

**UTVIKLING AV EN BESTEMMELSESMETODE FOR ISOMERENE  
AV PERFLUOROKTYLSULFONAT (PFOS) I HUMANT SERUM  
BASERT PÅ LC-MS/MS.**

**METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF ISOMERIC  
PERFLUOROOCTYLSULFONATE (PFOS) IN HUMAN SERUM BASED ON  
LC-MS/MS.**

**SARA NAYAB NASEEM**

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIVITENSKAP

INSTITUTT FOR KJEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP  
MASTEROPPGAVE 30 SEP. 2011



## FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Folkehelseinstituttet (FHI), Avdeling for analytisk kjemi (MIAN) med godkjenning og veiledning fra en hovedveileder ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKMB) ved Universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB) høsten 2011. Oppgaven utgjør 30 studiepoeng for forfatteren og er en del av sivilingeniørprogrammet i kjemi og bioteknologi på til sammen 300 studiepoeng.

Dette er en analytisk kjemi-oppgave. Separasjon ble en større del av oppgaven enn det som var tiltenkt ved oppgavestart. Alle analysene har blitt utført ved FHI, MIAN.

Jeg vil gjerne takke veilederne Line Småstuen Haug og Georg Becher ved FHI og hovedveileder Roland Kallenborn fra IKMB for mange gode råd og konstruktive tilbakemeldinger, både underveis med det praktiske arbeidet og med skriving av oppgaven. Jeg vil også takke Azemira Sabaredzovic og Amrit Sakhi Kaur for uvurderlig hjelp med laboratoriearbeidet og for et hyggelig laboratoriemiljø.

En takk rettes også tilslutt til PHD student Enrique Cequier for innspill og ideer til arbeidet.

Oslo, Desember, 2011

---

Sara Nayab Naseem

## **SAMMENDRAG:**

I denne studien har det blitt utviklet og testet en metode for bestemmelse for isomerene til perfluoroktylsulfonat (PFOS) i humant serum basert på væskrokromatografi-massespektrometri (LC-MS/MS) som var bygget på en tidligere utviklet metode for PFOS. Seks isomere av PFOS har blitt analysert; 1-perfluormetylheptyl sulfonat (1m-PFOS), 2-perfluormetylheptyl sulfonat (2m-PFOS), 3-perfluormetylheptyl sulfonat (3m-PFOS), 4-perfluormetylheptyl sulfonat (4m-PFOS), 5-perfluormetylheptyl sulfonat (5m-PFOS), 6-perfluormetylheptyl sulfonat (6m-PFOS) samt lineær PFOS (L-PFOS). Disse ble kvalitativt analysert med kolonnesvitsjning system. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM (multiple reaction monitoring) og  $m/z$  499 ble benyttet som både foreldre og datterion. Kollisjonsenergi var 40 eV. Metoden for analyse av PFOS isomere ble utviklet ved Folkehelseinstituttet (FHI), Avdeling for analytisk kjemi. Standarder av PFOS isomere ble benyttet, for å teste separasjon av isomere i prøvene. Separasjon av isomere i standarder ble hoveddelen av studien. To forskjellige analytiske kolonner ble testet; FlouroSep RP octyl (PFO) kolonne og C30 kolonne for separasjon av isomerene. C30 kolonne ble funnet til å være uegnet for analyser av PFOS isomere i denne studien, og dette skyldes trolig for sterk adsorpsjon av PFOS isomerene på stasjonærfasen, dårlig separasjonsevne og mye "tailing" på kromatogrammene. PFO kolonne viste seg å gi best separasjon. Ettersom det ble funnet PFOS isomere i reelle prøvene, viste dette at analysemetoden var tilfredsstillende for å separere PFOS isomere i serumprøver.

Denne studien viste at separasjon av PFO isomerene var teknisk mulig. L-PFOS, 1m-PFOS eller 5m-PFOS, 3m-PFOS, 2m-PFOS eller 4m-PFOS og 6m-PFOS ble tilfredsstillende separert under arbeidet. Men koeluering mellom 2m og 4m-PFOS og 1m og 5m PFOS viste at optimering og modifisering av metoden er nødvendig for framtidige undersøkelser.

## ABSTRACT

A new method has been developed and tested, aiming at the determination and identification of isomers of perfluorooctylsulfonate (PFOS) in human serum. The method development developed for liquid chromatography- triple quadruple mass spectrometry (LC-MS/MS) as quantization tool. Well established methods for the quantitative methods of unbranched PFOS were available at the institute for further adaptations. Six isomers of PFOS have been analyzed, 1-perfluoromethylheptyl sulfonate (1m-PFOS), 2-perfluoromethylheptyl sulfonate (2m-PFOS), 3- perfluoromethylheptyl sulfonate (3m-PFOS), 4-perfluoromethylheptyl sulfonate (4m-PFOS), 5-perfluoromethylheptyl sulfonate (5m-PFOS), 6-perfluoromethylheptyl sulfonate (6m-PFOS) and linear perfluorooctylsulfonate (L-PFOS). The selected target PFOS isomers were analyzed with standard column switching LC-MS/MS in the “pseudo” MRM (multiple reaction monitoring) and  $m/z$  499 was used both as parent and daughter ion. Collision energy was 40 eV. The method for analysis of PFOS isomers was developed entirely at The Norwegian Institute of Public Health (FHI), Department of Analytical Chemistry. Well characterized standard mixtures of PFOS isomers were used to test the separation of isomers in the samples as the major topic of the here presented MSc project. Two different analytical columns for PFOS isomers separation and quantification were tested; FluoroSep RP octyl (PFO) column and C30-column. C30-column was not suitable for quantitative analysis of PFOS isomers in this study; this is probably due to the additional absorption to the stationary phase, poor separation ability and lots of tailing in the chromatograms. PFO column proved to give better separation. Since the concentrations of PFOS isomers were identified, the here obtained results confirmed that the final analytical method is sufficient to separate the target PFOS isomers in serum samples. Although all target isomers were identified, further method optimization of the methods is still required since coelution between 2m and 4m-PFOS as well as 1m and 5m-PFOS occurred.

## **FORKORTELSER**

|                     |  |
|---------------------|--|
| <sup>19</sup> F NMR | <sup>19</sup> F nuclear magnetic resonance             |
| CE                  | kollisjonsenergi                                       |
| ECF                 | elektrokjemisk fluorering                              |
| ESI                 | elektrospray ionisering                                |
| FHI                 | Folkehelseinstituttet                                  |
| FOSA                | perfluoroktan sulfonamid                               |
| FOSE                | perfluoroktan sulfonamideretanol                       |
| GC                  | gasskromatografi                                       |
| LC                  | væskeskromatografi                                     |
| LC-MS/MS            | væskeskromatografi-trippel kvadrupol massespektrometri |
| MRM                 | multiple reaction monitoring                           |
| MS                  | massespektrometri                                      |
| PFAS                | per- og polyfluoreerte alkylstoffer                    |
| PFO                 | FlouroSep RP Octyl                                     |
| PFOS                | perfluor oktansulfonat                                 |
| POSF                | perfluoroktan sulfonylfluorid                          |
| POP                 | persistent organic pollutant                           |
| SIM                 | selective ion monitoring                               |
| SPE                 | fastfase ekstraksjon                                   |
| TOF                 | time of flight   |

For forkortelser av PFOS isomere se Tabell 1.

