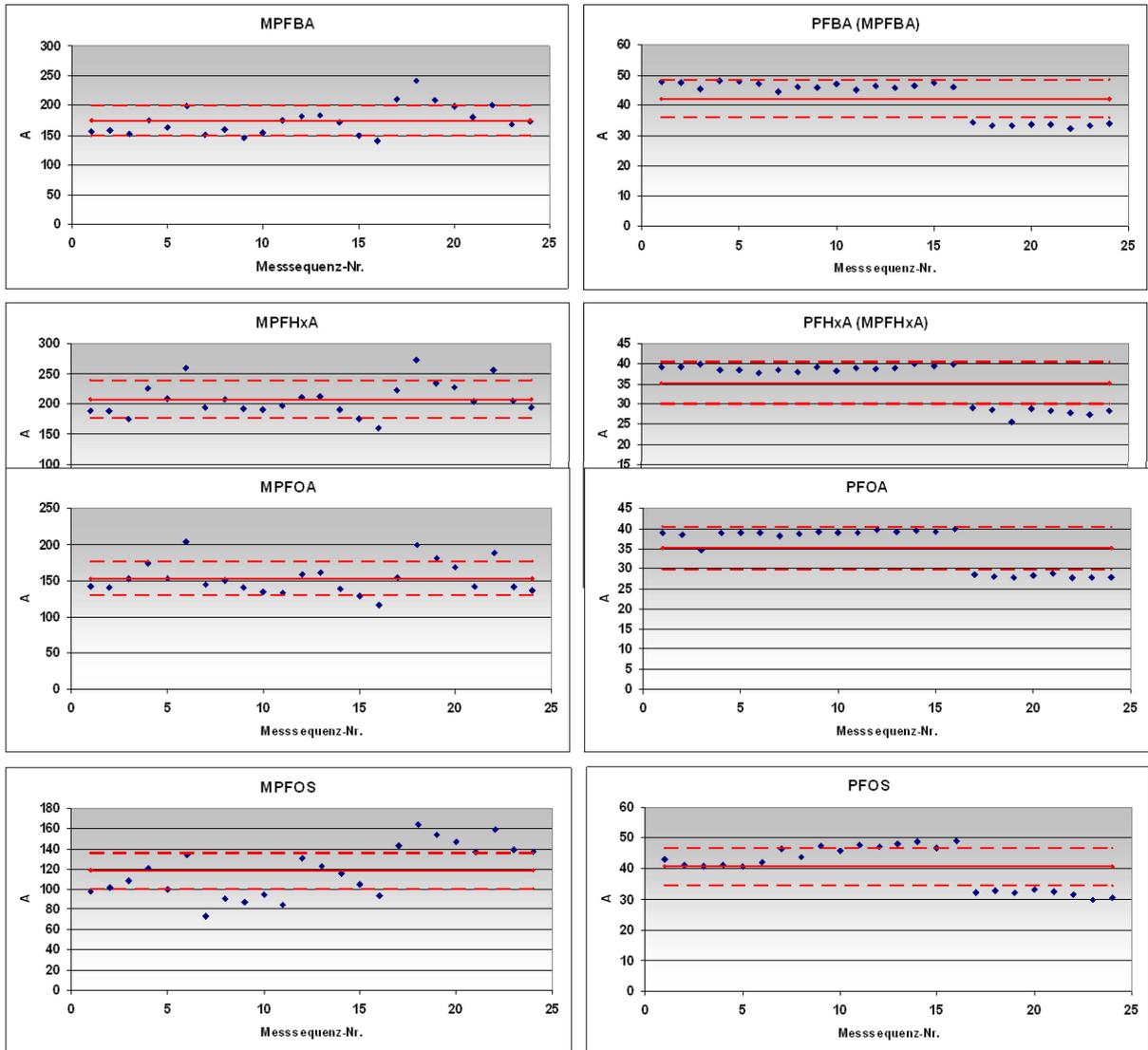


Bild 20 – Stabilität von Kalibrierungen, Beispiel

Messsequenzen mit durchschnittlich 30 – 40 Umweltproben und regelmäßiger Reinigung des MS-Gerätes, Messbedingungen siehe Tabelle 13

7.2 Kalibriersubstanzen

Für die Kalibrierung dürfen nach der Norm nur unverzweigte PFC eingesetzt werden, die für die Sulfonate zurzeit nur als Lösungen kommerziell sind (Tabelle 4).

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 (Tabelle 4) und wurde im Rahmen des Ringversuches untersucht.

7.3 Kenndaten der Grundkalibrierung und Messbedingungen

Tabellen 9 – 13 zeigen beispielhaft Kenndaten der Grundkalibrierung, die mit verschiedenen Messgeräten erzielt wurden. Die Messbedingungen sind jeweils angegeben.

Tabelle 9 – 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)} n = 8	CV _{r(OAG)} n = 10	S/N	S _{RT} n = 10
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									
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, in %									
CV _{r(OAG)}	Wiederholstandardabweichung an der oberen Arbeitsbereichsgrenze, in %									
S/N	Verhältnis des Signals zum Rauschen (Peak to Peak) an der unteren Anwendungsgrenze									
S _{RT}	Standardabweichung der Retentionszeiten, in min									

Tabelle 10 – 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)} n = 8	CV _{r(OAG)} n = 10	S/N	S _{RT} n = 10
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 Multipller-Spannung: 2200 V, Detektor-Spannung: 175 V									
Formelzeichen siehe Tabelle 9										

Tabelle 11 – 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)} n = 6	CV _{r(OAG)} n = 6	S/N	S _{RT} n = 10
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 5 µm; 150 mm x 4,6 mm									
Injektion	5 µl									
Eluent	A: 2mmol 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									
Formelzeichen siehe Tabelle 9										

Tabelle 12 – 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)} n = 6	CV _{r(OAG)} n = 6	S/N	S _{RT} n = 6
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 1,7 µm, 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-Lense: 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 Multiplier-Spannung: 621 V									
Formelzeichen siehe Tabelle 9										

Tabelle 13 – 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)} n = 6	CV _{r(OAG)} n = 6	S/N	S _{RT} n = 6
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, 3,5µm (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									
Formelzeichen siehe Tabelle 9										

8 Untersuchungen zur Richtigkeit und Präzision

Tabellen 14 – 16 geben Wiederfindungsraten für die verschiedenen Anwendungsbereiche des Verfahrens wieder. Die Werte wurden in verschiedenen Laboren nach den Vorgaben der Norm ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit externem Standard ohne weitere Korrektur. Bei der Ermittlung der Wiederfindungsraten wurden Befunde an PFC in den Originalproben jeweils berücksichtigt.

Tabellen 14 – 16 zeigen, dass die Vorgaben bezüglich der Wiederfindungsraten der internen Standards (50 % bis 150 %) bis auf wenige Ausnahmen eingehalten werden.

Tabelle 14 – Beispiele für Wiederfindungsraten aus Boden und Gewässersediment

Labor	1		2		2		1		3		4	
Probe	Boden B1				Boden B2				Gewässersediment			
Analysenwerte	TOC = 1,41 %				-				TOC = 7,74 %			
m_P (g)	2		1		1		2		0,5		1	
N ($\mu\text{g}/\text{kg } m_T$)	50		50		50		50		50		25	
V_E (ml)	10		10		10		10		10		20	
V_T (ml)	1		1		1		1		1		2	
Festphase	Strata-X-AW ^a											
m_S (mg)	60		60		60		60		60		200	
n	4		6		6		4		2		3	
Stoffe	A_i	s	A_i	s	A_i	s	A_i	s	A_i	s	A_i	s
PFBA	94,8	2,5	95,3	7,6	88,9	6,2	82,3	3,4	83,0	7,6	65,0	10,5
PFPeA	93,4	1,4	90,4	7,8	85,3	6,8	78,8	5,1	93,1	0,1	64,3	11,0
PFHxA	94,5	2,0	82,4	8,8	79,5	8,6	82,0	3,2	91,1	0,1	70,0	14,0
PFHpA	92,2	1,7	97,3	10,2	92,7	10,0	80,8	3,3	88,9	1,8	66,0	12,8
PFOA	92,8	1,1	98,1	9,2	86,3	6,8	85,2	1,3	82,3	2,7	68,3	12,9
PFNA	91,6	1,6	100,4	7,6	95,2	5,0	84,4	0,3	86,5	1,0	72,0	12,3
PFDA	88,8	2,0	96,1	8,6	86,0	5,8	82,9	2,2	95,2	0,8	74,7	11,0
PFBS	87,1	1,0	84,1	6,2	83,3	4,2	78,3	2,0	95,0	1,7	79,0	7,8
PFHxS	91,2	1,5	94,1	6,4	90,6	4,2	80,7	2,0	92,3	0,7	80,7	8,1
PFOS	89,9	2,1	95,1	4,2	88,5	5,2	89,5	2,4	96,7	0,6	67,7	4,1
¹³ C ₄ -PFBA	95,0	3,4	77,6	7,0	60,9	6,0	81,6	2,9	109,0	2,8	52,7	2,3
¹³ C ₂ -PFHxA	90,2	2,8	92,6	8,5	88,7	9,5	76,2	2,2	113,5	3,5	56,3	5,9
¹³ C ₄ -PFOA	88,9	2,3	100,8	5,5	98,7	3,5	77,6	1,4	102,0	1,4	66,0	12,0
¹³ C ₅ -PFNA ^b	86,5	3,5	-	-	-	-	77,8	0,9	-	-	64,0	12,2
¹³ C ₂ -PFDA ^b	83,9	3,2	-	-	-	-	76,7	1,8	-	-	72,7	11,7
¹⁸ O ₂ -PFHxS ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88,3	5,9
¹³ C ₄ -PFOS	86,5	2,6	100,6	5,0	98,0	5,0	79,2	1,2	118,5	3,5	83,7	2,9

m_P Masse der Probe, die extrahiert wurde, in Gramm (g);
 N Konzentrationsniveau, Aufstockung der Probe, in Mikrogramm je Kilogramm Trockenmasse ($\mu\text{g}/\text{kg } m_T$);
 V_E Volumen des Extraktionsmittels, in Milliliter (ml);
 V_T Teilvolumen des Extraktes, das aufgearbeitet wird, in Milliliter (ml);
 m_S Masse der Festphase, in Milligramm (mg);
 n Anzahl der parallelen Analysen;
 A_i mittlere Wiederfindungsrate für die Substanz i , in Prozent (%);
 s Standardabweichung der Wiederfindungsrate, in Prozent (%).

^a Strata-X-AW ist ein Beispiel für geeignetes handelsübliches Produkt. Die Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender der Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch das DIN.

^b Zusätzlich im Analysenverfahren

Tabelle 15 – Beispiele für Wiederfindungsraten aus Klärschlamm

Labor	1		3		5		6			6		
Probe	Klärschlamm K1		Klärschlamm K2		Klärschlamm K3		Klärschlamm K4			Klärschlamm K5		
Analysenwerte	TOC = 28,5 %		-		-		-			-		
m _P (g)	2		0,5		0,1		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
N (µg/kg m _T)	100		50		100		100	200	300	100	200	300
V _E (ml)	10		10		10		5	5	5	5	5	5
V _T (ml)	1		1		2		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Festphase	Strata-X-AW ^a											
m _S (g)	60		60		200		60			60		
n	3		3		3		1	1	1	1	1	1
Stoffe	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i					
PFBA	60,3	5,1	63,5	2,9	111	0,8	119	83	93	82	82	89
PFPeA	66,0	5,1	96,8	5,3	125	0,7	101	89	92	89	89	80
PFHxA	79,7	5,0	104,7	3,6	122	3,1	96	93	93	84	78	73
PFHpA	86,6	6,1	99,9	4,5	119	3,1	114	107	107	89	85	80
PFOA	99,4	5,5	104,0	7,7	117	8,2	111	101	107	89	77	81
PFNA	97,4	7,2	99,9	5,3	110	3,5	126	118	111	98	87	84
PFDA	100,7	7,2	93,7	1,3	37 ^c	5,1	105	101	100	96	87	84
PFBS	82,3	4,1	99,4	2,6	101	2,3	87	89	90	n.a.	88	80
PFHxS	91,1	6,3	91,8	5,4	102	2,0	82	80	85	94	87	82
PFOS	64,7	16,5	89,0	8,3	15 ^c	2,1	89	95	92	98	87	87
¹³ C ₄ -PFBA	61,2	4,7	64,7	3,4	98	2,2	96	84	95	88	87	81
¹³ C ₂ -PFHxA	71,7	4,3	102,6	5,0	102	1,3	95	86	89	74	77	73
¹³ C ₄ -PFOA	90,9	4,1	103,7	4,0	103	1,1	102	90	97	80	73	71
¹³ C ₅ -PFNA ^b	90,8	4,0	-	-	103	2,1	107	99	104	88	75	71
¹³ C ₂ -PFDA ^b	101,5	3,4	-	-	110	3,2	97	87	93	85	81	79
¹⁸ O ₂ -PFHxS ^b	-	-	-	-	112	4,7	79	90	85	83	85	76
¹³ C ₄ -PFOS	89,7	3,6	99,4	3,9	113	3,0	88	87	87	82	80	76
Formelzeichen siehe Tabelle 14												
^a Strata-X-AW ist ein Beispiel für geeignetes handelsübliches Produkt. Die Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender der Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch das DIN.												
^b Zusätzlich im Analysenverfahren												
^c Aufstockung im Vergleich zur Vorbelastung zu gering gewählt.												

Tabelle 16 – Beispiele für Wiederfindungsraten aus Kompost

Labor	1		5		7		8		8		8	
Probe	Gärrückstände				Bio-Kompost		Kompost Gärreste		Kompost Pflanzen		Kompost Bioabfall	
Analysenwerte	TOC = 36,2 %				-		TOC = 36,2 %		-		-	
m _P	2		0,5		1		1		1		1	
N (µg/kg m _T)	50		50		100		100		100		100	
V _E	10		10		10		10		10		10	
V _T	1		2		1		0,5		0,5		0,5	
Festphase	Strata-X-AW ^a				Oasis-WAX ^a		Chromabond HR-XAW ^a					
m _S (g)	60		200		60		60					
n	4		3		5		4		4		4	
Stoffe	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s	A _i	s
PFBA	81,7	7,7	101	4,7	84	3,3	98,0	2,9	90,8	6,9	108	5,0
PFPeA	83,4	11,1	98,9	7,2	104	7,7	92,5	1,9	77,0	4,5	99,8	5,1
PFHxA	84,6	10,5	94,4	5,4	91	2,9	97,0	3,2	85,3	2,7	110	1,4
PFHpA	86,4	8,8	106	4,9	88	4,6	102	4,1	88,2	4,9	107	4,9
PFOA	92,0	10,1	83,1	8,5	93	5,0	94,1	2,6	84,6	3,1	114	2,5
PFNA	97,3	9,3	102	4,4	95	7,7	97,4	1,0	90,2	1,5	98,6	3,7
PFDA	99,8	11,5	110	4,0	84	5,7	99,4	3,0	90,3	1,3	108	3,1
PFBS	92,3	6,7	95	7,0	84	7,3	81,9	2,9	77,9	1,4	86,8	2,3
PFHxS	98,7	8,8	115	4,5	87	1,8	92,9	2,8	85,9	1,4	96,6	1,5
PFOS	97,6	9,5	103	11,9	89	2,5	92,6	0,5	83,6	0,8	96,1	2,1
¹³ C ₄ -PFBA	79,1	7,4	92,4	4,9	82	3,3	116	8,9	93,9	9,6	130	5,3
¹³ C ₂ -PFHxA	79,1	8,3	90,5	4,7	88	3,4	105	5,4	95,5	4,7	107	5,9
¹³ C ₄ -PFOA	85,5	8,2	90,1	6,6	92	5,7	106	4,2	90,9	4,9	111	5,9
¹³ C ₅ -PFNA ^b	89,8	7,2	94,5	4,7	-	-	100	6,1	99,3	4,6	106	4,1
¹³ C ₂ -PFDA ^b	92,4	7,4	102	3,5	-	-	104	3,4	102	2,6	103	6,4
¹⁸ O ₂ -PFHxS ^b	-	-	104	3,1	-	-	97,4	3,3	97,4	1,3	102	7,3
¹³ C ₄ -PFOS	93,5	7,1	103	4,3	88	5,8	94,5	7,7	90,1	2,0	102	9,6

Formelzeichen siehe Tabelle 14

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

^b Zusätzlich im Analysenverfahren

9 Robustheit

9.1 Extraktion

Die Extraktionsausbeuten erwiesen sich in einem Bereich von 0,1 g – 1 g bei einem Volumen des Extraktionsmittels von 5 ml Methanol unabhängig von der Probenmenge. Ein Temperatureinfluß auf die Extraktionsausbeuten war im Bereich von 40 °C – 60 °C nicht feststellbar. Von weniger großem Einfluss erwies sich auch die Extraktionszeit, wobei teilweise nach 30 min die gleichen Ausbeuten erhalten wurden wie nach 60 min. Von Wichtigkeit dagegen ist, dass die Probe während der Extraktion mehrfach aufgeschüttelt wird, da sich sonst Minderbefunde ergeben können.

