

PFTs schnell, sicher und sensitiv nachweisen

Der Nachweis perfluorierter Tenside (PFTs) in Wasser beziehungsweise wässrigen Matrices erfolgt gemäß international gültiger Standards (ISO) mittels HPLC-MS/MS nach Festphasenextraktion (SPE). Dass es besser und schneller geht, als es die Norm verlangt, und obendrein noch komfortabel automatisiert, konnten Applikationsexperten jüngst belegen.

Wir braten unser Fleisch in Pfannen, die kein Anbrennen kennen, und schlüpfen in Jacken, Hosen und Schuhe, die nicht einen Regentropfen ins Gewebe sickern lassen. Der Chemie sei Dank! Sie erst ermöglicht uns diesen Luxus, der uns, so viel scheint sicher, nicht nur wohl tut, sondern auf Dauer auch teuer zu stehen kommt. Oft wird nämlich erst viel zu spät erkannt, dass mancher im Labor oder in großtechnischen Anlagen hergestellte Chemiewerkstoff weder gesund noch umweltverträglich ist.

Nehmen wir einmal die so genannten perfluorierten Tenside, manchen vielleicht besser bekannt unter dem Akronym PFT. Das sind rein künstliche Gebilde, Kreationen aus dem Labor: PFTs entstehen durch Synthesereaktion, bei der die Wasserstoffatome vornehmlich von Carbon- und Sulfonsäuren (PFC) mit einer Kettenlänge von C₄ bis C₁₀ durch Fluoratome substituiert werden. Strenggenommen lassen sich die PFTs daher in zwei Stoffgruppen unterteilen: in die perfluorierten Alkylsulfonate (PFAS) mit dem Perfluoroctansulfonat (PFOS) als bekanntesten Vertreter, und in die perfluorierten Carbonsäuren (PFCa), deren namhaftester Repräsentant die Perfluor-octansäure (PFOA) ist.

Einzigartiges Eigenschaftsprofil

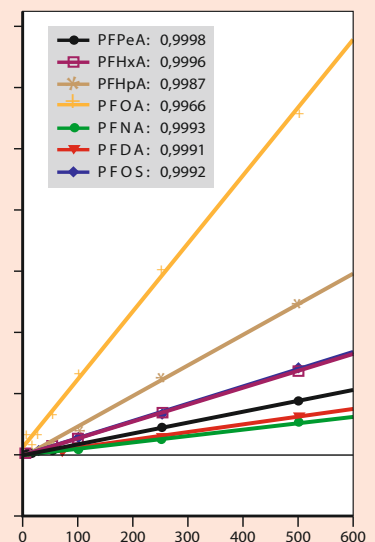
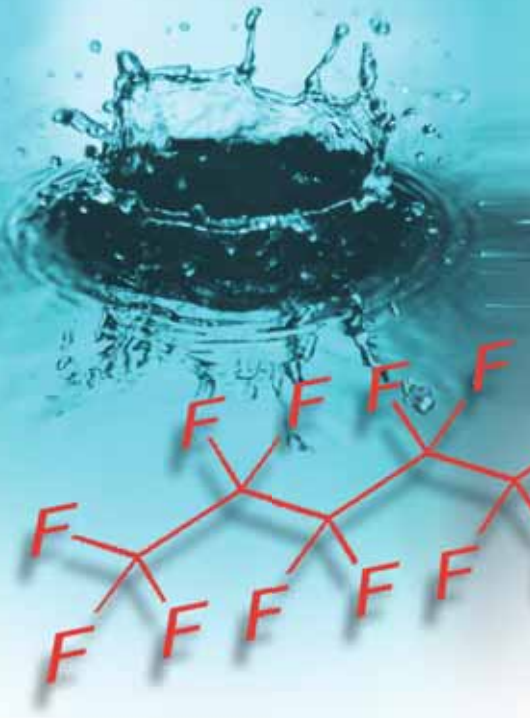
Einige interessante chemische Details: Während die Kohlenstoffkette der PFTs hydrophob ist, weist die jeweilige Kopf-