# INNHold

|   |           |
|---|-----------|
| FORORD .....  | i         |
| SAMMENDRAG:.....  | ii        |
| ABSTRACT.....   | iii       |
| FORKORTELSER.....   | iv        |
| <b>1. INTRODUKSJON .....</b>                                    | <b>1</b>  |
| 1.1 Bakgrunn for studie.....                                    | 1         |
| 1.2 Per- og polyfluoreerte alkylstoffer (PFAS).....             | 2         |
| 1.2.1 Generelt .....  | 2         |
| 1.2.2 Produksjon.....   | 2         |
| 1.2.3 PFOS.....   | 3         |
| 1.2.4 Toksikologi.....  | 5         |
| 1.2.5 Begrensninger og utfordringer.....                        | 5         |
| 1.2.6 Menneske eksponering .....                                | 6         |
| 1.2.7 PFOS relaterte isomerer.....                              | 7         |
| 1.3 Analyse av PFOS .....                                       | 7         |
| 1.3.1 Kolonnesvitsjing.....                                     | 8         |
| 1.3.2 Separasjon.....   | 8         |
| 1.3.3 Deteksjon.....  | 10        |
| <b>2. MATERIALER OG METODER.....</b>                            | <b>12</b> |
| 2.1 Kjemikalier:.....   | 12        |
| 2.2 Utstyr.....   | 13        |
| 2.3 Utvikling av metode .....                                   | 13        |
| 2.3.1 Tillaging av standardløsninger .....                      | 13        |
| 2.3.2 Testing av masseoverganger.....                           | 13        |
| 2.3.3 Testing av kollisjonsenergi.....                          | 14        |
| 2.3.4 Testing av skanntid.....                                  | 14        |
| 2.3.5 Utprøving av C30 kolonne .....                            | 14        |
| 2.3.6 Utprøving av PFO kolonne.....                             | 14        |
| 2.4 Endelig optimert metode .....                               | 15        |
| 2.4.1 Prøveopparbeidelse av serum for bestemmelse av PFAS ..... | 15        |
| 2.4.2 Tilkobling av kolonnesvitsjing system.....                | 15        |
| 2.4.3 Automatiske kolonnesvitsjing system .....                 | 15        |
| 2.4.4 Instrumentelle betingelser: .....                         | 16        |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.    | RESULTATER OG DISKUSJON .....  | 20 |
| 3.1   | Resultater fra testing av masseoverganger, kollisjonsenergi og skanntid.....                                 | 20 |
| 3.1.1 | Resultater fra testing av masseoverganger og kollisjonsenergi.....   | 20 |
| 3.1.2 | Resultater fra testing av skanntid.....  | 20 |
| 3.2   | Resultater for PFO kolonne før tilkobling av for-kolonne.....  | 21 |
| 3.3   | Resultater fra PFO kolonne etter tilkobling av for-kolonne.....  | 25 |
| 3.3.1 | Resultater for forsøk med PFO kolonne tilkoblet for-kolonne for enkle isomere.                               | 25 |
| 3.3.2 | Resultater for forsøk med PFO kolonne tilkoblet for-kolonne for blanding av alle utvalgte forbindelser ..... | 27 |
| 3.3.3 | Forsøk med PFO kolonne tilkoblet for-kolonne for reelle serum prøver .....                                   | 28 |
| 3.4   | Resultater fra C30 kolonne.....  | 31 |
| 3.4.1 | Resultater for forsøk med C30 kolonne ved pH 4.....  | 31 |
| 3.4.2 | Resultater fra forsøk med C30 kolonne ved pH 7 .....   | 32 |
| 3.5   | Diskusjon av analyseresultater .....   | 34 |
| 4.    | KONKLUSJON .....   | 36 |
| 5.    | VIDERE ARBEID .....  | 37 |
| 5.1   | Videre utvikling av metoden .....  | 37 |
| 5.2   | Kvantifisering av metoden .....  | 37 |
| 5.3   | Analysering av prøvene.....  | 37 |
|       | REFERANSER.....  | 38 |
|       | VEDLEGG:.....  | 44 |

# 1. INTRODUKSJON

## 1.1 Bakgrunn for studie

I de siste 50 årene har per- og polyfluorerte alkylstoffer (PFAS) blitt brukt i mange ulike produkter som for eksempel i smøremidler, maling, matvareinnpakking, impregnering av overflater (for eksempel tekstiler) og brannslukningsskum (1). Bekymring rundt bruk av disse stoffene oppstod rundt årtusenskiftet da et av stoffene kalt perfluor oktansulfonat,  $C_8F_{17}SO_3^-$  (PFOS) ble funnet i miljøprøver verden over, også i Arktis, og i blodet til mennesker (2). I ettertid har det blitt utført mye forskning på denne gruppen miljøforurensinger. Blant annet har dyreforsøk vist at stoffene kan ha uheldige effekter på reproduksjon og utvikling (3;4). Det er så langt ikke entydig påvist effekter på mennesker.

PFAS har hovedsakelig blitt produsert ved hjelp av to produksjonsprosesser. Den ene, elektrofluorering, som gir produkter med varierende kjedelengde og også forgrenede kjeder. Den andre prosessen, telomerisering, gir kun produkter med rettlinjede kjeder. De to produksjonsprosessene til sammen gir PFOS både i lineær og forgrenede form (5).

Menneskers eksponering for PFAS kan skje gjennom mat, drikke, støv og luft samt direkte kontakt med produkter som inneholder slike stoffer (6). I en studie av Benskin o.a. ble det fremsatt en hypotese om at informasjon om isomerprofilen til PFOS i serum kan være et verdifullt redskap for å kartlegge kilder til PFOS eksponeringen (7). I en ny studie (BROFLEX prosjekt) har det blitt funnet at mat generelt er den viktigste kilden til vår eksponering for PFAS (6). Men det relative bidraget fra innemiljøet kan variere mye mellom individer og kan til dels være betydelig (6).

Analysemetoden som ble benyttet ved Folkehelseinstituttet (FHI) til bestemmelse av PFAS i serum kunne skille mellom lineær-PFOS (L-PFOS) og forgrenet-PFOS, men den kunne ikke skille de ulike forgrenede isomerene. I den tidligere nevnte BROFLEX studien ble det funnet en statistisk sammenheng mellom andelen forgrenet PFOS i serum og den relative andelen av PFOS fra inhalasjon av luft (6). Denne sammenhengen ble undersøkt nærmere ved å bestemme de enkelte PFOS isomere (lineær og forgrenede) i human serum.

En metode for bestemmelse av isomerer av PFOS ble utviklet basert på væskechromatografi-trippel kvadrupol massespektrometri (LC-MS/MS), og denne metoden ble brukt på



serumprøver fra BROFLEX studien (6). Metoden som ble brukt under denne studien var hentet fra en studie av Haug o.a. (8).

## 1.2 Per- og polyfluorerte alkylstoffer (PFAS)

### 1.2.1 Generelt

I de siste 50 årene har PFAS vært brukt i mange industrielle prosesser (se innledning). Fluor-organiske kjemikalier har en eller flere karbon-hydrogen (C-H) bindinger erstattet med karbon-fluor (C-F) bindinger, dette fører til at disse stoffene får unike kjemiske og fysiske egenskaper; disse er amfifobe (hydrofobe – og oleofobe) svært stabile (C-F bindingen er termodynamisk de mest stabile bindingene), frastøtter vann og olje, er stabile under sterkt sure og basiske forhold, og har et høyt overflatespenning-nedsettende potensial. Disse egenskapene gjør fluor-organiske forbindelser godt egnet for overflatebehandling som maling, lakk, voks og lignende (2).

PFAS består enten av en delvis eller fullstendig fluorert alkylkjede med typisk mellom 4 og 18 karbonatomer og en polar funksjonell gruppe på enden av alkylkjeden. PFAS kan deles i to klasser; ioniske som har en sur funksjonell gruppe og nøytrale som har en polar, ikke ionisk funksjonell gruppe. I perfluorerte kjemikalier, er alle C-H bindinger erstattet med C-F bindinger(2).

Som nevnt tidligere begynte bekymringer om bruken av PFAS rundt år 2000, da PFOS ble funnet i miljøprøver fra mange steder i verden som også inkluderer humane blod (2). Deretter har det vært en god del internasjonal forskning på PFAS og så deres effekter, mest på dyr (3;9).

### 1.2.2 Produksjon

De to hovedprosesser for produksjon av PFAS er:

1. Elektrokjemisk fluorering (ECF) (for PFOS: 70 % lineær, 30 % forgrenet)

ECF er en grov prosess som fører til en kompleks blanding av lineære og forgrenede isomere med varierende kjedelengde. Hovedproduktet for denne prosessen er perfluoroktan sulfonyl fluorid (POSF), og er en forløper for produksjon av PFOS og nøytrale sulfonamider (5). En blanding av ca. 70 % av lineær og 30 % av forgrenede isomere av PFOS har blitt målt ved <sup>19</sup>F

NMR ( $^{19}\text{F}$  Nuclear Magnetic Resonance) spektroskopi i produkter fra hovedprodusenten 3M Co (10).

### 2. Telomerisering (100 % lineær)

Syntese av PFAS kan også gjøres ved telomerisering som involverer reaksjon av intermedietet perfluoralkyljodetan med tetrafluoretylen. Produktet består bare av lineære PFAS med partall antall av fluorente karboner (5).

### 1.2.3 PFOS

Strukturen av PFOS forbindelser kan enten være lineær eller forgrenet, se Tabell 1. Det finnes 89 mulige isomere av PFOS (11). Interessen om å finne ut mer om eksponeringskilder og toksisitet har vekket en del interessen om videre forskning på forgrenede isomere (12;13).

*Tabell 1: Kjemisk strukturer av 6-perfluormetylheptylsulfonat (6m-PFOS), 5-perfluormetylheptylsulfonat (5m-PFOS), 4-perfluormetylheptylsulfonat (4m-PFOS), 3-perfluormetylheptyl-sulfonat (3m-PFOS), 2-perfluormetylheptylsulfonat (2m-PFOS), 1-perfluormetylheptylsulfonat (1m-PFOS) og lineær-perfluoroktylsulfonat (L-PFOS) (14).*

| IUPAC nomenklatur             | Forkortelser | Struktur   |
|-------------------------------|--------------|--|
| 6-perfluormetylheptylsulfonat | 6m-PFOS      | <p style="text-align: center;">6-CF<sub>3</sub>-PFOS</p> |
| 5-perfluormetylheptylsulfonat | 5m-PFOS      | <p style="text-align: center;">5-CF<sub>3</sub>-PFOS</p> |
| 4-perfluormetylheptylsulfonat | 4m-PFOS      | <p style="text-align: center;">4-CF<sub>3</sub>-PFOS</p> |
| 3-perfluormetylheptylsulfonat | 3m-PFOS      | <p style="text-align: center;">3-CF<sub>3</sub>-PFOS</p> |
| 2-perfluormetylheptylsulfonat | 2m-PFOS      | <p style="text-align: center;">2-CF<sub>3</sub>-PFOS</p> |
| 1-perfluormetylheptylsulfonat | 1m-PFOS      | <p style="text-align: center;">1-CF<sub>3</sub>-PFOS</p> |
| Lineær-perfluoroktylsulfonat  | L-PFOS       | <p style="text-align: center;">L-PFOS</p>                |

Dyreforsøk har vist seg at det hovedsaklige opptaket av PFAS skjer gjennom inhalasjon og oral administrasjon (1;4). Den oleofobiske naturen til PFAS fører til disse ikke lagres i fettvev, men heller til proteiner som albumin og fettsyrebindende proteiner i kroppen (15). Lever som er målorgan for slike stoffer (1). Det finnes også høye konsentrasjoner av PFAS i blod og nyrer (1;16;17). Farmakokinetikk data tyder på at blodprøver er det beste alternativet for analyse av intern eksponering av PFAS (18).