Die Dichtheit der Extraktionsgefäße stellt in der Praxis kein Problem dar.

9.2 Reinigung von Extrakten

Die saure Konditionierung des Festphasenmaterials in Verbindung mit einer sauer eingestellten Probe ermöglicht die Sorption der Analyten aus Mischungen mit Methanolanteilen bis zu 50 %. Unter diesen Bedingungen darf das Probenvolumen 2 ml betragen. An einer Reihe von Proben aus den verschiedenen Anwendungsbereichen des Analysenverfahrens wurde nachgewiesen, dass keine relevanten Verluste an PFC infolge von Durchbruch bei der Reinigung auftreten. Tabelle 5 zeigt eine Auswahl von Ergebnissen dieser Untersuchungen. Die Verdünnung des Methanolextraktes mit Wasser erwies sich als notwendig, da bei reinen Methanolextrakten teilweise Durchbruch von PFC festgestellt wurde.

Alternativ kann das Festphasenmaterial alkalisch, gem. DIN 38407-42, konditioniert werden. Unter diesen Bedingungen darf der Volumenanteil an Methanol höchstens 5 % bei einem Probenvolumen von bis zu 50 ml betragen. Die Durchführung der Reinigung erfolgt entsprechend der Extraktion nach DIN 38407-42. Die maßgeblichen Einflussgrößen, wie Phasenverhältnis, Volumenanteil Methanol in der Probe, Volumina bei Waschschritten und Elution, wurden eingehend untersucht und die Arbeitsweise so festgelegt, dass genügend Abstand zu den Grenzbereichen besteht (siehe Abschnitt 6.3 und Validierungsdokument zur Norm 38407-42).

9.3 Massenspektrometrische Messung

Spezielle Untersuchungen zur Robustheit der massenspektrometrischen Detektion im Zusammenhang mit der Analyse von Feststoffextrakten wurden nicht durchgeführt, da davon auszugehen ist, dass die Verhältnisse sich nicht wesentlich von denen des Verfahrens DIN 38407-42 unterscheiden, wenn die Extrakte gereinigt wurden.

10 Verfahrenskenndaten aus Ringversuchen

10.1 Allgemeine Angaben

Der Validierungsringversuch zu DIN 38414-14 wurde im Zeitraum vom 06.01.2011 bis 28.01.2011 arbeitskreisintern an 4 Proben durchgeführt:

Probe 1: Standardlösung in Methanol

Probe 2: Klärschlamm

Probe 3: Boden

Probe 4: Futtermittel (Grassilage)

In jeder Probe waren die folgenden Verbindungen mit jeweils 4 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 20 Laboratorien teilgenommen und Ergebnisse abgegeben.

Die Auswertung des Ringversuches erfolgte nach DIN 38402-42 bzw. DIN/ISO 5725-2.

Die Anwendungsbereiche Gewässersediment und Kompost wurden nicht in den Ringversuch einbezogen, da kein geeignetes Probenmaterial zur Verfügung stand und von einer Aufstockung abgesehen wurde.

10.2 Herstellung der Ringversuchsproben

Die Probe 1 wurde aus einer PFC-Standardlösung der Firma Chiron durch Verdünnung mit Methanol hergestellt (Anlage). Die Probe wurde in 1,5-ml-CERTAN-Flaschen abgefüllt.

Die Herstellung der Proben 2 und 3 erfolgte aus Rückstellproben, die trocken, gemahlen und auf 250 µm abgeseibt aus früheren Untersuchungen zur Verfügung standen.

Zur Herstellung der Probe 2 wurden zwei Klärschlämme kommunaler Prägung gemischt und die Mischung in einem Taumelmischer homogenisiert. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurde die Probe 3 aus zwei Ackerböden belasteter Flächen hergestellt. Die Probenmenge der Mischungen betrug jeweils etwa 500 g.

Die Probe 4 wurde freundlicherweise fertig vorbereitet vom Landesbetrieb Hessisches Landeslabor für den Ringversuch zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen der Voruntersuchung wurden folgende TOC-Werte für die Ringversuchsproben ermittelt:

Probe 2, Klärschlamm, TOC 28 %

Probe 3, Boden, TOC 2,5 %

Probe 4, Futtermittel (Grassilage), TOC 45 %

Die Homogenität der Proben wurde mit jeweils 6 parallelen Analysen geprüft (Bild 21). Dabei wurden für die Klärschlammprobe und für die Grassilage relative Wiederholstandard-

abweichungen von weniger als 2 % erzielt, was auf eine homogene Zusammensetzung der Proben schließen lässt. Deutlich höher liegen die Werte für die Bodenprobe, wobei besonders die Standardabweichung von PFOA auffällt.

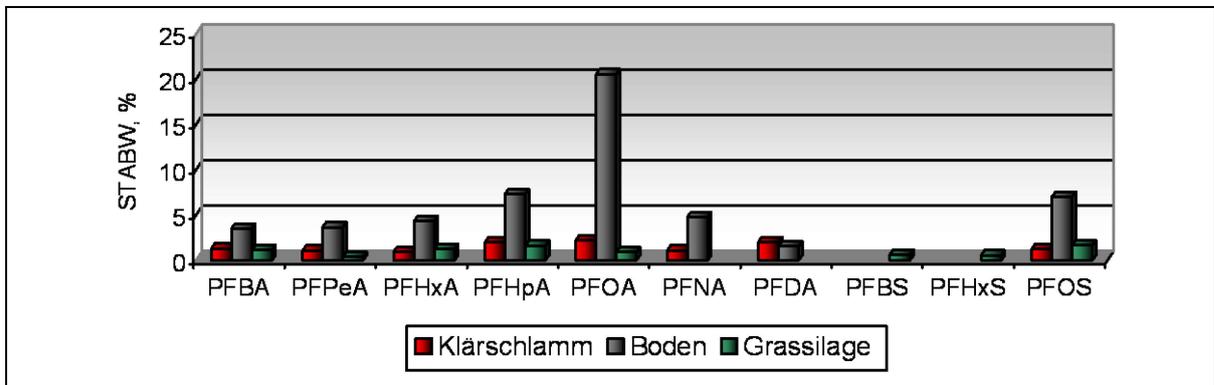


Bild 21 – Wiederholstandardabweichung bei Untersuchungen zur Homogenität der Ringversuchsproben

Die Feststoffproben wurden in 100-ml-Weithalsgläser mit Schraubkappe und Dichtung aus Polyethylen abgefüllt und die Klärschlammproben (je 20 g) durch Zugabe von 30 g Wasser auf einen Wassergehalt von 60 % eingestellt. Den Bodenproben (je 20 g) wurden jeweils 5 g Wasser zugefügt, die Grassilage (je 8 g) wurde trocken verschickt.

Beim Ringversuch wurde für die Probe 2 ein mittlerer Wassergehalt von 64,1 % und für die Probe 3 von 21,4 % ermittelt.

10.3 Angaben zur Analytik

Die Trocknung der Feststoffproben erfolgte vorwiegend durch Gefriertrocknung. Die Trocknung bei 40 °C an der Luft wurde bei der Klärschlammprobe nur von 2 Laboratorien, bei der Probe 3 von 9 und bei der Probe 4 von 7 Laboratorien angewendet. Bei fast allen Teilnehmern wurden die Proben gemahlen und überwiegend auch gesiebt (250 µm), so dass die Ergebnisse des Ringversuches das Gesamtverfahren widerspiegeln.

Die Feststoffproben wurden durchweg mit Methanol unter Einwirkung von Ultraschall extrahiert. Das Phasenverhältnis (Probenmasse/Volumen des Extraktionsmittels) variiert im Bereich von 0,01 – 0,1 g/ml und erfüllt damit in allen Fällen die Vorgabe (< 0,2 g/ml).

Bei den meisten Teilnehmern wurde der Extrakt einer Reinigung unterzogen, bei der Klärschlammprobe bei 19 Laboratorien, bei den Proben 3 und 4 bei 13 bzw. 17 Laboratorien. Entsprechend den normativen Vorgaben wurden hierzu ausschließlich Festphasenmaterialien mit schwacher Anionenaustauscherfunktion auf Polymerbasis, häufig mit einer Sorbensmasse von 60 mg, eingesetzt. Verwendet wurden die Materialien Strata-XAW (Firma Phenomenex), HR-XAW (Firma Macherey-Nagel) und Oasis WAX (Firma Waters). Aufgrund des geringeren Arbeitsaufwandes kam das Cleanup-Verfahren mit saurer Konditionierung etwas häufiger als das mit basischer Konditionierung zur Anwendung.

Die direkte Injektion des Extraktes wurde besonders bei der Analyse der Bodenprobe angewendet, da bei den zum Teil notwendigen hohen Verdünnungen des Extraktes die Matrix eine untergeordnete Rolle spielte.

Für die chromatographische Trennung wurden insgesamt 11 verschiedene Phasen eingesetzt, dabei häufiger die Materialien Acquity BEH C18 (Firma Waters), Synergi Fusion-RP (Firma Phenomenex) und Zorbax Eclipse (Plus) C18 (Firma Agilent Technologies). Als

Elutionsmittel wurden meistens Methanol/Wasser in Gegenwart von Acetatpuffer verwendet. Die Injektionsvolumina lagen in einem Bereich von 5 – 25 µl.

Insgesamt kamen 14 verschiedene Tandemmassenspektrometer von 4 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 isotoopenmarkierten 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.

10.4 Ergebnisse

10.4.1 Wiederfindungsraten von internen Standardsubstanzen

Bild 22 zeigt die Wiederfindungsraten der verwendeten internen Standardsubstanzen für die Proben 1 – 4 der einzelnen Laboratorien. Nach der Norm müssen die Wiederfindungs-raten bei der Untersuchung von Proben in einem Bereich von 50 % - 150 % liegen. Diese Anforderung wurde bei insgesamt 12 Mittelwerten (4 x PFBA, 3 x PFOS und je 1 x PFNA, PFDA, PFOA, PFHxA und PFHxS) nicht erfüllt. Die entsprechenden Einzelwerte der Laboratorien, insgesamt 1,5 % aller Einzelwerte, konnten deshalb bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

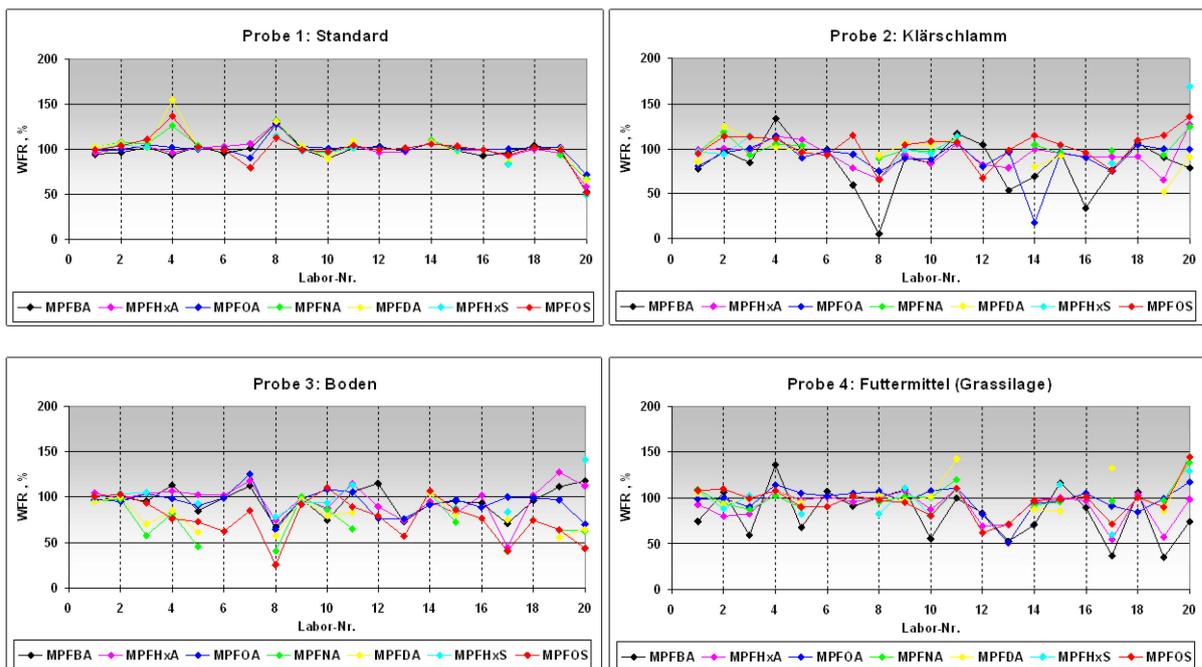


Bild 22 – Wiederfindungsraten interner Standardsubstanzen

10.4.2 Verfahrenskenndaten

Der Ringversuch wurde ausgewertet nach DIN 38402-42 bzw. DIN/ISO 5725-2. Die Tabellen 17 – 20 geben die Verfahrenskenndaten wieder.

Die Verfahrenskenndaten zeigen, dass der Ringversuch mit wenigen Ausnahmen für alle 4 Proben zufriedenstellend ausgefallen ist.

Die für die HPLC-MS/MS-Messung ermittelten Vergleichsvariationskoeffizienten liegen in einem Bereich von 10,5 % (PFBA) – 20,6 % (PFOS). Bis auf PFOS liegen die Werte unter 15 % und sind für die LC-MS typisch und akzeptabel. Zu hoch fällt lediglich der Wert für PFOS aus, wofür sich jedoch keine Erklärung ergibt (Tabelle 17). Die Wiederfindungsraten für PFPeA und PFHpA fallen mit rund 87 % zu gering aus. Die Wiederholvariationskoeffizienten sind zufriedenstellend und der Anteil an Ausreißern nicht zu hoch.

Tabelle 17 – Verfahrenskenndaten für die HPLC-MS/MS-Messung (Probe 1)

Substanz	l	n	o	\bar{x}	X	η	s_R	$C_{V,R}$	s_r	$C_{V,r}$
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

Legende:

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

Insgesamt gesehen fallen die Vergleichsvariationskoeffizienten für die HPLC-MS/MS-Messung etwas höher aus als bei dem Ringversuch zu DIN 38407-42 (Bild 23). Das dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die Probe 1 aus einer anderen Quelle stammt als die in den meisten Fällen verwendeten Lösungen für die Kalibrierung. Die Stoffe PFHxS und PFOS in der Probe 1 enthalten außerdem neben den unverzweigten auch verzweigte Isomere. Letzteres kann auch ein Grund für den höheren Vergleichsvariationskoeffizienten von PFOS bei Probe 1 sein.

