

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – analýza půd 30730.1 – Stanovení obsahu perfluoroalkylových sloučenin (PFAS) metodou LC-MS/MS	Strana	1
		Vydání	1
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU PERFLUOROALKYLOVÝCH SLOUČENIN (PFAS) METODOU LC-MS/MS

1 Rozsah a účel

Postup je určen pro analýzu perfluoroalkylových sloučenin v půdách, sedimentech, čistírenských kalech a dalších odpadních materiálech. Obsah PFAS se stanoví kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).

2 Princip

Vzorek se extrahuje sonifikací nebo vytřepáním do methanolu. Zkoncentrovaný extrakt se přečistí aktivním uhlím. Přečištěný extrakt se ředí vodou, odtředí a zfiltruje. Filtrát se analyzuje pomocí LC-MS/MS po ionizaci elektrosprejem v negativním módu v režimu sledování vybraných přechodů (MRM). Stanovení obsahu se provádí metodou izotopového ředění.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, nejlépe kvality pro reziduální analýzu. Rozpouštědla musejí být vhodná pro LC-MS analýzu. Dostačující čistota chemikálií, sorbentů a rozpouštědel se testuje proměřením slepého vzorku.

- 1 Voda (ultračistá), nejméně 1.stupně jakosti dle ČSN ISO 3696.
- 2 Methanol, CH₃OH.
- 3 Octan amonný, CH₃COONH₄, roztok, c(CH₃COONH₄) = 2 mol/l.
Příprava: 1,54 g CH₃COONH₄ se rozpustí v 10 ml směsi (1 : 1) vody (1) a methanolu (2).
- 4 Hydroxid sodný, NaOH, methanolický roztok, c(NaOH) = 0,2 mol/l.
Příprava: 0,2 g NaOH se rozpustí v 25 ml methanolu (2).
- 5 Kyselina chlorovodíková, HCl, methanolický roztok, c(HCl) = 2 mol/l.
Příprava: 1,8 ml 37% HCl se rozpustí v 10 ml methanolu (2).
- 6 Mobilní fáze A: 2 mM vodný roztok CH₃COONH₄.
Příprava: 0,25 ml 2M CH₃COONH₄ (3) se pipetuje do 250ml odměrné baňky a doplní vodou (1) po značku.
- 7 Mobilní fáze B: 2 mM roztok CH₃COONH₄ v methanolu.
Příprava: 0,25 ml 2M CH₃COONH₄ (3) se pipetuje do 250ml odměrné baňky a doplní methanolem (2) po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – analýza půd 30730.1 – Stanovení obsahu perfluoroalkylových sloučenin (PFAS) metodou LC-MS/MS	Strana	2
		Vydání	1
		Revize	0

- 8 GCB sorbent (Graphitized Carbon Black), např. Supelclean Envi-Carb (Supelco).
- 9 Certifikované analytické standardy nativních PFAS. Dodávají se komerčně v roztoku s deklarovanou koncentrací PFAS, např. PFAC-MXA (Wellington Laboratories).
- 10 Vnitřní isotopově značené standardy (ISTD) pro účely kvantifikace PFAS a kontrolu kvality, např. MPFHxA, MPFOA, MPFDA, MPFOS, M8PFOA, M8PFOS, MPFAC-MXA (Wellington Laboratories).
- 11 Pracovní a kalibrační roztoky PFAS a ISTD se připraví ředěním standardů PFAS (9) a ISTD (10).

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, např.:
 ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters),
 vybavený UPLC kolonou, např.:
 ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),
 ACQUITY BEH C18 VanGuard, 5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters).
- 2 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Horizontální třepačka s rychlostí do 300 kmitů/min.
- 5 Zařízení pro odpařování proudem inertního plynu.
- 6 Centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, pro objemy (1 – 100) ml.
- 7 Centrifugační zkumavky polypropylenové (PP) se šroubovacím víčkem, 15 ml.
- 8 Centrifugační zkumavky Eppendorf, 1,5 ml.
- 9 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex.
- 10 Filtrační materiál: stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm nebo centrifugační filtrační zkumavky s velikostí pórů nylonových filtrů 0,2 μm.
- 11 Vialky polypropylenové (PP), šroubovací, 0,3 ml; 2 ml.

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

1 g homogenního vzorku se naváží do 15ml centrifugační zkumavky a obohatí se vnitřním standardem (např. 2 ng – 10 ng jednotlivých izotopově značených PFAS). K obohacenému vzorku se přidá 1 ml 0,2M NaOH (4), důkladně se promíchá a nechá se stát 30 min. Poté se ke vzorku přidá 100 μl roztoku HCl (5) a vzorek se opět promíchá. Extrakce se provede

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – analýza půd 30730.1 – Stanovení obsahu perfluoroalkylových sloučenin (PFAS) metodou LC-MS/MS	Strana	3
		Vydání	1
		Revize	0

5 ml methanolu (2) po dobu 15 min na ultrazvukové lázni. Vzorek se odstředí 5 min při 3900 ot/min, supernatant se převede do 15 ml PP zkumavky a extrakce se 1 × zopakuje. Spojené extrakty se zkoncentrují proudem inertního plynu na objem 2 ml, přidá se 300 mg aktivního uhlí a suspenze se intenzivně protřepe po dobu 1 min. Poté se přečištěný extrakt odstředí 5 min při 3900 ot/min a alikvot o objemu 1 ml se převede do zkumavky Eppendorf. Takto ošetřený extrakt se zkoncentruje proudem inertního plynu na 0,5 ml, obohatí se nástríkovým standardem (např. 2 ng – 10 ng jednotlivých izotopově značených PFAS) a doplní vodou (1) na 1 ml. Po promíchání pomocí Vortexu se roztok zfiltruje a převede do vialky.