Mennesker utskiller PFAS veldig sakte i forhold til andre arter, og det skjer stort sett gjennom urinen (1). Elimineringstid avhenger av art, kjønn og karbon kjedelengden i stoffene (3). Ioniske PFAS utskilles sakte gjennom urin og metaboliseres ikke (1). Elimineringstid av PFOS kan ta flere år (19). I en studie av pensjonerte fluorkjemisk produksjonsarbeidere viste det seg at den geometriske gjennomsnittlige halveringstid for PFOS er 4,8 år (19).

### **1.2.4 Toksikologi**

I flere dyrestudier har blitt demonstrert at PFAS har toksikologiske effekter på lever, utviklingsevne, hormoner, immunforsvaret, og i tillegg kan disse stoffene være kreftfremkallende (3;4). For eksempel, gjentatte dosering studier av PFOS i gnagere og ikke humane primater indikerer et potensial til å redusere kroppsvekt og kroppsvekts økning, økning i lever vekt, og redusert serum kolesterol (6).

Flere epidemiologiske studier har prøvd å finne ut sammenhengen mellom eksponering og helseeffekter av ioniske PFAS. Denne sammenhengen har blitt testet for sukkersyke, kardiovaskulære sykdommer, kolesterol nivå, skjoldbruskkjertelen funksjonen, immunsystemet, leverfunksjonen, nyrefunksjonen, sex hormoner og reproduktivitetsevne, men disse studiene har ikke bekreftet en tydelig sammenheng mellom eksponering av PFAS og disse helseeffektene (20;21).

### **1.2.5 Begrensninger og utfordringer**

Siden PFOS er persistent, bioakkumulerende, toksisk og kan transporteres langt, har både PFOS og dens forløpere blitt regulert både nasjonalt og internasjonalt (23-25). Siden 2002 har ikke PFOS blitt produsert av sin tidligere hovedprodusent 3M Co i USA(22). I 2009 ble PFOS inkludert i liste over regulerte kjemikalier med anbefalinger til globale produksjonsbegrensninger, siden PFOS tilfredsstiller kriteriene for "Stockholm Convention on

Persistent Organic Pollutants” (POPs) (23). Samme type regulatoriske tiltak har blitt tatt i den Europeiske Unionen (24). I Norge er PFOS forbudt (25).

Det finnes mange PFAS som kan omdannes til PFOS. Slike stoffer er PFOS forløpere eller beskrives som PreFOS (13). Det er derfor vanskelig å stoppe eksponering av PFOS bare ved å begrense PFOS produksjon, fordi slike PreFOS også kan transformeres til PFOS (13).

POSF er utgangspunkt for produksjon av PFOS og ulike typer av perfluoroktan sulfonamider (FOSA) (13). Et eksempel på forløpere som kan nedbrytes til PFOS er perfluoroktan sulfonamidetanol (FOSE) alkoholer og akrylater som er brukt mye for papir beskyttelse og tekstil behandlinger (26). Flyktige forløpere som FOSE har blitt funnet i luft (27). Det er et behov for mer forskning på dette feltet som kan hjelpe til med regulatoriske tiltak mot PreFOS (13).

### 1.2.6 Menneske eksponering

Menneske eksponering for PFAS kan skje på ulike måter; gjennom kosthold, støv, luft og hudkontakt (6). Maten vi spiser kan være forurenset av PFAS på flere måter; kjøttet vi spiser kan være forurenset av PFAS i fôret dyrene har spist (28). Emballasjen på ferdig pakket mat kan også inneholde PFAS og disse kan derfor tas opp i maten (28;29). Konsentrasjoner i ng / L til µg/L nivå av PFOA er rapportert i drikkevann i nærheten av forurenset industriområder der PFAS er i bruk (30;31). En norsk studie har vist at mat er den viktigste kilde til menneske eksponering av PFOS (32). En annen norsk studie som inkluderer serumprøver fra 175 personer viste at fisk og skalldyr er hovedkilder til inntak av PFAS gjennom kosthold (33). Det har også vært undersøkelser som viser at rensing av drikkevann med de metodene som benyttes i dag, ikke fjerner PFAS effektivt.

Siden PFAS finnes i mange vanlige forbrukerprodukter, vil stoffene også kunne finnes i inneluft og husstøv. Konsentrasjoner av PFAS er høyere i innendørs luft enn utendørs luft (34). I en studie ble det funnet PFOS konsentrasjoner mellom 2,3 - 5065 ng/g støv (35).

Det har blitt vist at PreFOS kan bidra med 2-80 % av eksponeringen for PFOS (36). Men kun en studie har så langt utført isomerspesifikk bestemmelse av PFOS i husstøv (37). En slik metode kan imidlertid være et viktig redskap for å kartlegge opprinnelsen av PFOS (teknisk produkt eller nedbrytning).

Eksponering for PFAS gjennom hudkontakt kan skje gjennom produkter som tekstil, voks, matemballasjen og matlagingspanner (38). Undersøkelser har vist at opptaket av for eksempel PFOS gjennom huden er lavt, og denne eksponeringsvei er derfor antatt å utgjøre et lite bidrag til den totale eksponeringen (38).

### 1.2.7 PFOS relaterte isomerer

I en studie av Benskin o.a. ble det fremsatt en hypotese om at informasjon om isomerprofilen til PFOS kan hjelpe oss med å kartlegge kildene til eksponering (7).

I en tidstrendstudie ble det funnet at den relative andelen av forgrenede PFOS isomere har økt i tidsperioden 1976-2007 (32). Senere har det blitt vist at forgrenede PFOS isomere har kortere halveringstid sammenlignet med L-PFOS (39). Så langt er det derfor ingen god forklaring på økningen i andel forgrenede PFOS isomere.

I mennesker har andelen av forgrenede PFOS blitt funnet å variere mellom 20-50 % (12;32;38;39). PFOS produktene produsert av 3M inneholdt rundt 30 % av forgrenede isomere (7). En høyere andel forgrenede PFOS enn det som finnes i produktene, tyder på at vi blir eksponert for PFOS både fra PFOS og PreFOS. Dette har blitt støttet av en studie av Benskin o.a. hvor man fant en raskere biotransformasjon for forgrenede PreFOS sammenlignet med lineære PreFOS (7). Disse dataene viser at de høye andelen av forgrenede PFOS isomere i noen mennesker og dyr kan være på grunn av tilleggseksponering for PreFOS.

Kun 11 av de 89 mulige isomere (består av lineær, monometyl forgrenet, og dimetyl forgrenede kjeder) har blitt påvist i biologiske prøver (39;40-43).

## 1.3 Analyse av PFOS

PFOS analyser kan være krevende på grunn av begrenset prøve mengde, kompleks prøvematerial som for eksempel; blod og morsmelk. Analysemetoden kan være vanskelig å automatisere (44). I 2001 ble den første spesifikke metoden for kvantitativ analyse av PFAS i humant serum publisert (45). Denne prøveopparbeidelsen var arbeidskrevende og vanskelig å automatisere (45). I de siste 10 årene ble det gjennomført noen studier med målet om å utvikle en mer effektiv, robust og automatiserbar metode (46-50). Det har blitt brukt ”off-line” fastfase ekstraksjonsmetoder (SPE) (46;47), i tillegg til metoder som bruker “online”

ekstraksjon ved kolonnesvitsjing (48-50). Metoder som bruker kolonnesvitsjing krever lite manuell håndtering av prøvene, er raske og brukt som et startpunkt for utvikling av metoden for måling av PFAS i humant blod (48-50). LC er mye brukt fordi det er ingen behov for derivatisering, fordi i gasskromatografi-massspektrometri (GC-MS), må prøvestoff være flyktig, mens i LC trengs det ikke, og dermed kan LC brukes til å analysere alle klasser av PFAS. LC-MS har høy følsomhet og selektivitet i forhold til  $^{19}\text{F}$  NMR (48). Selvom GC-MS har bedre følsomhet enn LC-MS, vil den være mer krevende pga derivatisering (48).

Hittil har den mest brukte instrumentelle teknikken for kvantitative målinger av ioniske PFAS i biologiske prøver vært med negativ elektronspray ionisering (ESI) LC-MS/MS (8;46-50).