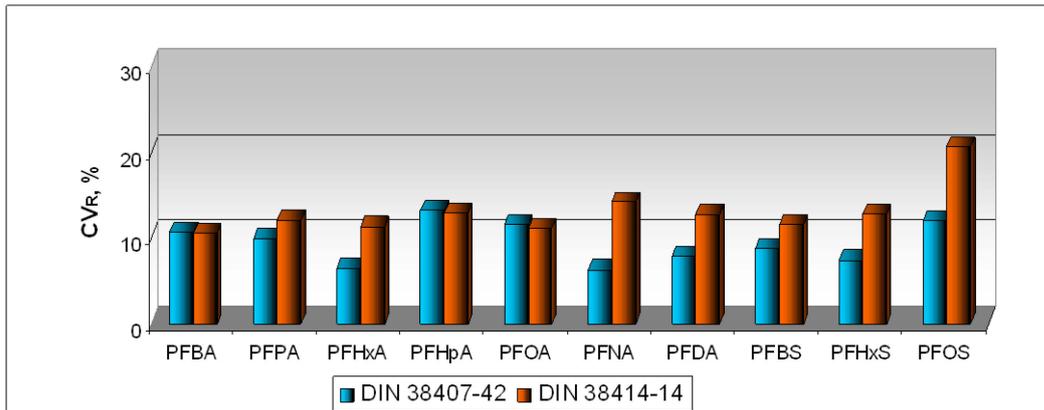


Bild 23 – Vergleichsvariationskoeffizienten für die HPLC-MS/MS-Messung (Standardlösung)

Tabelle 18 gibt die Kenndaten für die Matrix Klärschlamm wieder. Die Werte sind zufriedenstellend und der Anteil an Ausreißern meist gering. Die Massenanteile für PFBS und PFHxS lagen unterhalb von 10 µg/kg m_T, so dass für diese Stoffe keine Kenndaten für die Matrix Klärschlamm angegeben werden können.

Tabelle 18 – Verfahrenskennndaten für die Matrix Klärschlamm (Probe 2)

Parameter	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>o</i>	\bar{x}	<i>s_R</i>	<i>C_{V,R}</i>	<i>s_f</i>	<i>C_{V,f}</i>
PFBA	15	59	18,1	65,7	6,86	10,4	2,05	3,1
PFPeA	20	80	0,0	39,6	8,46	21,4	2,27	5,7
PFHxA	20	80	0,0	115	13,5	11,8	3,53	3,1
PFHpA	19	76	5,0	70,0	13,0	18,6	2,44	3,5
PFOA	18	72	5,3	535	67,3	12,6	23,3	4,4
PFNA	20	80	0,0	111	19,6	17,7	4,23	3,8
PFDA	19	76	0,0	727	104,7	14,4	26,2	3,6
PFOS	20	80	0,0	275	42,1	15,3	13,1	4,8

Legende:

- l* Anzahl der Laboratorien nach Ausreißereliminierung
- n* Anzahl der Analyseergebnisse nach Ausreißereliminierung
- o* Ausreißeranteil in %
- \bar{x} Gesamtmittelwert aller Analyseergebnisse (ohne Ausreißer) in µg/kg m_T
- s_R* Vergleichsstandardabweichung in µg/kg m_T
- C_{V,R}* Vergleichsvariationskoeffizient in %
- s_f* Wiederholstandardabweichung in µg/kg m_T
- C_{V,f}* Wiederholvariationskoeffizient µg/kg m_T

Die Verfahrenskennndaten für die Matrix Boden fallen insgesamt gesehen ebenfalls zufriedenstellend aus (Tabelle 19). Auffallend ist lediglich der etwas höhere Vergleichsvariationskoeffizient für PFOA, der vermutlich auf eine gewisse Inhomogenität der Probe zurückzuführen ist (Bild 21).

Die Massenanteile für PFBS und PFHxS lagen unterhalb von 10 µg/kg m_T, so dass für diese Stoffe keine Kenndaten für die Matrix Boden angegeben werden können.

Tabelle 19 – Verfahrenskennndaten für die Matrix Boden (Probe 3)

Parameter	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>o</i>	\bar{x}	<i>s_R</i>	<i>C_{V,R}</i>	<i>s_r</i>	<i>C_{V,r}</i>
PFBA	19	76	5,0	198	27,9	14,1	7,97	4,0
PFPeA	19	76	5,0	50,9	5,59	11,0	2,40	4,7
PFHxA	19	76	0,0	73,7	15,3	20,7	3,35	4,5
PFHpA	17	68	15,0	126	28,3	22,5	6,17	4,9
PFOA	18	72	10,0	1357	470,5	34,7	94,9	7,0
PFNA	10	39	0,0	10,7	2,23	20,9	0,74	6,9
PFDA	17	68	10,5	25,0	5,57	22,2	1,25	5,0
PFOS	17	68	0,0	4050	575,1	14,2	174,2	4,3

Legende: siehe Tabelle 18

Mit der Untersuchung einer Futtermittelprobe sollte gezeigt werden, dass das Analysenverfahren auch für andere Anwendungsbereiche eingesetzt werden kann.

Tabelle 20 zeigt, dass die Verfahrenskennndaten im gleichen Bereich liegen, wie die für Klärschlamm und Boden ermittelten Werte.

Tabelle 20 – Verfahrenskennndaten für die Matrix Grassilage/Futtermittel (Probe 4)

Parameter	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>o</i>	\bar{x}	<i>s_R</i>	<i>C_{V,R}</i>	<i>s_r</i>	<i>C_{V,r}</i>
PFBA	17	68	0,0	175	29,2	16,8	5,98	3,4
PFPeA	20	80	0,0	67,9	15,7	23,1	2,91	4,3
PFHxA	20	80	0,0	59,3	10,8	18,2	2,50	4,2
PFHpA	19	76	0,0	19,4	4,41	22,8	0,99	5,1
PFOA	18	72	10,0	74,0	10,9	14,8	2,38	3,2
PFBS	18	72	10,0	104	19,1	18,4	4,39	4,2
PFHxS	20	80	0,0	190	33,2	17,5	7,71	4,1
PFOS	20	80	0,0	320	60,4	18,9	13,90	4,3

Legende: siehe Tabelle 18

Bild 24 gibt eine Übersicht zu den festgestellten Ausreißern und zeigt, dass wie schon beim Ringversuch DIN 38407-42 überwiegend Ausreißer vom Typ C (zu hohe laborinterne Standardabweichung der Einzelwerte) auftreten. Sie sind nicht auf einzelne Laborwerte, sondern auf eine grundsätzlich zu hohe Streuung aller Einzelwerte einer Proben-Parameterkombination zurückzuführen, wie der geringe Anteil an Ausreißern vom Typ A signalisiert. Die Verteilung der Ausreißer vom Typ C macht deutlich, dass sie weder substanz- noch probenspezifisch sind. Vielmehr ist zu vermuten, dass die hohen laborinternen Wiederholstandardabweichungen auf nicht optimale Konditionen des Massenspektrometers, z.B. wegen Verschmutzung, zurückzuführen sind. So stammen mehr als die Hälfte aller Ausreißer vom Typ C vom Labor Nr. 20. Auch die Ausreißer vom Typ B treten nur bei einem Labor auf.

Proben	Labor-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Probe 1 Standard	PFBA	C																				
	PFPeA																					C
	PFHxA																					C
	PFHpA																					C
	PFOA																					C
	PFNA																		C			C
	PFDA				IS				B													C
	PFBS																					C
	PFHxS																					IS
	PFOS	C																				C
Probe 2 Klärschlamm	PFBA					C			IS		A			C			IS					C
	PFPeA																					
	PFHxA																					C
	PFHpA																					C
	PFOA								B								IS					
	PFNA																					
	PFDA																					
	PFBS																					
	PFHxS																					
	PFOS																					
Probe 3 Boden	PFBA					C																
	PFPeA																					C
	PFHxA																					IS
	PFHpA																					C
	PFOA																					C
	PFNA																					C
	PFDA																					C
	PFBS																					
	PFHxS																					
	PFOS										IS											IS
Probe 4 Futtermittel	PFBA					C															IS	IS
	PFPeA																					
	PFHxA																					
	PFHpA																					
	PFOA																					C
	PFNA																					
	PFDA																					
	PFBS																					C
	PFHxS																					C
	PFOS																					
Labor-Nr																						
WFR ISTD < 50 % oder > 150 %	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	0	1	2	
Anzahl Ausreißer Typ A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anzahl Ausreißer Typ B	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anzahl Ausreißer Typ C	2	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	4	0	0	14	

Bild 24 – Übersicht zu Ausreißern und nicht erfüllten Vorgaben für interne Standardsubstanzen

10.5 Graphische Darstellung der Ergebnisse des Ringversuchs

Ausreißerwerte sind in den Graphiken kenntlich gemacht.