5.2 UPLC-MS/MS stanovení

Extrakty se analyzují metodou UPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. Kalibrační standardy se zařadí do sekvence před i za stanovovaný vzorek.

Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v aktuální měřicí metodě použité přístrojové sestavy. Před analýzou reálných vzorků se ověří citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy je zajištěna využitím MRM módu při MS detekci. Sledované MRM pro nativní a izotopově značené PFAS jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. MRM sledované pro nativní a izotopově značené PFAS.

Nativní PFAS	MRM 1	MRM 2
PFBA	213 > 169	–
PFPeA	263 > 219	–
PFHxA	313 > 269	313 > 119
PFHpA	363 > 319	363 > 169
PFOA	413 > 369	413 > 169
PFNA	463 > 419	463 > 219
PFDA	513 > 469	513 > 219
PFBS	299 > 99	299 > 80
PFHxS	399 > 99	399 > 80
PFOS	499 > 99	499 > 80
Vnitřní standardy	MRM 1	MRM 2
13C2-PFHxA	315 > 270	–
13C4-PFOA	417 > 372	–
13C2-PFDA	515 > 470	–
13C4-PFOS	503 > 99	503 > 80
13C8-PFOA	421 > 376	–
13C8-PFOS	507 > 99	507 > 80

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – analýza půd 30730.1 – Stanovení obsahu perfluoroalkylových sloučenin (PFAS) metodou LC-MS/MS	Strana	4
		Vydání	1
		Revize	0

6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality reziduálních analýz pesticidů jsou uvedeny v Rozhodnutí Komise 2002/657/ES a Nařízení Komise (ES) č. 278/2012.

Zkouška je založena na metodě izotopového ředění, tzn. vzorek je obohacen izotopově značeným analogem sledovaného analytu (ISTD), který se využívá ke korekci ztrát při přípravě vzorku a eliminaci vlivu matricových interferentů přítomných v daném vzorku. Povolený rozsah pro výtěžnost ISTD v jednotlivých vzorcích je 60 % až 120 %.

Do každé série vzorků se průběžně zařazuje analýza kontrolního vzorku a procesní slepý pokus. Pro tyto kontrolní vzorky se vede a vyhodnocuje regulační diagram.

7 Výpočet a vyjádření výsledků

Přítomnost stanovovaného analytu je potvrzena, pokud je odchylka retenčního času daného analytu v chromatogramu vzorku a kalibračního standardu menší než 2,5 % a pokud se poměr produktových iontů ve spektru vzorku nachází v povoleném intervalu daném poměrem těchto produktových iontů ve spektru kalibračních standardů.

Metoda izotopového ředění umožňuje provést kvantifikace vzorku pomocí solventových kalibračních standardů. Kalibrační závislost musí vykazovat minimální charakteristiky $RSD < 25 \%$ a $R^2 > 0,99$.

Výsledek pod mezí stanovitelnosti se uvede jako $< LOQ$, tj. $< 0,1 \mu\text{g/kg}$. Pro hodnoty nad mezí stanovitelnosti se výsledek zaokrouhlí dle tabulky 2.

Tabulka 2. Zaokrouhlování a udávání výsledků.

Hladina reziduí ($\mu\text{g/kg}$)	Zápis výsledku
< 10	2 platné číslice
> 10	3 platné číslice

8 Validační data

Postupem daným pro tuto zkoušku byla stanovena výtěžnost a opakovatelnost zástupců PFAS, které vyhovovaly požadavkům uvedeným v Rozhodnutí Komise 2002/657/ES, tj. výtěžnost byla u všech validačních experimentů v rozmezí 70 % až 110 % a relativní standardní odchylka opakovaného stanovení byla menší než 20 %.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – analýza půd 30730.1 – Stanovení obsahu perfluoroalkylových sloučenin (PFAS) metodou LC-MS/MS	Strana	5
		Vydání	1
		Revize	0

9 Literatura

- 1 Powley, C.R., et al. 2005, Matrix-effect free analytical methods for determination of perfluorinated carboxylic acids in environmental matrixes, Anal. Chem. 77, 6353-6358.
- 2 Rozhodnutí Komise 2002/657/ES ze dne 12. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/E o používání analytických metod a interpretaci výsledků.
- 3 Nařízení Komise (EU) č. 278/2012 ze dne 28. března 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 152/2009, pokud jde o stanovení obsahu dioxinů a polychlorovaných bifenylů.