



Forord

Denne masteroppgaven er på 30 studiepoeng og er utført på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) på Ås. Oppgaven er en del av forskningsrådet, finansiert prosjekt i samarbeid mellom NMBU, norsk institutt for luftforskning (NILU) og Kina: Polyfluorinated compounds (Are point sources contaminating the environment-consequences for human exposure in China and Norway).

Først og fremst vil jeg takke min mor Shoket Palani og min far Ahsan Nazari for den støtten de har gitt meg gjennom studiet. Jeg vil deretter takke min veileder professor Roland Kallenborn for en god og lærerikt veiledning ikke minst for hans støtte og gode humor. En takk til de som har vært med og diskutert ulike problemstillinger som har oppstått under prosjektet Dag Ekeberg, Laura Røhler og Anders Philip Grefstad.

Jeg vil benytte muligheten til å takke universitetet på Ås og sist men ikke minst studieveileder Janne Beate Utåker.

Oslo, 05.2014

Behman Nazari

Sammendrag

Perfluorerte alkylstoffer (PFAS) er en fellesbetegnelse for en rekke fluoreerte organiske stoffer som har blitt mye brukt de siste 50 årene. PFAS kan ha skadelig effekt på dyr og mennesker dersom konsentrasjonen blir for høy. Målet med oppgaven har vært å utvikle en kvantitativ metode for analyse av 18 utvalgte PFAS (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PENA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFOcDA, PFBS, PFHxS, PFOSA, PFOS og PFDS) i vannprøver.

I dette studiet ble det utviklet en metode med HPLC-ESI-QqQ-MS/MS i multiple reaction monitoring (MRM). Optimaliseringen ble utført ved å bruke 75 pg/μL av de ulike PFAS-stoffene. Analyttene ble separert på C₁₈-kolonne, 300 ACE 3- (75x2,1 mm i.d 3μm).

Tuning og kalibrering av massespektrometeret ble utført med polypropylene glycol (PPG) løsning for Q1 og Q3 både for positive og negative ioner. Syv standarder fra 1 – 200 pg/μL ble brukt for å lage kalibreringskurver og til å finne metodens linearitet. Kalibreringskurvene til alle PFAS stoffene gav linearitet på $R^2 > 0,95$ som er den nedre grense for en godkjent linearkalibreringskurve. Deteksjonsgrense (LOD) er brukt som nedre grense til det lineære området, den høyeste standarden ble brukt som øvre grense for linearitet. Relativt responsfaktor (RRF_i) ble beregnet for alle standardene i det lineære området av de ulike stoffene. Relativt responsfaktor for hver spesifikk forbindelse hadde variasjon på +/- 10 % fra middelerdi for alle PFAS stoffene med unntak for PFOA. Standard 1 og 7 for PFOA hadde et avvik på henholdsvis + 13 % og + 12 %. Muligens årsak kan være kontaminering av PFOA i kolonnen.

For de fleste PFASs LOD og kvantifiseringsgrense (LOQ) var henholdsvis på ca. 0.2-1 pg/μL og 0.5-2 pg/μL, med unntak for PFOcDA og PFOA. For PFOcDA ble LOD og LOQ henholdsvis 5 pg/μL og 10 pg/μL, LOD og LOQ for PFOA kunne ikke bestemmes grunnet at injektorsystemet ble kontaminert.

Tre kontrollprøver med kjent konsentrasjoner (5, 25 og 50 pg/μL) ble brukt for å validere nøyaktigheten til metoden. Nøyaktigheten til dette forsøket ble funnet til å være veldig nært den sanne verdig til alle PFAS stoffene. Gjenvinningsprosenten ble 93 – 109 % for de tre kontrollprøvene for de utvalgte PFAS stoffene. Størst avvik var i kontrollprøven med en konsentrasjon på 5 pg/μL, og avviket var størst for PFOA og PFOcDA.

Symboler og forkortelser

API	Atmosfærisk trykk ionisasjon (atmospheric pressure ionization)
C	Konsentrasjon
CAD	Collision Gas
CE	Collision Energy
CI	Kjemisk ionisering
CID	Collisional-induced dissociation
CUR	Curtain Gas
CXP	Collision Cell Exit Potential
Da	Dalton
DC	Likestrøm
DP	Declustering Potential
E	Elektrisk
EI	Elektronionisering
EP	Entrance Potential
ESI	Elektrosprayionisasjon (electrospray ionisation)
F	Mobilfasehastighet
FP	Focusing Potential
g	Gram
pg	picogram
GS1	Ion Source Gas 1
GS2	Ion Source Gas 2
HPLC	High performance liquid chromatography
IS	IonSpray Voltage
I.S.	Intern standard
kV	Kilovolt
L	Liter
LC	Væskeskromatografi (liquid chromatography)
LOD	Deteksjonsgrense
LOQ	Kvantifiseringsgrense
M	Molar (mol/liter)
m	Masse
mm	Millimeter
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
mg	Milligram
min	Minutter
mL/min	Milliliter per minutt
MP	Mobilfase
MRM	Multiple Reaction Monitoring
ms	Millisekund

MS	Masse spektrometeri (mass spectrometry)
MS/MS	Tandem masse spektrometri
MW	Molekyl vekt
m/z	Masse/ladning
PCB	Polyklorerte bifenyler
PFAS	Perfluorerte alkylstoffer
PFBA	Perfluorobutanoic acid
PFDA	Perfluorodecanoic acid
PFDS	Perfluorodecane sulfonate
PFPeA	Perfluoropentanoate
PFHxA	Perfluorohexanoic acid
PFHpA	Perfluoroheptanoic acid
PFOA	Perfluorooctanoic acid
PENA	Perfluorononanoic acid
PFUnDA	Perfluoroundecanoic acid
PFDoDA	Perfluorododecanoic acid
PFTTrDA	Perfluorotridecanoic acid
PFTeDA	Perfluorotetradecanoic acid
PFHxDA	Perfluorohexadecanoic acid
PFOcDA	Perfluorooctadecanoic acid
PFBS	Perfluorobutane sulfonate
PFHxS	Perfluorohexane sulfonate
PFOSA	Perfluorooctanesulfonamid
PFOS	Perfluorooctane sulfonate
PFMe ₂ OA	Perfluoro-3,7-dimethyl-octanoic acid
PPG	Polypropylene glycol
POP	Persistent Organic Pollutants (organisk miljøgifter)
RP-HPLC	Omvendt fase væske kromatografi (reversed phase high performance liquid chromatography)
R	Splittforhold
R _s	Oppløsningsevnen
RecSTD	Gjenvinningstandard
R ²	Korrelasjonskoeffisienten
RF	Radiofrekvens
RT	Retensjonstid
RRF _i	Relative response factor
SIM	Selected ion monitoring
SP	Stasjonær fase
SPE	Fast fase ekstraksjon (solid phase extraction)
S	Signal
S/N	Signal-to-noise ratio
Si-OH	Silanolgruppe
TIC	Total ionekromatogram (total ion chromatogram)

U	Spenning
V	Volt
z	Ladning
Å	Ångstrøm
μ	Mikro
μm	Mikrometer

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse

1 Innledning.....	1
1.1 Innledning/bakgrunn.....	1
1.2 Formål.....	2
2 Teori	3
2.1 Perfluoralkylstoffer (PFAS)	3
2.1.1 Beskrivelse	3
2.1.2 Kjemiske og fysikalske egenskaper	3
2.1.3 Miljø.....	4
2.1.4 Kartlegging av PFAS bruk i Norge.....	5
2.2 Høyoppløselig Væskekromatografi (HPLC)	5
2.2.1 Normal fase kromatografi	6
2.2.2 Omvendt fase kromatografi	6
2.2.3 Løsningsmidler	7
2.3.4 Pumper	7
2.3.5 Kolonner	7
2.4 Koblinger med Massespektrometer (MS/MS).....	8
2.4.1 Generelt om MS/MS	8
2.4.2 Ionisering	8
2.4.2.1 Elektronsprayionisering (ESI)	9
2.4.3 Analysator	9
2.4.4 API 2000	10
2.5 Prøveopparbeidelse.....	11
2.5.1 Fastfase ekstraksjon	11
2.5.2 Sorbenter	12
2.5.3 Omvendt fase ekstraksjon	12

Innholdsfortegnelse

2.6 Kvantitativ og kvalitativ analyse	12
2.6.1 Topphøyde og toppareal	12
2.6.2 Kalibrering	13
2.6.3 Oppløsningsevne	14
2.6.4 Deteksjonsgrense (LOD) og Kvantifiseringsgrense (LOQ).....	15
3 Materialer og metode	16
3.1 Materialer og utstyr	16
3.2 Metode	18
3.2.1 Til lagning av standard.....	18
3.2.2 Instrument og komponent spesifikk kalibrering	18
3.2.3 Metode for HPLC	18
3.2.4 Komponent spesifikk optimalisering av MS/MS	20
3.2.5 Analyse av Standard	20
4 Resultat og diskusjon	21
4.1 Identifisering av PFAS	21
4.2 Kalibreringskurve.	26
4.3 Analytisk sensitivitet (LOD og LOQ)	27
4.4 Linearitet.....	28
4.5 Relativt responsfaktor (RRF _i).....	30
4.6 Sterke og svake sider av metoden.....	30
5 Kvalitetssikring	31
6 Konklusjon	32
Referanseliste	33
Appendiks.....	35

1 Innledning

1.1 Innledning/bakgrunn

Perfluorerte alkylstoffer (PFAS) er et samlet navn for organiske-fluor forbindelser som er menneskelig skapt forurensninger spredt i miljøet [1]. I mer enn 50 år har den industrielle produksjonen av PFAS pågått. Jordbruksområder, drikkevann reservoarer og fiskeriområder er utsatt for PFAS både i Norge og verden. Utslipp av PFAS fra direkte og indirekte kilder er anslått å være ca. 3200-7300 t [1]. Det er stor forskjell mellom bruk og produksjon av PFAS i verden. Norge produserer ikke PFAS, men bruker produkter som inneholder PFAS blant annet i produkter som brannslukning skum, tepper, tekstiler og andre produkter [2].

PFAS finnes i vann, jord, dyr og mennesker, og er et veldig stabilt stoff, hovedsakelig grunnet de sterke bindingene mellom karbon og fluor. Fluor har en veldig sterk elektronegativitet og av den grunn har god evne til å inngå i kjemiske forbindelser. Dette fører til en lang halveringstid, og overproduksjon vil derfor raskt føre til oppsamling i næringskjeden når det bioakkumuleres [1, 3, 4]. Ikke alle PFAS har stort bioakkumuleringspotensiale, PFOS er blant dem som har høyest. De blir lett tatt opp av vannlevende organismer når de først er i vannet, og konsentrasjonen øker med trofisk nivå. Ionisk PFAS er ikke fettløselige, og vil derfor ikke akkumuleres i fettvevet som polyklorerte bifenylene (PCB), men binder seg til blodproteiner. Derfor er det normalt å finne høyest konsentrasjon av PFAS i organer og vev som har blodtilførsel (lever, nyre, milt).[5]

Tidligere studier har vist at en del perfluorerte alkylstoffer, som perfluoroktansulfonat (PFOS), langkjedet perfluorerte karboksylsyrer (PFCA) herunder perfluoroktansyre (PFOA), kan ha en skadeeffekt på organismer og miljø ved for høye konsentrasjoner av forbindelsene. Nye utviklede analysemetoder bekrefter at enkelte perfluorerte forbindelser spres til luft og vann og kan akkumuleres i både i dyr og menneske [6].

PFAS har vært vanskelig å kartlegge på grunn av deres lave konsentrasjon i vanlig prøver. Derfor fokuserer denne oppgaven rundt utfordringer med å utvikle og validere en kvantitativ analyse for PFAS bestemmelse med tilstrekkelig lav følsomhet. Væskekromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS) er i dag den mest brukte bestemmelsesteknikken for denne type sporstoffer. LC-MS har lav terskel for deteksjon, helt ned til pikogram mengde (pg/g nivå) og samtidig har en høy selektivitet som er nødvendig til bruk for miljøanalyse.

Den første rapporten om PFAS i vandig prøver ble publisert for grunnvann var tatt på to steder i USA som var påvirket av brannslukkings- aktiviteter. Konsentrasjonen ($\Sigma\text{PFHxA}+\text{PFHpA}+\text{PFOA}$) av disse 2 stedene ble funnet til å være mellom 125 $\mu\text{g/L}$ opp til over 7 mg/L, selv etter 7-10 år med inaktivitet [7].

1.1 Formål

I det siste har det blitt funnet betydelig miljøproblemer blant annet lekkasje fra brannskog og flyplasser som inneholder perfluoreerte alkylstoffer (PFASs). Derfor er det viktig å analysere vannprøver som har blitt forurensede av disse lekkasjene. Hensikten med oppgaven var å lage en kvantitativ metode for analyse av utvalgte komponenter av PFAS (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PENA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFOcDA, PFBS, PFHxS, PFOSA, PFOS og PFDS) i vannprøver. Metoden er basert på fastfase ekstraksjon (SPE) og LC-MS/MS.

2 Teori

2.1 Perfluoralkylstoffer (PFAS)

2.1.1 Beskrivelse

PFAS kan produseres via to ulike synteseveier, som gir to ulike typer av forbindelser [7]

- Perfluorineringsprosesser
- Telomeriseringsprosesser

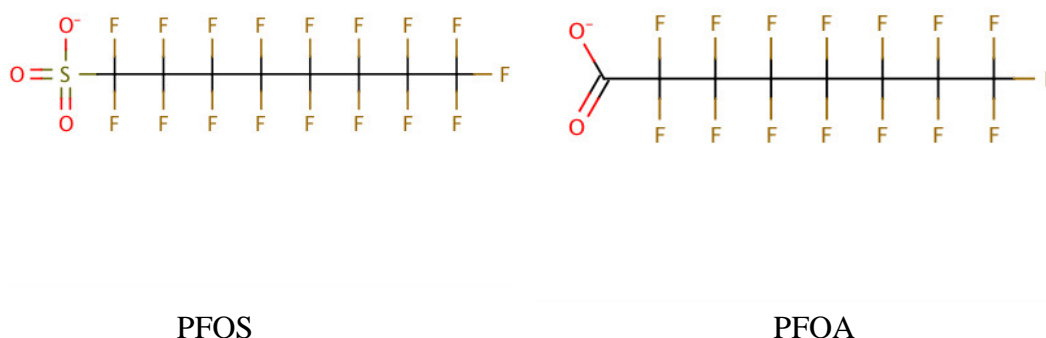
Den viktigste perfluorineringsprosessen er Simons ElectroChemical Fluorination (ECF-prosessen). Perfluoroktylsulfonylfluorid (POFS) dannes i denne prosessen, den er basis for den videre produksjonen av PFOS relaterte - forbindelser. Denne prosessen vil ikke gi en ren kjemisk forbindelse, men den vil gi en blanding av isomerer og homologier med ulike kjedelengder og strukturer. Stoffer som kalles perfluoroktylsulfonat (PFOS) relaterte stoffer er blant annet produsert etter ECF-metoden.

Ikke fullfluorinerte stoffer produseres ved hjelp av telomeriseringsprosesser (benevnes også som telomerer), men som har lineære perfluoralkylkjeder med et etylen sluttgruppe i alkylkjeden, fulgt av en funksjonell gruppe. Detaljerte opplysninger om struktur og bruksområder kan finnes i tidligere publiserte rapporter [7, 8].

2.1.2 Kjemiske og fysikalske egenskaper

Per- og polyfluoroalkyl forbindelser (PFAS) består av en perfluoralkyl kjede med en hydrofil endegruppe. Karbonkjeden kan variere med en lengde fra 4-18 karboner [9]. Hos Perfluorforbindelser er alle hydrogenatomer erstatt med fluor atomer. Den generelle strukturformel er $F(CF_2)_nR$, hvor R er en alkylgruppe, og n er antall $(-CF_2-)$ i kjeden. Det finnes ulike klasser av perfluoralkyl forbindelser (PFASs). De mest kjente gruppene av PFASs er perfluoralkylsulfonsyrer eller perfluoralkylsulfonat (PFASs) og perfluorkarboksylsyrer eller perfluorkarboksylater (PFCAs) [10, 11].

PFAS er brukt innfor en rekke bruksområder fordi den har en del felles karakteristiske egenskaper, bl.a. høy kjemisk og termisk stabilitet, høy elektrisk isolasjonsevne, lav overflateenergi, lav lysbrytningsindeks og god bestandighet mot korrosjon og ytre påvirkning [2]. PFOS og PFOA er blant de viktigste PFAS forbindelser, se Figur 2.1 for kjemisk struktur for PFOS og PFOA.



Figur 2.1. Kjemisk struktur av PFOS og PFOA [12]

Primært er de gode overflateegenskapene til stoffene som er årsaken til bruk i mange applikasjoner. Noen av de viktigste egenskapene er nevnt under [2]:

- Minskning av væskens overflatespenning (særlig vann)
- Bedring av produktets hefteevne til underlaget
- Vann-, smuss- og oljeavstøtende egenskaper

2.1.3 Miljø

Det er lite kunnskap om helse- og miljøeffekter knyttet til PFAS generelt, men informasjonen som foreligger gir grunn til bekymring. PFOS og Perfluoroktansyre (PFOA) er av de forbindelsene innen PFASs som er best undersøkt [8].

PFOS og **PFOA** brytes svært langsomt ned i miljøet. Grunnen til dette er de kjemiske strukturene gjør dem svært meget stabilt. Stoffet vil delvis adsorberes til jord og sedimenter ved utslipp. Dermed kan det forventes at PFOS vil gjenfinnes i sedimenter, vann og organisk materiale i miljøet. I marine pattedyr, bl.a. i isbjørn på Svalbard er stoffet blitt påvist. PFOS har derfor et meget stort potensiale for langsiktige skadeeffekter på helse og miljø. PFASs regnes av den grunn som Persistent Organic Pollutants (POP) (organisk miljøgifter) [2, 8]. Arbeidere som har arbeidet med framstilling av PFOS-relaterte forbindelser har påvist stoffet i blodet. Det har vært påvist overhyppighet av blærekreft hos eksponerte arbeidere. Leverskader og skader på skjoldbruskkjertelen samt reproduksjonsskader hos pattedyr er også påvist.

PFOA har lavt potensial for bioakkumulering. Stoffet brytes ikke ned biologisk, fordampes ikke fra vann, og i liten grad vil det adsorberes til sedimenter og jord.

Det har blitt påvist konsentrasjon i menneske blod av ulike PFAS forbindelser, se Tabell 2.1 for oversikt (Appendiks). [2, 8].

2.1.4 Kartlegging av PFAS bruk i Norge

Som nevnt tidligere er PFAS ikke produsert i Norge, men importert enten i form av løsninger, kjemisk-teknisk produkter eller som bestanddel av faste bearbejdede produkter (for eksempel impregnerte tekstiler).

PFAS mengde i Norge er fordelt i hovedsak på følgende produkttyper [2]:

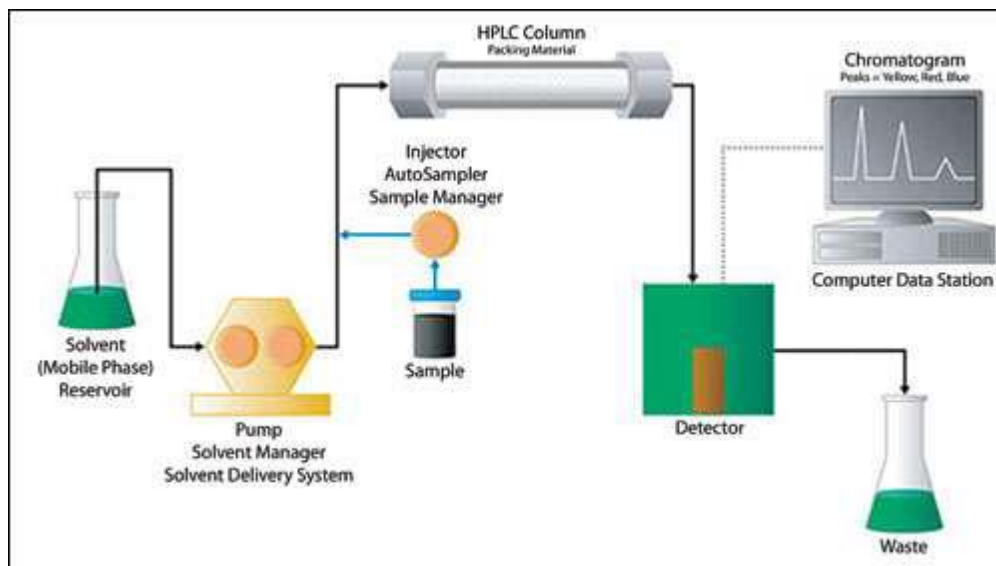
- Brannslukkingsmidler
- Maling og lakk
- Gulvvoks og polish
- Tekstilimpregneringsmidler

Langt flere PFAS har tidligere blitt registrert, bl.a. inngått i et stort antall avfettingsmidler og rengjøringsmidler.

På verdensbasis er det 8 store PFAS- produsenter i Europa og USA, samt 5 i Japan. Det finnes flere land som produserer PFAS-holdige produkter med utgangspunkt i PFAS fra andre. Se rapporten statens forurensningstilsyn (SFT) [2] for mer oversiktlig kartlegging av PFAS i Norge.