10.5.1 Graphiken zu Probe 1 – Standardlösung

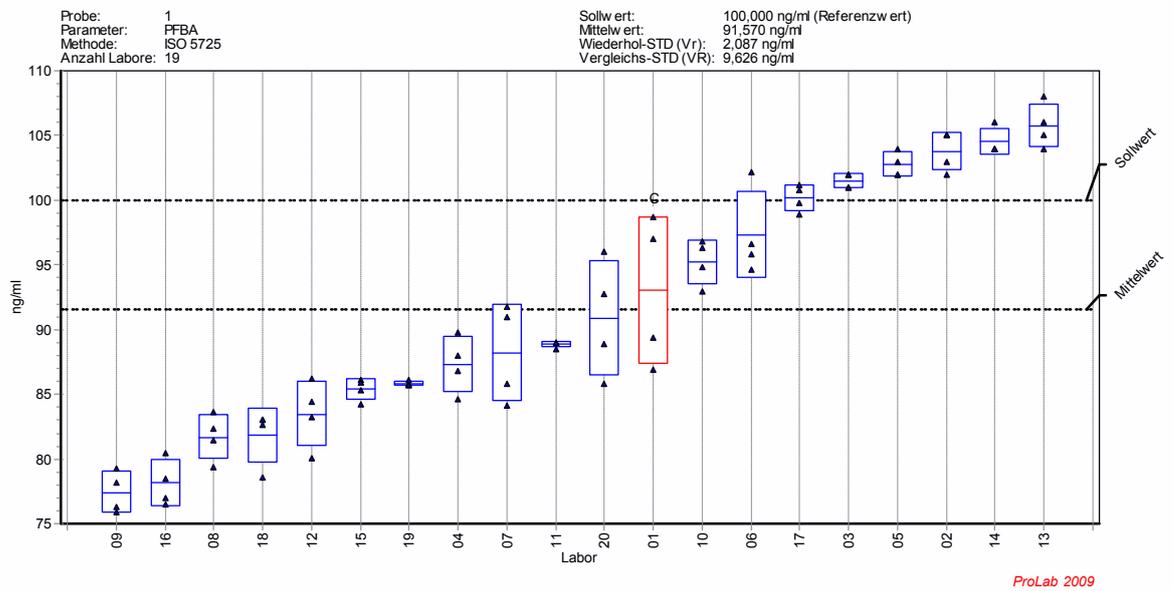


Bild 25.1 – PFBA, Probe 1

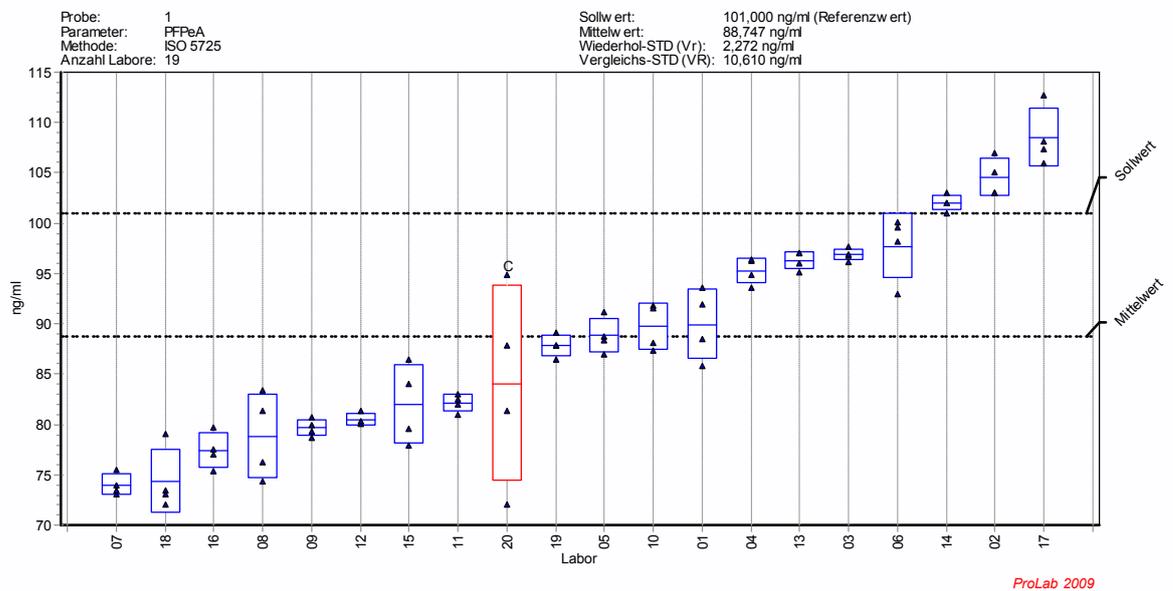


Bild 25.2 – PFPeA, Probe 1

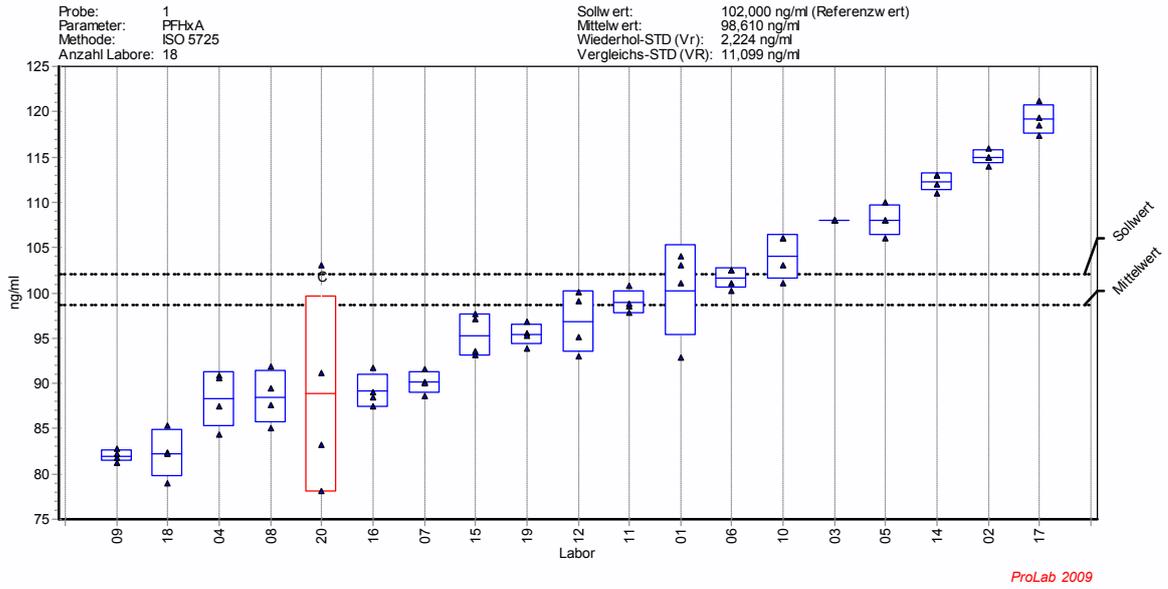


Bild 25.3 – PFHxA, Probe 1

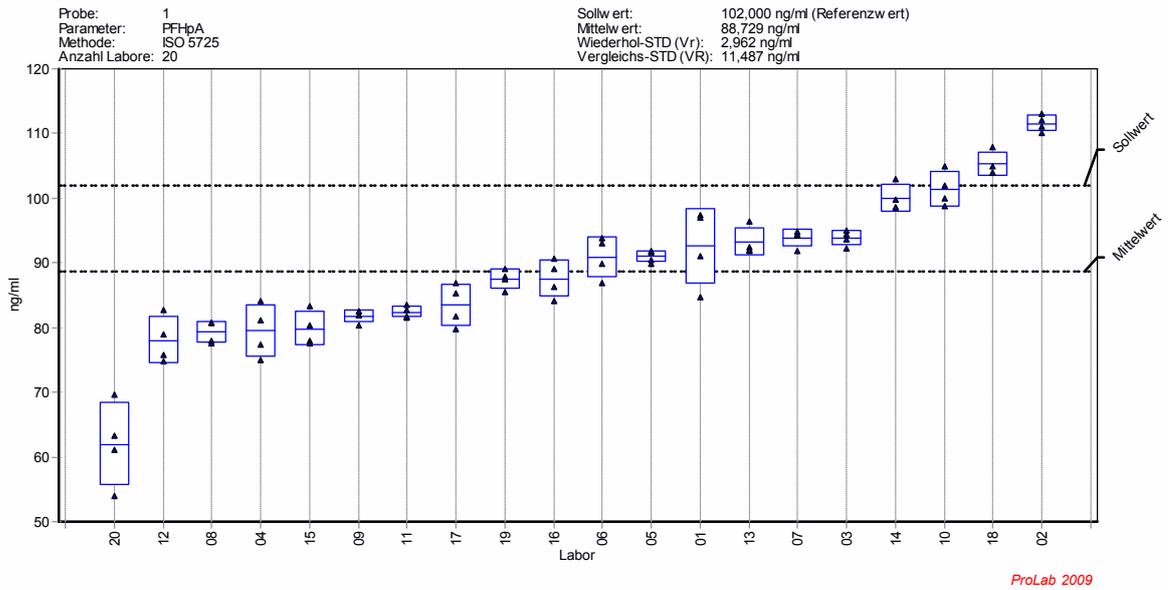


Bild 25.4 – PFHpA, Probe 1

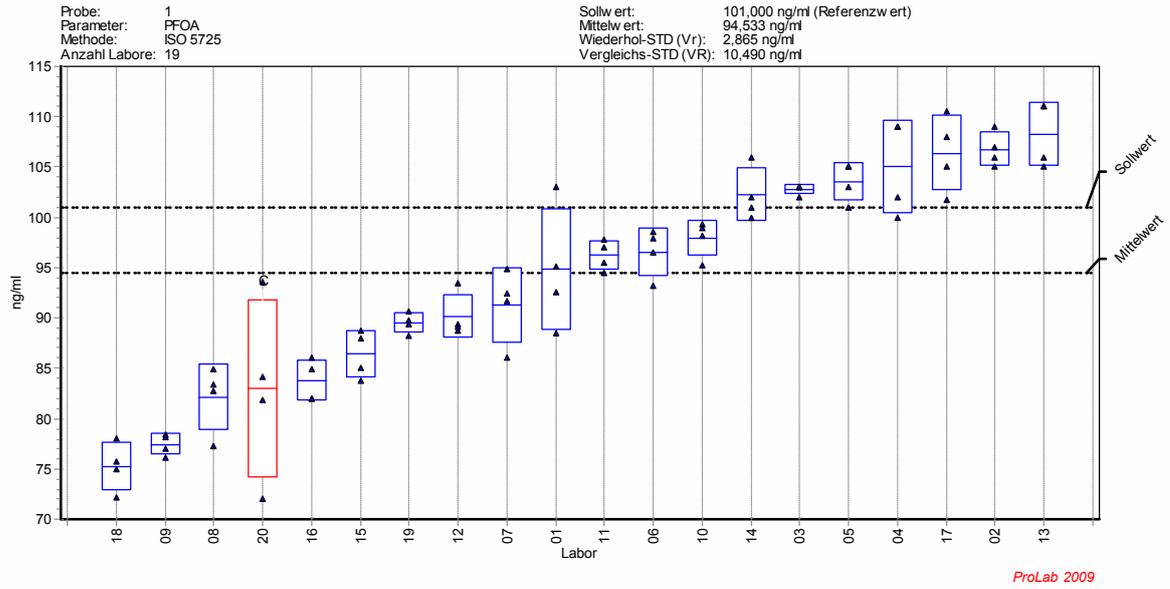


Bild 25.5 – PFOA, Probe 1

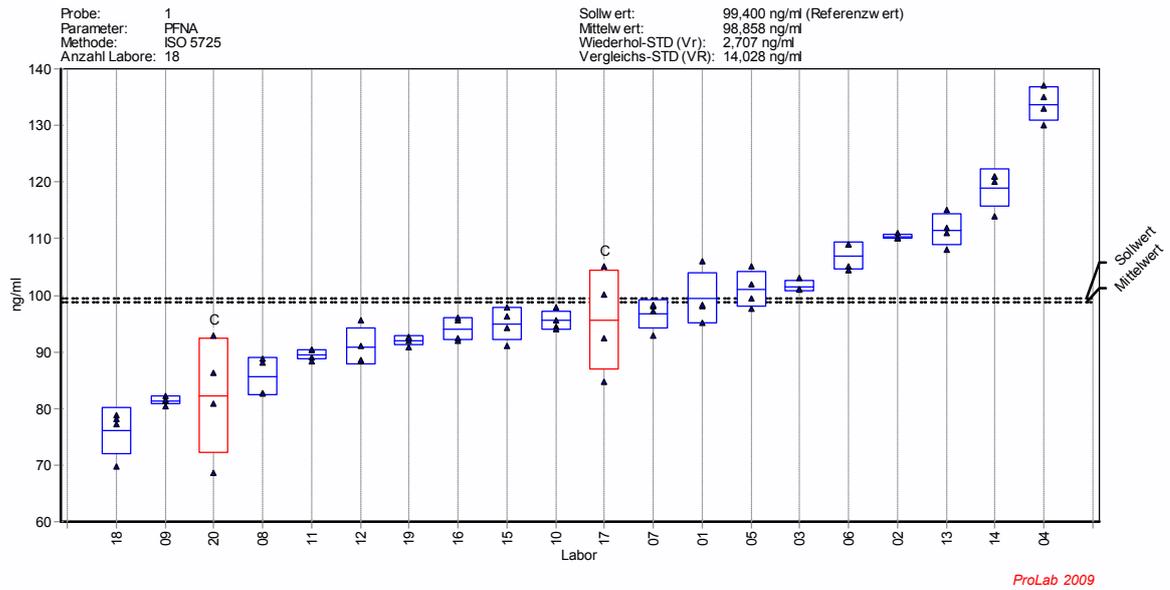


Bild 25.6 – PFNA, Probe 1

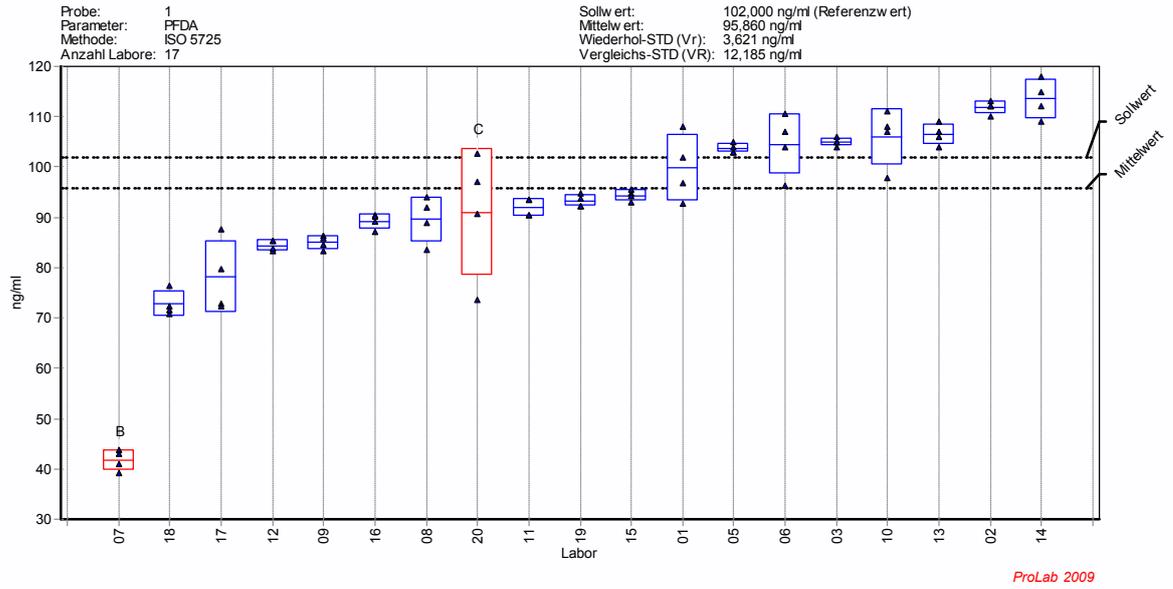


Bild 25.7 – PFDA, Probe 1

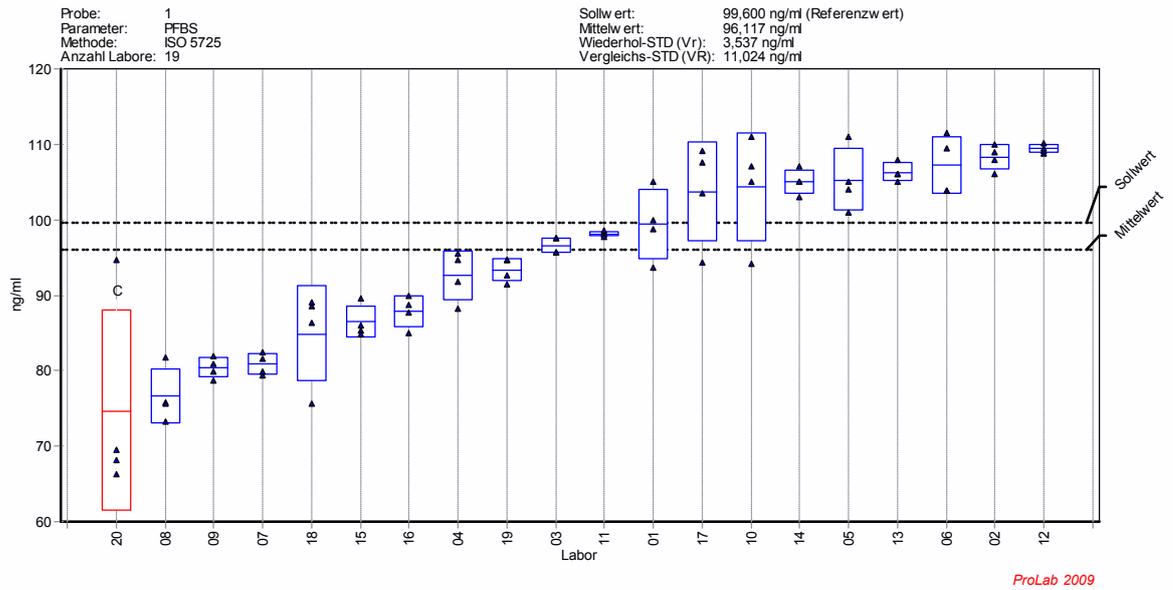


Bild 25.8 – PFBS, Probe 1

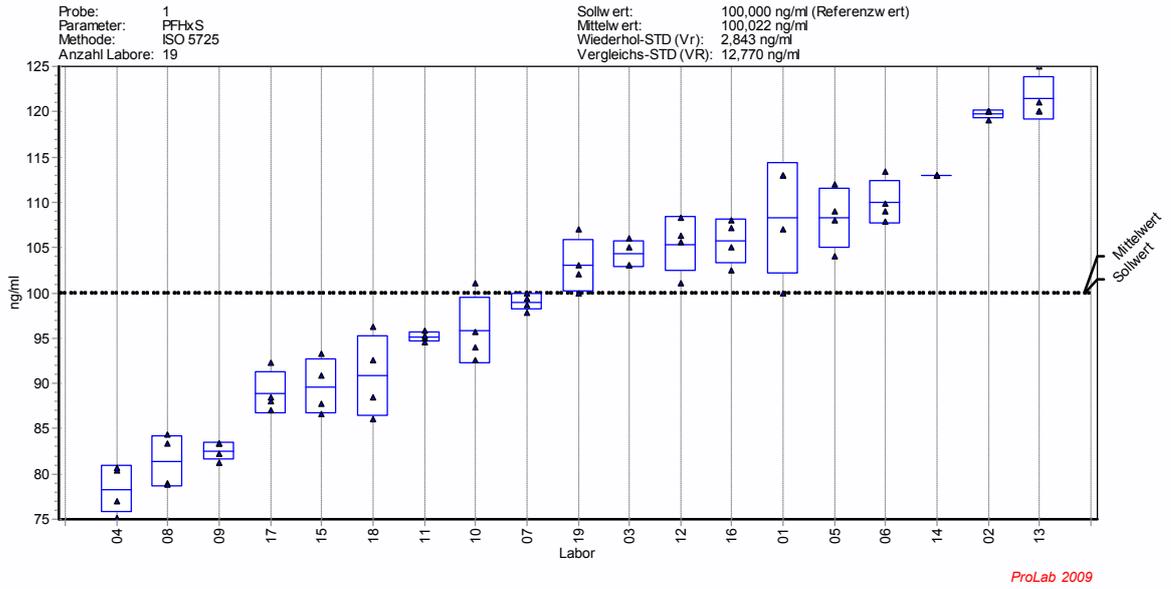


Bild 25.9 – PFHxS, Probe 1

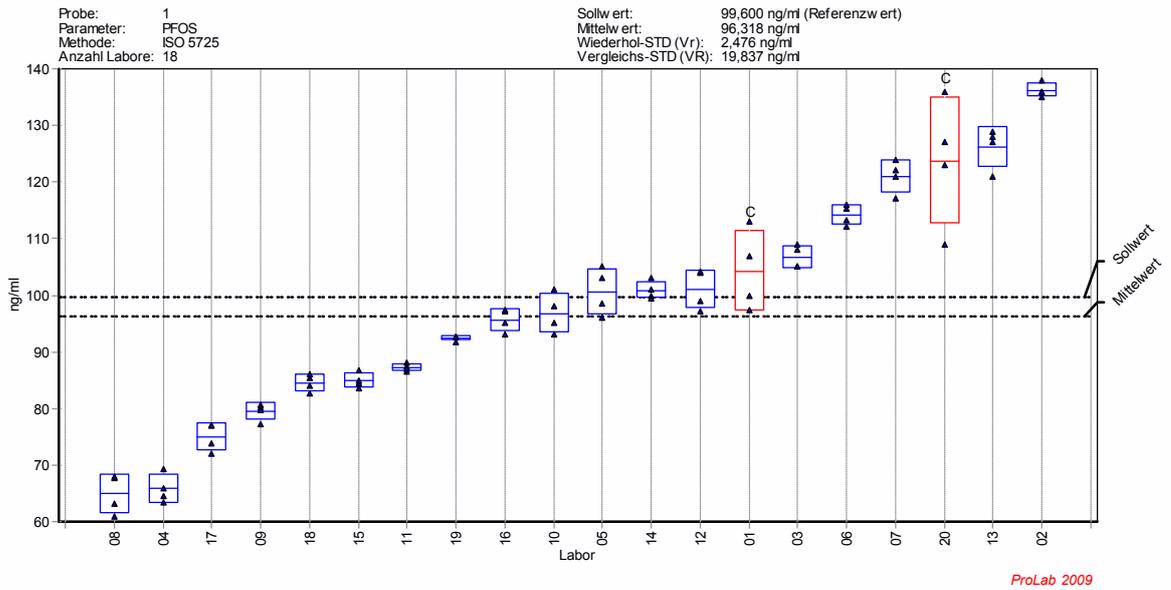


Bild 25.10 – PFOS, Probe 1

10.5.2 Graphiken zu Probe 2 – Klärschlamm

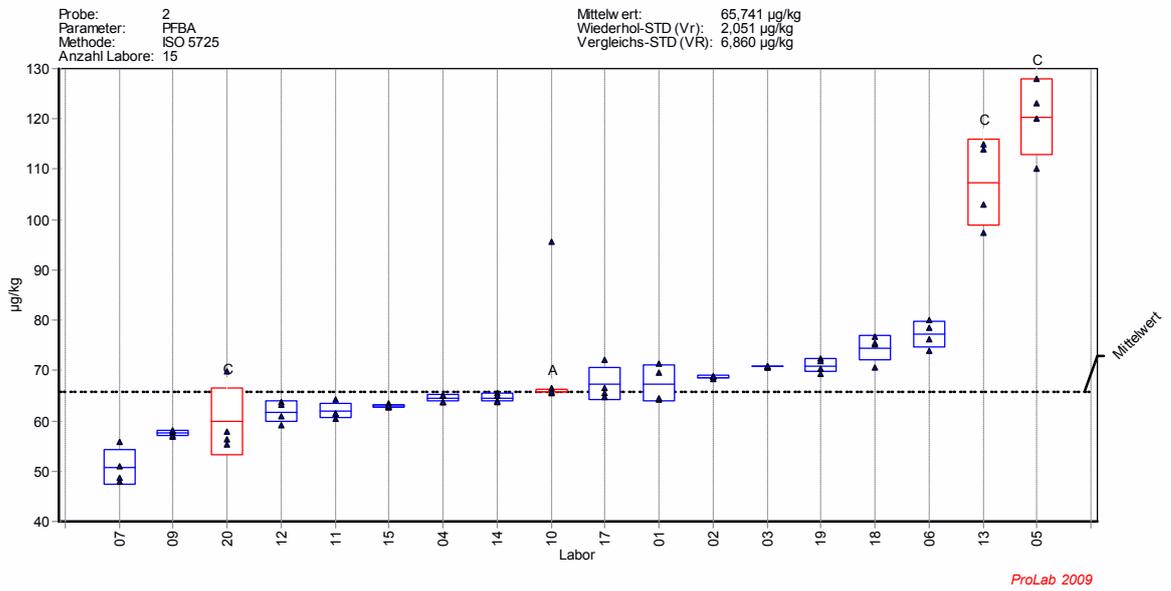


Bild 26.1 – PFBA, Probe 2

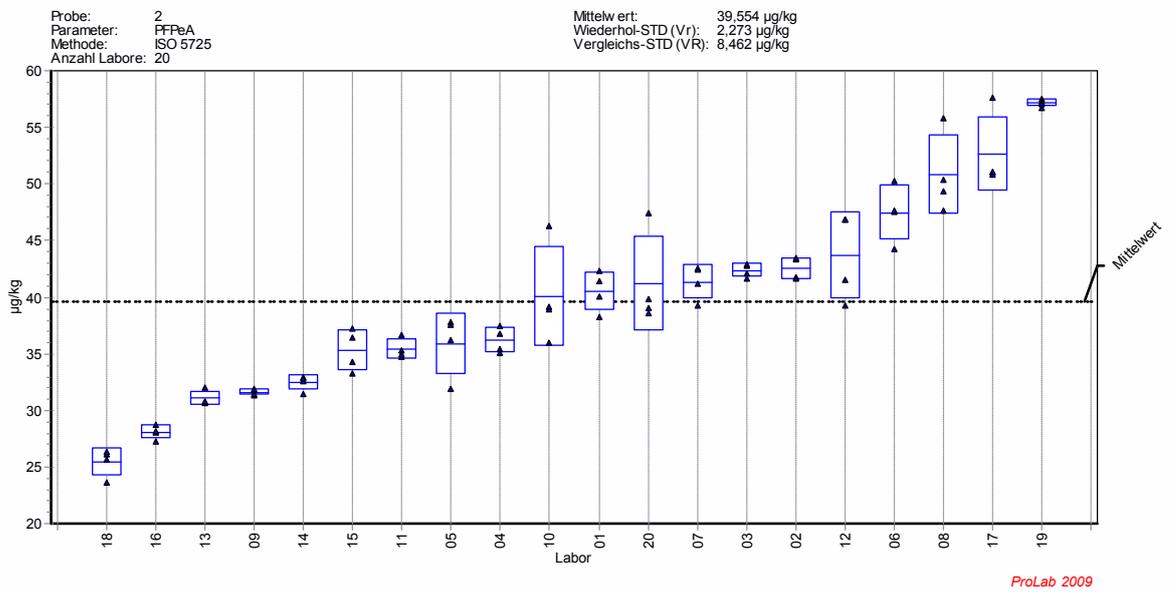


Bild 26.2 – PFPeA, Probe 2

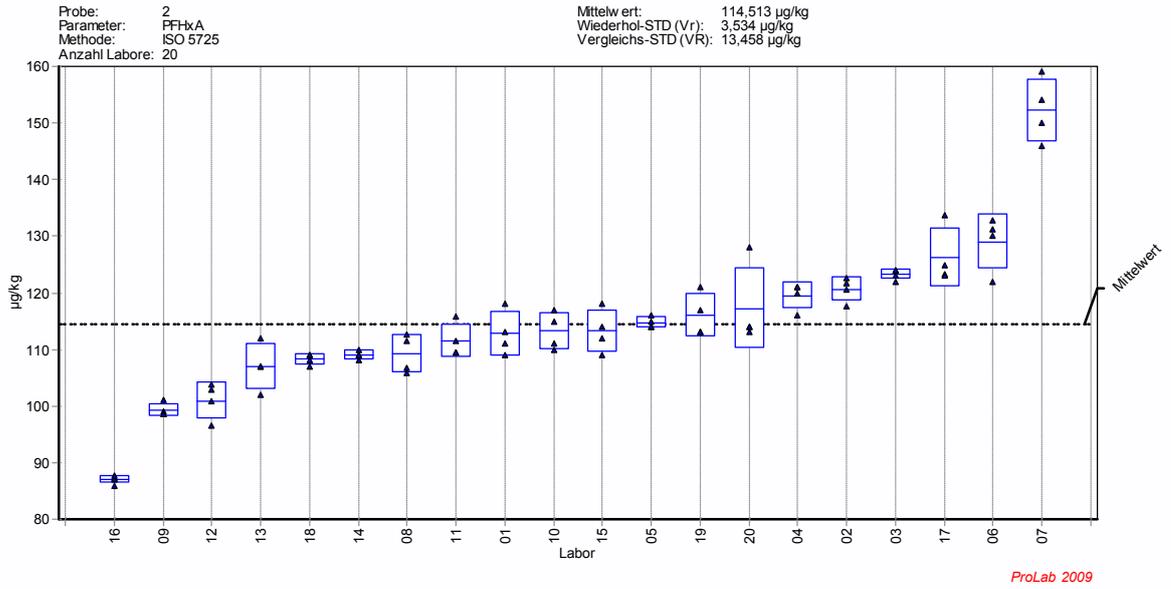


Bild 26.3 – PFHxA, Probe 2

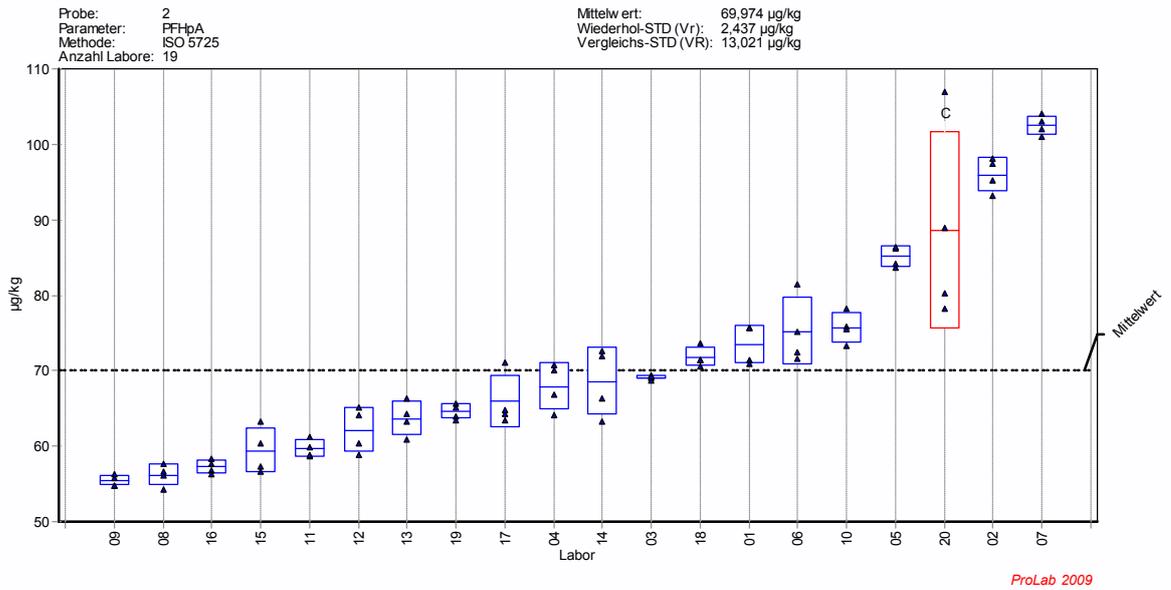


Bild 26.4 – PFHpA, Probe 2

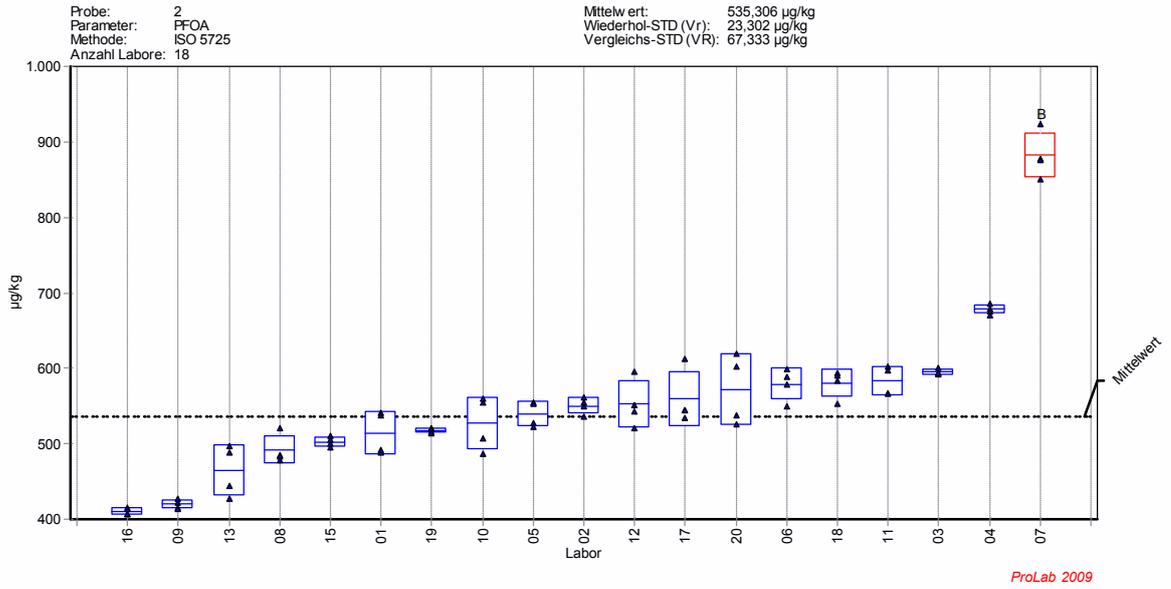


Bild 26.5 – PFOA, Probe 2

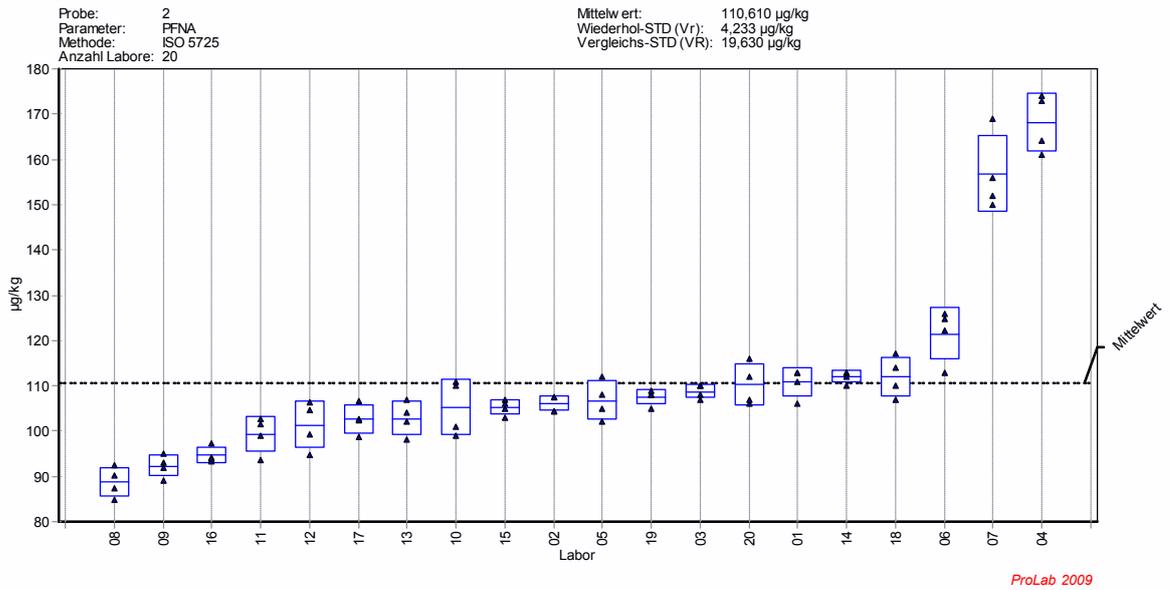


Bild 26.6 – PFNA, Probe 2

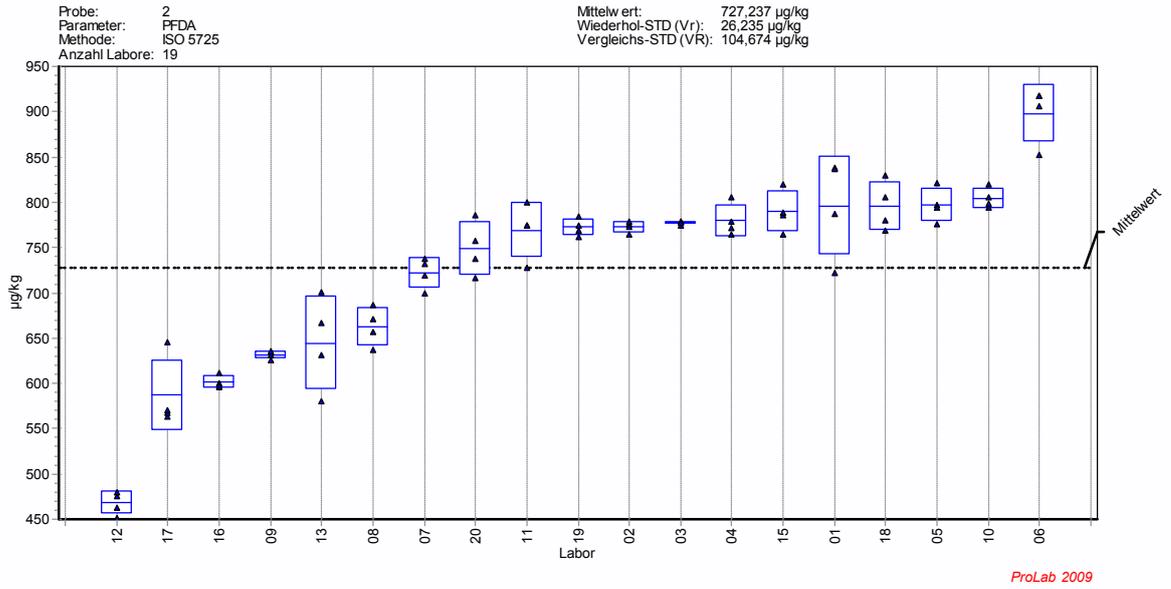