### 1.3.1 Kolonnesvitsjing:

Kolonnesvitsjing vil si at to eller flere kolonner skiftes inn og ut av væskestrømmen ved hjelp av egnede ventiler. Kolonnesvitsjing gir følgende fordeler:

- Høy selektivitet
- Avsetning av materiale med stor retensjonstid på en for-kolonne for å hindre at materiale med stor retensjonstid ankommer hovedkolonnen. For-kolonne kan renses ved ”back-flushing” (51).

Bakgrunnskontaminasjon av PFAS både for instrumentet og laboratoriet var identifisert som et betydelig problem ved tidligere kvantitative analyser av PFAS (52;53). Slike utfordringer kan løses ved å minimalisere prøveopparbeidelsen og ved å installere en gaurd kolonne mellom hver av LC pumper og svitsjingsventilene som for eksempel en Hypercarb gaurd kolonne (54;55).

I noen tilfeller vil matriks komponenter kunne påvirke signalet til PFAS analyttene, og dette er spesielt viktig for komplekse biologiske materialer som blod. For å hindre dette er det ønskelig med en selektiv opprensing metode. I dag er SPE den mest brukte rensemetode for humant blod- og morsmelksprøver, enten manuelt utført (46;50) eller via ”on-line” kolonnesvitsjing system (8;48-50).

### 1.3.2 Separasjon:

For å oppnå en tilfredsstillende separasjon av PFAS, kreves det at det blir valgt riktige eksperimentelle betingelser som påvirker separasjonen. Dette inkluderer valg av

separasjonskolonne (type stasjonærfase og mobilfase, lengde og diameter på kolonnen), instrument (trykk og temperatur, prøvevolum, MS innstillinger, ionisering), pH (for syrer og baser), internstandard osv.

Separasjon av PFOS vil kunne bli utført med upolare stasjonærfaser. Stasjonærfasenes polaritet vil påvirke retensjonstid hovedsakelig på grunn av hydrofobe interaksjoner og i noen grad av van der Waal krefter, men ikke her siden molekylvekten er den samme for alle utvalgte PFOS isomerene og polare interaksjoner (51). PFOS har vært tidligere analysert i kolonner med ulike upolare faser (7;8;12;39).

C18-kolonne har vært brukt tidligere i en studie og det visste seg å gi dårlig separasjon, flere isomere hadde overlapp (44). Det kan komme av at kolonne affiniteten til C18- kolonne er slik at den ikke greier å separere noen PFOS isomere fra hverandre. Separasjonen kan være vanskelig PFOS isomere med C-18 kolonne fordi disse har samme molekylvekt og ulike struktur som gjør det vanskelig å separere de fra hverandre (51). Separasjonen av PFOS isomere har også vært vanskelig i en tidligere studie (8).

Flere tidligere studie viser at FluoroSep RP Octyl (PFO) kolonne egner seg bra til forgrenede PFOS (7;12;39). Den perfluoreerte stasjonærfasen er mindre polar enn C8 og C18, som gir en unik mulighet til å oppnå vanskelig separasjon med en enkel isokratisk mobilfase. Den fluorerte oktyl fasen har en veldig høy selektivitet, spesielt for halogener (56).

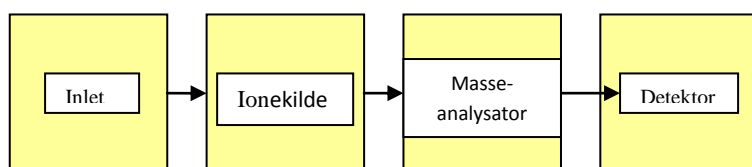
Chiralpak IC HPLC kolonne har også vært brukt i en studie uten å gi noe separasjon i normalfase (57). Separasjon i omvendtfase brukte ca. 85 minutter per analyse og gav dårlig separasjon (57).

Sammenlignet med C18 standard omvendtfase kolonner er YMC30 kolonnen betydelig mer hydrofob (58). Også når kun organiske, upolare løsemiddel blir brukt som mobilfase er mange forbindelser holdt tilbake på kolonnen (58). YMC30 kolonne har bra fasetykkelse og viser tilfredsstillende vekselvirkninger for langkjedede organiske forbindelser (58). Dermed kan også ulike typer av komplekse isomerer (inkl. konjugerte dobbelbindinger) separeres effektivt på denne kolonnen. Et eksempel for en effektiv separasjon med YMC30, er analyser av ulike karotenoider, som har blitt referert til i en del publikasjoner (59;61).



### 1.3.3 Deteksjon

Etter den væskekromatografiske PFAS separasjonen, blir massespektrometri (MS) brukt som detektor. Det er vanligvis tre hovedkomponenter i et MS instrument; ionekilde, masseanalysator og en detektor, se Figur 1.



*Figur 1: Skjematisk figur av et massespektrometer.*

MS er en viktig deteksjonsmetode for identifisering av komplekse biologiske prøver. I tidligere studier er det vist at MS i kombinasjon med LC er en velegnet detektor for ikke flyktige PFAS (8;12;40). Standard løsninger blir først injisert og separert gjennom LC kolonne og deretter kvantifisert og identifisert ved hjelp av fragmentprogrammer ( $m/z$ ) (51). MS i fullskann modus har begrenset følsomhet, derfor kan SIM (selected ion monitoring) brukes for å optimere følsomheten. MRM (multiple reaction monitoring) øker selektivitet, slik at bare noen få utvalgte ioner blir skannet (51).

Alle PFAS ble detekterert ved "pseudo" MRM i en tidligere studie (6). "Pseudo" MRM kan forklares på følgende måte; i første kvadrupol detekteres kun  $m/z$  499 (molekylion). Dette ionet introduseres i kollisjonscellen hvor det påføres en kollisjonsenergi. Molekylionet til PFOS er veldig stabilt og vil ikke bli fragmentert. Det blir derimot andre stoffer med  $m/z$  499 og derfor oppnår man et renere kromatogram ved hjelp av "pseudo" MRM enn SIM (639).

MS er en detektor som bare detekterer ladde partikler (ioner), fordi kun ladede komponenter akselereres i det elektromagnetiske feltet i det analytiske systemet. Det finnes forskjellige typer masseanalysatorer, de vanligste er magnetsektor-, kvadrupol-, TOF (time of flight) og ionefelleanalysatoren (51).

Tandem (MS-MS) massespektrometre er instrumenter som har mer enn en analysator. Slike instrumenter kan brukes til strukturelle og sekvensering studier som for eksempel kvadrupol-kvadrupol, magnetiske sektor-kvadrupol og kvadrupol-TOF (51).

Under denne studien brukes det en trippel kvadrupol. Den første analysatoren blir brukt til å isolere et forløperion (foreldreion), som fragmenter til å danne produktioner og nøytrale

fragmenter (51). Kvadrupol 1 velger ut ioner. Alle ionene i kollisjonscellen går videre til kvadrupol 2 som er ingen analysator, men kun en ionsamler. Denne kan operere enten i skann mode eller låst på en eller flere definerte masser. Kvadrupol 3 analyserer alle ioner som er fragmentert (51).

I LC-MS/MS blir det brukt multippel masseoverganger for kvalitativt og kvantitative analyser. De ionene som fragmenteres for PFOS mest er masse  $m/z$  80, men denne massen har interferens i dyreprøver, derfor blir masse  $m/z$  90 brukt som oftest for kvantifisering av PFOS biologiske prøver av LC-MS (61).

## 2. MATERIALER OG METODER

Det ble tatt utgangspunkt i metoden til Haug o.a (8) for kjemikalier, utstyr og instrumentelle betingelser og Benskin o.a (39) for analytisk kolonne og masseoverganger.

### 2.1 Kjemikalier

Alle løsninger og kjemikalier er av HPLC grad

- Standarder kjøpt av Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada), (L-PFOS, 1m-PFOS, 2m-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS med konsentrasjon 1 µL/mL)
- Metanol og acetonitril (HPLC grade) fra LabScan (Dublin, Irland)
- 2-propanol (HPLC grade) fra Alfa Aesar (Karlsruhe, Tyskland)
- Ammoniumhydroksid (puriss PA grade) fra Fluka (Steinheim, Tyskland)
- Maursyre (GPR Reapur grade) fra VWR BDH Prolabo (Leicestershire, England)
- Eddiksyre (PA grade) fra Merck (Darmstadt, Tyskland)
- Argon med renhetsgrad 99, 9999% fra AGA (Oslo, Norge)
- Nitrogen, Maxigas Nitrogen generator fra Domnick Hunter Ltd (Gateshead, Storbritannia)
- Type I vann fra TKA GenPure water purification system GmbH (TKA Water Purification systems GmbH, Niederelbert, Tyskland)

Alt glassutstyr ble vasket i 2,5 % Extran MA 01 fra Merck, Darmstadt, Tyskland og skylt deretter i destillert vann før det ble brent ved 450 °C i 4 timer.

Alle standardløsninger var løst i metanol og lagret i glassampuler ved -18 °C.

- Costar<sup>®</sup> microcentrifuge tubes fra Corning Incorporated, Corning, New York, USA. Disse er testet for mulige forurensninger, spor av perfluorerte alkylstoffer.

Det samme ble gjort for prøveglass og korker, fra Agilent Technologies, San Jose, California, USA. Og pipettespisser fra Finntip, Thermo Fisher Scientific OY, Vantaa, Finland.

