 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10596.1 – Stanovení obsahu perfluoralkylovaných sloučenin metodou LC-MS/MS	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU PERFLUORALKYLOVANÝCH SLOUČENIN METODOU LC-MS/MS

1 Rozsah použití

Postup je určen pro analýzu perfluoralkylovaných sloučenin v krmivech. Obsah PFAS se stanoví kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).


2 Princip

Vzorek se extrahuje sonikací do acetonitrilu. Zkondcetrovaný extrakt se přečistí přidávkou hexanu a aktivního uhlí. Přečištěný extrakt se ředí vodou 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).
- 2 Methanol, CH₃OH, pro LC-MS.
- 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 Acetonitril, pro LC-MS.
- 5 Hexan, pro stopovou analýzu.
- 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.


 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10596.1 – Stanovení obsahu perfluoralkylovaných sloučenin metodou LC-MS/MS	Revize	0

- 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.
- 8 GCB sorbent (Graphitized Carbon Black), např. Supelclean Envi-Carb (Supelco).
- 9 Certifikované analytické standardy nativních PFAS (viz. Tabulka 1). Dodávají se komerčně v roztoku s deklarovanou koncentrací PFAS, např. PFAC-MXA nebo PFAC-MXB (Wellington Laboratories).

Tabulka 1. Seznam standardů PFAS.

PFAS	Zkratka	Vzorec	Molekulová hmotnost (g/mol)
Perfluorhexanová kyselina	PFH _x A	C ₆ HF ₁₁ O ₂	314,05
Perfluorheptanová kyselina	PFH _p A	C ₇ HF ₁₃ O ₂	364,06
Perfluoroktanová kyselina	PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂	414,07
Perfluornonanová kyselina	PFNA	C ₉ HF ₁₇ O ₂	464,08
Perfluordekanová kyselina	PFDA	C ₁₀ HF ₁₉ O ₂	514,08
Perfluorundekanová kyselina	PFUnDA	C ₁₁ HF ₂₁ O ₂	564,09
Perfluordodekanová kyselina	PFDoDA	C ₁₂ HF ₂₃ O ₂	614,10
Perfluortridekanová kyselina	PFT _r Da	C ₁₃ HF ₂₅ O ₂	664,10
Perfluortetradekanová kyselina	PFTeDA	C ₁₄ HF ₂₇ O ₂	714,11
Perfluorhexadekanová kyselina	PFH _x DA	C ₁₆ HF ₃₁ O ₂	814,12
Perfluoroktadekanová kyselina	PFODA	C ₁₈ HF ₃₅ O ₂	914,14
Perfluorhexansulfonová kyselina	PFH _x S	C ₆ HF ₁₃ O ₃ S	400,12
Perfluoroktansulfonová kyselina	PFOS	C ₈ HF ₁₇ O ₃ S	500,13
Perfluordekansulfonová kyselina	PFDS	C ₁₀ HF ₂₁ O ₃ S	600,15

- 10 Isotopově značené standardy (ISTD) pro účely kvantifikace PFAS a kontrolu kvality (viz. Tabulka 2), např. MPFH_xA, MPFOA, MPFDA, MPFOS, M8PFOA, M8PFOS, MPFAC-MXA (Wellington Laboratories).

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10596.1 – Stanovení obsahu perfluoralkylovaných sloučenin metodou LC-MS/MS	Revize	0

Tabulka 2. Seznam izotopově značených vnitřních standardů ¹³C-PFAS, ¹⁸O-PFAS.