Bild 26.7 – PFDA, Probe 2

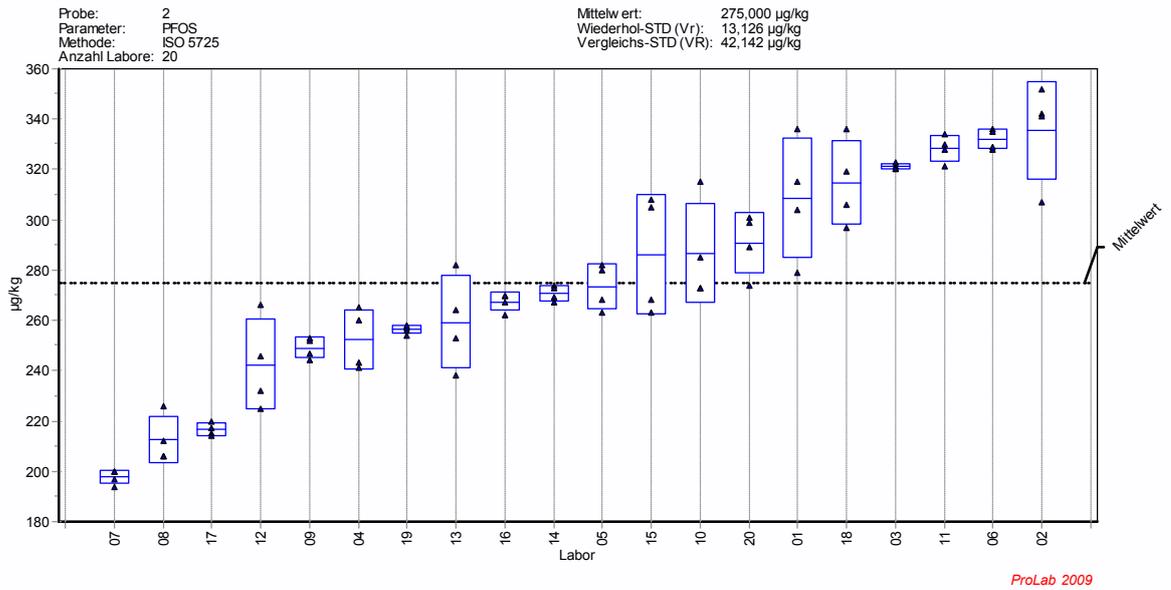


Bild 26.8 – PFOS, Probe 2

10.5.3 Graphiken zu Probe 3 – Boden

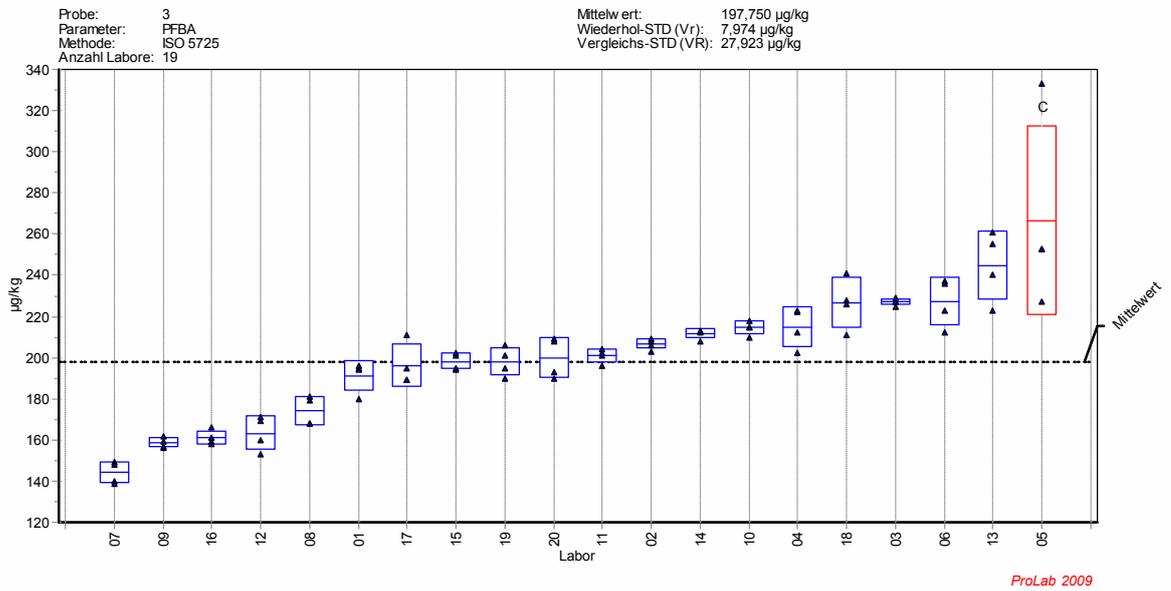


Bild 27.1 – PBFA, Probe 3

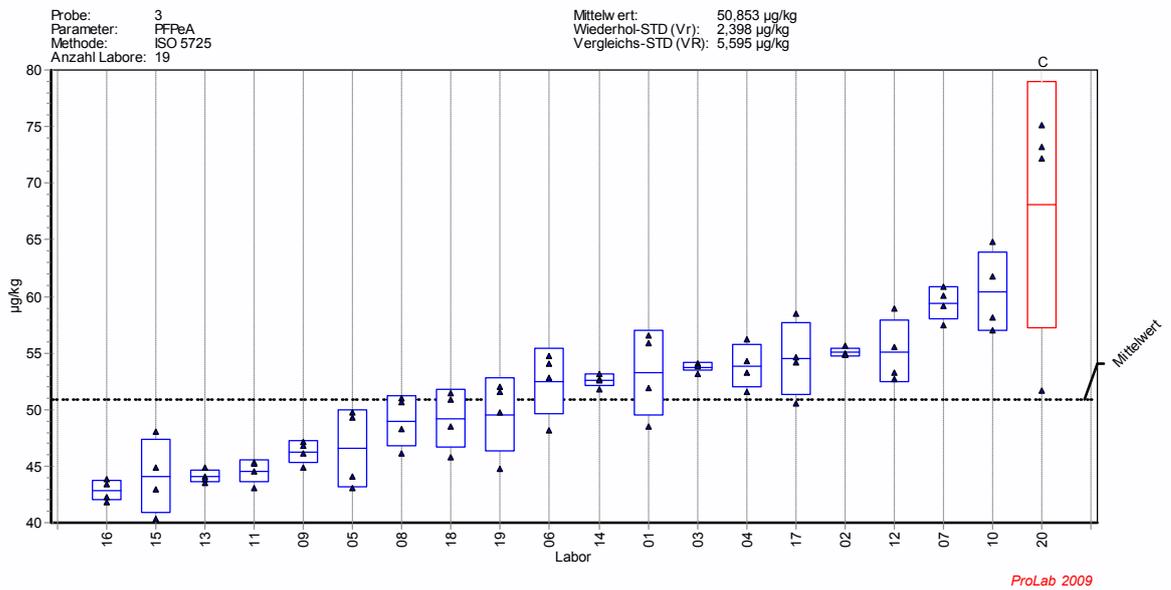


Bild 27.2 – PFPeA, Probe 3

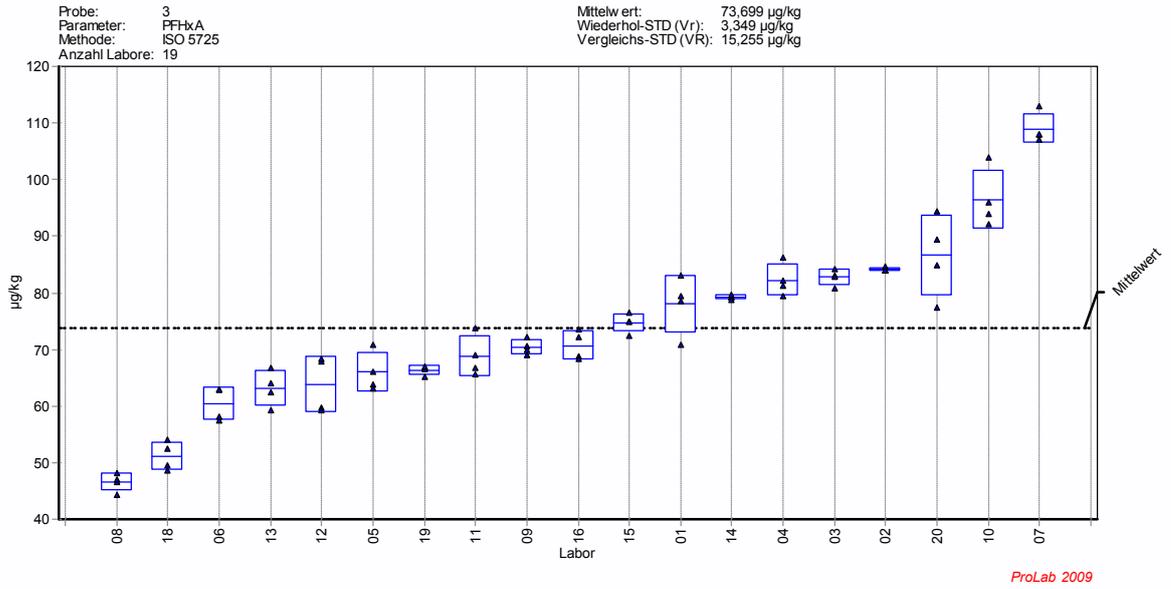


Bild 27.3 – PFHxA, Probe 3

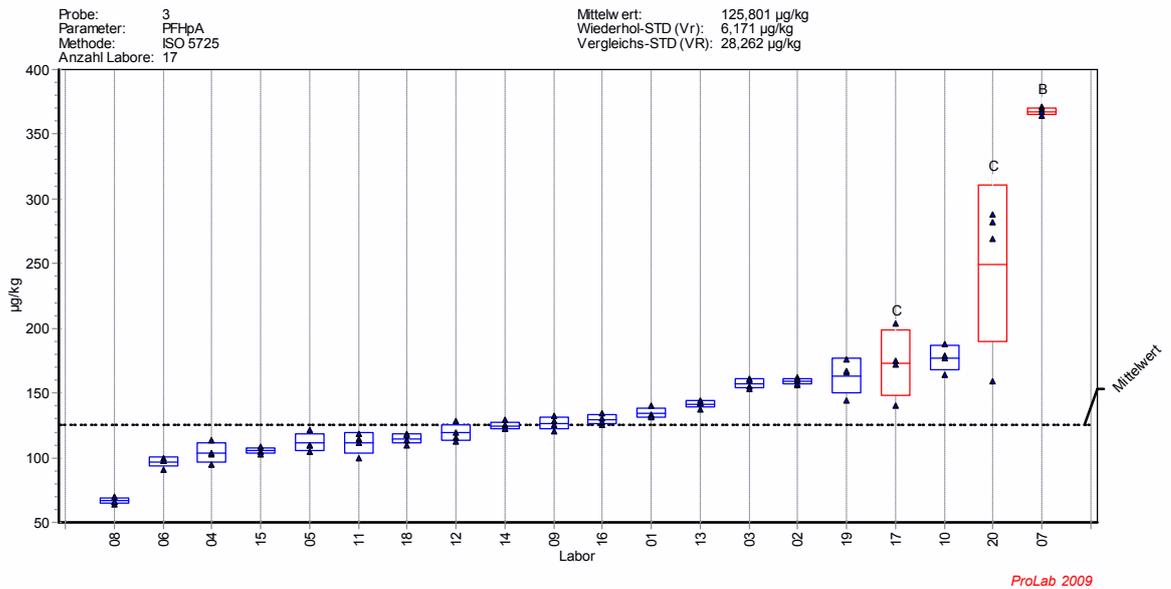


Bild 27.4 – PFHpA, Probe 3

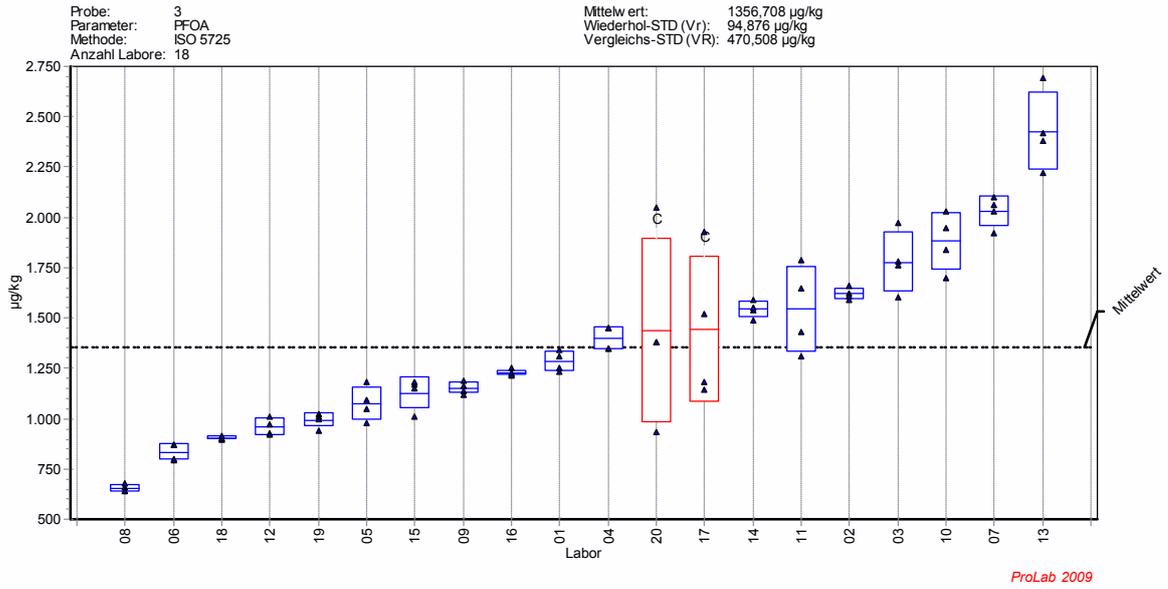


Bild 27.5 – PFOA, Probe 3

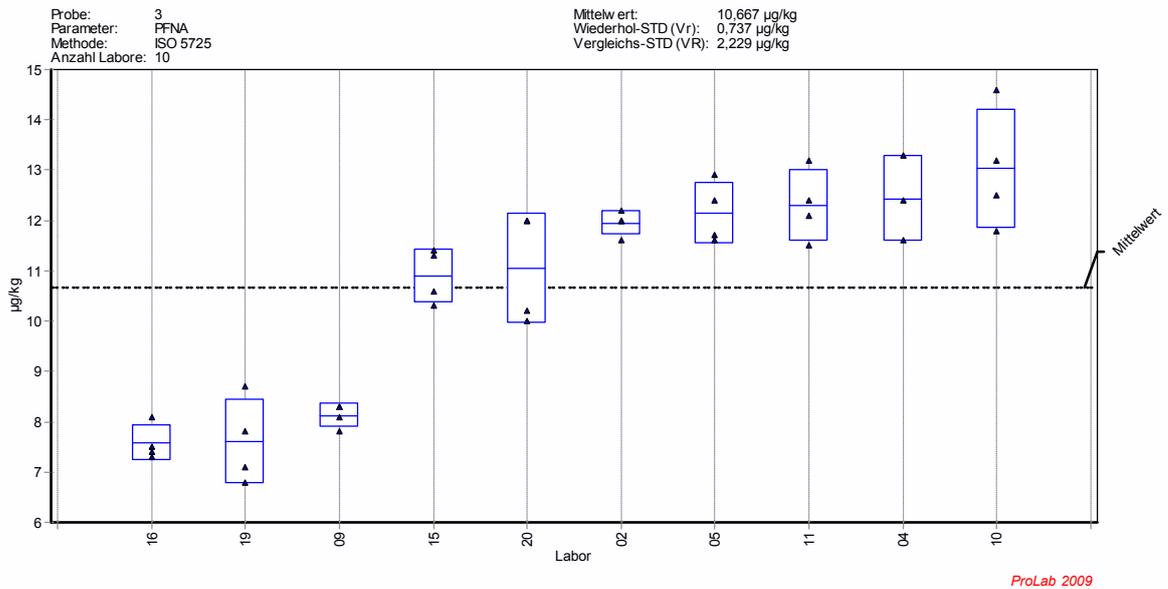


Bild 27.6 – PFNA, Probe 3

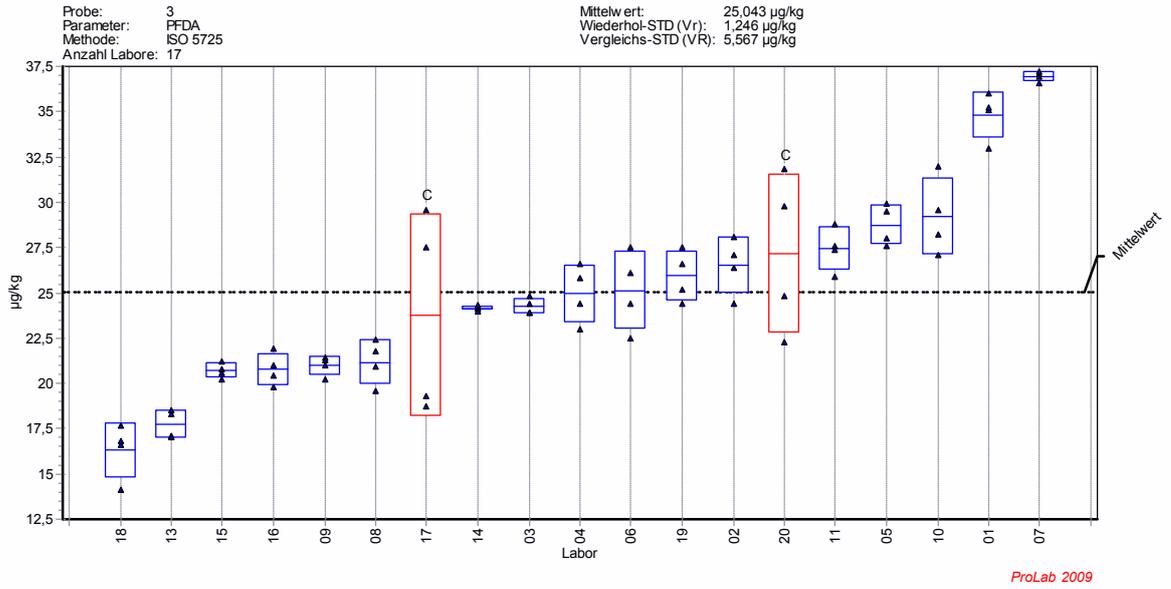


Bild 27.7 – PFDA, Probe 3

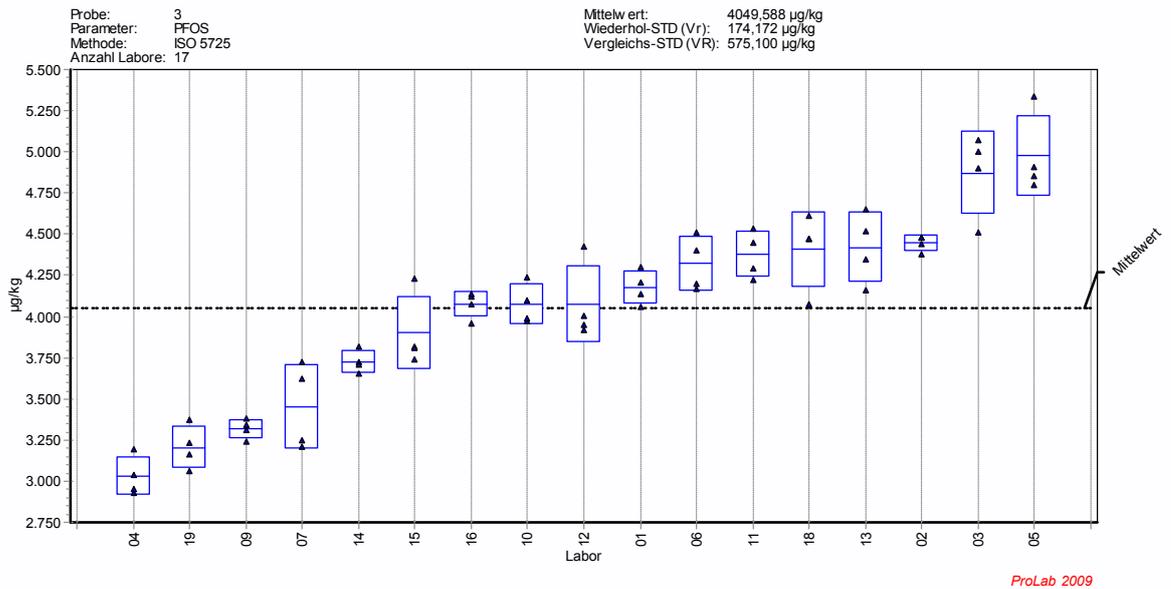


Bild 27.8 – PFOS, Probe 3

10.5.4 Graphiken zu Probe 4 – Grassilage (Futtermittel)

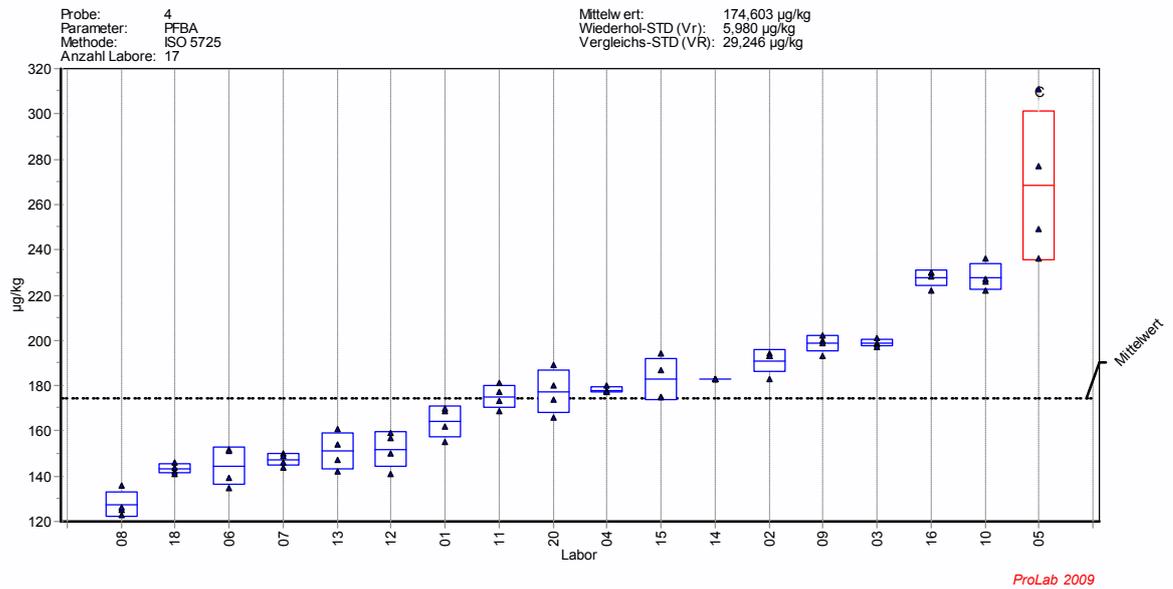


Bild 28.1 – PFBA, Probe 4

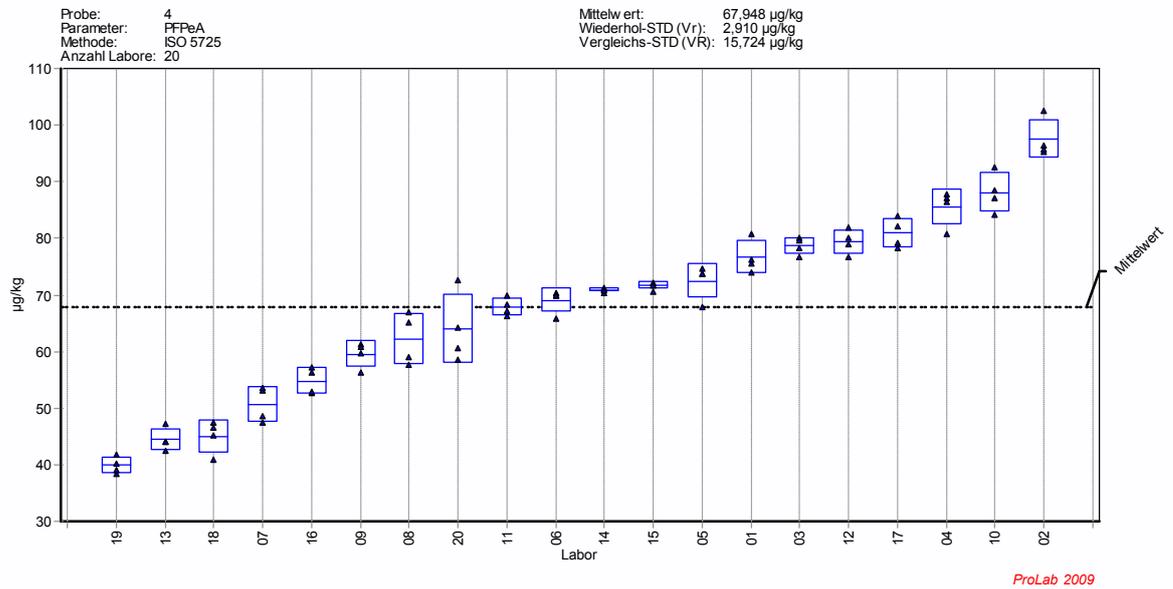


Bild 28.2 – PFPeA, Probe 4

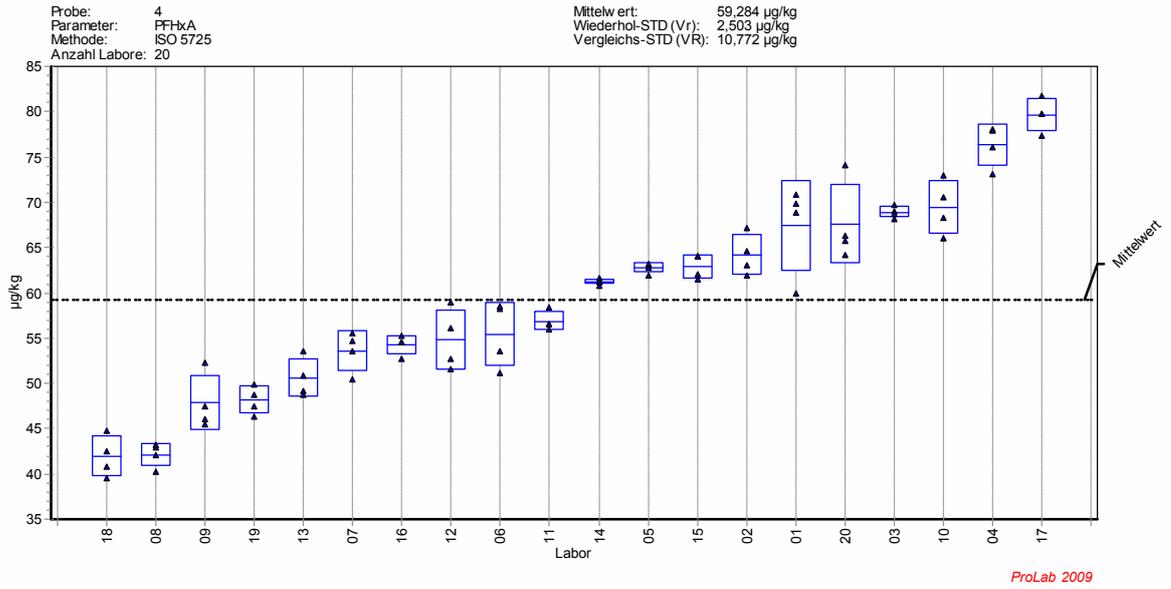


Bild 28.3 – PFHxA, Probe 4

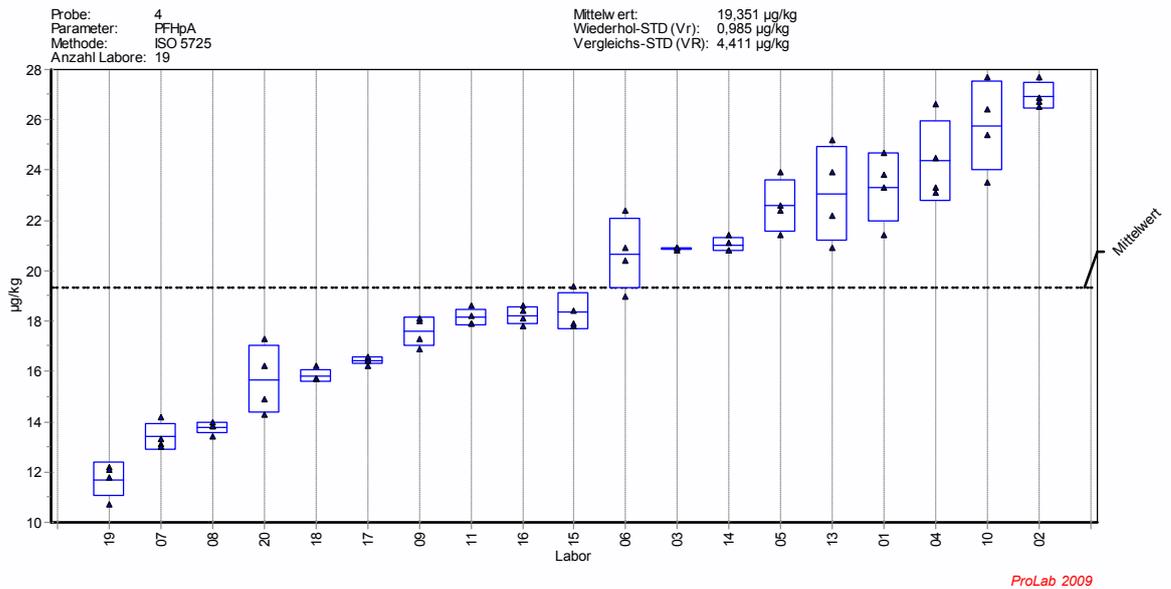


Bild 28.4 – PFHpA, Probe 4

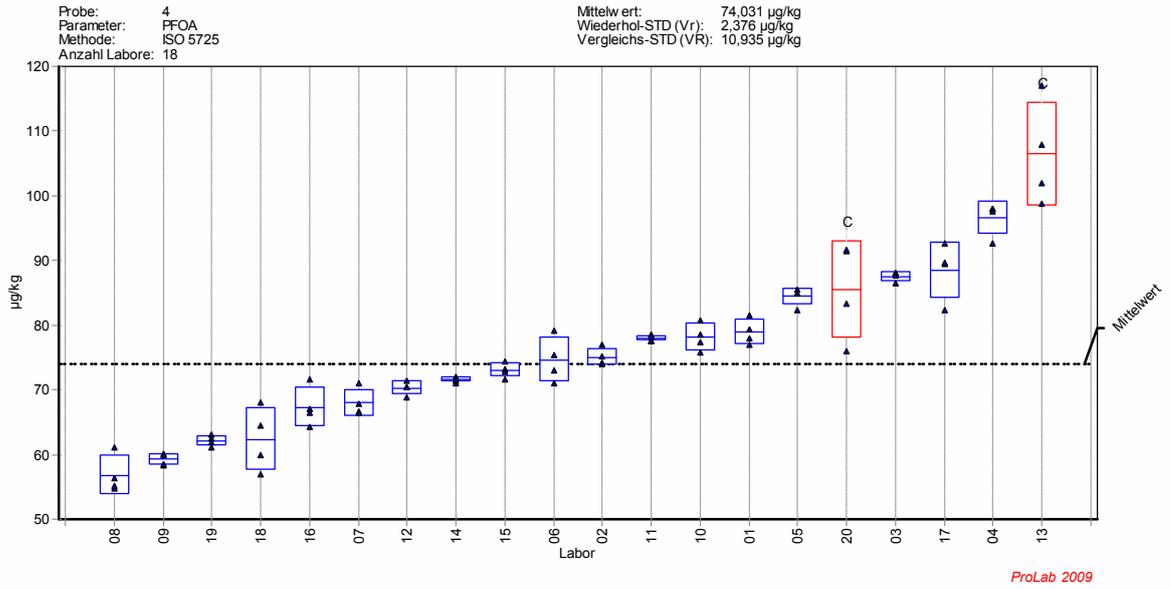


Bild 28.5 – PFOA, Probe 4

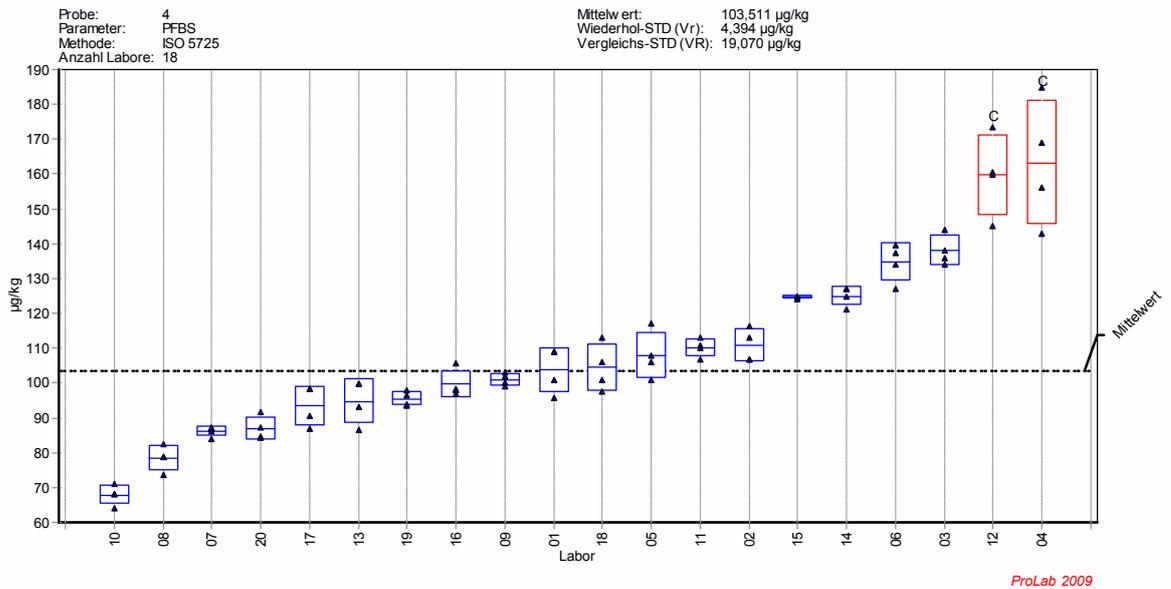


Bild 28.6 – PFBS, Probe 4

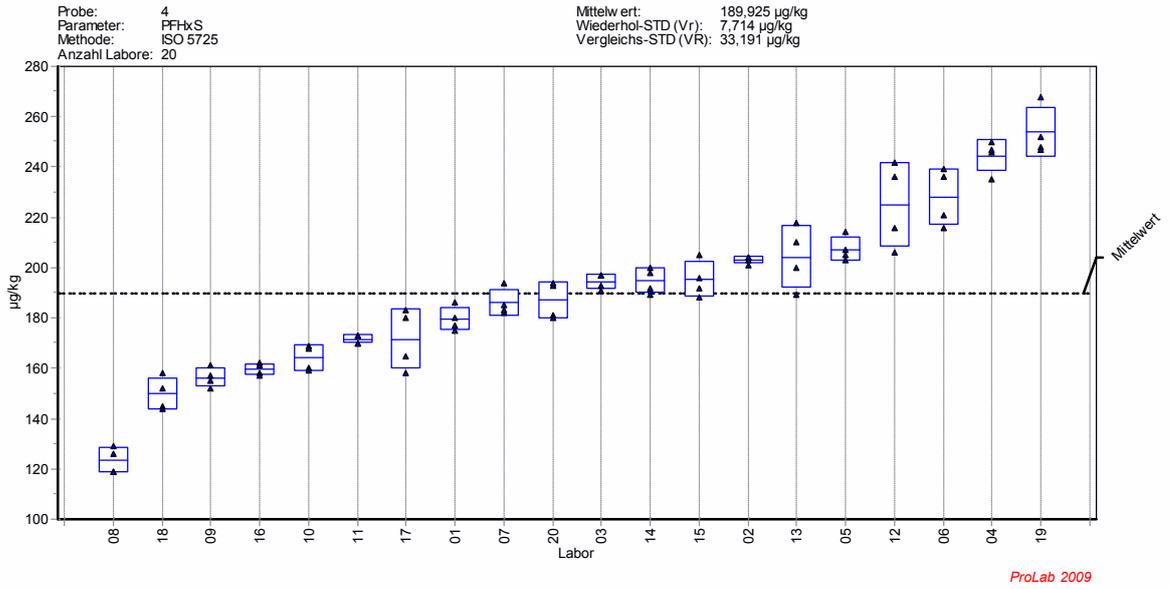


Bild 28.7 – PFHxS, Probe 4