2.2 Høyoppløselig Væskerkromatografi (HPLC)

Høyoppløselig væskerkromatografi (HPLC) er en teknikk som blir brukt i analytisk kjemi til separasjon av kjemiske komponenter i en kompleks løsning. Separasjonen av stoffene vil skje i en analytisk kolonne, fordi den stasjonærfasen og mobilfasen har forskjellig affinitet. Ved å regulere mobilfasehastighet, mobilfasegradient, mobilfasesammensetning, temperatur eller trykket kan separasjonen i kolonnen optimaliseres. Spredning av de ulike stoffene i kolonnen oppstår på grunn av ulike båndspredningsprosesser. De viktigste båndspredningsprosessene er longitudinal diffusjon, eddy diffusjon, og massetransport i mobilfase, stillestående mobilfase, og stasjonærfase [13]. Et enkelt HPLC instrument er illustrert i Figur 2.2.



Figur 2.2. Skisse av de viktigste delene i en HPLC [14]

2.2.1 Normal fase kromatografi

Normalfase kromatografi er en teknikk som benyttes for separasjon av stoffer med polare funksjonelle grupper. Den har en stasjonærfase med høyere polaritet enn mobilfase. Stasjonærfasen som normalt blir brukt, er silika-gel med silanolgrupper. Dipol-dipol bindinger og hydrogenbindinger mellom de funksjonelle gruppene i analytten og silanolgruppene (Si-OH) på overflaten til silikapartiklene er årsaken til interaksjon av stasjonærfase analytten [15].

2.2.2 Omvendt fase kromatografi

Omvendt fase kromatografi (reversed phase chromatography (RP)) er viktig separasjonsprinsipp innen høyoppløselig væskechromatografi. Hvor den mobilfasen er polar og den stasjonærefasen er upolar. Mobilfasen består av en blanding av en buffer og et organisk løsningsmiddel, typisk metanol (MeOH) eller acetonitril (MeCN) (i dette forsøket er det blitt benyttet metanol). Buffer er nødvendig for å holde kontroll på pH under separasjon og dermed for å få optimal separasjon. Til stasjonærefasen blir det normalt benyttet silika med ulike alkyl-substituerte (f.eks. C₁₈, C₈, C₄) eller liknende material [15, 16]. I dette forsøket ble det benyttet en C₁₈-kolonne, 300 ACE 3- (75x2,1 mm i.d 3µm).

2.2.3 Løsningsmidler

Mobilfasen er polar, og som løsningsmidler er metanol eller acetonitril brukt. Disse kan blandes med vann, en vandig buffer eller med hverandre.

Mobilfasen bør ha en temperatur som er i likevekt med systemet, og derfor skal ikke løsningsmidlet blandes før bruk [17].

Noe viktige egenskaper (se under) som løsningsmidlene ideelt skal som elueringsmidler [17].

- Transparente (med hensyn til detektoren som benyttes)
- Rene
- Lav viskositet
- Lav toksisitet
- Lite brennbare
- Ikke-reaktive (med prøven eller med kromatografiske system)
- Løsningsmidlene filtreres før bruk

2.3.4 Pumper

Mobilfasen leveres av pumper som opererer enten ved konstant strømningshastighet eller/ og ved konstanttrykk. I dag er konstanttrykk nesten utelukket, pga. at man ikke har kontroll med den reelle mobilfasehastigheten [18].

2.3.5 Kolonner

Separasjonen skjer i en analytisk kolonne under høyt trykk (60-300 bar) ved bruk av pumpe. De mest brukte kolonnene har en indre diameter fra 2-5 mm. Normalt består pakkematerialene av porøse partikler, i dette forsøket er det brukt en C₁₈ kolonne som består av en upolar alkankjede. Når vi operer med en upolar stasjonærfase (C₁₈) så er mobilfasen av en polar forbindelse/r vandig løsningsmiddel med innblanding av vannløselige løsemidler f.eks. metanol (som er blitt benyttet i dette forsøket) [19]. Det er mange forskjellige kolonner man kan bruke. I dette forsøket blir det brukt en ACE C₁₈. Det er designet for å takle de mest utfordrende kromatografiske bruksområder, noe som gir utmerket ytelse med syrer, baser og nøytrale molekyler.

2.4 Koblinger med Massespektrometer (MS/MS)

2.4.1 Generelt om MS/MS

Massespektrometer (MS) er en masse selektiv detektor hvor signalet (S) er avhengig av konsentrasjonen (C), mobilfasehastigheten (F) og et eventuelt splittforhold (R) i det kromatografiske systemet (se likning 2.2) [20].

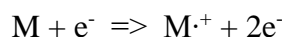
$$S = C \cdot F \cdot R \quad (2.2)$$

Når MS/MS blir benyttet som detektor kan masse spesifikk informasjon (karakteristisk fragmentering eller intensitet av enkelt ioner) gi strukturinformasjon. Dette kan benyttes for kvantitative og/eller kvalitative analyser. Normalt består MS av tre hovedkomponenter; ionekilde masseanalysator og detektor [20].

I ionekilden blir molekylet ionisert og de ioniserte molekylene vil bli fragmentert (i karakteristisk underenheter (ladde fragmenter)). Fragmentering oppstår er avhengig av molekylets struktur og hvor mye energi som tilføres ved ioniseringen. Seperasjon i en analysator skjer etter ionenes masse/ladning (m/z) og de blir detektert av en detektor. Det er viktig at disse prosessene operer under svært lav trykk/høy vakuum for at ionene skal komme fram til detektoren (vanligvis er en elektronmultiplikator som blir benyttet som detektor, som også er blitt brukt i dette forsøket) [20, 21].

2.4.2 Ionisering

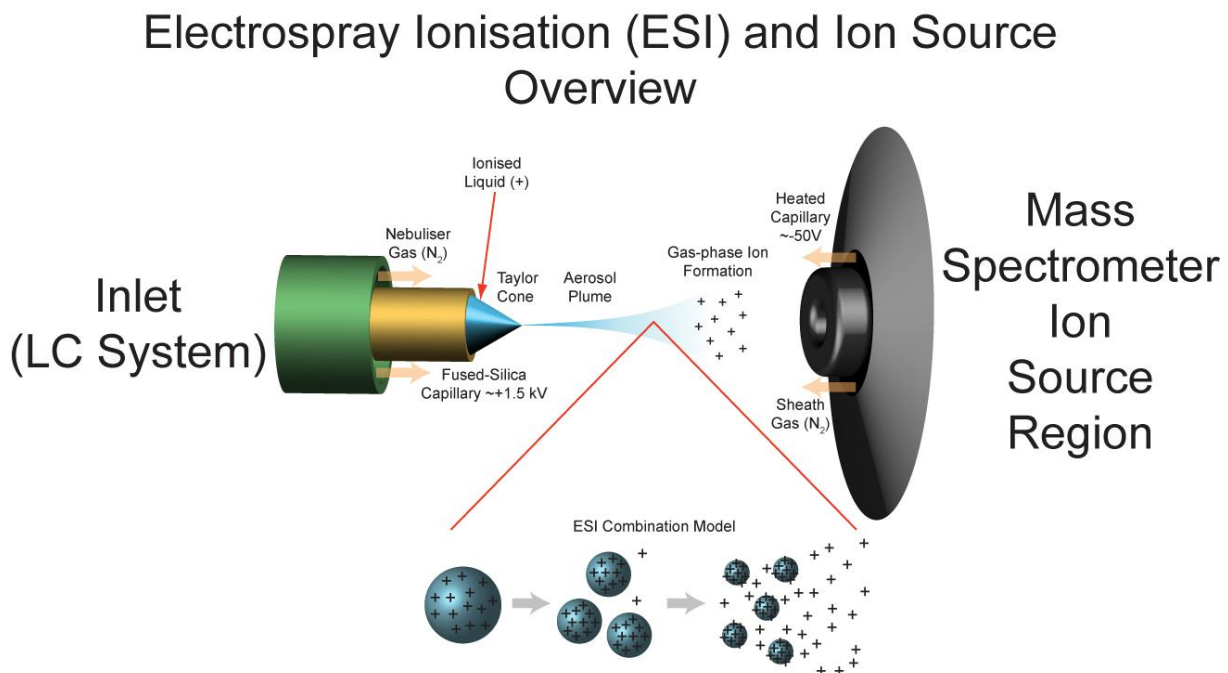
Ionekilden er den delen av massespektrometret hvor molekylet blir ionisert. Elektron ionisasjon (EI), kjemisk ionisasjon (CI) og elektroprayionisasjon (ESI) er av de mest vanlige ioniseringsteknikker. Den vanligste måten for ionisering er å la analytter kolliderer med elektroner med høy energi (elektron ionisering). Hvor et elektron blir slått ut av molekylet (M), og det blir det dannet et radikalion ($M^{\cdot+}$) og samtidig får en avgitt to elektroner (e^-) med lav energi [22]:



Radikalionet som dannes i denne ionisasjonsprosessen er betegnet som molekylionet. Normalt vil molekylet i ioniseringsprosessen bli tilført mye mer energi enn det som trengs for å oppnå en ionisering. Derfor vil molekylionet være ustabil, og det vil det brytes ned til mindre ioner, radikaler og nøytrale molekyler. Ionene som blir dannet ved nedbryting vil bli registret, og dette fragmenteringsmønsteret vil gi opphav til et massespekter som er unikt for enhver analysert forbindelse Positive og negative molekylioner og fragmenter kan dannes ved ionisering i ionekilden ved bruk av ulike ioniseringsteknikker i massespektrometri [16].

2.4.2.1 Elektronsprayionisering (ESI)

Elektronsprayionisering er en myk ioniseringsteknikk som vanligvis brukes i sammenheng med høyoppløselig væskkromatografi separasjon for å bestemme molekylvektene av proteiner, peptider og andre biologiske makromolekyler. Ved ESI vil en væske med relativt høy ledningsevne bevege seg gjennom et kapillærrør, og deretter vil væsken bli forstøvet ved hjelp av en spenning og nitrogengass. Dette vil føre til dannelselse av aerosol av ladde analyttioner. Det er pålagt et potensial (vanligvis på ca. 3kV) mellom kapillærrøret og en elektrode. Ionene vil bli trukket inn i masseanalysatoren [22, 23]. Se Figur 2.3 for prinsippet av elektronsprayionisering.



Figur 2.3. Prinsippet bak elektronspray ionisering (ESI). Hvor væskestrømmen fra LC kolonnen forstøves til en aerosol av ladede partikler, og ioner i gassfase som blir dratt videre inn i masseanalysatoren ved hjelp av et elektrisk felt [24].

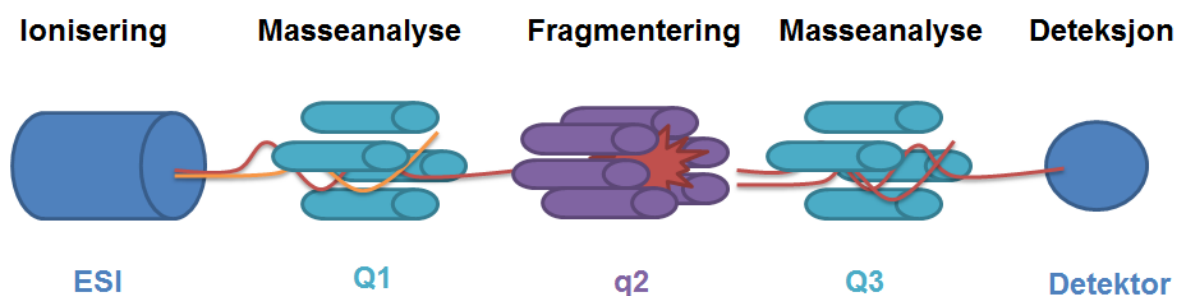
Fordeler med å bruke ESI MS som analyse metode er evnen til å håndtere prøver som har store masser. En annen fordel er at denne metoden er en av de mykeste ioniserings metoder som er tilgjengelig. I tillegg er det også en stor fordel ved ESI MS er det at den imponerende følsomheten den har, og derfor kan det være svært nyttig i nøyaktige kvantitative og kvalitative målinger. En ulempe kan være at apparatet må holdes veldig rent og har tendens til lett å bli forurenset [16, 23].

2.4.3 Analysator

Det finnes ulike masseanalysator i MS, blant de vanligste er magnetsektor-, kvadrupol-, flygetid- og ionefelleanalysatoren [20].

2.4.3.1 Kvadrupol

Kvadrupolen består av fire parallelle staver som er enten hyperbolske eller sylindriske. En fast likespenning (U) og en vekselspanning ($V = V_0 \cos \omega t$) er pålagt disse i radiofrekvensområde. Elektrisk felt mellom stavene blir dannet ved å tilføre likestrøm (DC) og radiofrekvens (RF) [38]. Det elektriske feltet fungerer som filter hvor utvalgte ioner vil slippe igjennom til detektoren basert på deres m/z -verdi [20, 25]. I dette forsøket er det blitt benyttet en trippelkvadrupol (se Figur 2.4 for illustrasjon).



Figur 2.4. I ESI dannes det ioner som separeres i Q1. Alle eller utvalgte ioner transporteres gjennom Q1 for fragmentering i q2. Fragmentene fra q2 separeres i Q3. Alle eller utvalgte fragmenter detekteres i detektoren [26]

Fra en trippelkvadrupol (som er illustrert ovenfor, se Figur 2.4) ser en at kvadrupolene er satt i serie. Hvor den første Q1 og tredje Q3 kvadrupolen er masseanalytatorer og filtrer ioner. q2 er en hexapol og fungerer som en kollisjonscelle. Ionene som passerer gjennom Q1 vil kollidere med nøytral gass og fragmenteres ved kollisjonsindusert dissosiasjon (CID). Deretter vil fragmentene bli transportert videre til Q3 og utvalgte fragmenter slippes gjennom til detektoren [25].

2.4.4 API 2000

API 2000 serien av LC MS/MS instrumenter er væskechromatografi (LC) massespektrometer (MS), som inkluderer en atomsfærisk trykk ionisasjon (API) ionekilde. Se Figur 2.5 for bilde av instrumentet.



Figur 2.5. API 2000 massespektrometer (MS) – frontsiden.

Dette instrumentet og komponentene oppfyller eller overgår kravene til internasjonal standard. For et større innblikk av dette instrumentet se rapport Site Planning Guide API 2000™ LC/MS/MS System [27].

2.5 Prøveopparbeidelse

I mange tilfeller er det nødvendig å ha en prøveopparbeidelse av komplekse prøver. Dette kan skyldes ulike grunner, noen av grunner er nevnt under [28].

- Separasjonssystemet kan bli ødelagt av komponenter i prøven.
- Komponenter i prøven kan interferer med analysen av de aktuelle stoffene.
- De aktuelle stoffene kan ha veldig lav konsentrasjon og ikke bli detektert.

For å kunne oppnå vilkårene ovenfor må det gjøres en prøveopparbeidelse. Målet med prøveopparbeidelse er å rense og oppkonsentrere aktuelle stoffer i prøven for å kunne bli separert og detektert. Det finnes mange typer metode til å rense, isolere og oppkonsentrere. De viktigste metodene er væske-væske ekstraksjon og fastfase ekstraksjon [28].

2.5.1 Fastfase ekstraksjon

Prinsippet bak fastfase ekstraksjon er et stoffs fordeling mellom en væske og overflaten til et fast materiale (en sorbent). Formålet med fastfase ekstraksjon er samme som væske-væske ekstraksjon, nemlig å rense, isolere og oppkonsentrere stoffer i væsker. En fast sorbent som skal isolere et stoff på overflaten, må overflaten ha en kjemisk egenskap som gir en interaksjon med stoffet. Som er sterkere enn interaksjonen mellom stoffet og væsken det er løst i [28].

2.5.2 Sorbenter

Silika baserte sorbenter som ble brukt i fastfase ekstraksjonen. Fastfase ekstraksjon kan utføres ved tre ulike metoder, omvendt fase ekstraksjon, normal fase ekstraksjon og ionebytting ekstraksjon (alle tre bruker sorbenter). I dette tilfellet er det omvendt fase ekstraksjon som skal bli benyttet. Det er flere gode grunner hvorfor det blir benyttet silika sorbent. En av dem er at silika er et fast material som verken krymper eller sveller i ulike løsningsmidler. Derfor ekvilibrerer silika sorbentene raskt i nye løsningsmidler, og komplekse ekstraksjonsprosedyrer med ulike løsningsmidler kan utføres raskt.

Det er ingen problem for fast fase ekstraksjon å operere med pH 1 - 14, dette skyldes den korte kontakttiden mellom sorbenten og løsningsmiddelet. Dette er derimot ikke samme tilfelle med HPLC, hvor kontakttiden mellom stasjonær og mobilfase er lang. Dermed må silika som er benyttet til stasjonærfase operere med en pH mellom 2 – 8. 60 Ångstrøm er vanlig porestørrelse på silika sorbentene [28].

2.5.3 Omvendt fase ekstraksjon

For å konsentrere og rense upolare stoffer fra polare prøveløsninger, benyttes omvendt fase ekstraksjon. Med polare prøveløsninger så menes alle slags vandige løsninger. Ved omvendt fase ekstraksjon kan de fleste organiske molekyler bli isolert. Et unntak kan være dersom molekylet inneholder så mange polare eller ioniske grupper, at karbonstrukturen i molekylet maskeres [28].

2.6 Kvantitativ og kvalitativ analyse

2.6.1 Topphøyde og toppareal

Kvantitative analyse baser seg på sammenhengen mellom mengde stoff som passerer detektoren, og detektorens respons for denne stoffmengden. Det er viktig å arbeide innenfor et lineært område av deteksjonssystemet. Grunnen til det er for å ha lineær sammenheng mellom stoffmengde og respons. Det er topphøyden eller topparealet som blir benyttet for detektorens respons fordi stoffer som passere detektoren blir registrert som topper på kromatogrammet [29].

2.6.2 Kalibrering

Ved å måle topphøyde eller toppareal kan det omgjøres til absolutt mengde eller konsentrasjon av stoff i prøven. Vanligvis benyttes det to beregningsmåter: Ekstern og intern standard kvantifisering. I dette forsøket blir det benyttet intern standard [29].

En intern standard (I.S.) er et stoff som blir tilsatt til en prøveløsning i en kjent mengde så tidlig som mulig under prøveopparbeidelsen/prøve innhenting som mulig. En I.S. må ha noen viktige egenskaper for å kunne oppnå formålet sitt [29]:

- Skal ikke være noe I.S. i prøven fra før.
- Skal ha en retensjonstid nært stoffet som skal bestemmes.
- Skal oppføre seg likt stoffet som skal bestemmes under prøveopparbeidelsen.
- Skal være kromatografisk separert fra andre stoffer i prøveekstraktet (ikke nødvendig med MS/MS detektor).
- Skal være tilgjengelig i ren og godt karakterisert form.
- Skal være stabilt under lagring og prøveopparbeidelsen.

Hvorfor benytte I.S.?

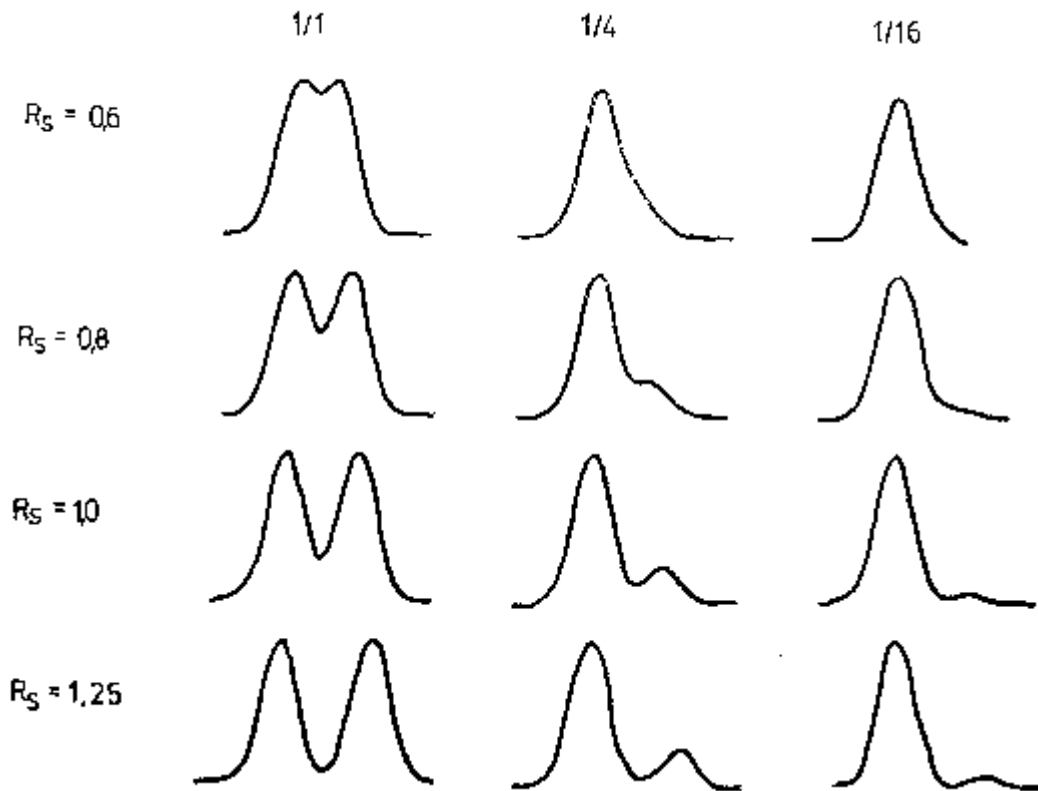
- Korrigere for tap ved forandring i injisertvolum.
- Korrigere for forandringer under kromatografisk analyse.
- Korrigere for tap ved prøveopparbeidelsen.
- Kvantifisering av ukjent konsentrasjoner ved bruk av komponent spesifikke responsfaktorer.

Dersom det er flere stoffer som skal bestemmes, kan det være nødvendig og ha flere interne standarder. For å kunne benytte en I.S. må vi ha en detektor som måler analytt og I.S. under samme kromatografisk separasjon [29].