Som vaskeløsninger for injeksjonssprøyten ble 50 % metanol i vann og 100% acetonitril brukt.

## 2.2 Utstyr

- Kolonnesvitsjning system. HTC PAL (CTC analysis AG, Zwingen, Sveits) autosampler med en seks-port og en en ti-port switching ventiler (CTC). To Surveyor LC pumper (Thermo Finningan, San Jose, CA, USA).
- To Hypercarb guard kolonne (10 med mer x 4mm x 5  $\mu$  m) ("Trap" kolonner, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), installert mellom svitsjeventiler og pumper.
- For-kolonne, Betasil C8 (50mm x 2,1 mm x 3  $\mu$  m partikler) (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)
- FlouroSep RP Octyl kolonne (PFO) (3 $\mu$  100Å, 15cm x 2,1 mm) (ES industries, West Berlin, NJ).
- YMC30 kolonne (S-3  $\mu$ m, 150mm x 2,1 mm) (YMC europe GMBH, Dinslaken, Tyskland)
- Lavtoppløsende TSQ Quantum (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) trippel kvadrupol MS (Thermo Fisher Scientific, OY, Vantaa, Finland)

## 2.3 Utvikling av metode

### 2.3.1 Tillaging av standardløsninger

980  $\mu$ L metanol ble tilsatt 6 autosamplerglass. 20 $\mu$ L av hver av originalløsningene ble overført til hver sin ampulle. Blandingene ble mikset forsiktig på whirlmikser.

Konsentrasjon av de nye løsningene var 20 pg/ $\mu$ L. Standardløsninger ble laget i tre forskjellige mobilfaser; metanol (20pg/ $\mu$ L), 50% buffer (15 mM ammonium acetat i vann) (10pg/ $\mu$ L) og 50% 0,1 M maursyre (10pg/ $\mu$ L).

### 2.3.2 Testing av masseoverganger

Alle utvalgte isomere er oppført i Tabell 1 ble introdusert direkte inn på MS for å finne karakteristiske fragmenteringsmønster. Masseovergangene fra en studie av Benskin o. a. (39)

ble brukt, se Vedlegg, Figur 14-19. Dette ble gjort for å se om man kunne separere isomerene med hensyn på  $m/z$  istedenfor på elueringstid.

### 2.3.3 Testing av kollisjonsenergi

Forskjellige kollisjonsenergier (eV) ble testet ut for å finne hvilken verdi som ga høyest følsomhet, se Vedlegg Figur 14-19.

### 2.3.4 Testing av skanntid

Det ble testet ut forskjellige skanntid for de ulike  $(M+H)^+$  ioner for å se om det økte følsomheten. Ved å øke skanntid, vil innsamlingstiden for et ion av spesifikk masse øke. Dette kan øke følsomheten.

### 2.3.5 Utprøving av C30 kolonne

Alle utvalgte isomere oppført i Tabell 1 ble analysert enkeltvis ved metoden som er beskrevet i 2.4 og her ble det også testet ulike gradientprogrammer for å optimaliser separasjon mellom analyttene. Det var en god del "tailing" på kromatogrammene med denne metoden.

Det ble antatt at "tailing" kan komme av ukontrollerte interaksjoner mellom stasjonærfasen (pga silanol gruppene) og analyttene, for å unngå dette problemet, ble det laget en ny buffer løsning med pH 7 istedenfor pH 4.

Løsninger med pH 7 ble analysert ved metoden beskrevet i 2.4. Forskjellige gradientprogrammer ble testet. Standardprøver fortynnet med kun 50% metanol og 50% bufferløsning (15 mM ammonium acetat i vann) og kun 50% acetonitril med 50% bufferløsning (15 mM ammonium acetat i vann) ble analysert hver for seg.

### 2.3.6 Utprøving av PFO kolonne

Alle utvalgte isomere som er oppført i Tabell 1 ble introdusert inn på den kolonnen enkeltvis, for å optimere separasjon av isomerene. Den beste metoden ble senere testet på kolonnesvitsjing system.

Alle standardløsninger var til å begynne med i 100% metanol. Det ble testet ut mange forskjellige gradientprogrammer for å optimaliser separasjon mellom analyttene. Isokratisk gradientprogram ble brukt først. Standardløsninger ble fortynnet med 50% buffer (15 Mm ammonium acetat i vann), fordi det ble antatt at det kunne påvirke separasjonen. Acetonitril er en sterkere eluringsløsemiddel enn metanol, derfor ble metanol brukt i tillegg for å øke

eluringstiden og dermed separasjonen. Det ble testet forskjellige gradientprogrammer som hadde forskjellige sammensetninger av buffer (15 mM ammonium acetat i vann), metanol og acetonitril. Den beste metoden gradientprogrammet for separasjonen av PFOS isomere er beskrevet i 2.4.

## 2.4 Endelig optimert metode

### 2.4.1 Prøveopparbeidelse av serum for bestemmelse av PFAS

Fem serumprøver fra den nevnte BROFLEX studien ble analysert (6). 150 µL serum ble overført til en Eppendorf-rør med automatpipette. 120 µL metanol ble tilsatt. Alt ble grundig mikset med en Whirlmikser og sentrifugert ved 14000 rpm i 20 minutter. 200 µL av supernatanten ble overført til et autosamplerglass og ble tilsatt 500 µL av 0,1 M maursyre i vann og mikset .

### 2.4.2 Tilkobling av kolonnesvitsjing system

Nye standardløsninger ble laget i 50% 0,1 M maursyre i vann for å få standardløsningene til å ligne mest på behandlede serumprøver. Program for LC-pumpe ble oppdatert med riktige parametere, se 2.4.4 og Tabell 5. Det visste seg at den utviklede metoden for PFOS isomere fungerte tilfredsstillende i kolonnesvitsjing system hvor de enkle isomerene ble analysert først og senere ble en blanding av alle isomerene samt L-PFOS analysert.

Det ble analysert 5 serumprøver fra den nevnte BROFLEX studien for å teste om denne metoden kan anvendes på reelle prøver (6).

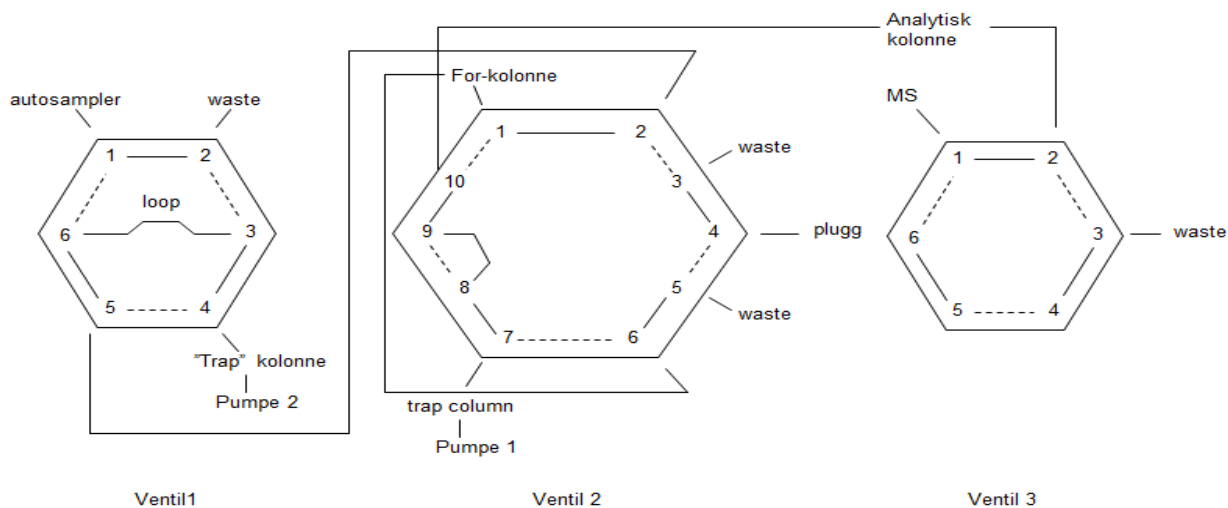
### 2.4.3 Automatiske kolonnesvitsjing system

Spor av PFAS i LC-pumpen, løsemiddel-reservoarer, i slanger og pakninger, ble fjernet ved å bruke ”trap” kolonner. Disse ”trap” kolonnene (Hypercarb guard column) er installert mellom LC-pumpen og svitsjeventiler.

400 µl serumprøve injiseres i 500 µl loop. Prøven føres til en for-kolonne ved hjelp av 0,1 M maursyre i vann og retarderes. Så økes pH på for-kolonnen ved å introdusere 0,2 % NH<sub>4</sub>OH i vann. Analyttene elueres fra for-kolonne til analytisk kolonne ved ”back-flushing”, og separeres i den analytiske kolonnen ved bruk av acetonitril/metanol/vann gradient.

For å unngå krysskontaminering og for å hindre økende mottrykk, ble en omfattende vask av LC-systemet gjort ved å bruke ulike kombinasjoner av metanol, acetonitril, vann, 0,2%

NH<sub>4</sub>OH i vann og 50% 2-propanol i vann. Mobilefaseprogrammene for begge LC-pumper er beskrevet i 2.4.2, prinsippet for mobilfaseprogrammene for LC-pumpene er hentet fra en tidligere studie av Haug o.a. (8) og de tre ventilene er skjematisk skissert i Figur 2.