gruppe hydrophile Eigenschaften auf. Der amphiphile Charakter erklärt die Verwendung dieser Verbindungsklasse als Tensid. Im Gegensatz zu den klassischen Tensiden besitzt die Kohlenstoffkette der PFTs allerdings noch einen lipophoben Charakter. Das bedeutet aus praktischer Sicht: Sie weist nicht nur Wasser ab, sondern ebenso Öl, Fett und Schmutz. Aus genau diesem Grund haben PFTs als Additive insbesondere in der Textil- und Papierindustrie rasch Karriere gemacht; dort werden sie eingesetzt, um Oberflächen zu modifizieren oder zu veredeln. Ihr Einsatzspektrum reicht jedoch noch sehr viel weiter. Grund ist die polare Kohlenstoff-Fluor-Bindung, die zu den stabilsten Bindungen zählt, die die organische Chemie kennt. PFTs sind thermisch und chemisch extrem stabil. Sie kommen zum Einsatz in der Galvanik, als Emulgator bei der Herstellung von Fluorpolymeren (Teflon) oder als Additiv bei Feuerlösch-, Schutz-, Schmier- und Imprägniermitteln.

Wo Licht ist, da ist auch Schatten

Die Eigenschaften, die PFTs auszeichnen, haften ihnen gleichzeitig als Makel an. „PFOA und PFOS sind toxikologisch teilbewertbare Stoffe; die Datenlage hinsichtlich weiterer PFTs ist dagegen sehr unvollständig. Primär bzw. stark gentoxische (das Erbmaterial unmittelbar angreifende) Wirkungen,

etwa durch reaktive Metaboliten, sind allerdings unwahrscheinlich“, heißt es in der „Stellungnahme der Trinkwasserkommission des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) beim Umweltbundesamt“. Anders ausgedrückt: Die Experten meinen, PFTs sind aus heutiger Sicht begrenzt giftig; über die langfristigen Folgen ist man sich noch nicht ganz schlüssig, zumal sich diese Stoffe im menschlichen Gewebe anreichern. Wobei man, am Rande bemerkt, bei der Untersuchung in der Regel



Kalibriergerade PFTs 5 ng/mL bis 500 ng/mL externe Standardlösungen.



Chemische Struktur des PFOS



Chemische Struktur der PFOA

lebender Eisbären als auch im Humanblut nachweisen. Im Gegensatz zu POPs unterliegen PFTs indes keinerlei photolytischen, hydrolytischen, oxidativen oder reduktiven Transformationen. Sie sind beständig gegenüber UV-Strahlen und Verwitterung und werden weder aerob noch anaerob abgebaut. PFOS, PFOA und die anderen Mitglieder der PFT-Familie bleiben uns aller Wahrscheinlichkeit nach sehr, sehr lange erhalten.



PFTs sind thermisch sehr stabil, was ihren Einsatz in Feuerlöschmitteln erklärt.

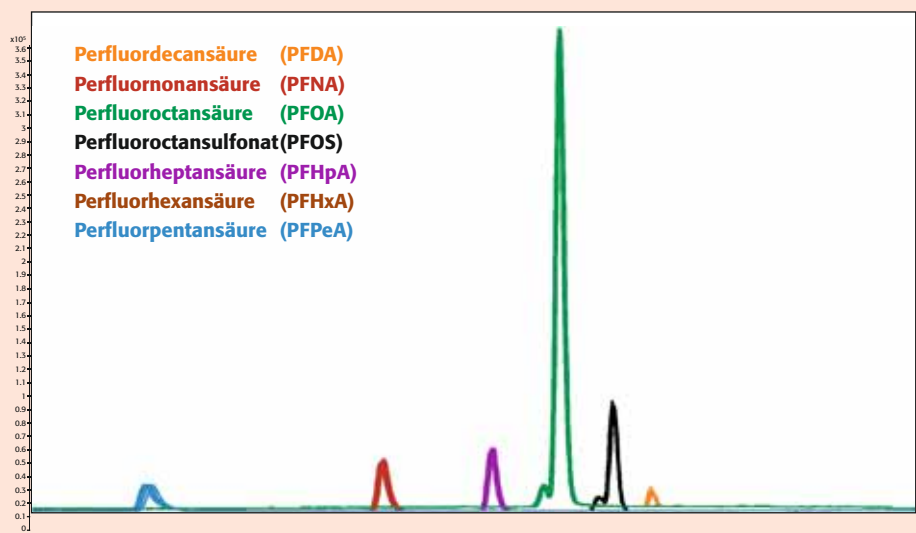
Da die Büchse der Pandora nun einmal geöffnet ist, sind wir gefordert, das Beste aus der Situation zu machen. Vorneweg: Es besteht kein Grund zur Hysterie, schließlich gibt es Mittel und Wege, Gesundheitsrisiken zu minimieren, insbesondere durch Einhaltung empfohlener Grenzwerte. Die Trinkwasserkommission etwa führt als Richtgröße 1 µg/L ins Feld. Die Einhaltung dieses Wertes zu überwachen, erfordert jedoch eine leistungsstarke Analysetechnik. Sie sollte es ermöglichen, Rückstandsbelastungen auch in geringer