For å bruke intern standard kvantifisering må det lages standardkurve ved ulike konsentrasjonsområder for linearitetstesting. Standardkurve settes opp ved å plote arealforholdet stoff/I.S. eller topphøydeforholdet stoff/I.S. mot innholdet av stoff i prøven [29].

2.6.3 Oppløsningsevne

Oppløsningsevnen R_s og toppstørrelse er viktig for å kunne skille toppene fra hverandre som igjen kan gi rett kvantitativt mål av analytt. Figur 2.6 viser en illustrasjon av en varierende oppløsningsevne ved varierende toppstørrelser [13].



Figur 2.6. Separasjon av to stoffer ved varierende oppløsningsevne og topphøyde [13].

Fra Figur 2.6 kan en se hvor viktig det er med rett verdig av oppløsningsevne og toppstørrelse for å skille toppene fra hverandre.

En kan lett konkludere feil dersom en ikke tar hensyn til at oppløsningsevnen må ha en viss størrelse. Det kan for eksempel være en topp med liten forurensing som ikke oppdages med lav oppløsningsevne. Identifisere ulike stoffer i en blanding kun ved hjelp av retensjonstiden kan være problematisk dersom man ikke har stor nok oppløsningsevne i en kromatografisk separasjon. Hvis en får overlapp av to topper kan midlertid tiden for toppens maksimum forskyve seg. Ved en $R_s = 1,5$ vil en oppnå en separasjon til grunnlinje og ingen påvirkning i retensjonstiden fra andre topper [13].

Overlapping av topper kan gi feil analyseresultater dersom toppene medføre at topphøydene eller topparealene forandrer seg. Det er topphøyder eller toppareal som blir brukt ved kvantitative analyser. I dette studiet ble det benyttet toppareal [13].

2.6.4 Deteksjonsgrense (LOD) og Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Deteksjonsgrensen (LOD) er instrumentavhengig terskel verdi hvor du kan positiv bekreftelse er tilstede. Med dette menes LOD er den laveste konsentrasjonen hvor en ville være i stand til å skille fra konsentrasjonen oppnådd fra måling av en blindprøve [30].

Kvantifiseringsgrense (LOQ) beskrevet som den laveste konsentrasjonen som kan kvantifiseres med en gitt måleusikkerhet.

Det finnes flere måter å bestemme LOD og LOQ på. En av dem er å måle signal-to-noise ratio (S/N), [30]. LOD og LOQ kan bregnes fra hhv likning 2.3 og 2.4.

$$\text{LOD} = S/N = 3 \quad (2.3)$$

$$\text{LOQ} = S/N = 10 \quad (2.4)$$

Dette kan nås ved eksperimentelt til man for et verdig (forholdet S/N) på 3 og 10, som er vist i likning 2.4 og 2.5.

En annen måte gjøre det på er statistisk tilnærming. Hvor antall (minst 3) blankprøver blir analysert og fra det kan man bruke likning 2.6 til å finne standardavviket (SD). Deretter kan man benytte likning 2.7 og 2.8 til å finne LOD og LOQ.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (2.5)$$

Hvor n er antall prøver (blank), x er den analysert prøven og \bar{x} er gjennomsnitt

$$\text{LOD} = 3 * SD \quad (2.6)$$

$$\text{LOQ} = 10 * SD \quad (2.7)$$

3 Materialer og metode

3.1 Materialer og utstyr

Tabell 3.1.1 viser apparatur som er brukt i metoden.

Tabell 3.1.1. Apparatur med produkt og leverandør.

Apparatur	Produkt	Leverandør
Vekt	ED2245	VWR, Oslo, Norge
Sprøyte	509914	Sigma-Aldrich, Supelco, USA
HPLC	Series 200, pumpe, kolonne ovn	Perkin Elmer, Waltham Massachusetts USA
MS	API 2000	AB Sciex, Framingham Massachusetts USA
Mikro injeksjons pumpe	CMA 100	CMA Microdialysis, Kista, Sverige
HPLC C ₁₈ Kolonne	ACE 3 C ₁₈ – 300, 75x2,1 mm, 3 µm	ACE, Aberdeen, Scotland. Kolbotn, Norge

Tabell 3.1.2 presentere kjemikalier benyttet i dette forsøket.

Tabell 3.1.2. Kjemikalier med kvalitet/konsentrasjon og produsent.

Kjemikalier	Kvalitet/Konsentrasjon	Produsent
Ammonium Acetat	<i>p.a</i>	Merck, Darmstadt Tyskland
Gjenvinning intern standard, Perfluor-3,7-dimetyl-oktansyre	50 µg/ml	Chiron As, Trondheim Norge
Intern Standard, FFAS/M8FOSA: 13C/180-Perfluoralkylsulfonates 13C-FOSA	2.5 µg/ml	PERFluorinated Organics in Our Diet (PERFOOD). Seventh Framework Programme (FP7). Find a project Amsterdam, Nederland
Intern Standard, MPFAC Mix: 13C –Perfluoralkylkarboksyl syre	2.5 µg/ml	PERFluorinated Organics in Our Diet (PERFOOD). Seventh Framework Programme (FP7). Find a project Amsterdam, Nederland
Metabol	≥99.9 %	Fluka, Buch Sveits
Polypropylen glykol (PPG), Negtaivt	3×10^{-4} mol/L	AB Sciex, Framingham Massachusetts USA
Polypropylen glykol (PPG), Positivt.	1×10^{-4} mol/L	AB Sciex, Framingham Massachusetts USA
Standard, Perfluoralkylsulfonates	2.5 µg/ml	PERFluorinated Organics in Our Diet (PERFOOD). Seventh Framework Programme (FP7). Find a project Amsterdam, Nederland
Standard, Perfluoralkylcarboxylic acids	2.5 µg/ml	PERFluorinated Organics in Our Diet (PERFOOD). Seventh Framework Programme (FP7). Find a project Amsterdam, Nederland
Vann	HPLC kvalitet	Fluka, Buch Sveits

3.2 Metode

3.2.1 Til lagning av standard

Fra stamløsningenes analytt (STD), intern standardene (I.S.) og gjenvinningstandard (RecSTD) ble det laget fortykning og deretter ble det laget 7 felles standarder med I.S. og RecSTD for de utvalgte PFAS stoffene (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PENA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFOcDA, PFBS, PFHxS, PFOSA, PFOS og PFDS), se Tabell 3.1 for oversikt.

Tabell 3.1. Konsentrasjon av intern standard (IS), gjenviningstandard (RecSTD) og analytt (STD).

Standard nr.	I.S. (pg/ μ L)	RecSTD (pg/ μ L)	STD (pg/ μ L)
1	5	5	1
2	5	5	5
3	5	5	10
4	5	5	20
5	5		50
6	5	5	100
7	5	5	200

Standardene fra Tabell 3.1 ble benyttet å lage kalibreringskurve for de overnevnte PFASs. Det ble lagt laget standarder med lavere konsentrasjon enn 1 pg/ μ L for å finne LOD og LOQ eksperimentelt (se Resultat/diskusjon) til de utvalgte PFAS komponenter (Se Tabell 4.1.2).

3.2.2 Instrument og komponent spesifikk kalibrering

Før optimalisering av stoffene ble instrumentet tunet og kalibrert for Q1 og Q3 både positivt og negativ ioner (ble gjort manuelt). Det ble gjort ved å benytte Polypropylene glycol (PPG) løsning ved å bruke en 500 μ L sprøyte. Med hensikten å finne de innstillingene på massespektrometeret som gir best signalintensitet av analyttene.

3.2.3 Metode for HPLC

PerkinElmer Series 200 Micro Pump ble benyttet. Ulike programmer ble benyttet for pumpe, de beste programmene er gitt i Tabell 3.2 – 3.4.

Mobilfasen (MP) i HPLC kromatografi består av organiskløsemidler og vann. I dette forsøket består mobilfasen av HPLC vann (A) og en buffer (B) som består av metanol og NH₄OAc (~ 2.0 mM). Gjennom forsøket ble det holdt en konstant temperatur på 35 °C og en trykk på over 70 bar. Metoden er inspirert av tidligere forsøk [31, 32].

Tabell 3.2. Program for pumpe som ble benyttet under forsøket.

Step	Time (min)	Flow (mL)	Vol. % A	Vol. % B
0	0.0	0.200	80.0	20.0
1	1.0	0.200	60.0	40.0
2	5.0	0.200	25.0	75.0
3	5.0	0.200	0.0	100
4	5.0	0.200	0.0	100
5	1.0	0.200	90.0	10.0
6	4.0	0.200	90.0	10.0

Tabell 3.3. Program for pumpe som ble benyttet under forsøket, hvor A og B er hhv vann og mobilfase.

Step	Time (min)	Flow (mL)	Vol. % A	Vol. % B
0	0.0	0.200	95.0	5.0
1	1.0	0.200	70.0	30.0
2	5.0	0.200	25.0	75.0
3	5.0	0.200	0.0	100
4	5.0	0.200	0.0	100
5	1.0	0.200	95.0	5.0
6	4.0	0.200	95.0	5.0

Tabell 3.4. Program for pumpe som ble benyttet under forsøket, hvor A og B er hhv mobilfase og vann.

Step	Time (min)	Flow (mL)	Vol. % A	Vol. % B
0	0.0	0.200	90.0	10.0
1	1.0	0.200	70.0	30.0
2	5.0	0.200	25.0	75.0
3	5.0	0.200	0.0	100
4	5.0	0.200	0.0	100
5	1.0	0.200	95.0	5.0
6	4.0	0.200	90.0	10.0

Programmet i Tabell 3.3 er best egnet seg til dette formålet, og har blitt benyttet til dette forsøket. Tidligere forsøk har anbefalt å benytte metanol framfor acetonnitril for noe av FPAS stoffene (i dette forsøket er det kun teste for metanol) [33].

3.2.4 Komponent spesifikk optimalisering av MS/MS

Det ble benyttet eget program med egen pumpe (CMA/100 Microinjection Pump) for optimalisering av PFASs med dens interne standard (I.S.) og gjennvining (RecSTD), hvor det ble benyttet en 500 µL sprøyte med en hastighet på en 5-10 µL/min (i dette forsøket ble det brukt 8 µL/min). Konsentrasjonen av PFASs, ISTD og RecSTD som ble benyttet for optimalisering var på 50 pg/µL og 75 pg/µL. Deretter ble det lagt en metode (se Tabell 3.5 Appendiks) for å kunne identifisere og kvantifisere PFASs, I.S. og RecSTD.

I Tabell 3.5 er den optimaliserte metoden som ble benyttet under dette forsøket oppført.

3.2.5 Analyse av Standard

Tabell 3.5 og 3.6 (Appendiks) viser til de optimaliserte parameterene for metoden som ble benyttet for å analysere de 7 standardene i Tabell 3.1. Analysen ble utført med en temperatur på ca. 35 °C i HPLC instrumentet med et trykk over 70 bar. Gassen som ble benyttet som kollisjons gass var nitrogen, og hadde et trykk på ca. 4 bar.

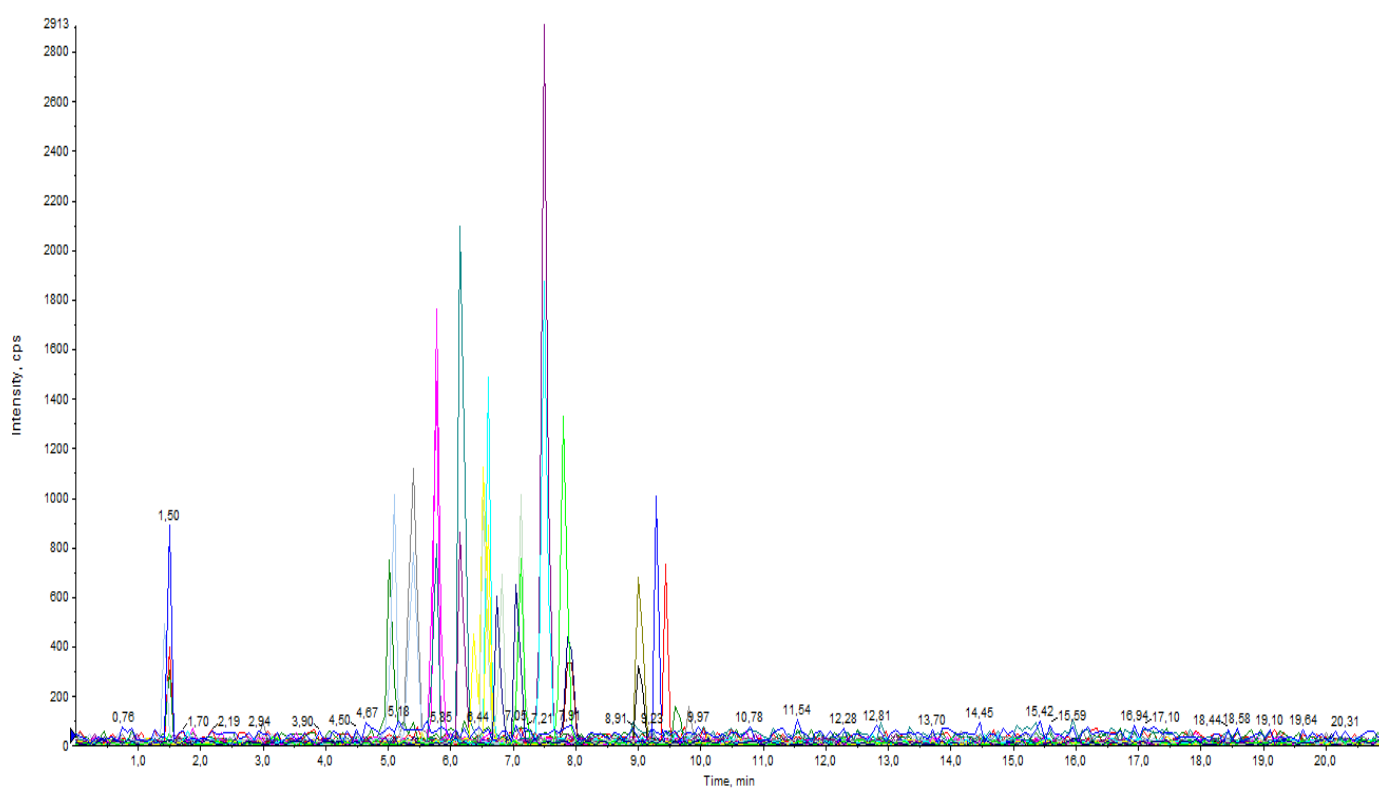
Etter analyse av standardene ble det lagt kalibreringskurve for PFAS stoffene ovenfor (se Appendiks).

Kontrollprøver med tre kjent konsentrasjoner (5, 25 og 50 pg/µL) fra stamløsningene ble analysert for å validere nøyaktigheten til metoden (se Kvalitetssikring).

4 Resultat og diskusjon

4.1 Identifisering av PFAS

HPLC-MS/MS ble brukt til blant annet til å identifisere, separere og bestemme retensjonstiden av de ulike PFAS stoffene. Som nevnt tidligere i oppgaven er tre ulike HPLC metoder blitt benyttet for separasjon av stoffene, de kan brukes til dette formålet. I dette forsøket er det blitt benyttet metoden i Tabell 3.3. Denne ble valgt fordi den gav skarpestopper. Figuren 4.1.1 under viser kromatogrammet av de ulike PFAS stoffene i HPLC-MS/MS, se Tabell 4.1.1 for fargekode av Figur 4.1.1.



Figur 4.1.1. Kromatogram til utvalgte PFAS standard (3 pg/ μ L) inkludert intern standard (3 pg/ μ L) i HPLC-MS/MS.

Tabell 4.1.1 Fargekode til Figur 4.1.1.

■	XIC of -MRM (29 pairs): 213,046/169,000 Da ID: PFBA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 217,000/172,000 Da ID: MPFBA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 263,000/218,900 Da ID: PFPeA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 313,005/269,000 Da ID: PFHxA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 315,000/270,000 Da ID: MPFHxA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 362,992/318,900 Da ID: PFHpA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 412,928/368,800 Da ID: PFOA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 421,000/376,000 Da ID: MPFOA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 462,921/418,900 Da ID: PFNA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 472,000/427,000 Da ID: MPFNA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 512,988/468,900 Da ID: PFDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 519,000/474,000 Da ID: MPFDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 563,004/518,900 Da ID: PFUnDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 570,000/525,000 Da ID: MPFUnDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 612,999/568,800 Da ID: PFDoDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 615,000/570,000 Da ID: MPFDoDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 662,991/618,900 Da ID: PFTrDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 712,979/668,800 Da ID: PFTeDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 812,989/768,900 Da ID: PFHxDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 913,018/169,100 Da ID: PFOcDA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 299,000/80,000 Da ID: PFBS from Sample 9 (F)
■	XIC of -MRM (29 pairs): 399,000/80,000 Da ID: PFHxS from Sample 9 (F)
■	XIC of -MRM (29 pairs): 403,000/84,000 Da ID: MPFHxS from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 498,000/78,000 Da ID: PFOSA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 506,000/78,000 Da ID: MPFOSA from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 499,000/80,000 Da ID: PFOS from Sample 9 (F)
■	XIC of -MRM (29 pairs): 507,000/80,000 Da ID: MPFOS from Sample 9
■	XIC of -MRM (29 pairs): 599,000/80,000 Da ID: PFDS from Sample 9 (F)
■	XIC of -MRM (29 pairs): 512,957/468,700 Da ID: PFMe2OA from Sample 9

Figur 4.1.1 viser en god og klar separasjon med tydelig topp av de ulike PFAS stoffene av interesse. Hvor x-aksen er retensjonstiden (min) og y-aksen er intensitet (cps). Se Tabell 4.1.2 for identifisering av PFAS stoffene med dens retensjonstid.

Tabell 4.1.2. PFAS med dens analytt, akronym, formel og retensjonstid (RT).

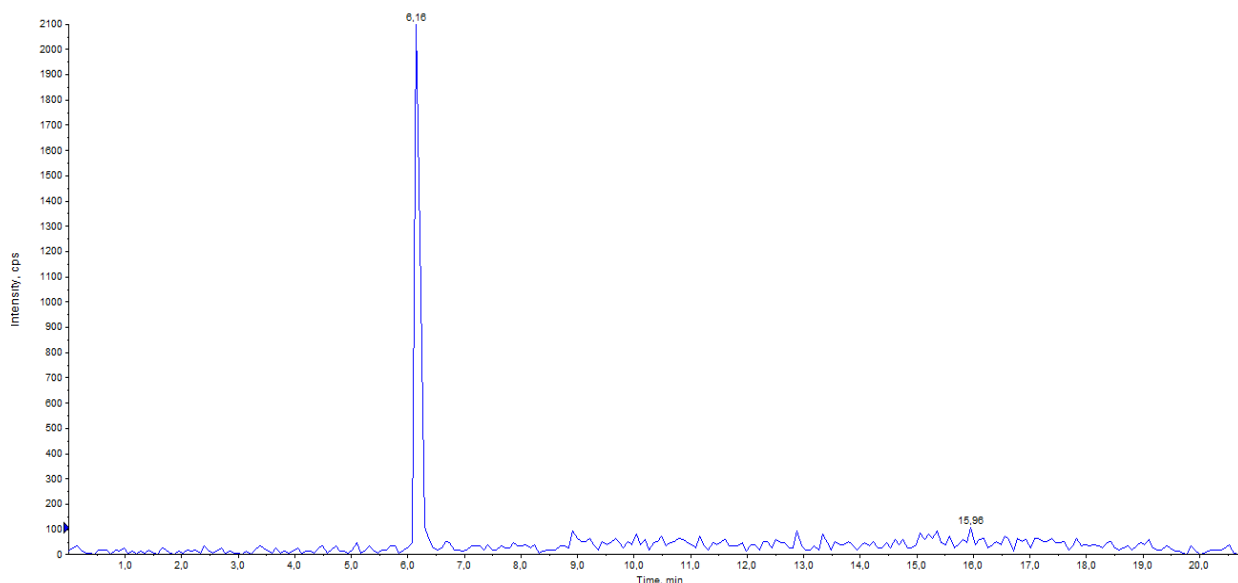
Analytt	Akronym	Formel	RT (min)
Perfluorobutanoic acid	PFBA	C ₃ F ₇ COOH	1.50
Perfluoropentanoate	PFPeA	C ₄ F ₉ COOH	5.02
perfluoroheptanoic acid	PFHxA	C ₅ F ₁₁ COOH	5.39
perfluoroheptanoic acid	PFHpA	C ₆ F ₁₃ COOH	5.77
perfluorooctanoic acid	PFOA	C ₇ F ₁₅ COOH	6.16
perfluorononanoic acid	PENA	C ₈ F ₁₇ COOH	6.60
perfluorodecanoic acid	PFDA	C ₉ F ₁₉ COOH	7.12
Perfluoroundecanoic acid	PFUnDA	C ₁₀ F ₂₁ COOH	7.89
perfluorododecanoic acid	PFDoDA	C ₁₁ F ₂₃ COOH	9.01
Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA	C ₁₂ F ₂₅ COOH	9.29
Perfluorotetradecanoic acid	PFTeDA	C ₁₃ F ₂₇ COOH	9.44
perfluorohexadecanoic acid	PFHxDA	C ₁₅ F ₃₁ COOH	9.61
perfluorooctadecanoic acid	PFOcDA	C ₁₇ F ₃₅ COOH	9.82
perfluorobutane sulfonate	PFBS	C ₄ F ₉ SO ₂ O ⁻	5.09
perfluorohexane sulfonate	PFHxS	C ₆ F ₁₃ SO ₂ O ⁻	5.76
Perfluorooctanesulfonamid	PFOSA	C ₈ H ₂ F ₁₇ NO ₂ S	7.50
Perfluorooctane sulfonate	PFOS	C ₈ F ₁₇ SO ₂ O ⁻	6.53
Perfluorodecane sulfonate	PFDS	C ₁₀ F ₂₁ SO ₂ O ⁻	7.80
Perfluoro-3,7-dimethyl-octanoic acid	PFMe ₂ OA	C ₉ F ₁₉ COOH	7.05

Tidligere rapport [34] viser en annen retensjonstid enn det som er funnet i dette forsøket, men rekkefølgen av PFAS stoffene er likt noe som er forventet også gjøre her. Siste toppen som kommer er PFOcDA og har en retensjonstid på ca. 10 min. Totallanalyse tiden til LC metoden som er blitt benyttet i dette forsøket kan reduseres. Tidligere forsøk som har benyttet LC-MS/MS har oppnådd godt separasjon for 30 PFASs med en totallanalyse tid på 12 min [35]

Det har blitt observert at retensjonstiden for de ulike PFAS stoffene forandrer seg fra en analysekjøring til en annen. Retensjonstiden varierer ikke systematisk, dette kan skyldes luft i pumpe noe som er observert i dette tilfellet. I pumpe 2 ble det observert luft, og ikke noe tegn i pumpe 1. Dette kan løses ved å spyle luft fra pumpehodet, hvis dette ikke hjelper bør pumpebyttinger byttes om nødvendig. Dette kan forårsake at væskestrømmen (flow) forandre seg og gi ulik retensjonstid. En annen grunn kan være kolonne problem, hvor kolonne har blitt brukt over lengre tid og må byttes ut. Det har dukket opp uidentifisert toppen i kromatogrammet. Dette kan skyldes kontaminering som er blitt introdusert før kolonnen fordi toppene er skarp. Dette kan løses ved å vaske godt, som rutine bør det vaskes mellom hver prøve.