*Figur 2: En skjematisk forklaring av den automatiske kolonnesvitsjing systemet for opparbeidelse og analyse av prøvematerialet. Stiplede og hele linjer viser til posisjon 1 og posisjon 2 til ventilene (8).*

Massespektrometeret ble operert i negativ ESI modus med en spray spenning på 3 kV og et "skimmer offset" av 5 V. En kapillær temperatur på 300 °C, kappe gasstrykk på 60 vilkårlige enheter (AU) og en ekstra gasstrykk av 5 AU var brukt. Argongass lufttrykket var satt til 0,2 Pa. Den optimale skanntid var 0,05 s.

#### 2.4.4 Instrumentelle betingelser:

En oversikt over hvilke løsemidler som ble brukt for Pumpe 1 og Pumpe 2 er presentert i Tabell 2.

*Tabell 2: En oversikt over forskjellige løsemidler for pumpe 1 og pumpe 2 som er illustrert i Figur 2.*

|          | <i>Pumpe 1</i>  | <i>Pumpe 2</i>   |
|----------|---|--|
| <b>A</b> | 0,1 M maursyre i vann (HCOOH (aq))                            | Vann (H <sub>2</sub> O)  |
| <b>B</b> | 0,2% ammoniumhydroksid i vann<br>(NH <sub>3</sub> (aq))       | 15 mM ammoniumacetat i vann<br>pH 4(CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (aq)) |
| <b>C</b> | Metanol (CH <sub>3</sub> OH)                                  | Metanol (CH <sub>3</sub> OH)   |
| <b>D</b> | 50% 2-propanol i vann (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH (aq)) | Acetonitril (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N)                                |

MS metode innstillinger:

Skann betingelser for MS er oppgitt i Tabell 3.

*Tabell 3: Oversikt over skannbetingelser; masseoverganger, kollisjonsenergi og foreldreion.*

| <i>Foreldreion</i><br>( <i>m/z</i> ) | <i>Datterion</i><br>( <i>m/z</i> ) | <i>Kollisjonsenergi</i><br>( <i>eV</i> ) |
|--------------------------------------|------------------------------------|--|
| 499                                  | 80                                 | 40                                       |
| 499                                  | 99                                 | 40                                       |
| 499                                  | 130                                | 40                                       |
| 499                                  | 169                                | 40                                       |
| 499                                  | 180                                | 40                                       |
| 499                                  | 219                                | 40                                       |
| 499                                  | 230                                | 40                                       |
| 499                                  | 280                                | 40                                       |
| 499                                  | 330                                | 40                                       |
| 499                                  | 419                                | 40                                       |
| 499                                  | 499                                | 40                                       |



Gradient oversikt for pumpe 2 er presentert i Tabell 4. For løsemiddel oversikt for pumpe 2, se Tabell 2.

*Tabell 4: Pumpehastighet for pumpe 2 og løsemiddel gradient brukt for den opprinnelige kromatografiske separasjonen av PFOS isomerene .*

| <i>Tid (min)</i> | <i>Flow (<math>\mu</math>L/min)</i> | <i>B(%)</i> | <i>C(%)</i> | <i>D(%)</i> |
|------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 0,00             | 200,0                               | 40,00       | 40,00       | 20,00       |
| 1,00             | 200,0                               | 40,00       | 40,00       | 20,00       |
| 35,00            | 200,0                               | 25,00       | 40,00       | 35,00       |
| 37,00            | 200,0                               | 10,00       | 0,0         | 90,00       |
| 40,00            | 200,0                               | 10,00       | 0,0         | 90,00       |
| 40,10            | 200,0                               | 40,00       | 40,00       | 20,00       |
| 45,00            | 200,0                               | 40,00       | 40,00       | 20,00       |

LC pumpe:

Loading tid (10 port ventil svitsjes slik at analytter kan elueres fra for-kolonnen til den analytiske kolonnen): 360 s

Eluerings tid (10 port ventil svitsjes slik at mobilfase fra MS-pumpe går rett til analytisk kolonne): 1200 s

Gradient oversikt over pumpe 1 er presentert i tabell 5. For oversikten over de forskjellige løsemidlene for pumpe 1, se Tabell 2.

*Tabell 5: LC pumpehastighet for pumpe 1 og modifisert løsemiddel gradient (inkl. buffer) som ble brukt for PFOS isomer separasjon.*

| <i>Tid (min)</i> | <i>Flow (mL/min)</i> | <i>A(%)</i> | <i>B(%)</i> | <i>C(%)</i> | <i>D(%)</i> |
|------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0,00             | 0,500                | 90,00       | 0,00        | 10,00       | 0,00        |
| 2,00             | 0,500                | 90,00       | 0,00        | 10,00       | 0,00        |
| 2,10             | 0,500                | 0,00        | 95,00       | 5,00        | 0,00        |
| 6,20             | 0,500                | 0,00        | 95,00       | 5,00        | 0,00        |
| 6,30             | 0,500                | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 100,00      |
| 10,0             | 0,500                | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 100,00      |
| 10,10            | 0,500                | 0,00        | 90,00       | 10,00       | 0,00        |
| 16,00            | 0,500                | 0,00        | 5,00        | 95,00       | 0,00        |
| 19,90            | 0,500                | 0,00        | 5,00        | 95,00       | 0,00        |
| 20,00            | 0,500                | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 100,00      |
| 23,00            | 0,500                | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 100,00      |
| 23,10            | 0,500                | 0,00        | 10,00       | 10,00       | 0,00        |

### 3. RESULTATER OG DISKUSJON

#### 3.1 Resultater fra testing av masseoverganger, kollisjonsenergi og skanntid

##### 3.1.1 Resultater fra testing av masseoverganger og kollisjonsenergi

I noen studier har det vært brukt andre masseoverganger som har gjort det mulig å separere PFOS isomere ved hjelp av masseforskjell ( $m/z$ ) (39;63). En slik tilnærming har ikke vært mulig under denne oppgaven. Det viste seg at 40 eV var den beste kollisjonsenergien og ble brukt videre til analyser. Kun masseovergangen  $m/z$  499 $\rightarrow$ 499 var tilstrekkelig for alle utvalgte isomere og derfor ble det brukt i videre forsøk som har vært brukt tidligere i en studie av Haug o.a. (8). Alle de utvalgte isomere ble analysert ved forskjellige masseoverganger og kollisjonsenergi. I Vedlegg (Figur:14-19) er resultatene for de forskjellige masseovergangstestene presentert som ikke var tilfredsstillende for denne metoden.

##### 3.1.2 Resultater fra testing av skanntid

Det ble testet ut fire ulike skanntider for å se om det påvirker følsomheten. Skanntid 0,01s, 0,05 s, 0,1s, 0,2 s ble testet. Det viste seg at følsomheten (respons) ble enda lavere enn følsomheten for 0,05 s som var brukt i metoden til Haug o.a. (8), se Tabell 6.

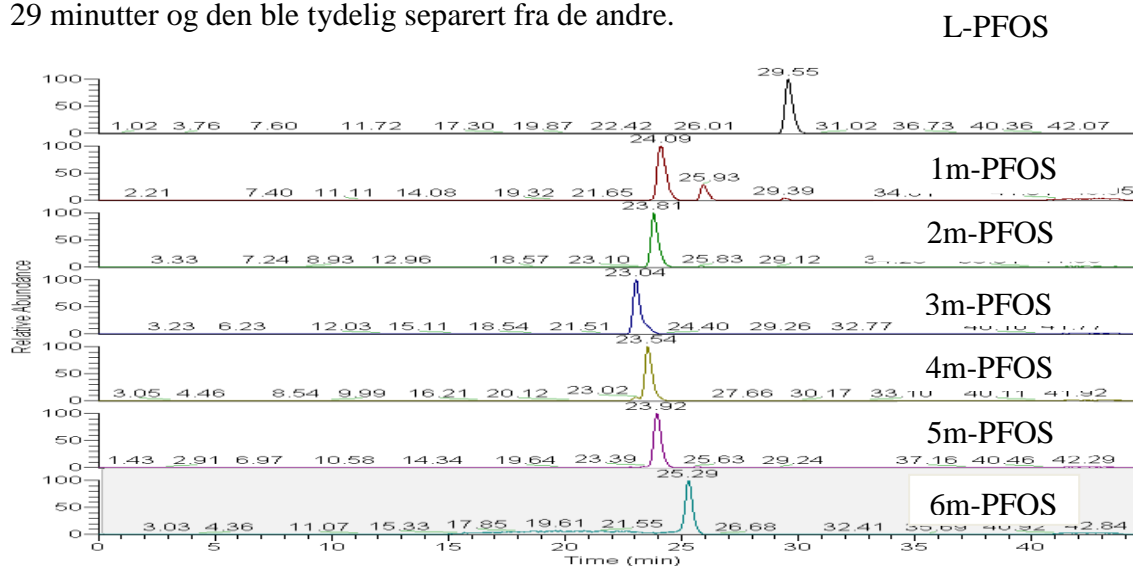
*Tabell 6: Oversikt over skanntid, respons og retensjonstid for 4m-PFOS.*

| <i>Skanntid (s)</i> | <i>Respons</i>      | <i>Retensjonstid (min)</i> |
|---------------------|---------------------|----------------------------|
| 0,01                | 2,44 E <sup>5</sup> | 9,57                       |
| 0,05                | 4,44 E <sup>5</sup> | 9,73                       |
| 0,10                | 3,56 E <sup>5</sup> | 9,63                       |
| 0,20                | 3,17 E <sup>5</sup> | 9,53                       |

### 3.2 Resultater for PFO kolonne før tilkobling av for-kolonne

Flere gradient programmer ble testet for å optimalisere separasjon som nevnt i 2.3.6. Metoden beskrevet i 2.4 gav den beste separasjon og kun disse resultatene blir presentert videre i oppgaven.