PFOA und PFOS betrachtet; andere PFTs sind weniger gut untersucht. Wie die Mitglieder des berühmten „Dreckigen Dutzends“, also die persistenten organischen Schadstoffe (POPs), sind PFTs ubiquitär. Über Industrieabfälle und -abwässer gelangen sie in die Umwelt und breiten sich rund um den Globus aus. Man findet sie überall auf der Welt: in Oberflächen-, Fließ- und Grundwässern; sie reichern sich in der Nahrungskette an und lassen sich sowohl in der Leber frei-

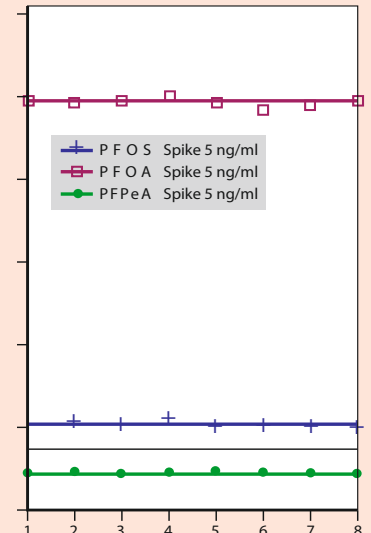
Konzentration in unterschiedlichen, zum Teil komplexen problematischen Umweltproben wie matrixlastigen Abwässern oder Klärschlamm sicher, sensitiv und reproduzierbar und vor allem auch einfach und schnell zu bestimmen.

Entwicklung einer automatisierten SPE-HPLC-MS/MS-Methode

Ausgehend von der gültigen ISO-Norm (ISO/DIS 25101), die sich auf die Bestimmung von PFOS und PFOA konzentriert, haben wir versucht, die gängige HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von PFTs aus Wasser und Klärschlamm nach vorheriger Festphasenex-



Eine Abwasserprobe wurde mit 0.5 ng/mL aufgestockt und achtmal unabhängig voneinander aufgearbeitet. Hier zu sehen sind die MRM-Spuren im Overlaid-Modus. Zu erkennen ist eine exzellente Reproduzierbarkeit für alle Substanzen: PFPeA (blau), PFHxA (braun), PFHpA (violett), PFOA (grün), PFNA (rot), PFOS (schwarz), PFDA (gelb).



Wiederholbarkeit der Methode PFOS, PFOA, PFPeA.



traktion (SPE) auf die Bestimmung von weiteren gebräuchlichen PFTs auszudehnen und zu optimieren. Ziel war es ferner, insbesondere die notwendige Probenvorbereitung zu vereinfachen und idealerweise zu automatisieren, um auf die aufwändigen manuellen Arbeitsschritte der SPE verzichten zu können und damit die Analysendauer und die Zahl möglicher Fehlerquellen zu minimieren, was die Analyse letztlich sicherer macht.

Der Nutzen, den man aus der Automatisierung der Probenvorbereitung zieht, liegt auf der Hand: reproduzierbare Messergebnisse, höherer Probendurchsatz, größere Flexibilität des Laborpersonals. Um den individuellen Erfordernissen gerecht zu werden, haben wir bei der Methodenentwicklung darauf Wert gelegt, die automatisierte SPE wahlweise offline oder online zur LC-MS/MS-Analyse durchführen zu können, was uns auch gelang. Noch eine kurze Randbemerkung: Da wir uns vornehmlich damit beschäftigt haben, die maßgebliche Norm (ISO/DIS 25101) zu optimieren, werden wir im weiteren Verlauf dieser Arbeit darauf verzichten, Grundlagen, die der Normschrift zu entnehmen sind, zu referieren. Stattdessen fokussieren wir unsere Aufmerksamkeit auf die Automatisierung der üblicherweise zeit- und arbeits-

intensiven SPE und die Konsequenzen, die sich aus diesem Schritt ableiten.