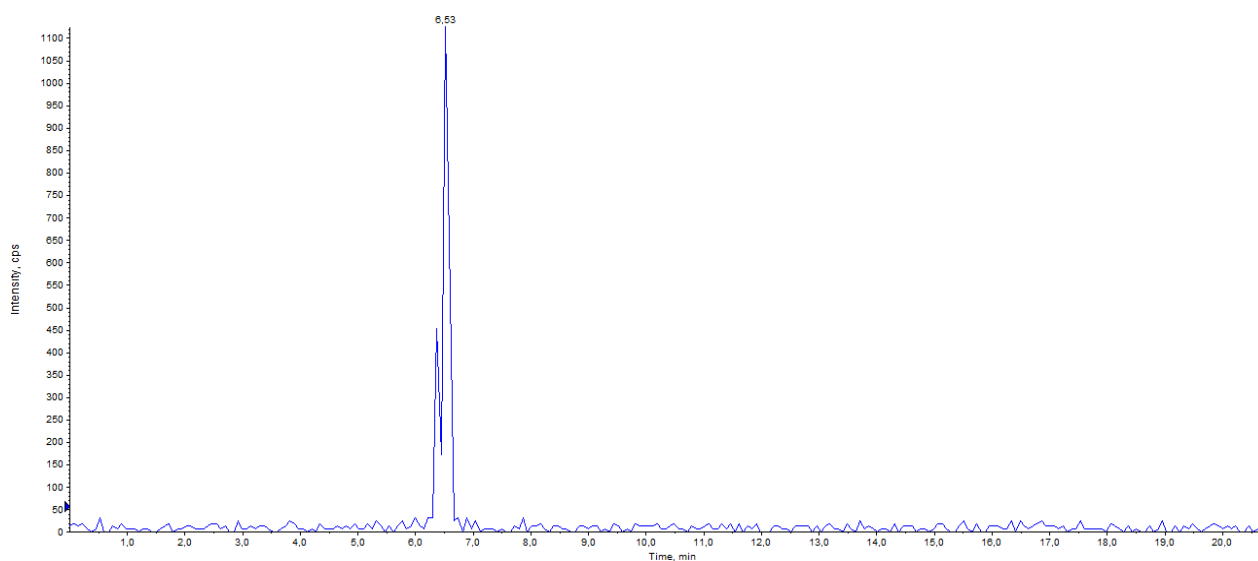
Fra Figur 4.1.1 er det vanskelig å vite hvilken topp tilhører de ulike PFAS stoffene.

Computeren er innstilt med eget software program til å identifisering de ulike stoffene. Et eksempel på dette er Figur 4.1.2 av PFOA.



Figur 4.1.2. Kromatogram av PFOA i HPLC-MS/MS.

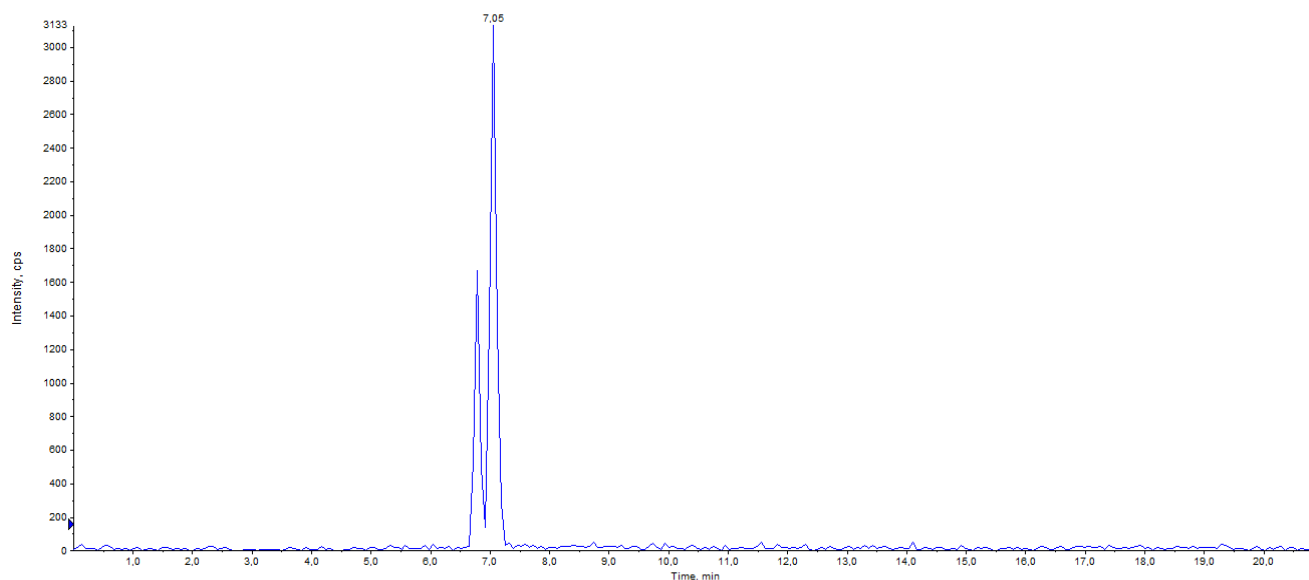
En kan se fra Figur 4.2 at vi har en klar og tydelig topp av PFOA. Separasjons metode fungerer veldig fint og er anbefalt til videre bruk for PFAS. Kromatogrammet til PFOS Standarden gav to topper.



Figur 4.1.3. Kromatogram av PFOS i HPLC-MS/MS.

Fra Figur 4.1.2 (PFOA) observeres det en normaltopp, mens Figur 4.1.3 (PFOS) gir to topper. Dette tyder på at vi har spor av forgrenet PFOS ved siden av den lineære PFOS. Den første toppen tyder på at vi har en branched isomer ved siden av L-PFOS. Dette kan bekreftes av tidligere studie som er gjort [36].

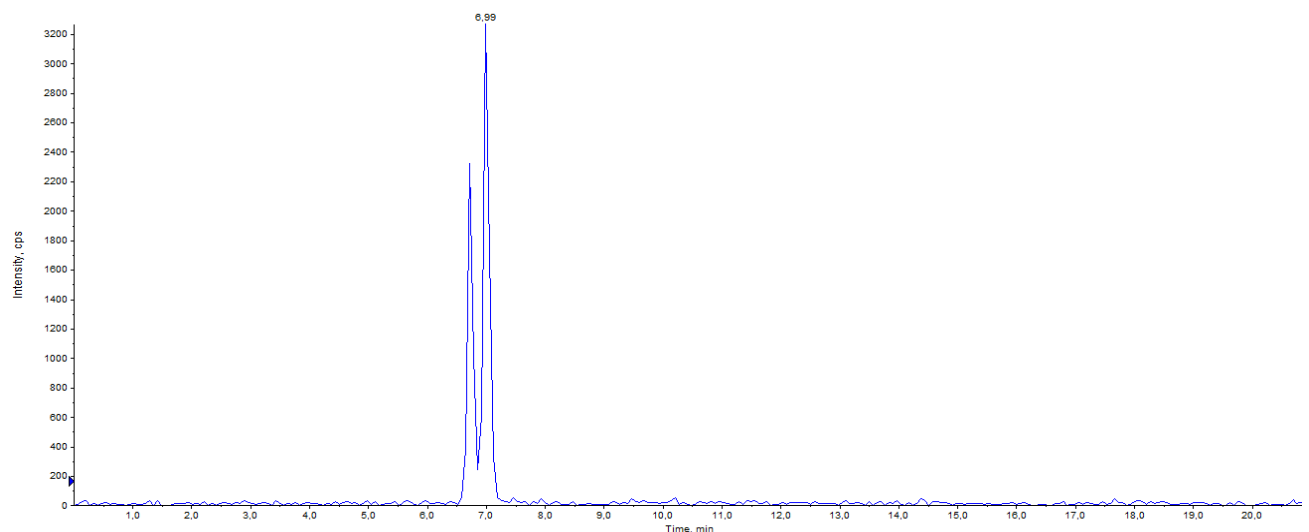
I PFDA Kromatogrammet er det observert to topper. Normalt skal det være en topp, se Figur 4.1.4 for Kromatogram av PFDA.



Figur 4.1.4. Kromatogram av PFDA i HPLC-MS/MS.

Etter grundig søk viser det seg at disse to toppene (Figur 4.1.4) er en blanding av PFDA og RecSTD (PFMe₂OA).

Denne konklusjonen er tatt basert på å observere kromatogrammet disse 2 stoffene. Figur 4.1.5 er kromatogram av PFMe₂OA som gir 2 topper som er veldig likt kromatogram til PFDA. Figur 4.1.4 og 4.1.5 har samme konsentrasjon (5 pg/μL).



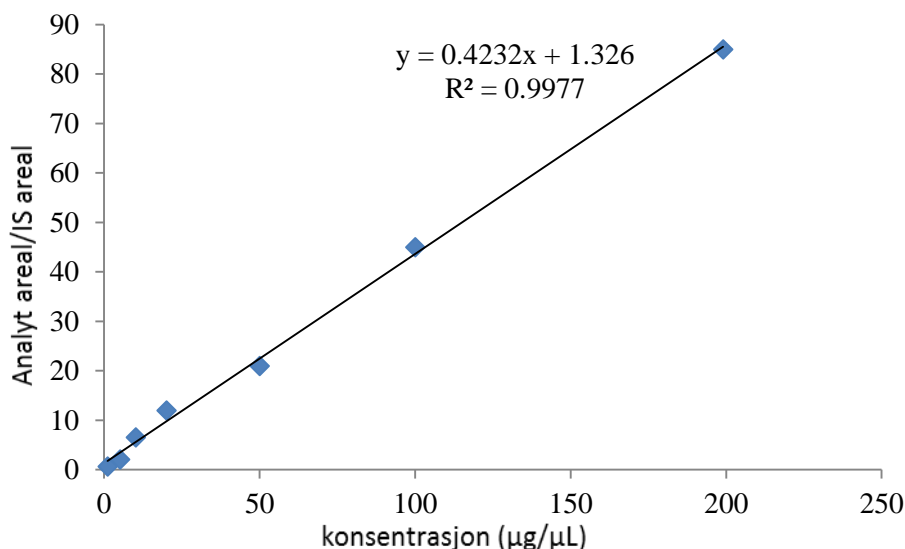
Figur 4.1.5. Kromatogram av PFMe₂OA i HPLC-MS/MS.

Som det er nevnt tidligere har RecSTD (PFMe₂OA) konstant konsentrasjon i alle standardene, men det har ikke standarden PFDA. Ved å observere de ulike konsentrasjonene kan en se den første toppen tilhører PFMe₂OA, og den andre PFDA. Dette kan man si ved å ha observert kromatogrammene til PFDA og PFMe₂OA i de syv standardene i Tabell 3.1. PFMe₂OA som er har en konstant konsentrasjon i alle standardene, bør gi noe samme utslag den første toppen når PFDA konsentrasjon økes. Når man øker vesentlig konsentrasjon av PFDA bør det gi en vesentlig økt utslag av den andre toppen. Analyse av den økte konsentrasjonen av PFDA (se Figur 4.1.6 i Appendiks) viser at den første toppen gir samme utslag som Figur 4.1.4. Den andre toppen (Figur 4.1.6) gir mye større utslag enn det som er i Figur 4.1.4.

Kromatogrammet 4.1.4 og 4.1.6 av PFDA er hhv standard på 5 pg/μL og 10 pg/μL. Derfor kan man si at den første toppen er PFMe₂OA, og den andre toppen er PFDA. Dette kan bli bekreftet også ved å se på Kromatogrammet av PFMe₂OA, se Figur 4.1.5 og 4.1.7. Analyse av PFMe₂OA av standardene på 5 pg/μL og 10 pg/μL skal gi samme utslag av PFMe₂OA. Figur 4.1.5 og 4.1.7 gir samme utslag av PFMe₂OA i den første toppen, men gir forskjellig utslag i den andre toppen. Dette viser at den første toppen må være PFMe₂OA, og den andre toppen PFDA. Når en observere kromatogrammet og spekteret til de standardene gir det samme konklusjon.

4.2 Kalibreringskurve.

Etter optimaliserte Multiple Reaction Monitoring (MRM) overganger for de PFASs i MS/MS instrumentet (se Tabell 3.5 Appendiks) ble standardene analysert (minst 3 ganger). De overgangene (Q1 og Q3) fra Tabell 3.5 ble valgt fordi de hadde størst intensitet. Tidligere forsøket har valgt samme overgang (Q1 og Q3) som i dette forsøket [1, 37, 38]. Deretter ble kalibreringskurve laget ved å benytte rådataene for de ulike stoffene ved å plote konsentrasjons mot forholdstallet (arealet analytt/ arealet intern standard). Metoden MRM med negativ polaritet ble benyttet for kvantifisering. Korrelasjonskoeffisienten (R^2) må være større 0.95 [39]. Korrelasjonskoeffisienten for alle PFAS stoffene i dette forsøket ble større enn 0.95 Figur 4.2.1 viser kalibreringskurve for PFOS med R^2 på 0,9977. Se Figur 4.2.2-4.2.18 (Appendiks) for kalibreringskurve med R^2 til resten av PFASs.



Figur 4.2.1. Kalibreringskurve for PFOS hvor konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet Intern standard).

For å få riktig kalibreringskurve er det viktig å ha forholdstallet riktig. Derfor er det viktig å bruke rett intern standard for de ulike stoffene. Se Tabell 4.2.19 for oversikt over de ulike PFAS stoffene med deres interne standard.

4.3 Analytisk sensitivitet (LOD og LOQ)

Med rene standere ble det utført eksperimentelt forsøk for å finne deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) av PFASs, se Tabell 4.3.1. Dette ble gjort ved å se på signal-to-noise ratio (S/N), hvor LOD og LOQ er definert i likning 2.4 og 2.5. Før LOD og LOQ av PFAS stoffene ble bestemt ble blankprøve (rent metanol) analysert. Blankprøve ble benyttet for å kunne få et bilde av PFAS stoffene. Med analyse av blankprøve kan blant annet en se om bakgrunn signalet er høy eller om det er noe kontaminering av PFAS stoffene.

Etter bruk av instrumentet har vi opplevd en klar kontaminering, spesifikt for stoffet PFOA (se Figur 4.3.2 Appendiks). Dette problemet må løses før en kan bestemme LOD og LOQ for PFOA.

Hovedmistenkt var før- og hovedkolonne, derfor ble i første omgang sett på dem. Det ble byttet før- og hovedkolonne uten det førte til noe endring, dermed ble før- og hovedkolonne utelukket. I etterkant har det vist seg at PFOA kontamineringen har vært på grunn av injektorsystemet som er kontaminert. Det vil ikke være mulig å bestemme LOD eller LOQ for PFOA når vi har en så sterk intensitet i blankprøven.

Tabell 4.3.1. Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) med signal-to-noise forhold (S/N) til PFAS med injiseringsvolum på 10 µL.

Akronym	LOD (pg/µL)	LOQ (pg/µL)
PFBA	1	2
PFPeA	1	2
PFHxA		0.1
PFHpA	0.2	0.5
PFOA	*	*
PENA	0.4	0.9
PFDA	0.3	1
PFUnDA	0.5	1.1
PFDoDA	0.5	1.1
PFTTrDA	0.5	1.1
PFTeDA	0.4	0.7
PFHxDA	0.5	1
PFOcDA	5	10
PFBS	0.4	0.9
PFHxS	0.5	1.5
PFOSA	0.2	0.7
PFOS	0.2	0.5
PFDS	0.2	0.4

*Ikke målt på grunn av kontaminering.

Følsomheten til de fleste PFAS stoffene er veldig bra. Alle PFAS har LOD på ≤ 1 pg/µL, unntatt PFOcDA som har en LOD på 5 pg/µL.

Ved å sammenligne LOD og LOQ med tidligere forsøke som har benyttet Agilent 6460 trippel LC/MS system har de oppnådd mye lavere for noen av PFAS stoffene [37]. Blant dem er PFOA, PFDA, PFOS, PFHxDA, PFBS og PFBA som har henholdsvis en LOD/LOQ på 0.02/0.5 µg/l, 0.02/0.5 µg/l, 0.02/0.05 µg/l, 0.02/0.1 µg/l, 0.02/0.05 µg/l, 0.02/0.02 µg/l.

4.4 Linearitet

Kalibreringskurve er lineær for alle analytter med en $R^2 > 0.95$. Den øvre grensen av lineariteten er bestemt av den høyeste standard som er analysert. Den nedre grensen av den lineære er begrenset ved metodens LOD. Lineariteten for PFAS stoffene varierer mye, for noen av dem kan dette instrumentet måle LOD på 0.1 og 0.2 pg/µL. Se Tabell 4.4.1 for

linearitetsområde for de ulike PFAS stoffene. Konsentrasjon under LOD blir ikke detekterbart.

Tabell 4.4.1. Linearitetsgrense til PFAS.

Akronym	Lineærområde (pg/μL)
PFBA	1 – 200
PFPeA	1 – 200
PFHxA	0.1 – 200
PFHpA	0.2 – 200
PFOA	- 200
PENA	0.4 – 200
PFDA	0.3 – 200
PFUnDA	0.5 – 200
PFDoDA	0.5 – 200
PFTTrDA	0.5 – 200
PFTeDA	0.4 – 200
PFHxDA	0.5 – 200
PFOcDA	5 – 200
PFBS	0.4 – 200
PFHxS	0.5 – 200
PFOSA	0.2 – 200
PFOS	0.2 – 200
PFDS	0.2 – 200

LOD og LOQ for PFOA kunne ikke bli bestemt på grunn av kontaminering (som det er nevnt tidligere).

Den minste standard som har blitt benyttet i dette forsøket er på 0.1 pg/μL. Med en standard på 0.1 pg/μL ga det en LOQ for PFHxA. LOD for PFHxA har ikke blitt bestemt, og derfor blir LOQ benyttet som den nedre grense i dette tilfellet. For PFOcDA ble LOD veldig høy (5 pg/μL) i forhold til de andre PFAS stoffene.

Tidligere forsøk som har benyttet Selected Reaction Monitoring Assays med LC/MS/MS [40] har oppnådd godt linearitet for en konsentrasjonsområde 0.04-2.5 pg/μL med en korrelasjonskoeffisienten (R^2) over 0.999 blant dem er PFBS, PFHxS, PFHpA, PFDS.

Det er viktig å påpeke at lineariteten kan være høyere enn 200 pg/μL for PFAS stoffene. For å kunne bekrefte dette må det analyseres eksperimentelt med større Standard. Det er viktig å nevne at den lineære området kan være mye større enn 200 pg/μL. En konsentrasjon på en 200 pg/μL er sikkert midt i den lineære område. For dette forsøket er det ikke nødvendig å teste for så høy konsentrasjon, grunn at våre vannprøver er anslått å inneholder lav konsentrasjon av PFASs.

4.5 Relativt responsfaktor (RRF_i)

Responsfaktoren til de ulike PFAS stoffene ble beregnet ved å bruke analyse arealet av analytt og intern standard til de syv standardene ved å benyttet likningen 4.1 under.

$$RRF_i = \frac{Amount^{13C} \times Area^{12C}}{Amount^{12C} \times Area^{13C}} \quad (4.1)$$

RRF_i: Relative response factor

Amount ¹³C: Mengde (µg) av IS i kvantifisering standard

Amount ¹²C: Mengde (µg) av målforbindelsen i kvantifisering standard

Area ¹³C: Areal i kromatogrammet av IS i kvantifisering standard

Area ¹²C: Areal i kromatogrammet av målforbindelsen i kvantifisering standard

Relative response factor er beregnet for de standardene som er i det linealområde, se Tabell 4.4.1 for linearitetsgrense til PFASs.

I dette forsøket er RRF_i for en bestemt PFAS stoff beregnet til å være veldig likt for alle standardene, men for noen av standardene avviker det litt fra den middelverdien. Et avvik +/- 10 % fra middelverdi er akseptabelt. For PFOA standard 1 og 7 hadde henholdsvis et avvik på +13 % og 12 % som er litt høyere enn det akseptable avviket. Dette kan skyldes kontaminering av PFOA. Se tabell 4.5.1 - 4.5.18 (Appendiks) for beregnet RRF_i verdig med middelverdi og avvik for de ulike PFAS stoffene til de ulike standerne. Figur 4.5.1 – 4.5.18 illustrerer avviket mellom de syv standardene fra middelverdien. Dette tyder på at standardene er laget med stor nøyaktighet.