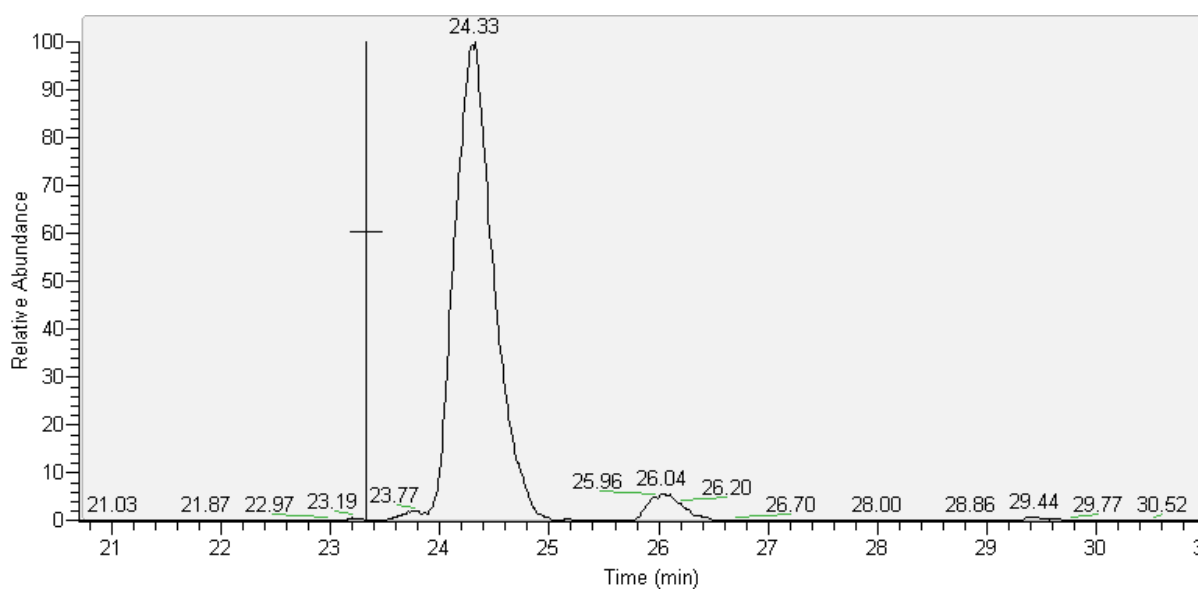
Den beste separasjonen av alle de utvalgte isomere inkludert L-PFOS er presentert i Figur 3 og tilhørende Tabell 7. L-PFOS ble tydelig separert fra de andre isomerene med en retensjonstid på 29,55 minutter. 1m-PFOS gav hele tiden tre topper, det kan komme av forurensninger i standard løsningen fra leverandøren, og det ble antatt at toppen med retensjonstid 24,09 minutter var 1m-PFOS, siden den hadde høyest topp. Den viste seg å være vanskelig å separere 1m-PFOS fra 5m-PFOS som har en retensjonstid 23,92 minutter og disse kommer ut som én topp i en blanding, se Figur 4. 2m-PFOS har en retensjonstid på 23,81 minutter som viser seg å være vanskelig å separere fra 4m-PFOS, se Figur 5. En blanding av 1, 2, 4 og 5m-PFOS resulterte i to topper, som igjen peker på at separasjonen av disse stoffene er vanskelig, se Figur 6 og tilhørende Tabell 8. 3m-PFOS har en retensjonstid på 23,04 minutter og er separert fra de andre isomerene. 6m-PFOS har en retensjonstid på 25,29 minutter og den ble tydelig separert fra de andre.



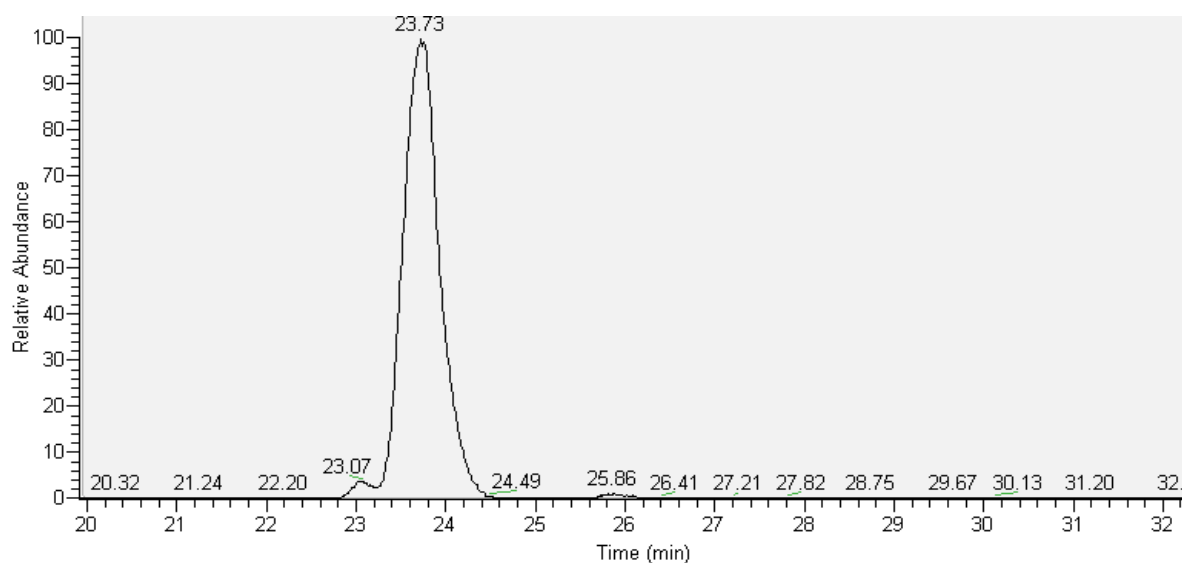
*Figur 3: Kromatogrammer for L-PFOS, 1m-PFOS, 2m-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS for PFO kolonne før tilkobling av kolonnesvitsjing system. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$  499 (konsentrasjon var ca 10 pg/ $\mu$ L).*

*Tabell 7: Oversikt over identifisert topper, deres retensjonstider og navn på PFOS iosmere fra Figur 3.*

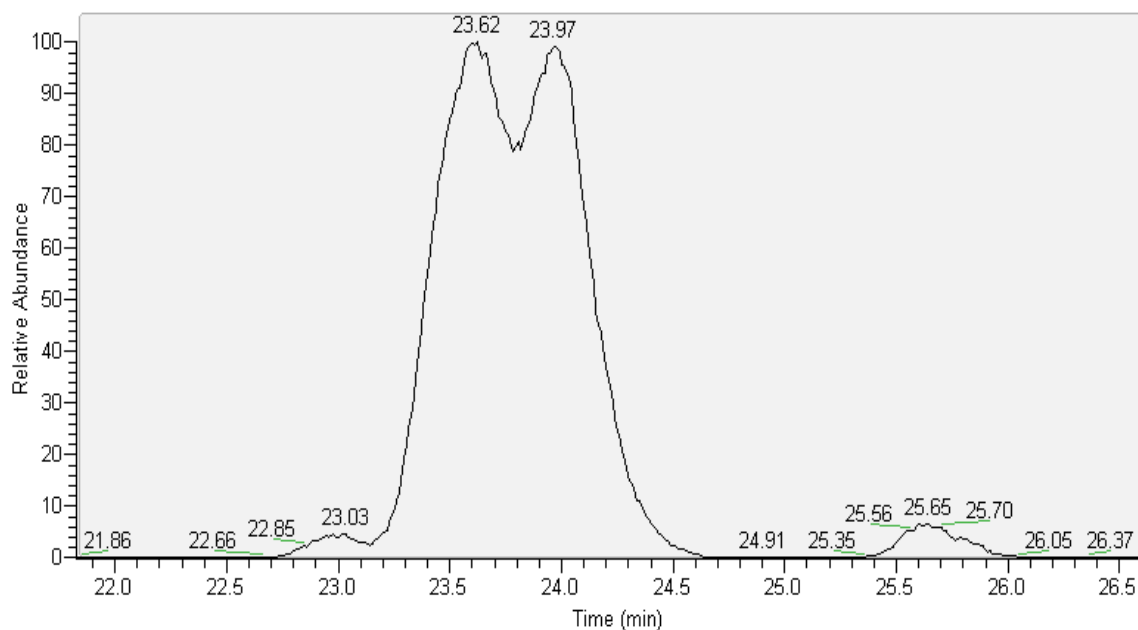
| <i>Forbindelse</i> | <i>Retensjonstid (min)</i> |
|--------------------|----------------------------|
| L-PFOS             | 29,55                      |
| 1m-PFOS            | 24,09                      |
| 2m-PFOS            | 23,81                      |
| 3m-PFOS            | 23,04                      |
| 4m-PFOS            | 23,54                      |
| 5m-PFOS            | 23,92                      |
| 6m-PFOS            | 25,29                      |