¹³ C-PFAS, ¹⁸ O-PFAS	Zkratka	Vzorec	Molekulová hmotnost (g/mol)
Perfluor-n-(1,2- ¹³ C ₂)hexanová kyselina	¹³ C ₂ -PFHxA	¹³ C ₂ ¹² C ₄ HF ₁₁ O ₂	316,04
Perfluor-1-hexan(¹⁸ O ₂)sulfonová kyselina	¹⁸ O ₂ -PFHxS	C ₆ HF ₁₃ ¹⁸ O ₂ ¹⁶ OS	404,11
Perfluor-n-(1,2,3,4- ¹³ C ₄)oktanová kyselina	¹³ C ₄ -PFOA	¹³ C ₄ ¹² C ₄ HF ₁₅ O ₂	418,04
Perfluor-n-(1,2,3,4,5- ¹³ C ₅)nonanová kyselina	¹³ C ₅ -PFNA	¹³ C ₅ ¹² C ₄ HF ₁₇ O ₂	469,04
Perfluor-1-(1,2,3,4- ¹³ C ₄)oktansulfonová kyselina	¹³ C ₄ -PFOS	¹³ C ₄ ¹² C ₄ HF ₁₇ O ₃ S	504,10
Perfluor-n-(1,2- ¹³ C ₂)dekanová kyselina	¹³ C ₂ -PFDA	¹³ C ₂ ¹² C ₈ HF ₁₉ O ₂	516,07
Perfluor-n-(1,2- ¹³ C ₂)undekanová kyselina	¹³ C ₂ -PFUnDA	¹³ C ₂ ¹² C ₉ HF ₂₁ O ₂	566,08
Perfluor-n-(1,2- ¹³ C ₂)dodekanová kyselina	¹³ C ₂ - PFDoDA	¹³ C ₂ ¹² C ₁₀ HF ₂₃ O ₂	616,08
Perfluor-n-(¹³ C ₈)oktanová kyselina	¹³ C ₈ -PFOA	¹³ C ₈ HF ₁₅ O ₂	422,01
Perfluor-n-(¹³ C ₈)oktansulfonová kyselina	¹³ C ₈ -PFOS	¹³ C ₈ HF ₁₇ O ₃ S	508,07

11 Standardní roztoky PFAS

Pracovní roztok PFAC-MXB: 5 ng (jednotlivých PFAS) v 1 ml methanolu.

Pracovní roztok PFAC-MXB: 200 ng (jednotlivých PFAS) v 1 ml methanolu.


Pracovní roztok PFAC-MXB: 2000 ng (jednotlivých PFAS) v 1 ml methanolu.

Pracovní roztok MPFAC-MXA (IS1): 200 ng (jednotlivých izotopově značených PFAS) v 1 ml methanolu.

Pracovní roztok RSTD-M8PFAS (IS2): 100 ng M8PFOS a 100 ng M8PFOA v 1 ml methanolu.

12 Kalibrační standardní roztoky PFAS

Připraví se ze standardních roztoků (11) v koncentračním rozsahu (0,02 – 40) ng/g (viz Tabulka 3.).


 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř		Strana	4	
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv			Vydání	1
	10596.1 – Stanovení obsahu perfluoralkylovaných sloučenin metodou LC-MS/MS			Revize	0

Tabulka 3. Příprava kalibračních standardních roztoků.

Kalibr. úroveň PFAS (ng/g)	Koncentrace (ng/ml)		Objem (μl)					
	PFAS	MPFAS	IS1 200 ng/ml	IS2 100 ng/ml	PFAC- MXB 5 ng/ml	PFAC- MXB 200 ng/ml	PFAC- MXB 2000 ng/ml	50% ACN v H ₂ O
0	0	3,00	15	30	-	-	-	955,0
0,02	0,010	3,00	15	30	2,0	-	-	953,0
0,05	0,025	3,00	15	30	5,0	-	-	950,0
0,10	0,050	3,00	15	30	10,0	-	-	945,0
0,20	0,100	3,00	15	30	20,0	-	-	935,0
1,00	0,500	3,00	15	30	-	2,5	-	952,5
10,0	5,00	3,00	15	30	-	25,0	-	930,0
20,0	10,0	3,00	15	30	-	-	5,0	950,0
40,0	20,0	3,00	15	30	-	-	10,0	945,0

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem umožňující měření v MRM módu, vybavený UHPLC 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.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Třepačka min. 300 kmitů/min.
- 5 Zařízení pro odpařování proudem inertního plynu.
- 6 Centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min.
- 7 Centrifugační zkumavky polypropylenové (PP) se šroubovacím víčkem, 15 ml.
- 8 Centrifugační zkumavky Eppendorf, 1,5 ml.
- 9 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex.
- 10 Stříkačkové filtry z regenerované celulózy, případně nylonové o velikosti pórů 0,2 μm.
- 11 Vialky polypropylenové (PP), šroubovací, 2 ml.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10596.1 – Stanovení obsahu perfluoralkylovaných sloučenin metodou LC-MS/MS	Revize	0