4.6 Sterke og svake sider av metoden

Sterke sider av metoden er den har god sensitiviteten til alle PFAS stoffene unntatt PFOcDA. Den trenger lite injeksjonsvolum (1 µL) av prøven for å oppnå god sensitivitet. Det er klar og godt separasjon til alle PFAS stoffene. Metoden gir høy nøyaktighet til sann verdig.

Svake sider av metoden er at den har lett tildens å bli kontaminert. Når det oppstår problemer er det ikke lett å se hvor det er i systemet. Feilsøking tar veldig langt tid og det er ikke lett.

Det er utfordrerne å jobbe med så lav konsentrasjon som det blir gjort i denne oppgaven.

5 Kvalitetssikring

Enver analysemetode bør valideres for å bekrefte at metoden er egnet til sitt formål. I dette forsøket blir lineariteten, relativt responsfaktor, nøyaktighet, LOD og LOQ bestemt til å kvalitetssikre analyseresultatene (det er flere parametere som inkludere i en valideringsmetode).

Lineariteten til PFAS stoffene som er listet i Tabell 4.4.1 forteller om evnen til å gi standardkurver med en respons som er lineær funksjon av konsentrasjon. Den lineære regresjonen og korrelasjonskoeffisienten (R^2) med en verdi større enn 0.95 dokumentere lineariteten [39]. R^2 har blitt funnet til å være større enn 0.95 for alle PFAS stoffene. Den nedregrense som er blitt benyttet til kalibreringskurven er deteksjonsgrense (LOD). Som angir den laveste detekterbare konsentrasjon av et stoff i en prøve. Hvor kvantifiseringsgrense (LOQ) er den laveste konsentrasjonen av analytt som kan bestemmes. LOD og LOQ bestemmes ut i fra S/N-forholdet.

Relativt responsfaktor (RRF_i) ble beregnet for alle standardene i det lineære området av de ulike stoffene. Standard 1 og 7 til PFOA hadde henholdsvis et avvik på +13 % og 12 % som er litt høyere enn det akseptable avviket som er på +/- 10 % [39].

Kontrollprøver med tre kjent konsentrasjoner (5, 25 og 50 pg/ μ L) ble analysert for å validere nøyaktigheten til metoden. Metodens nøyaktighet angir hvor nært den målte verdien er nær sann verdig. Nøyaktigheten til dette forsøket ble funnet til å være veldig nært den sanne verdig til alle PFAS stoffene. Det variert mellom 93 – 109 % av gjenvinning for de 3 kjente konsentrasjonen til de ulike PFAS stoffene. Med dette kan vi konkludere at det ikke er noe systematisk feil i metoden [41]. Største avviket var i den minste konsentrasjon (5 pg/ μ L), og avviket var størst for PFOA og PFOcDA blant PFASs.

6 Konklusjon

Det lyktes med å utvikle en HPLC-MS/MS metode for separasjon og kvantifisering av 18 PFAS stoffene; PFOS, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PENA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFOcDA, PFBS, PFHxS, PFOSA og PFDS. Vi anbefaler å benytte metoden til rutineanalyser av PFAS stoffer i vannprøver.

Alle tre HPLC separasjonsmetoden som ble testet i dette forsøket (presentert i tabell 3.2 - 3.4) ga god separasjon, men metoden (Tabell 3.3) som ble brukt videre i forsøket var valgt på grunnlaget av smalere topper og bedre intensitet. Separasjon mellom de ulike PFAS stoffene var klar og tydelig. Noe variasjon i retensjonstider forklares med pumpeproblemer.

For de ulike PFAS varierer LOD og LOQ. Dette kan bli sett ved å sammenligne LOQ til PFHxA og PFOcDA som er henholdsvis under 0,1 og 10 pg/ μ L. Kalibreringskurve til alle PFAS stoffene gav gode linearitet med en R^2 over 0.95. For de overnevnte PFAS stoffene er R^2 henholdsvis 0.9977, 0.9987, 0.9971, 0.9983, 0.9997, 0.9968, 0.9981, 0.9984, 0.9986, 0.9981, 0.9988, 0.9895, 0.9896, 0.9780, 0.9990, 0.9794, 0.9967, 0.9865.

RRFi for en bestemt PFAS stoff ble beregnet til å være veldig likt for alle standardene, men for noen av standardene avviker det litt fra den middelverdien.

På grunn av kontaminering av hovedkolonnen kunne ikke LOD og LOQ beregnes eksperimentelt for PFOA. Dette påvirket også RRFi til PFOA. For RRFi er et avvik +/- 10 % fra middelverdi er akseptabelt, men for PFOA viste avviket å være +13 % og 12 % for henholdsvis standard 1 og 7.

Nøyaktigheten til dette forsøket ble funnet til å være veldig nært den sanne verdig til alle PFAS stoffene. Det variert mellom 93 – 109 % av gjenvinning for de tre kjente konsentrasjonen (5, 25 og 50 pg/ μ L) til de ulike PFAS stoffene.

Metoden er robust med hensyn på forandring av mobilfase, andre brukere og over lengere tidsbruk uten det har ført til noe signifikantforskjell.

Referanseliste

1. Ahrens, L.P., M. Xie, Zhiyong. Ebinghaus, R., *Determination of polyfluoroalkyl compounds in water and suspended particulate matter in the river Elbe and North Sea, Germany.* . 2009.
2. Huse, A., *Bruken av PerFluorAlkylStoffer (PFAS) i produkter i Norge. MaterialStrømsanalyse.* . 2004.
3. Yamashita, N., et al., *A global survey of perfluorinated acids in oceans.* Mar Pollut Bull, 2005. **51**(8-12): p. 658-68.
4. McLachlan, M.S., et al., *Riverine discharge of perfluorinated carboxylates from the European continent.* Environ Sci Technol, 2007. **41**(21): p. 7260-5.
5. Berger, U.T., C. . *Per- og polyfluorerte alkylstoffer stoffer (PFAS).* 2014; Available from: http://www.nks-analytisk.no/documents/kjemi_4_pfas.pdf.
6. Olsen, G.W., et al., *Serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in an elderly population from Seattle, Washington.* Chemosphere, 2004. **54**(11): p. 1599-611.
7. Janhnke, A., *Polyfluorinated Alkyl Substances (PFAS) in the Marine Atmosphere - Investigations on Their Occurrence and Distribution in Coastal Regions.* 2007.
8. Hekster, F.M.V., *Perfluoralkylated substances Aquatic environmental assessmen.* 2002.
9. Strum, R.A., L., *Trends of polyfluoroalkyl compounds in marine biota and in humans.* Environmental Chemistry, 2010. **6**.
10. Clara, M., et al., *Emissions of perfluorinated alkylated substances (PFAS) from point sources - identification of relevant branches.* Water Sci Technol, 2008. **58**(1): p. 59-66.
11. Stock, N.L., et al., *Perfluoroalkyl contaminants in the Canadian Arctic: evidence of atmospheric transport and local contamination.* Environ Sci Technol, 2007. **41**(10): p. 3529-36.
12. Garsjø, M., *Perfluorinated alkylated sunstances (PFAS) in arctic char (*Salvelinus aplanus*): A case study from Svalbard.* 2013, universitetet for Norges Miljø og biovitenskap.
13. Greibook, T.L., E. Rasmussen, K.E., *Kromatografisk Teori*, in *Kromatografi separasjon og deteksjon*. 1998 Aurskog, Norge. p. 6-24.
14. 2014 ; Available from: http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_US&cid=10049055.
15. Rønning , O.P., *Prøvetaking og prøveoppbeidelse* , Høgskolen i Oslo, 2010: p. 22-59.
16. Nissen, W.M.A., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.* Chromatographic. Vol. 97. 2006: Taylor and Francis Group.
17. Greibook, T.L., E. Rasmussen, K.E., *Væskekromatografi (HPLC)*, in *Kromatografi separasjon og deteksjon*. 1998 p. 213-218.
18. Greibook, T.L., E. Rasmussen, K.E., *Væskekromatografi (HPLC)*, in *Kromatografi separasjon og deteksjon*. 1998, Aurskog, Norge: Aurskog, Norge. p. 176-179.
19. Greibook, T.L., E. Rasmussen, K.E., *Væskekromatografi (HPLC)*, in *Kromatografi separasjon og deteksjon*. 1998: Aurskog, Norge. p. 200-210.
20. Greibook, T.L., E. Rasmussen, K.E., *Koplinger med MS*, in *Kromatografi separasjon og deteksjon*. 1998: Aurskog, Norge. p. 255-274.
21. Agilent Technologies; Available from: <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf>.
22. Elgaaen, C., *Undersøkelser om anvendbarheten av membranintroduksjons-massespektrometri (MISM) for analyser av aminer i uft og vann.* Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) Institutt for kjemi, Mai 2012.
23. Hoffmann, E.D.S., V., *Mass Spectrometry Principles and Applications.* John Wiley & Sons, Ltd, 2007. **Third Edition**.

24. <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php>. 2014.
25. Kicman, A.T., M.C. Parkin, and R.K. Iles, *An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **260-262**: p. 212-27.
26. Løvbak, S.G., *LC-MS/MS-DIFFERENSIERING AV NEURONSPEKIFIKK ENOLASE I SERUM*. Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet , Universitetet i Oslo, 2012.
27. 2014; Available from: <http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/2000-site-planning-guide.pdf>.
28. Greibook, T.L., E. Rasmussen, K.E., *Prøveopparbeidelse*, in *Kromatografi separasjon og deteksjon*. 1998: Aurskog, Norge. p. 275-287.
29. Greibook, T.L., E. Rasmussen, K.E., *Kvantitativ analyse*, in *Kromatografi separasjon og deteksjon*. 1998: Aurskog, Norge. p. 288-294.
30. Service, W.C.A., *Limit of Detection and Limit of Quantitation*. 2011.
31. *Analysis of PFCs in Environmental Water Using Triple Quadrupole LC/MS/MS [LCMS-8030]*. Available from: <http://www2.shimadzu.com/applications/LCMS/C081.pdf>.
32. Ruderisch, A.D., C. ; Wendt, J. ; Fenzel, S. ; *Pitfalls and Prospects: Analysis of Perfluorinated Compounds (PFCs) utilizing LC/MS/MS* 2009.
33. Maestri, L., et al., *Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonate in human tissues by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(18): p. 2728-34.
34. Lacina, O., et al., *Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: milk and fish*. J Chromatogr A, 2011. **1218**(28): p. 4312-21.
35. Kadar, H.V., B. Bichon, Emmanuelle. Monteau, F. Antignac, J. , *HPLC Separation of Thirty Perfluorinated Compounds and Isomers Using a Pentafluorophenyl Reverse Phase Column*. 2010, Thermo Fisher Scientific.
36. Langlois, I. and M. Oehme, *Structural identification of isomers present in technical perfluorooctane sulfonate by tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(5): p. 844-50.
37. Anumol, T.M., S. and Snyder, S. , *High Sensitivity HPLC Analysis of Contaminants of Emerging Concern (CESs) in water Using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS System*, in *Agilent Technologies*. 2012: USA.
38. 2014 ; Available from: <http://www2.shimadzu.com/applications/LCMS/SSI-LCMS-007.pdf>.
39. Danzer, K., *Analytical Chemistry Theoretical and Metrological Fundamentals*. 2007.
40. Gu, C.J., G. Szilasie, R. Hassan, S. Zhang, A. Sanders, M., *Sensitive an accurate quantitation of perfloutinated compoubnds in human breast milk using selected reaction monitoring assays by LC/MS/MS*. 2010: San jose, USA.
41. Haug, M.C., *LC-MS basert analysemetode av gentamicin i blodprøver*. Universitetet i Tromsø UIT, 2012.

Appendiks

Tabell 2.1. Oversikt av PFAS konsentrasjon nivåer i menneske blod (ng/mL) [8]

Origin	n	Date	PFHxS	PFOS	PFDS	PFOSA	PFHxA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	Remarks	Reference
U.S.	65		<1.5-21.4	6.7-81.5		<1.5 2.2		<5-35.2				from blood supply companies	Hansen et al. 2001
U.S.	126		5-1880	91-10600		0.5-612		21-6160				occup. exposed	Olsen et al. 2003a
	60		1-210	15-946		<LOQ		6-298				(occup. exposed)	
U.S.			<1.2-5.9	<6.1-58.3		<1.3 22.1		<3.0-7.0				matched with liver samples	Olsen et al. 2003b
U.S.	175		0.2-32	<1.3-164		<1.3-26		<3-88					
Colombia	56		<0.4-0.9	4.6-14		<0.4-5.6		3.7-12.2					
Brazil	29		<0.6-15.3	4.3-35		<0.4-2.3		<20					
Italy	50		<1-2.1	<1-10.3		<1.3-2.3		<3					
Poland	25	2000-04	<0.4-2.6	16-116		<0.4-7.7		9.7-40					Kannan et al. 2004
Belgium	20		<1-1.4	4.5-27		<3		<1-13					
India	45		<1-2.9	<1-3.1		<3		<3-3.5					
Malaysia	23		1.2-6.8	6.2-18.8		1.3-11		<10					
Korea	50		0.9-20	3.0-92		<0.1-7.2		<15-256					
Japan	38		<2.6-7.6	4.1-40.3		<2.6-9.5		<6.8-12.3					
Canada	56	2002		3.7-65.1		<4.8		<1.2-7.2					Kubwabo et al. 2004
Sweden	66	1997-2000	0.4-28.4	1.7-37.0	<0.1-4.5	0.4-22.9	<0.1-1.6	0.5-12.4	<0.1-1.9	<0.1-0.6	<0.1-0.7		Kärman et al. 2006a
Australia	20	2002-03	2.7-19	12.7-29.5		0.36-2.4		5.0-9.9	0.4-2.0			pooled samples	Kärman et al. 2006b
Sweden	12	2004	1.8-11.8	8.2-48.0	<0.1-0.33	<0.10-0.49		2.4-5.3	0.43-2.5	0.27-1.8	0.20-1.5	matched with milk samples	Kärman et al. 2006c
Germany	356	2005		2.1-55				0.5-19.1					Fromme et al. 2006
China	85	2004		mean 3.72-79.2									Yeung et al. 2006
U.S.	16	2004-05						0.9-8.6	0.17-1.2	0.05-0.25	n.d. 0.06	pooled samples	De Silva & Mabury 2006
Japan	15	2003		4.9-17.6		<1.0		<0.5-2.3				maternal blood	Inoue et al. 2004
				1.6-5.3		<1.0		<0.5				cord blood	
Japan	39	1977		GM 1.1				GM 0.2				females only	
	23	2003		GM 3.5				GM 2.8				females only	Harada et al. 2004
	225	2003		GM 3.5-28.1				GM 2.8-12.4					
Germany	10	1985		14.9-103.7				5.6-32.8					Schröter-Kermani 2005
	16	2004		8.3-33.1				3.0-36.0					
U.S.	178	1974	<1.4-2.5	21.1-40.2				<1.0-3.0					Olsen et al. 2005a
	178	1989	1.3-1.6	25.0-44.0				4.4-6.7					

GM geometric mean.

Tabell. 3.5. Optimalisering av PFASs, ISTD og RecSTD for MS/MS

ID	Q1 m/z (Da)	Q3 m/z (Da)	Time (ms)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
PFBA	213.4	168.9	150.0	-16.000	-350.0	-10.5	-10.0	-12.0
PFPeA	263.4	219.0	150.0	-26.000	-350.0	-11.0	-8.0	-10.0
PFHxA	313.4	268.9	150.0	-16.000	-350.0	-10.5	-10.0	-22.0
PFHpA	263.3	318.9	150.0	-36.000	-90.0	-10.5	-12.0	-24.0
PFOA	413.3	368.9	150.0	-36.000	-50.0	-11.0	-12.0	-28.0
PENA	463.2	418.9	150.0	-36.000	-330.0	-10.5	-14.0	-32.0
PFDA	513.2	468.9	150.0	-31.0	-250.0	-10.5	-14.0	-40.0

Appendiks

PFUnDA	563.1	518.9	150.0	-36.0	-350.0	-11.0	-16.0	-40.0
PFDoDA	613.1	568.5	150.0	-41.0	-330.0	-10.5	-16.0	-46.0
PFTTrDA	663.1	619.1	150.0	-46.0	-310.0	-11.0	-18.0	-48.0
PFTeDA	713.1	669.1	150.0	-46.0	-240.0	-10.5	-18.0	-54.0
PFHxDA	813.1	769.0	150.0	-51.0	-340.0	-10.5	-20.0	-58.0
PFOcDA	913.1	168.8	150.0	-56.0	-250.0	-10.5	-50.0	-12.0
PFBS	299.3	79.8	150.0	-66.0	-350.0	-10.5	-42.0	-8.0
PFHxS	399.2	79.8	150.0	-81.0	-350.0	-10.5	-88.0	-6.0
PFOS	499.0	80.0	150.0	-71.0	-330.0	-10.5	-92.0	-6.0
PFDS	599.1	79.8	150.0	-101.0	-320.0	-10.5	-104.0	-6.0
PFOSA	498.2	77.8	150.0	-76.0	-290.0	-10.5	-62.0	-6.0
MPFBA	217.0	172.0	150.0	-11.0	-350.0	-10.5	-10.0	-10.0
MPFHxA	315.0	270.0	150.0	-21.0	-350.0	-10.5	-10.0	-20.0
MPFOA	421.0	376.0	150.0	-21.0	-350.0	-10.5	-12.0	-30.0
MPFNA	472.0	427.0	150.0	-31.0	-350.0	-10.5	-14.0	-32.0
MPFDA	519.0	474.0	150.0	-41.0	-340.0	-10.5	-14.0	-36.0
MPFUnDA	570.0	525.0	150.0	-56.0	-330.0	-10.5	-16.0	-42.0
MPFDoDA	615.0	570.0	150.0	-41.0	-350.0	-10.5	-18.0	-46.0
MPFHxS	403.0	84.0	150.0	-86.0	-300.0	-10.5	-64.0	-6.0
MPFOS	507.0	80.0	150.0	-111.0	-350.0	-10.5	-80.0	-6.0
MPFOA	506.0	78.0	150.0	-91.0	-340.0	-10.5	-62.0	-6.0
PFMe ₂ OA (RecSTD)	512.9	468.7	150.0	-6.0	-350.0	-12.0	-12.0	-36.0

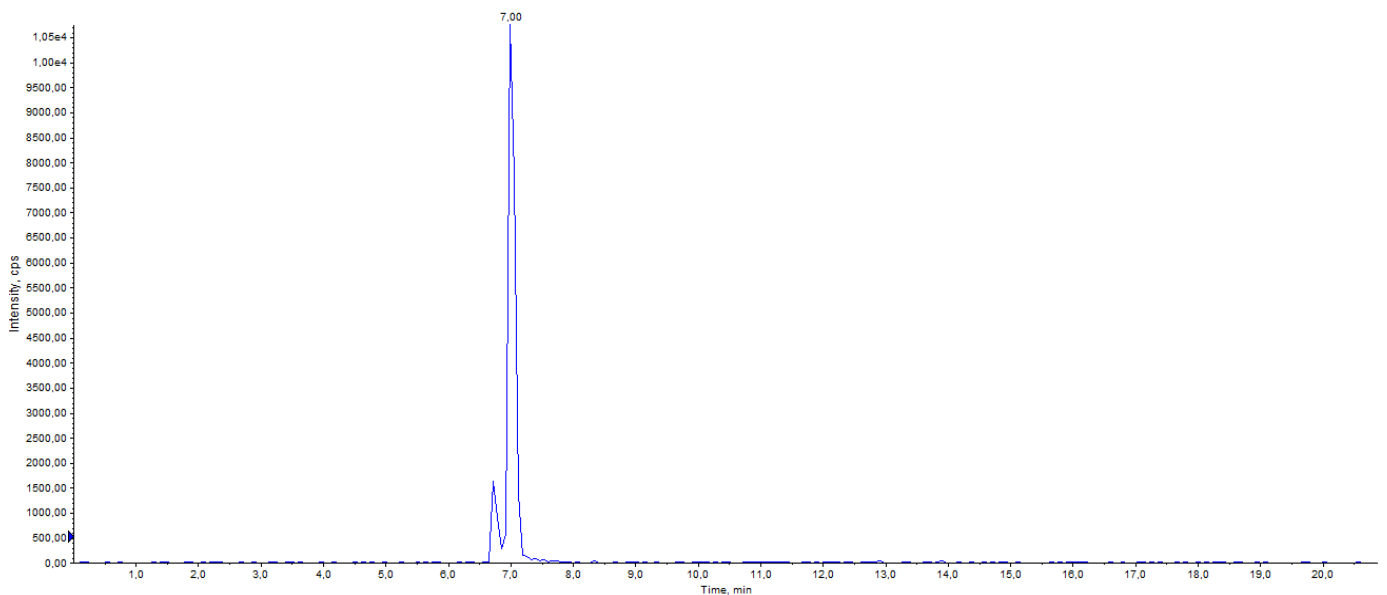
Declustering Potential (DP), Focusing Potential (FP), Entrance Potential (EP), Collision Energy (CE), Collision Cell Exit Potential (CXP).

Tabell 3.6. Parameter som ble benyttet under forsøket.