Material und Methode

Zur Untersuchung kamen reale Fluss- und Abwasserproben, die mit verschiedenen PFTs unterschiedlicher Konzentration aufgestockt waren. Die Methodenentwicklung sowie die nachfolgende Analyse erfolgte auf einer LC-MS/MS-Gerätekombination von Agilent Technologies (1200 LC mit 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS) in Verbindung mit dem GERSTEL-MultiPurposeSampler (MPS) beziehungsweise der GERSTEL-PrepStation, die beide für die automatisierte SPE ausgestattet waren. Mittels automatisierter SPE-HPLC-MS/MS wurden folgende PFTs bestimmt: **Perfluordekansäure (PFDA)**, **Perfluornonansäure (PFNA)**, **Perfluoroctansäure (PFOA)**, **Perfluoroctansulfonat (PFOS)**, **Perfluorheptansäure (PFHpA)**, **Perfluorhexansäure (PFHxA)** sowie die **Perfluorpentansäure (PFPeA)**. Zur Quantifizierung wurde Perfluorbutansäure (PFBA) als interner Standard eingesetzt, da diese Verbindung nicht als Kontaminant in der Probe vorlag.

HPLC-Parameter

| | | | |
|--------------------|---|-------|------|
| HPLC-Anlage: | Agilent 1200 SL | | |
| HPLC-Säule: | Maisch Reprisil C ₁₈ HD, 50 x 2,1 mm, 3 µm | | |
| Fluss: | 0,3 mL/min | | |
| Eluenten: | Ammoniumacetat-Puffer/Methanol (MeOH) | | |
| Eluentengradient: | | | |
| | 0 min | 20 % | MeOH |
| | 10 min | 100 % | MeOH |
| | 14 min | 100 % | MeOH |
| | 15 min | 20 % | MeOH |
| Analysendauer: | 25 min | | |
| Injektionsvolumen: | 2 µL | | |

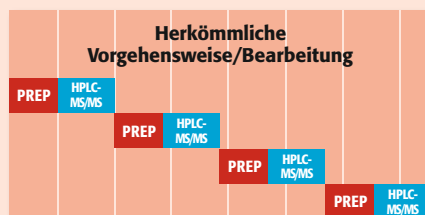
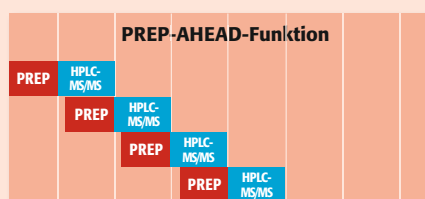
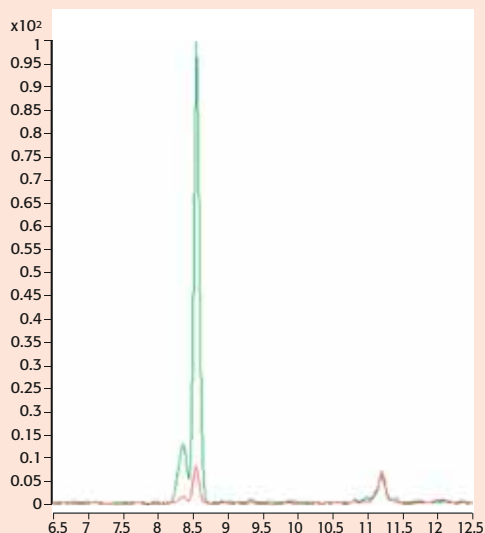
MS-Parameter

| | | | |
|-----------------------------|------------------------------------|--|--|
| MSD: | Agilent Triple Quadrupole 6410 | | |
| Ionisationsmodus: | ESI neg. | | |
| N ₂ -Temperatur: | 350 °C | | |
| N ₂ -Fluss: | 10 L/min | | |
| MS-Modus: | MRM (multiple reaction monitoring) | | |

Massenübergänge:

| | | |
|-------|------------|-----|
| PFDA | 513 -> 469 | m/z |
| PFNA | 463 -> 419 | m/z |
| PFOA | 413 -> 369 | m/z |
| PFOS | 499 -> 99 | m/z |
| PFHpA | 363 -> 319 | m/z |
| PFHxA | 313 -> 269 | m/z |
| PFPeA | 263 -> 219 | m/z |

Einzelstandard PFOS 0,1 ng/mL (grün) und 0,01 ng/mL (rot) in H₂O, Injektionsvolumen hier: 60 µL.



Die PrepAhead-Funktion der GERSTEL-MAESTRO-Steuersoftware ermöglicht es, Probenvorbereitung und LC-MS/MS-Analyse zeitlich zu verschachteln, was hinsichtlich der bisher üblichen Analysenzeit eine Einsparung von bis zu 50 Prozent bedeutet.