5 Postup


5.1 Příprava vzorku

1 g homogenního vzorku se naváží do 15ml centrifugační zkumavky a obohatí se vnitřním standardem (30 μ l ISTD-1, c = 200 ng/ml). Extrakce se provede do 5 ml acetonitrilu (4) po dobu 15 min na ultrazvukové lázni. Vzorek se odstředí 10 min při 4000 ot/min, supernatant se převede do 15ml PP zkumavky a extrakce se 1 \times zopakuje. Spojené extrakty se zkoncentrují proudem inertního plynu na objem 2 ml, přidají se 2 ml hexanu (5) a směs se intenzivně protřepe po dobu 2 min na třepačce při min. 300 kmitech/min. Poté se přečištěný extrakt odstředí 10 min při 4000 ot/min. Vrstva hexanu se odebere do odpadu a extrakt se zkoncentruje na 1 ml proudem inertního plynu. Přidá se 100 mg aktivního uhlí, směs se intenzivně protřepe po dobu 2 min na třepačce při min. 300 kmitech/min, promíchá a odstředí se 5 min při 4000 ot/min. 0,5 ml extraktu se smíchá s nástřikovým standardem (30 μ l ISTD-2, c = 100 ng/ml) a doplní vodou (1) na 1 ml (~ 470 μ l) ve zkumavce Eppendorf. Po promíchání pomocí Vortexu se roztok zfiltruje přes filtr z regenerované celulózy 0,2 μ m do PP vialky.

5.2 UHPLC-MS/MS stanovení

Extrakty se analyzují metodou UHPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů.

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 Tabulkách 4 a 5.


 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10596.1 – Stanovení obsahu perfluoralkylovaných sloučenin metodou LC-MS/MS	Revize	0

Tabulka 4. MRM sledované pro nativní PFAS.

Nativní PFAS	MRM 1	MRM 2
PFHxA	313 > 269	313 > 119
PFHpA	363 > 319	363 > 169
PFHxS	399 > 80	399 > 99
PFOA	413 > 369	413 > 169
PFNA	463 > 419	463 > 219
PFOS	499 > 99	499 > 80
PFDA	513 > 469	513 > 219
PFUdDA	563 > 519	563 > 269
PFDS	599 > 80	599 > 99
PFDODA	613 > 569	613 > 319
PFTTrDA	663 > 619	663 > 369
PFTeDA	713 > 669	713 > 319
PFHxDA	813 > 769	813 > 219
PFODA	913 > 869	913 > 269

Tabulka 5. MRM sledované pro izotopově značené PFAS.

Vnitřní standardy	MRM 1	MRM 2
¹³ C ₂ -PFHxA	315 > 270	–
¹⁸ O ₂ -PFHxS	403 > 103	–
¹³ C ₄ -PFOA	417 > 372	–
¹³ C ₅ -PFNA	468 > 423	–
¹³ C ₄ -PFOS	503 > 99	503 > 80
¹³ C ₂ -PFDA	515 > 470	–
¹³ C ₂ -PFUdDA	565 > 520	–
¹³ C ₂ -PFDODA	615 > 570	–
¹³ C ₈ -PFOA	421 > 376	–
¹³ C ₈ -PFOS	507 > 99	507 > 80

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10596.1 – Stanovení obsahu perfluoralkylovaných sloučenin metodou LC-MS/MS	Revize	0

6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality analýz PFAS jsou uvedeny v Rozhodnutí Komise 2002/657/ES a Nařízení Komise (EU) 2022/1428.

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.

Do každé série vzorků se průběžně zařazuje analýza procesního slepého a kontrolního vzorku, který se využívá pro vedení regulačního diagramu.

7 Výpočet


Přítomnost stanovovaného analytu je potvrzena, pokud je odchylka relativního retenčního času daného analytu a jeho přiřazeného izotopově značeného ISTD v chromatogramu vzorku a kalibračního standardu menší než 1 % a pokud se poměr produktových iontů ve spektru vzorku nachází v povoleném intervalu ± 30 %, 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 $RSD < 20$ % a $R^2 > 0,995$.

Výsledek pod mezí stanovitelnosti se uvede jako $< LOQ$, tj. $< 0,05 \mu\text{g/kg}$ nebo $< 0,1 \mu\text{g/kg}$. Pro hodnoty nad mezí stanovitelnosti se výsledek zaokrouhlí podle tabulky 5.

Tabulka 5. Zaokrouhlování a udávání výsledků.

Hladina reziduí ($\mu\text{g/kg}$)	Zápis výsledku
< 1	2 platné číslice
> 1	3 platné číslice

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10596.1 – Stanovení obsahu perfluoralkylovaných sloučenin metodou LC-MS/MS	Revize	0

8 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) 2022/1428 ze dne 24. srpna 2022, kterým se stanoví metody odběru vzorků a analýzy pro kontrolu perfluoralkylovaných látek v některých potravinách.
- 4 Kantošová, K. 2014, Stanovení vybraných perfluoroalkylových sloučenin v komplexních maticích, Diplomová práce.