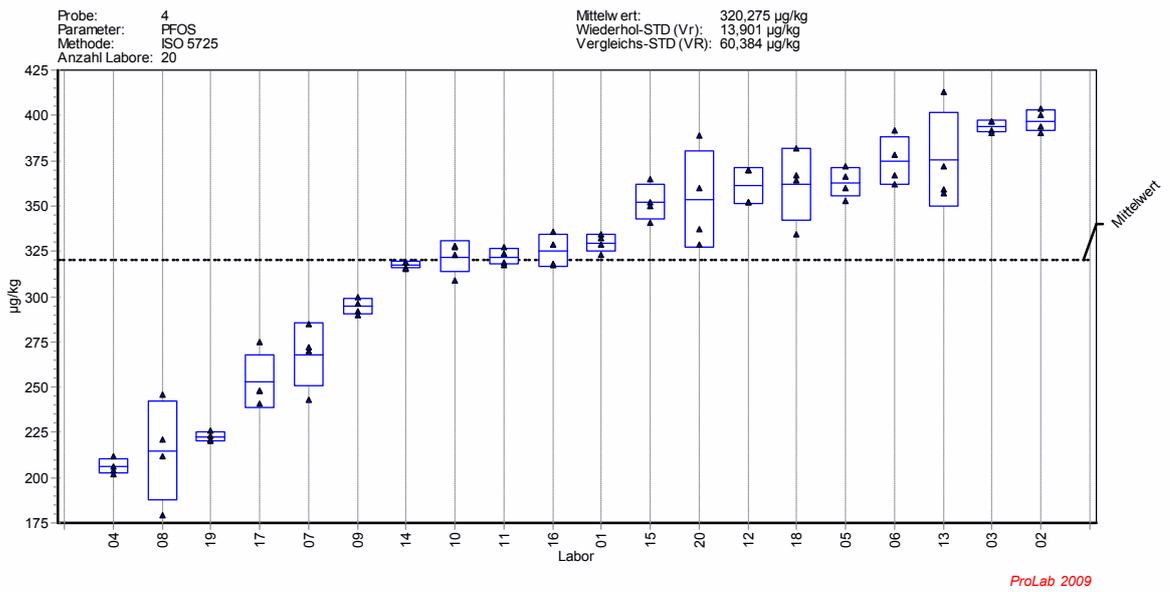


Bild 28.8 - PFOS, Probe 4

11 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 21 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 21 – Relativer Anteil verzweigter Isomere, Beispiele

Probe	PFBA	PFPA	PFBS	PFHxA	PFHpA	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA
	+ / 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 29 gibt die chromatographische Trennung von PFOS-Isomeren bei beiden Massenübergängen 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 große Unterschiede zwischen den beiden Massenübergängen bestehen.

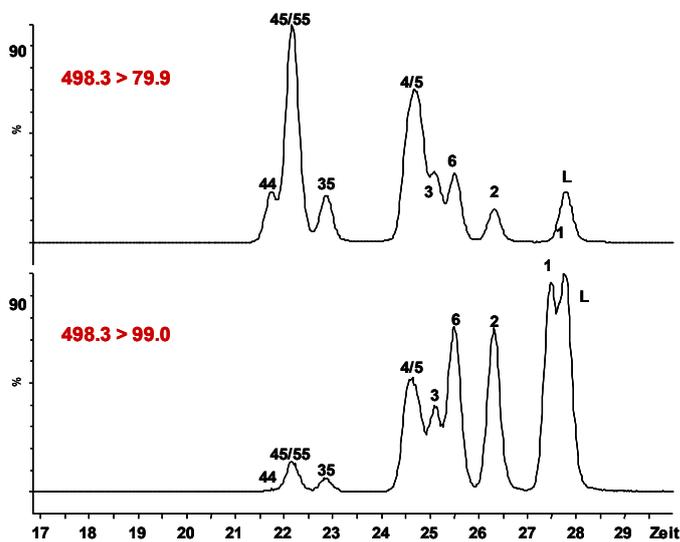


Bild 29 – Chromatographische Trennung von PFOS-Isomeren

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; $V_{inj} = 20 \mu\text{l}$, PFOS-Mixtur mit je 5 ng/ml in MeOH; A: 5 mmol NH_4Ac /Wasser // B: 0,05 % HAc/MeOH, Gradient: 50 % nach 65 % B in 30 min, linear; Fluss 0,25 ml/min, Temperatur 40 °C

Peak-Nr.: (L) n-Perfluoroktansulfonsäure, (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 30).

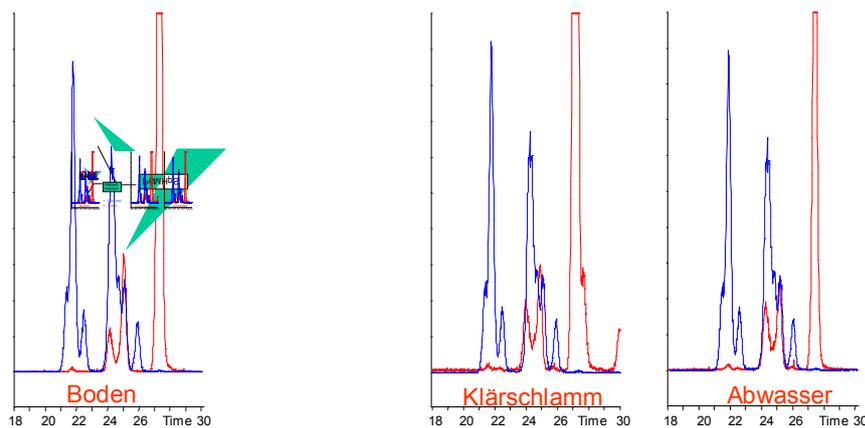


Bild 30 – Zuordnung verzweigter PFOS-Isomere in Umweltproben, Beispiele