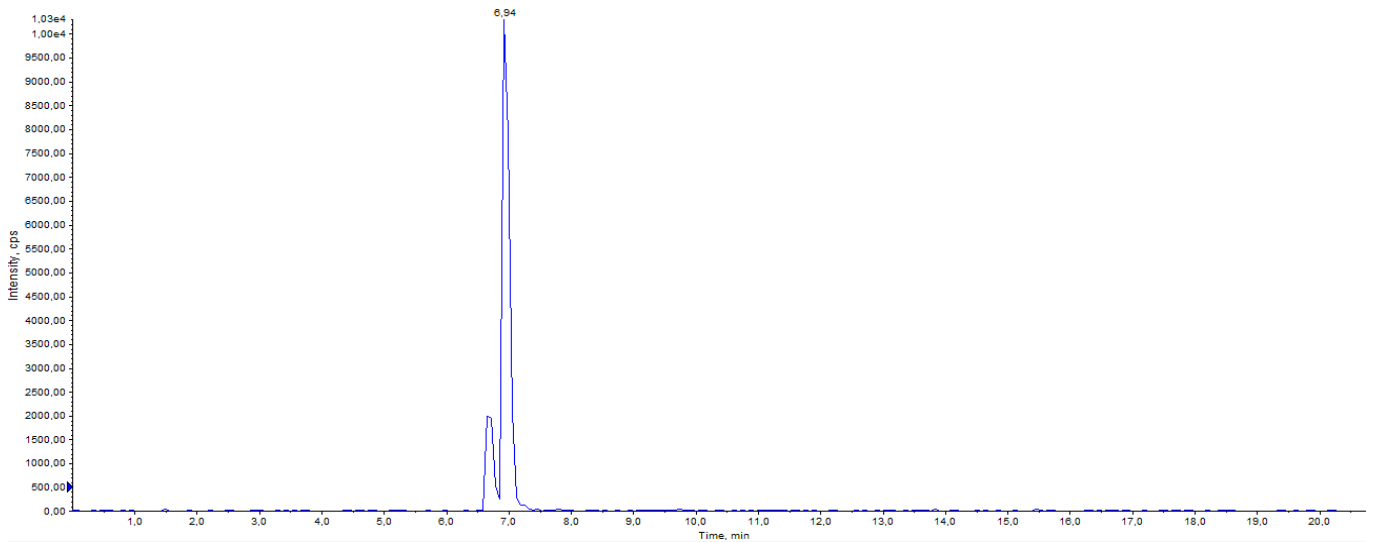
Parametere	Størrelse/enhet
Scan type	MRM
Polarity	Negative
Total Scan Time (includes pauses)	4.4950 (sec)
Duration (total run time)	21 (min)
Delay Time	0 (sec)
Cycles	280
Cycle	4.4950 (sec)
Syringe Size	250 (µL)
Injection Volume	20 (µL)
Pre-inject Flushes	3
Post-inject Flushes	3
Air Cushion	10 (µL)
Excess Volume	10 (µL)
Sample Speed	Medium

Appendiks

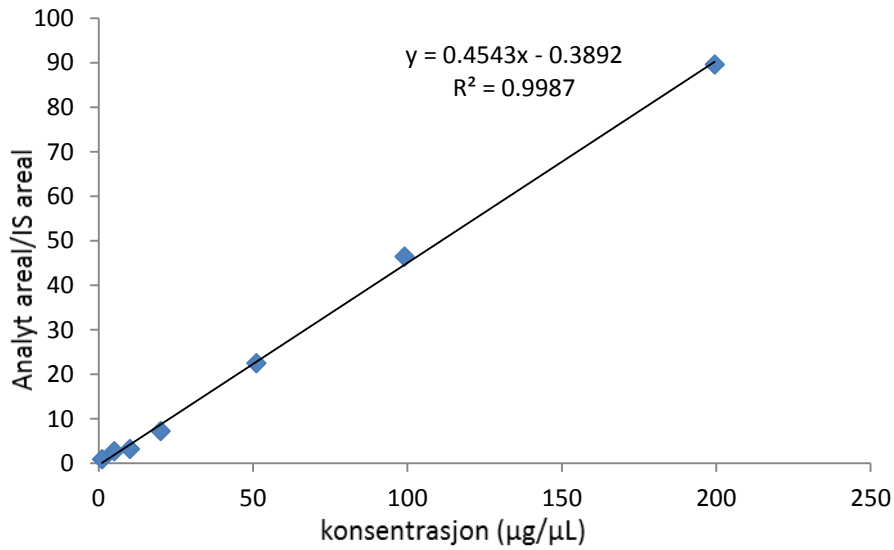
Needle Level	10 (%)
Inject Delay Time	0.0
Replicate injections	1 (min)
Analysis Time	0.0 (min)
Lopp Mode	Partial
Loop Volume	10
Flush Volume	250 (µL)
Flush Speed	Medium
Setpoint (C)	20
Curtain Gas (CUR)	30.0
Collision Gas (CAD)	4
IonSpray Voltage (IS)	-4000.0
Temperature (TEM)	250.0
Ion Source Gas 1 (GS1)	50
Ion Source Gas 2 (GS2)	0.0



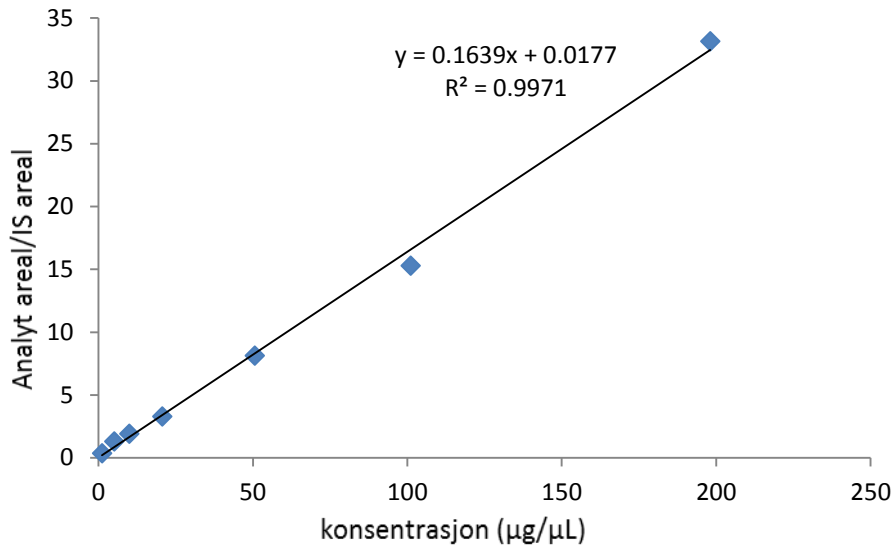
Figur 4.1.6. Separasjonskromatografi av PFDA i HPLC-MS/MS.



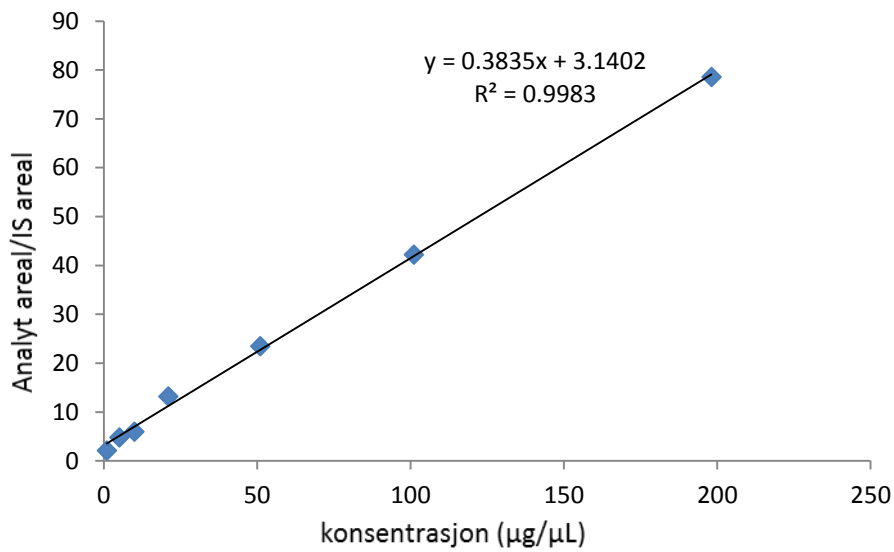
Figur 4.1.7. Separasjonskromatografi av PFMe₂OA i HPLC-MS/MS.



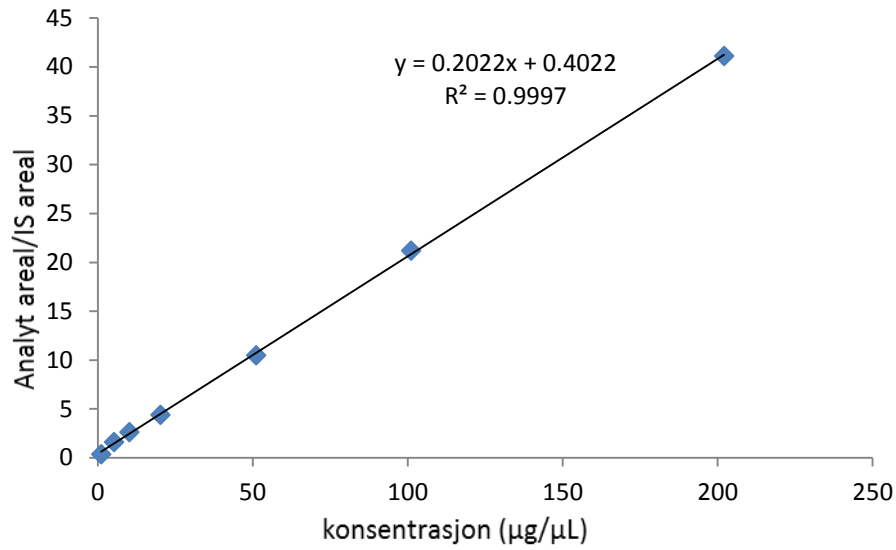
Figur 4.2.2. Kalibreringskurve for PFBA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



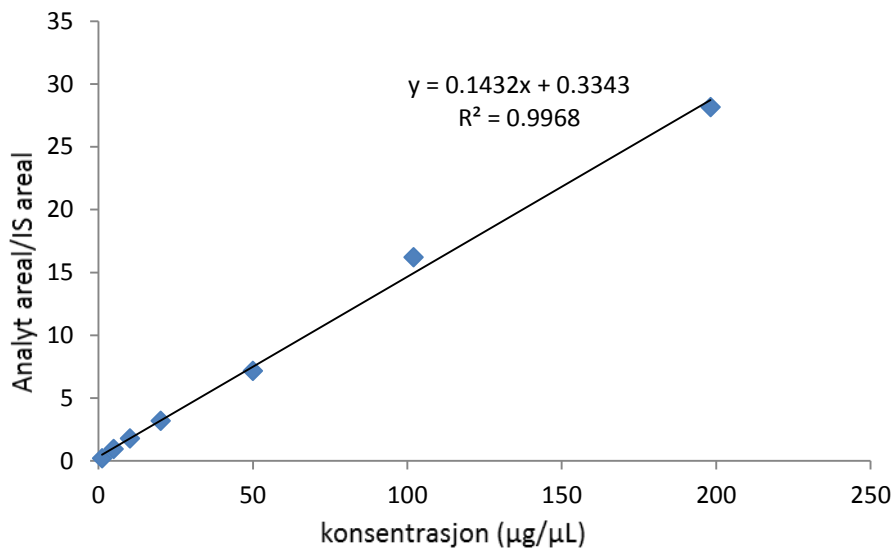
Figur 4.2.3. Kalibreringskurve for PFPeA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



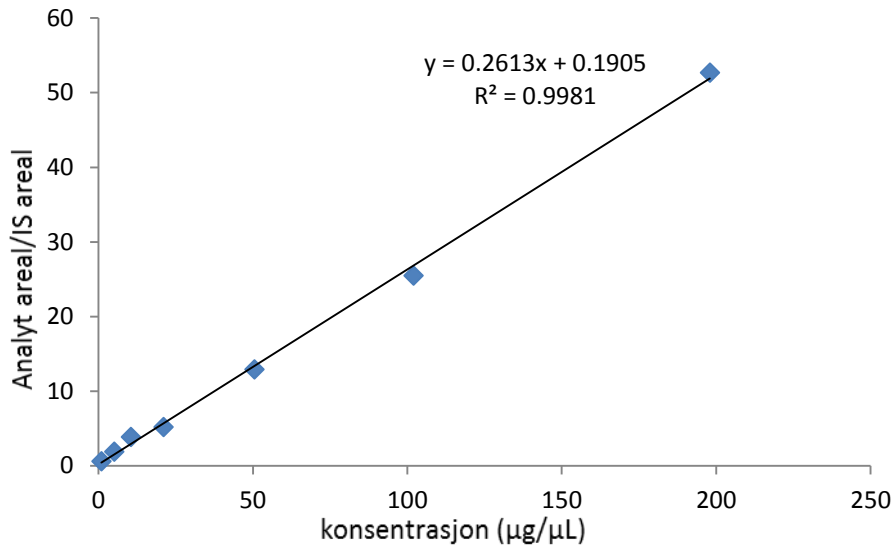
Figur 4.2.4. Kalibreringskurve for PFHxA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



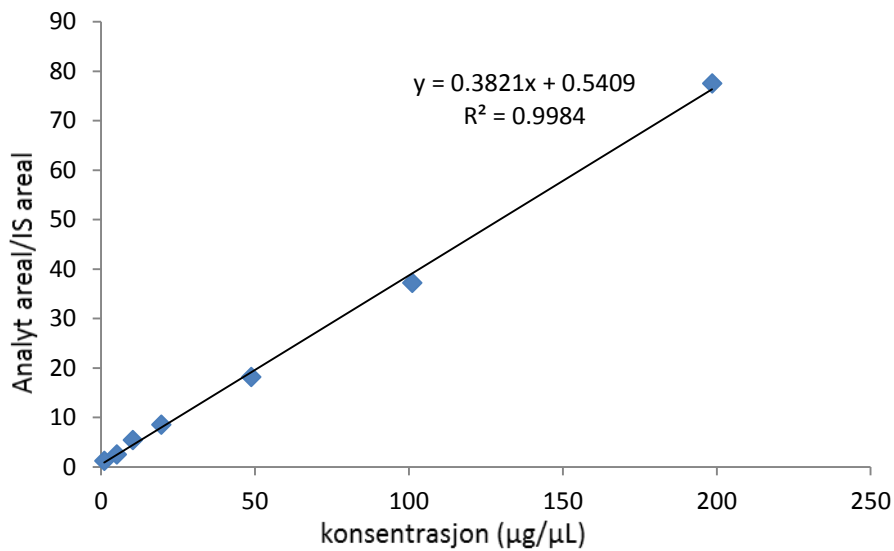
Figur 4.2.5. Kalibreringskurve for PFHpA. Konsentrasjon ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



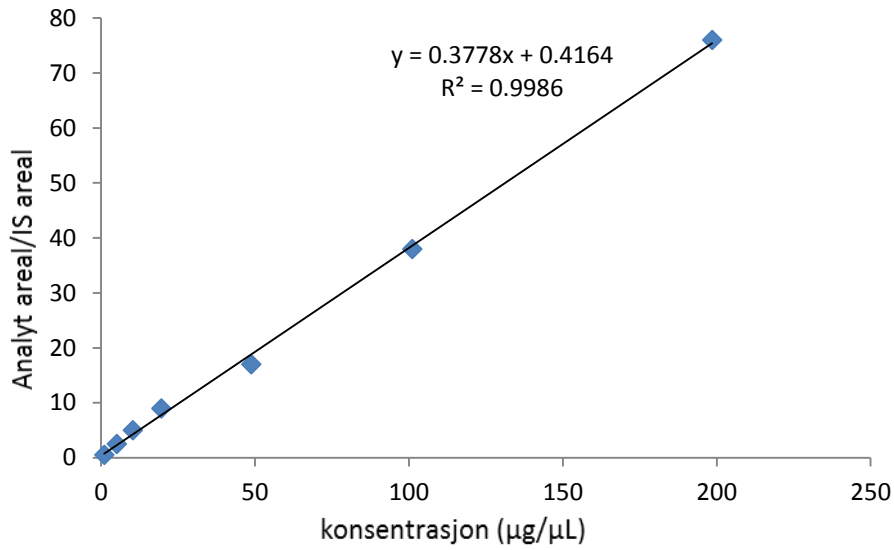
Figur 4.2.6. Kalibreringskurve for PFOA. Konsentrasjon ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



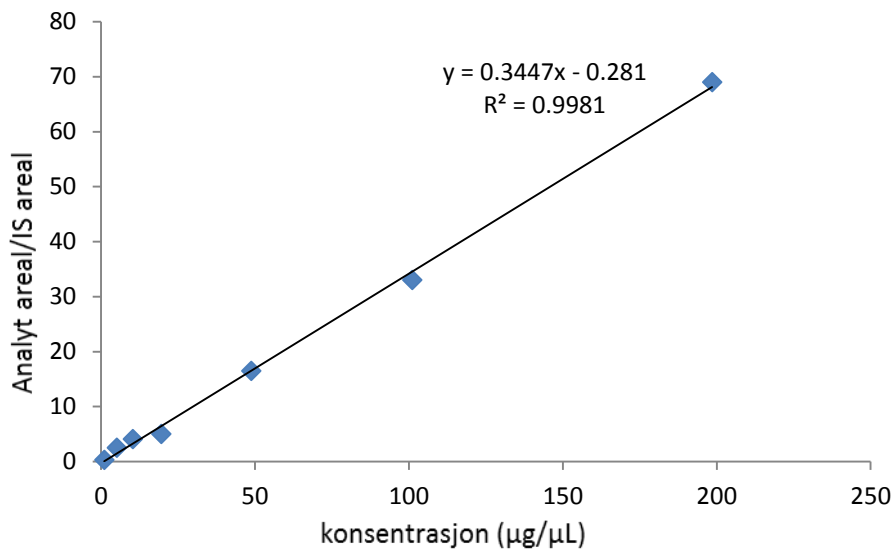
Figur 4.2.7. Kalibreringskurve for PFNA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



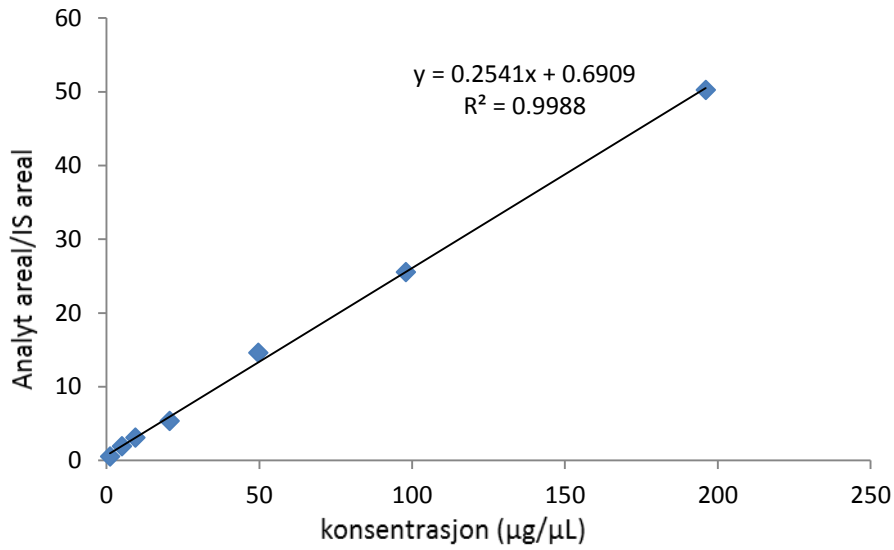
Figur 4.2.8. Kalibreringskurve for PFDA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



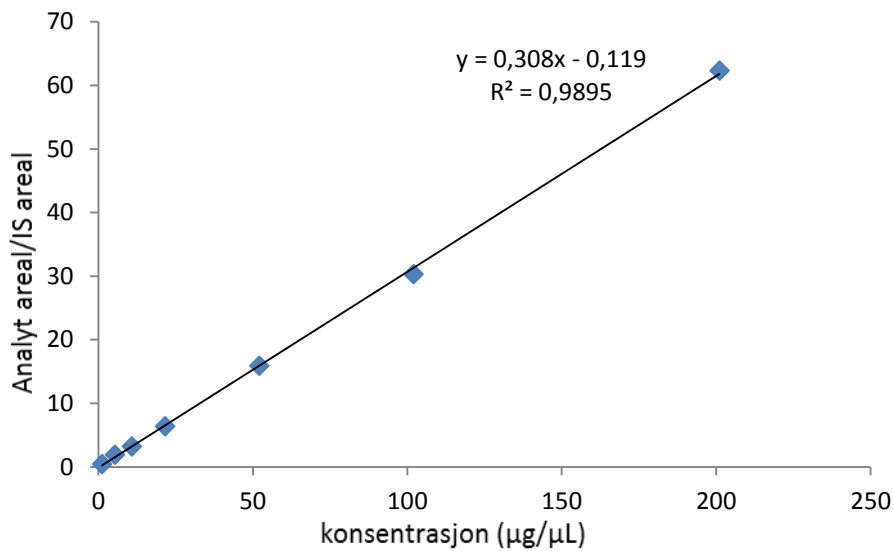
Figur 4.2.9. Kalibreringskurve for PFUnDA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