MPS-SPE-Parameter

Beim MPS beziehungsweise bei der GERSTEL-PrepStation handelt es sich jeweils um einen multifunktionalen Autosampler für die GC und HPLC, der neben der automatisierten SPE (mit Standardkartuschen) sämtliche in der LC und GC gängigen Probenvorbereitungstechniken automatisieren und dem Anwender einen Mehrwert bieten kann, etwa in Bezug auf eine flexible Methodenentwicklung oder die täglich anstehende Routineanalytik. Unter anderem lassen sich der MPS wie auch die MPS-PrepStation durch Einbindung der GERSTEL-MAESTRO-Steuersoftware in die ChemStation sowie durch Anbindung an die MassHunter-Software (beide von Agilent Technologies) steuern. Es braucht nur eine Sequenztabelle erstellt zu werden; Probenvorbereitung und Probenabgabe lassen sich im wahrsten Sinne des Wortes per Mausklick planen, einstellen und steuern. Sämtliche Schritte werden vom MPS automatisiert vorgenommen, und zwar stets so, dass die Vorbereitung der Probe abgeschlossen ist bzw. ihre Aufgabe ins System (online-Vorgehensweise mit MPS-PrepStation) exakt in dem Moment erfolgen kann, wenn der vorherige LC-Lauf abgeschlossen ist.

Die folgende Tabelle zeigt die einzelnen Schritte der SPE (verwendet wurden handelsübliche Kartuschen

der Marke Oasis WAX 150 mg 6 mL), wie sie vom MPS beziehungsweise der MPS-PrepStation automatisch vorgenommen werden:



Schema der SPE-Schritte, wie sie vom MPS automatisiert durchgeführt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte LC-MS/MS-Methode mit automatisierter SPE zum Nachweis der C₅- bis C₁₀-perfluorierten Tenside erbrachte sehr gute und überzeugende Resultate, und zwar in jeder Hinsicht: Kalibrierung, Sensitivität, Wiederfindung und Reproduzierbarkeit sowie im Hinblick

auf Effizienz, Sicherheit und Zuverlässigkeit. Da die automatisierte SPE mit dem MPS beziehungsweise der MPS-PrepStation mit handelsüblichen Kartuschen arbeitet, lassen sich bestehende Methoden leicht übertragen, so auch im Fall der PFTs. Für jede einzelne Probe wird eine neue Kartusche eingesetzt, womit Verschleppungen ausgeschlossen sind. Dank der Verschachtelung von SPE (Probenvorbereitungsdauer: 25 min.) und Probenabgabe lässt sich die Analysensequenz in der Hälfte der bisher üblichen Zeit durchführen. Die Kalibrierung mit dotierten Lösungen (5 - 500 ng/mL) erbrachte eine sehr gute Linearität über den gesamten betrachteten Bereich. Die Reproduzierbarkeit lässt sich als ausgezeichnet klassifizieren. Die Standardabweichung bei Überprüfung der Wiederholbarkeit lag substanzabhängig zwischen 1 und 3 Prozent. Die Bestimmungsgrenze lag bei einem Anreicherungsfaktor von 2,5:1 bei 0,5 ng/mL; eine Anreicherung um den Faktor 100 ist denkbar und möglich, was zu einer weiteren Reduzierung der Bestimmungsgrenze führt.

Fazit und Ausblick

Die von uns entwickelte automatisierte SPE-LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von PFTs hat sich in jeder Hinsicht bewährt. Dank der automatisierten Vorgehensweise bei der SPE erfolgt die Reduktion von Matrixeffekten auf überaus effektive und anwenderfreundliche Weise mit dem Effekt einer erstklassigen Reproduzierbarkeit. Die Vergleichbarkeit mit der ISO-Methode ist voll gegeben, die hier beschriebene SPE-LC-MS/MS-Methode überzeugt hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Sensitivität. Wie vermutet, entfaltet sie die volle Wirksamkeit insbesondere bei schwierigen Proben wie Abwässern. Die von uns durchgeführte Untersuchung sowie deren Resultate lassen den Schluss zu, dass sich die hier beschriebene automatisierte SPE-LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von PFTs auch aus anderen komplexen Matrices wie Urin und Blut anwenden lässt.



Hochleistung auf zwei Schienen: Meike Baden positioniert Vials auf den Proben-trays der Dual-rail-Variante des MultiPurpose-Samplers (MPS).

Autoren

Dr. Norbert Helle, Meike Baden,
TeLA GmbH Bremerhaven,
Fischkai 1, 27572 Bremerhaven,
Tel. ++49-471-4832423,
Fax. ++49-471-4832438,
www.tela-bremerhaven.de