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 22 zeigt, dass die Abweichungen der konventionellen Auswertemethode sich in Grenzen halten. Entsprechend den Responsefaktoren wird 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 22 – 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 Isomeren	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 Isomeren	4 MHpS + 5MHpS	22	7	154
	6 MHpS	41	15	545
	Summe Isomere	346	355	5898
Vergleich	Abweichung, %	10	5	5

12 Literatur

[1] Validierungsdokument zu DIN 38407-42

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

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)

13 Anlage

GRAVIMETRIC CERTIFICATE

General Product Data:Product Name: Mixture of PFAC (C₄-C₁₀) and PFAS (C₄,C₆,C₈)

Product No.: S-4594-5-ME

Batch Specific Data:

Batch No.: 10 655

Product description:

Compound	Prod.no.	Batch	CAS no.	Purity	Grav. conc.
Heptafluorobutyric acid	2810.4	5709	375-22-4	99 %	5.00 µg/mL
n-Nonafluoropentanoic acid	2819.5	5782	2706-90-3	98 %	5.04 µg/mL
Perfluorohexanoic acid	2590.6	8347	307-24-4	99.9 %	5.09 µg/mL
Perfluoroheptanoic acid	2821.7	6460	375-85-9	98.2 %	5.10 µg/mL
n-Perfluorooctanoic acid	2042.8	3616	335-67-1	95.2 %	5.04 µg/mL
Perfluorononanoic acid	2715.9	5200	375-95-1	>98 %	4.97 µg/mL
n-Perfluorodecanoic acid	2823.10	6195	335-76-2	98.2 %	5.04 µg/mL
Perfluorobutane sulphonate, potassium salt	2719.4	5237	29420-49-3	>98 %	4.98 µg/mL