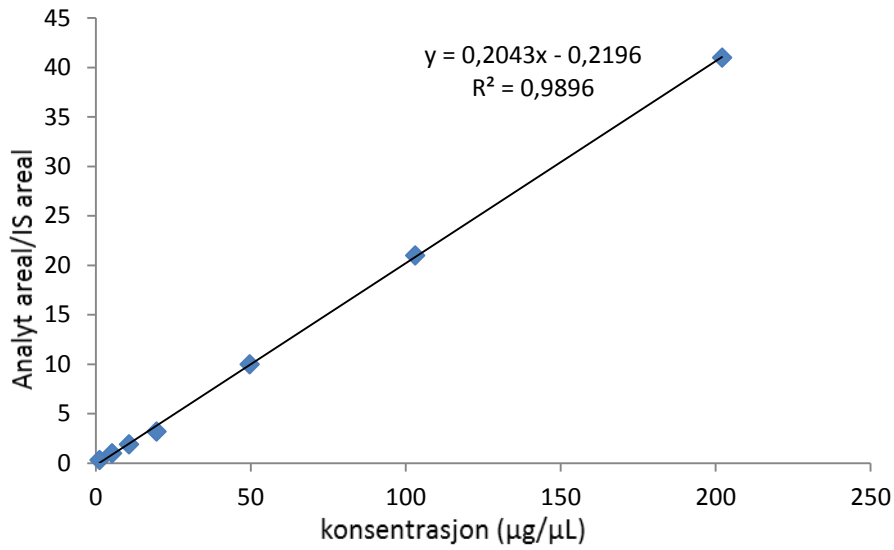
Figur 4.2.10. Kalibreringskurve for PFDoDA Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



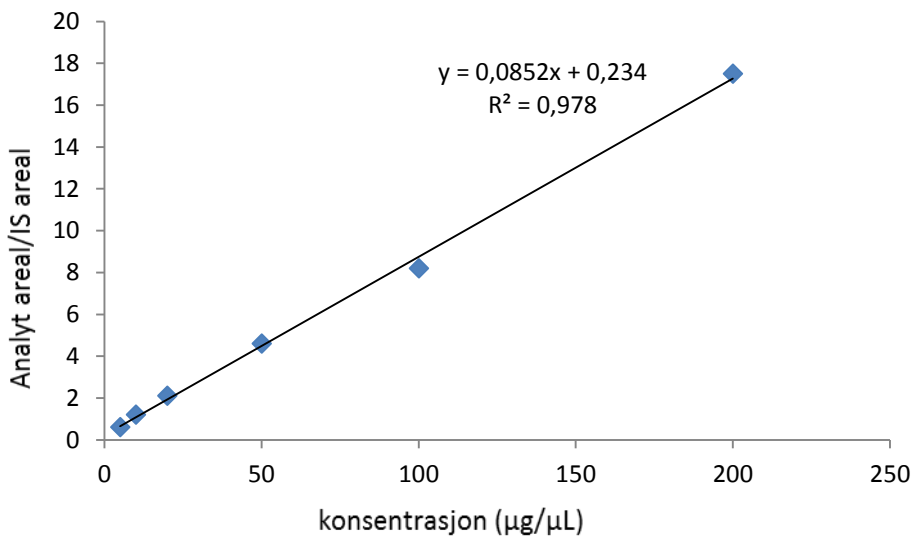
Figur 4.2.11. Kalibreringskurve for PFTTrDA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



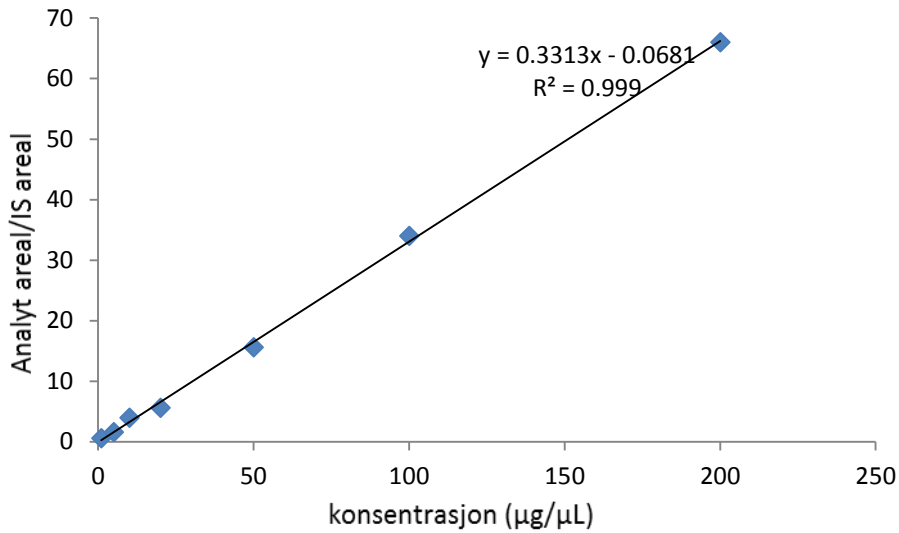
Figur 4.2.12. Kalibreringskurve for PFTeDA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



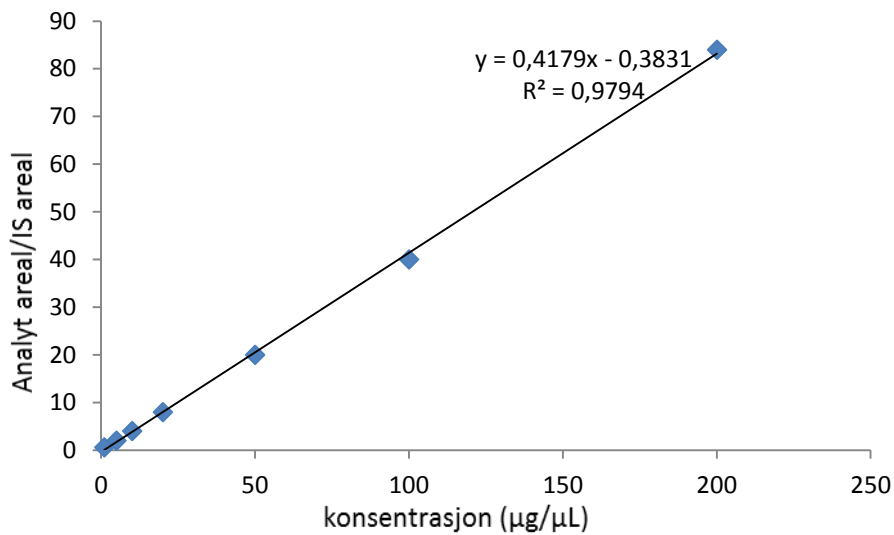
Figur 4.2.13. Kalibreringskurve for PFHxDA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



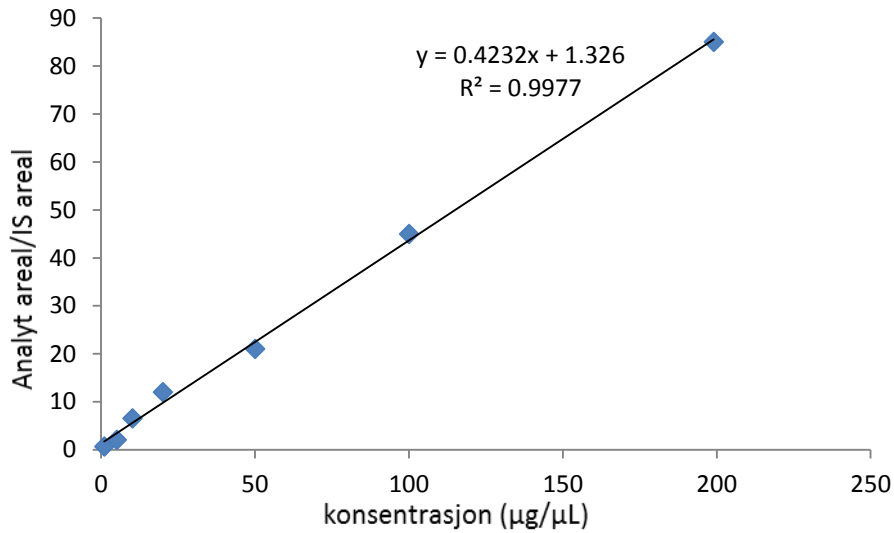
Figur 4.2.14. Kalibreringskurve for PFOcDA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



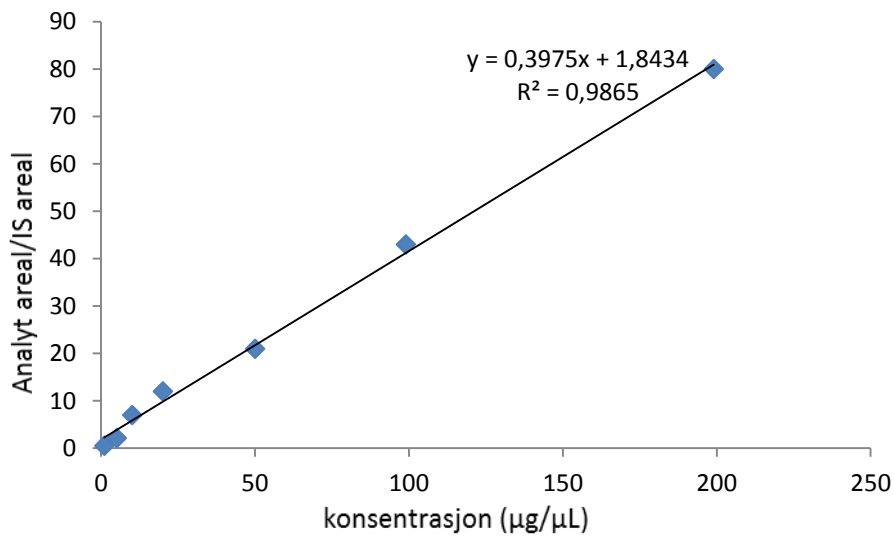
Figur 4.2.15. Kalibreringskurve for PFBS. Konsentrasjon ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



Figur 4.2.16. Kalibreringskurve for PFHxS. Konsentrasjon ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



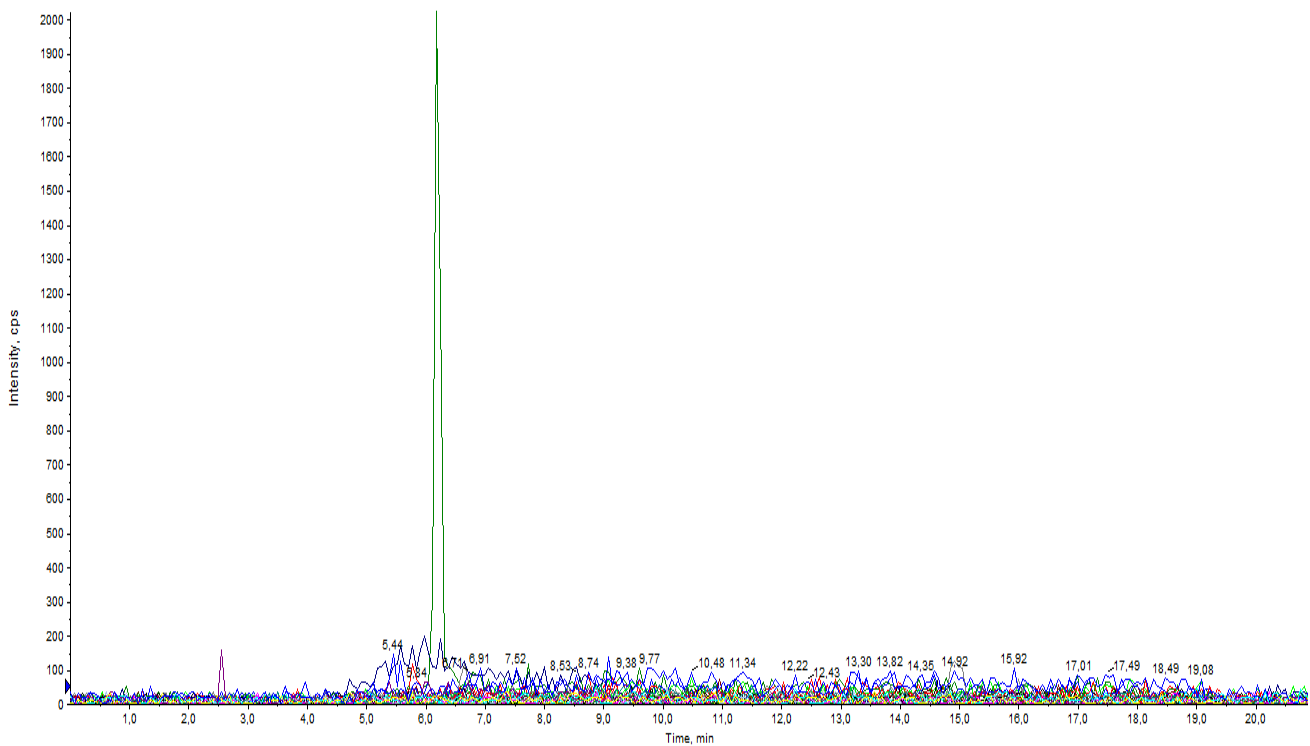
Figur 4.2.17. Kalibreringskurve for PFOSA. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).



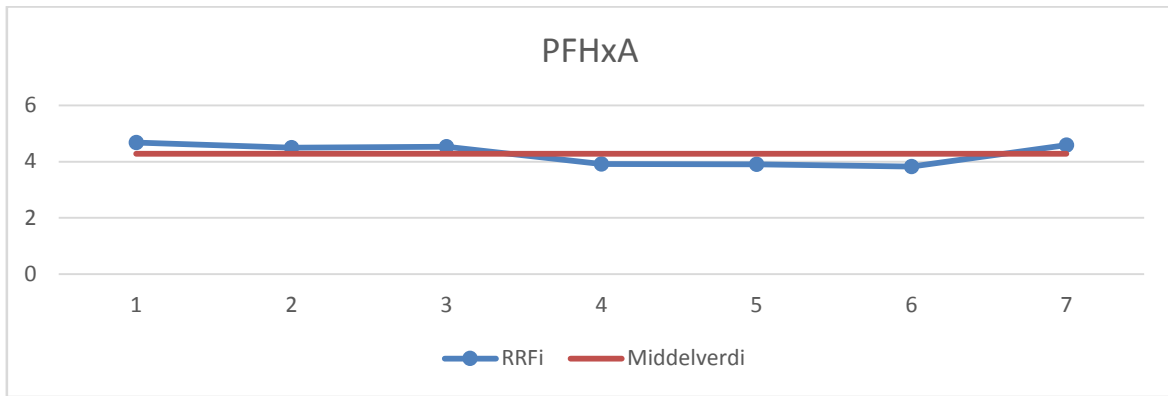
Figur 4.2.18. Kalibreringskurve for PFDS. Konsentrasjon (pg/µL) er plottet mot forholdstallet (arealet analytt/arealet intern standard).

Tabell. 4.2.1. De ulike PFAC standardene med deres interne standard.

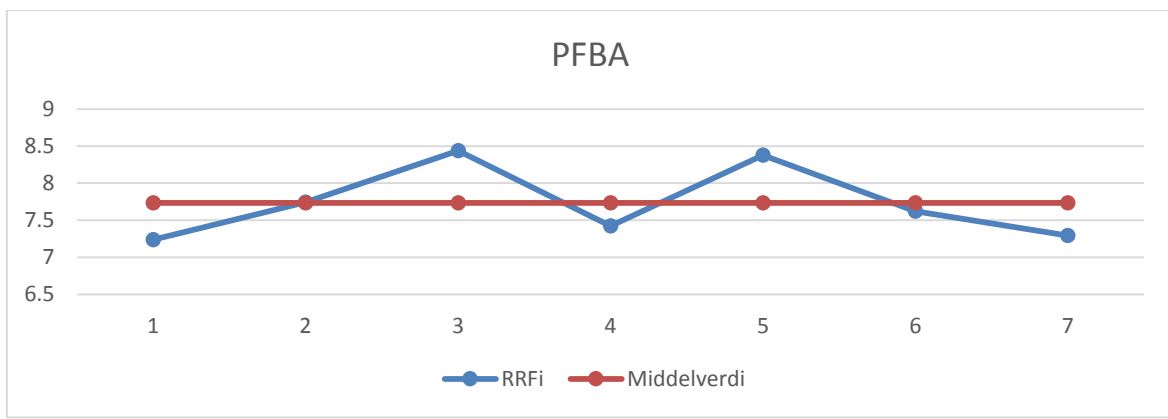
Standard	Intern standard
PFBA	MPFBA
PFPeA	MPFH _x A
PFH _x A	MPFH _x A
PFHpA	MPFOA
PFOA	MPFOA
PENA	MPFNA
PFDA	MPFDA
PFUnDA	MPFUnDA
PFDoDA	MPFDoDA
PFTTrDA	MPFDoDA
PFTeDA	MPFDoDA
PFH _x DA	MPFDoDA
PFOcDA	MPFDoDA
PFBS	MPFH _x S
PFH _x S	MPFH _x S
PFOS	MPFOS
PFDS	MPFOS
PFOSA	MPFOSA



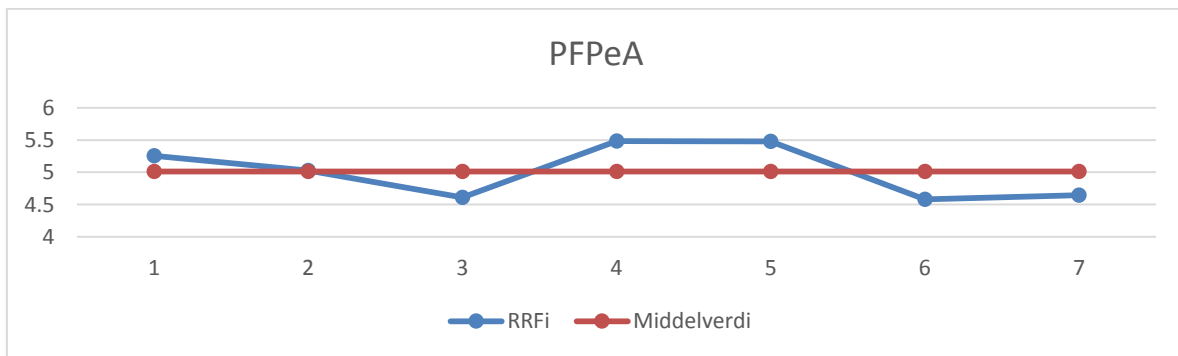
Figur 4.3.2. kromatogram av blankprøve for PFAS ved HPLC-MS/MS. Den intense toppen er PFOA.



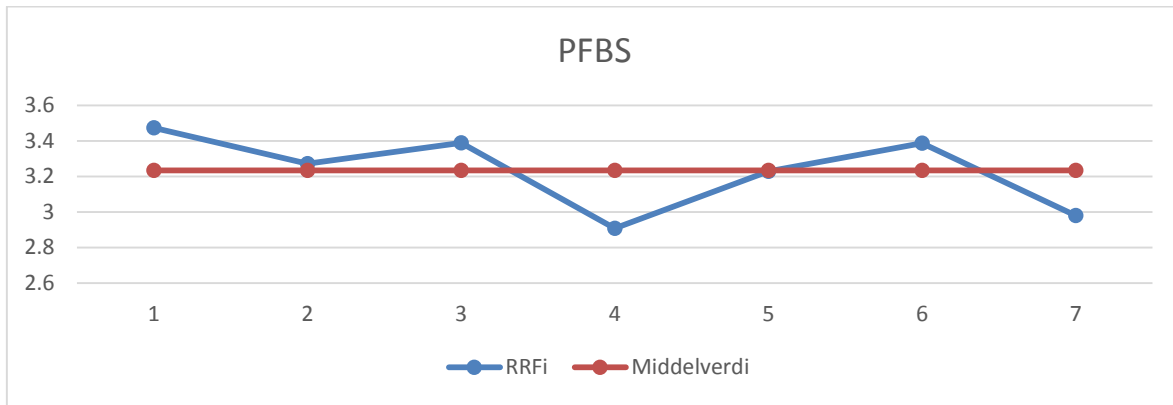
Figur 4.5.1. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFHxA



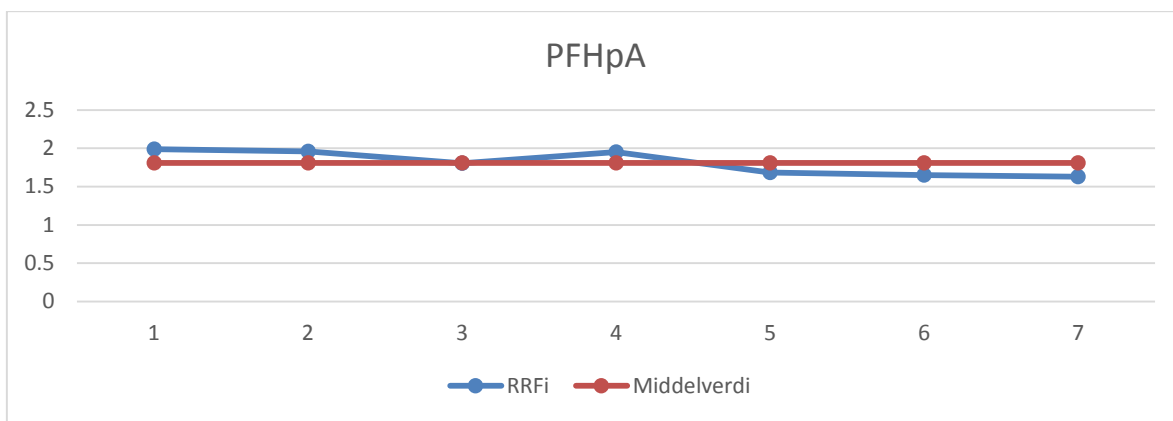
Figur 4.5.2. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFBA



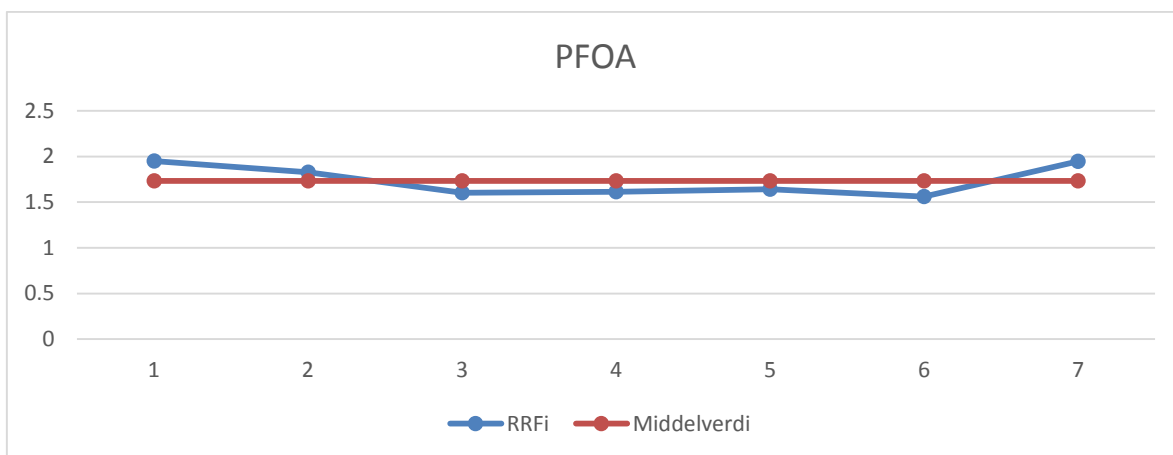
Figur 4.5.3. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFPeA



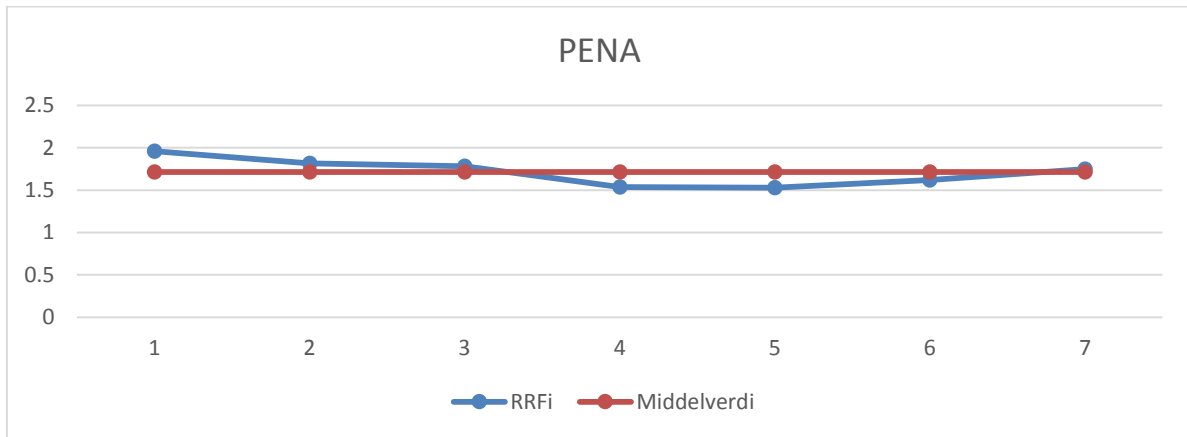
Figur 4.5.4. RRF_i med middelverdi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFBS



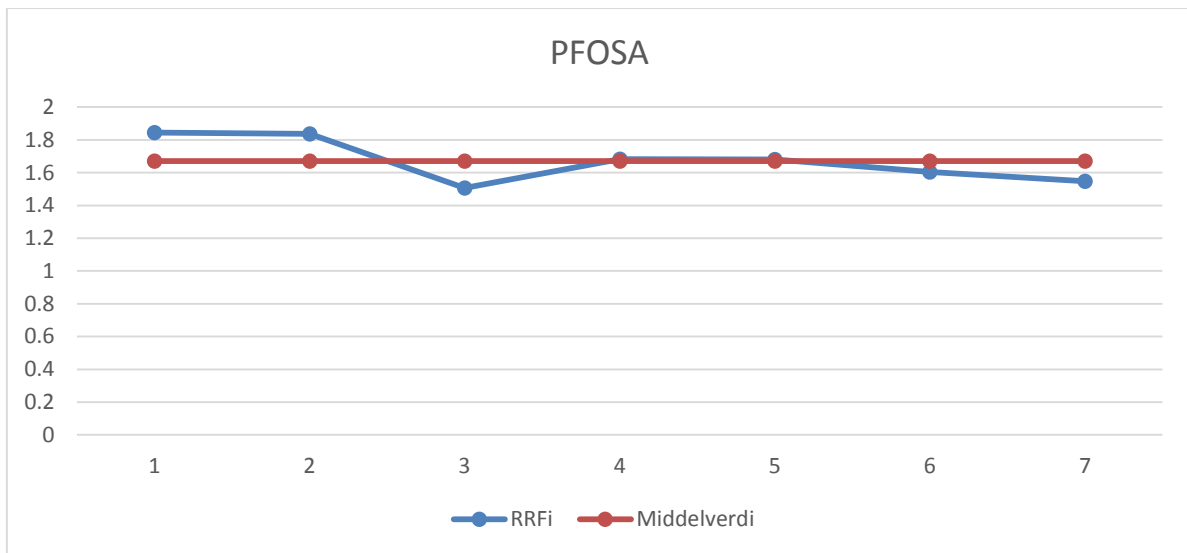
Figur 4.5.5. RRF_i med middelverdi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFHpA



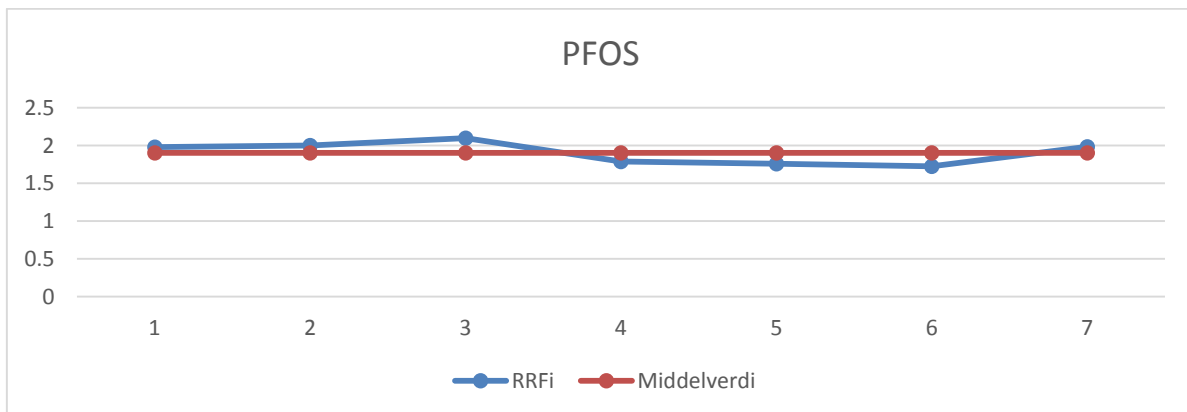
Figur 4.5.6. RRF_i med middelverdi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFOA



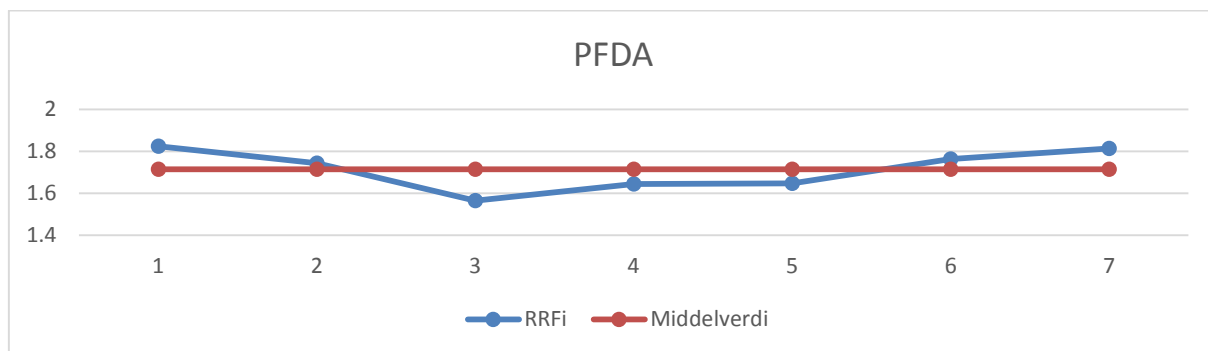
Figur 4.5.7. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PENA



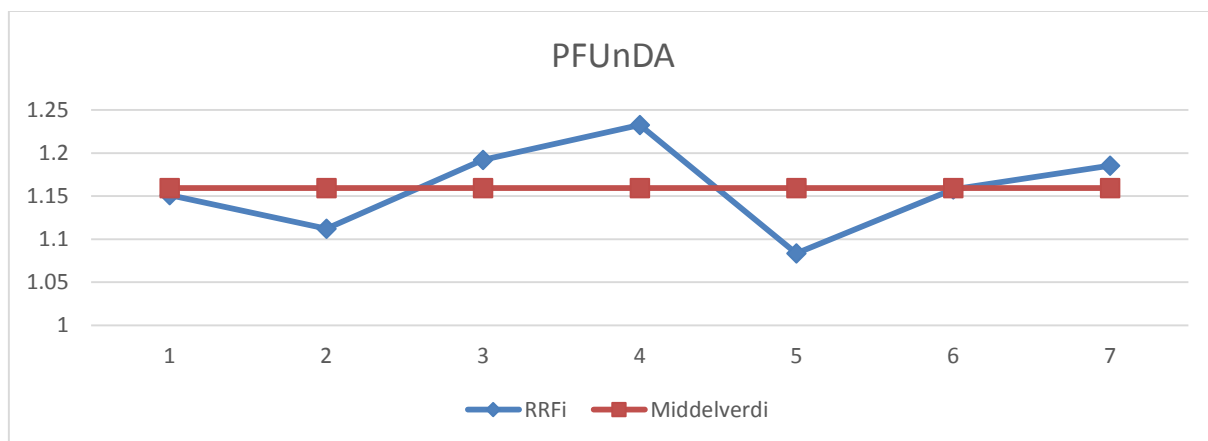
Figur 4.5.8. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFOSA



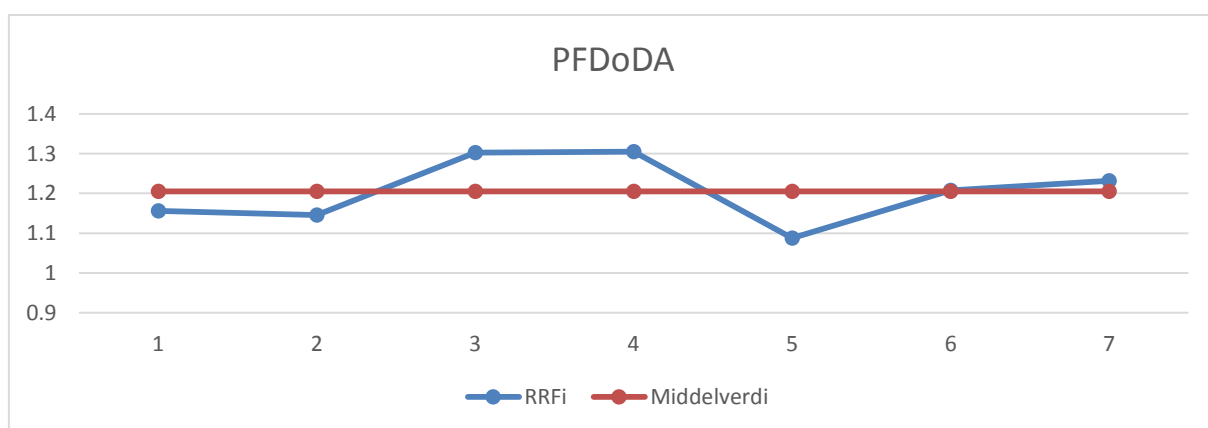
Figur 4.5.9. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFOS



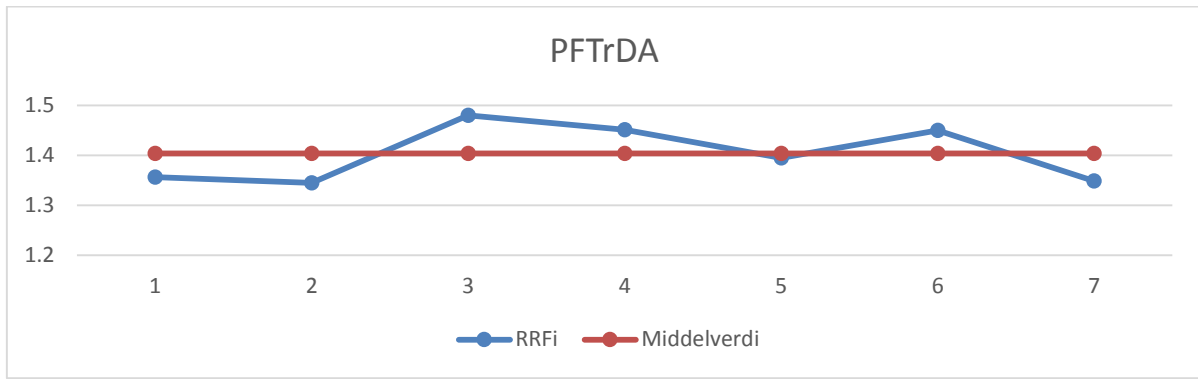
Figur 4.5.10. RRF_i med middelverdi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFDA



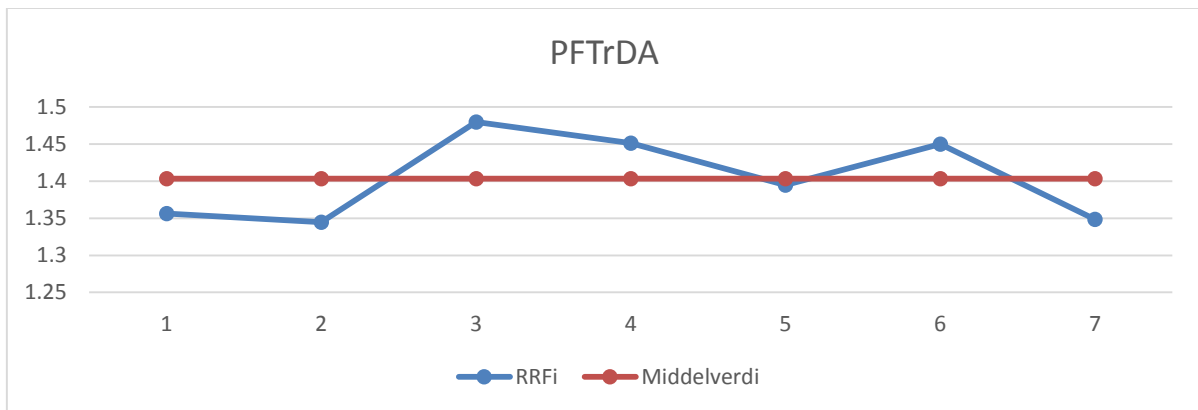
Figur 4.5.11. RRF_i med middelverdi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFUnDA



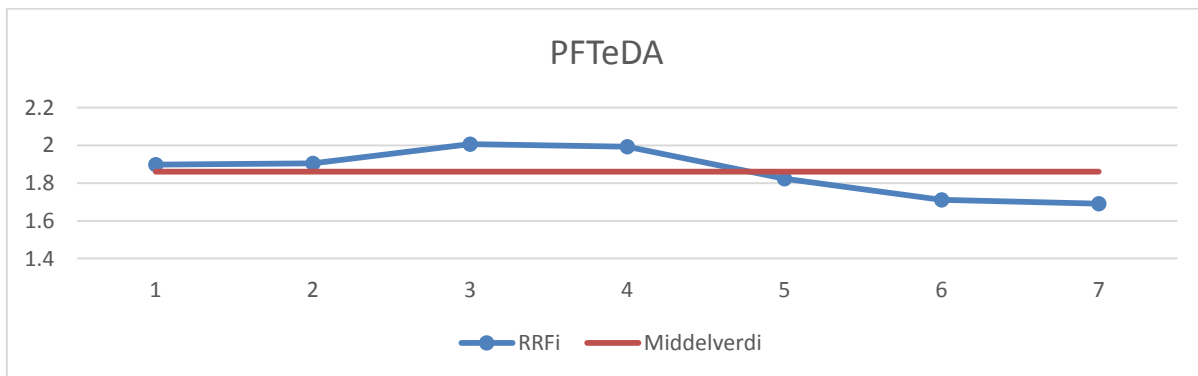
Figur 4.5.12. RRF_i med middelverdi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFDODA



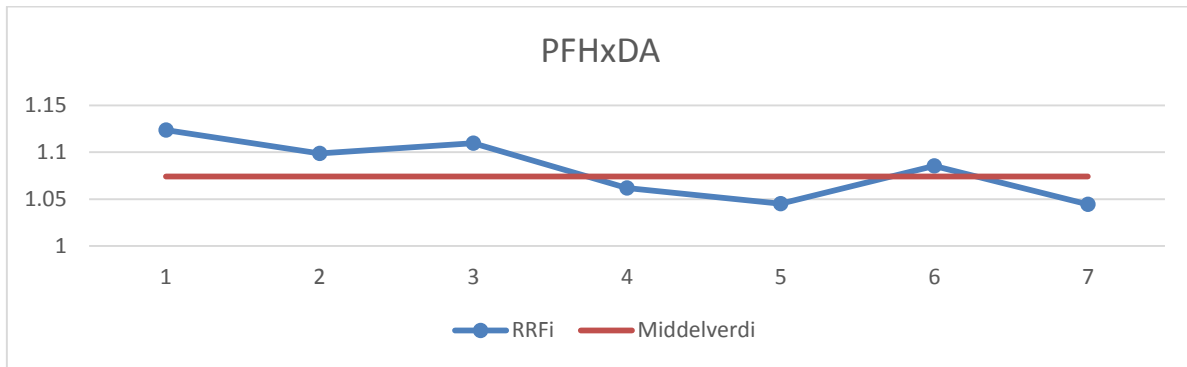
Figur 4.5.13. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFTTrDa



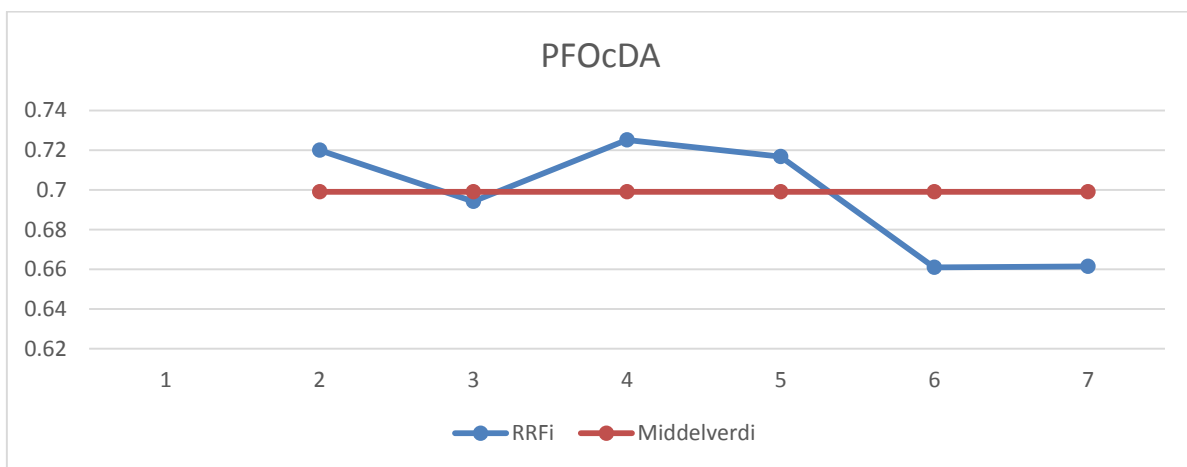
Figur 4.5.14. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFTTrDa



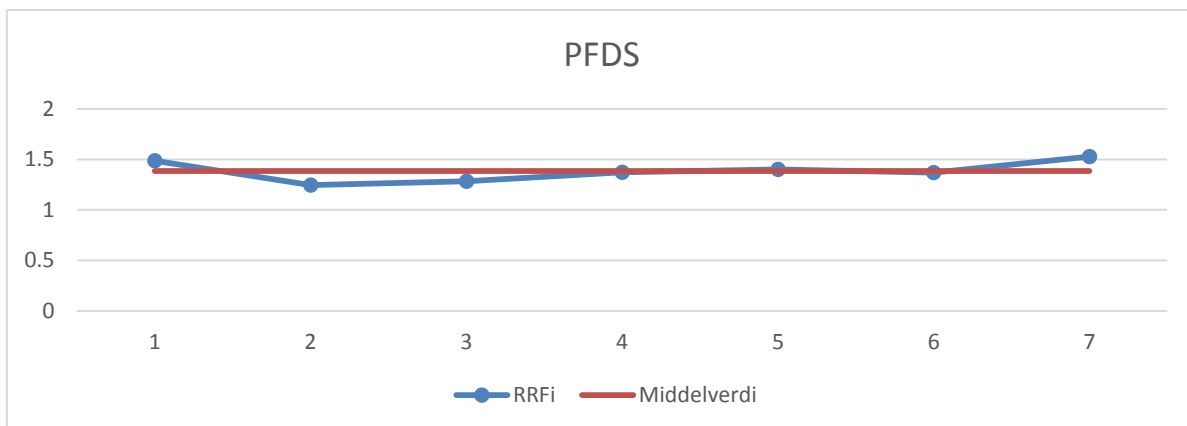
Figur 4.5.15. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFTTeDa



Figur 4.5.16. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFHxDA



Figur 4.5.17. RRF_i med middelveidi for standardene (5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFOcDA



Figur 4.5.18. RRF_i med middelveidi for standardene (1,5,10,20,50,100,200 pg/μL) til PFDS



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no