Perfluorohexane sulfonic acid, potassium salt	8581.6	9276	3871-99-6	100.2%	5.02 µg/mL
Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt	2193.8	6466	2795-39-3	98.4 %	4.98 µg/mL

The gravimetric concentrations have not been adjusted for compound impurities

Listed concentrations for the perfluoroalkylsulfonates are reported as the anion, addition of molar equivalent of NaOH to prevent esterification of the acids.

Solvent: Methanol, Analytical Reagent (a.r.), Batch 0371/9
Purity: 99.8 %, Density: 0.7914 g/mL

Tolerance: The uncertainty in the preparation of this standard is less than ± 5 %
(maximum combined uncertainty of purity, weights and volumes)

Quantity: 1.1 mL
Before opening, allow the standard to reach room temperature

Storage: Dark and cool
Before opening allow standard to reach room temperature

Expiry date: Guaranteed 1 year from date of issue

All weights and volumes are traceable to NIST

Trondheim, 08 December 2010

Issued by:

for *Sharmila. Rathnasingam*
Linn Margrethe Bringedal

Approved by:

Huiling Liu
Huiling Liu



Chiron AS

Stiklestadvn. 1
N-7041 Trondheim
Norway

Phone No.:
+47 73 87 44 90
Fax No.:
+47 73 87 44 99

E-mail:
chiron@chiron.no
Website:
www.chiron.no

Org. No.:
967 607 657