*Figur 4: Kromatogram for blanding av 1m-PFOS og 5m-PFOS. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$  499 (konsentrasjon var ca. 5 pg/ $\mu$ L).*



*Figur 5: Kromatogram for blanding av 2m-PFOS og 4m-PFOS. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$ 499 (konsentrasjon var ca.5 pg/ $\mu$ L).*

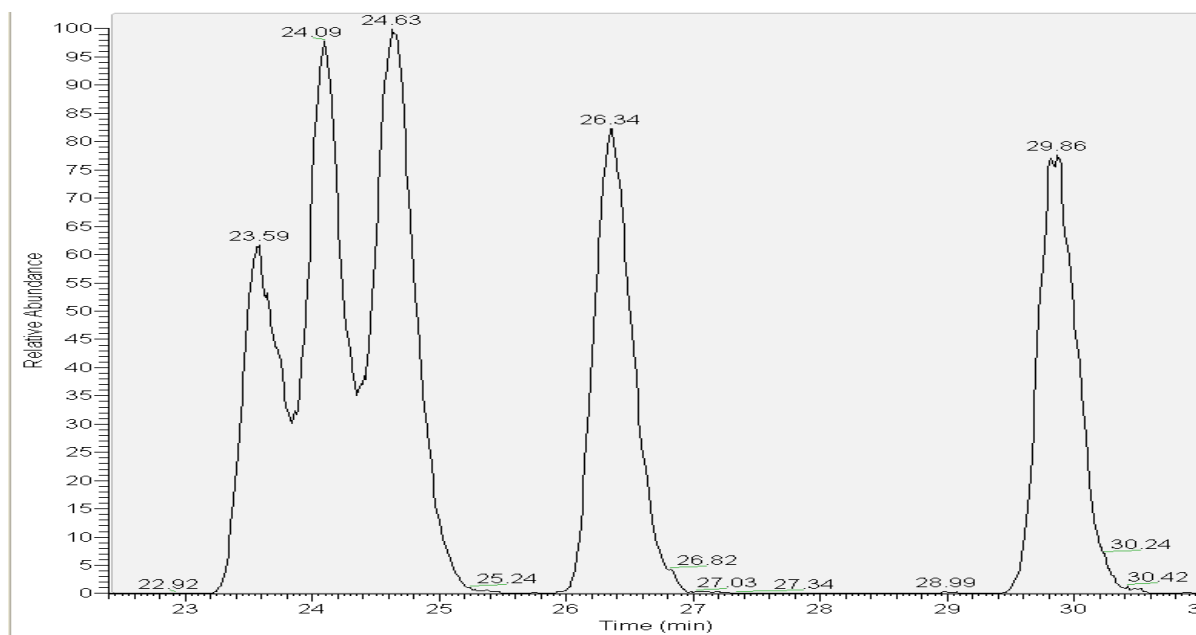


*Figur 6: Kromtogram for blanding av 1m-PFOS, 2m-PFOS, 4m-PFOS og 5m-PFOS. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$ 499 (konsentrasjon var ca. 2,5 pg/ $\mu$ L).*

*Tabell 8: Oversikt over identifisert topper, deres retensjonstid og navn på forbindelser fra Figur 6.*

| <i>Forbindelser</i> | <i>Retensjonstid (min)</i> |
|---------------------|----------------------------|
| 2m-PFOS+4m-PFOS     | 23,97                      |
| 1m-PFOS+5m-PFOS     | 23,62                      |

En blanding av L-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS ble analysert. Det var separasjon mellom alle 5 stoffene, se Figur 7 og tilhørende Tabell 9. Her vises det at L-PFOS og 6m-PFOS er grunnlinje separert fra alle andre isomerene.



*Figur 7: Kromatogram for blanding av L-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$  499 (konsentrasjon var ca. 2 pg/ $\mu$ L).*

*Tabell 9: Oversikt over identifisert topper, deres retensjonstid og navn for PFOS isomerene (for separasjon se Figur 7).*

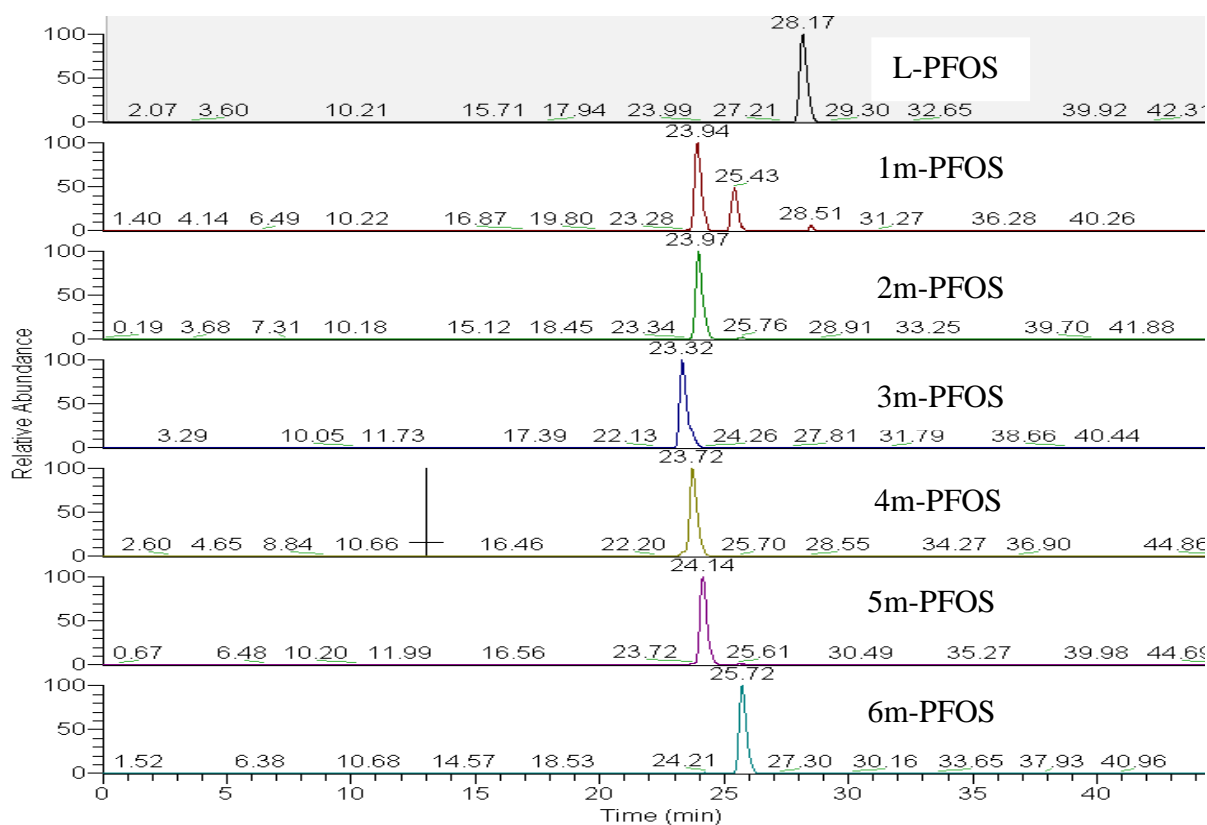
| <i>Forbindelse</i> | <i>Retensjonstid (min)</i> |
|--------------------|----------------------------|
| L-PFOS             | 29,86                      |
| 3m-PFOS            | 23,59                      |
| 4m-PFOS            | 24,09                      |
| 5m-PFOS            | 24,63                      |
| 6m-PFOS            | 26,34                      |

### **3.3 Resultater fra PFO kolonne etter tilkobling av for-kolonne**

#### **3.3.1 Resultater for forsøk med PFO kolonne tilkoblet for-kolonne for enkle isomere**

Metoden beskrevet i 2.4 ble brukt for analyser på PFO kolonne med for-kolonne tilkoblet. Separasjons rekkefølge var den samme som i Figur 3, men retensjonstiden hadde økt med ca. 10 minutter i forhold til resultater for PFO kolonne uten tilkobling av for-kolonne (Figur 3), se Figur 8 og tilhørende Tabell 10. Dette viser at metoden er tilfredsstillende for separasjon av flere PFOS isomerne separasjon med tilkoblet for-kolonne.





*Figur 8: Kromatogrammer for L-PFOS, 1m-PFOS, 2m-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS for PFO kolonne med SPE tilkoblet. Deteksjon skjedde ved 'pseudo' MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$  499 (konsentrasjon var ca 10 pg/ $\mu$ L).*

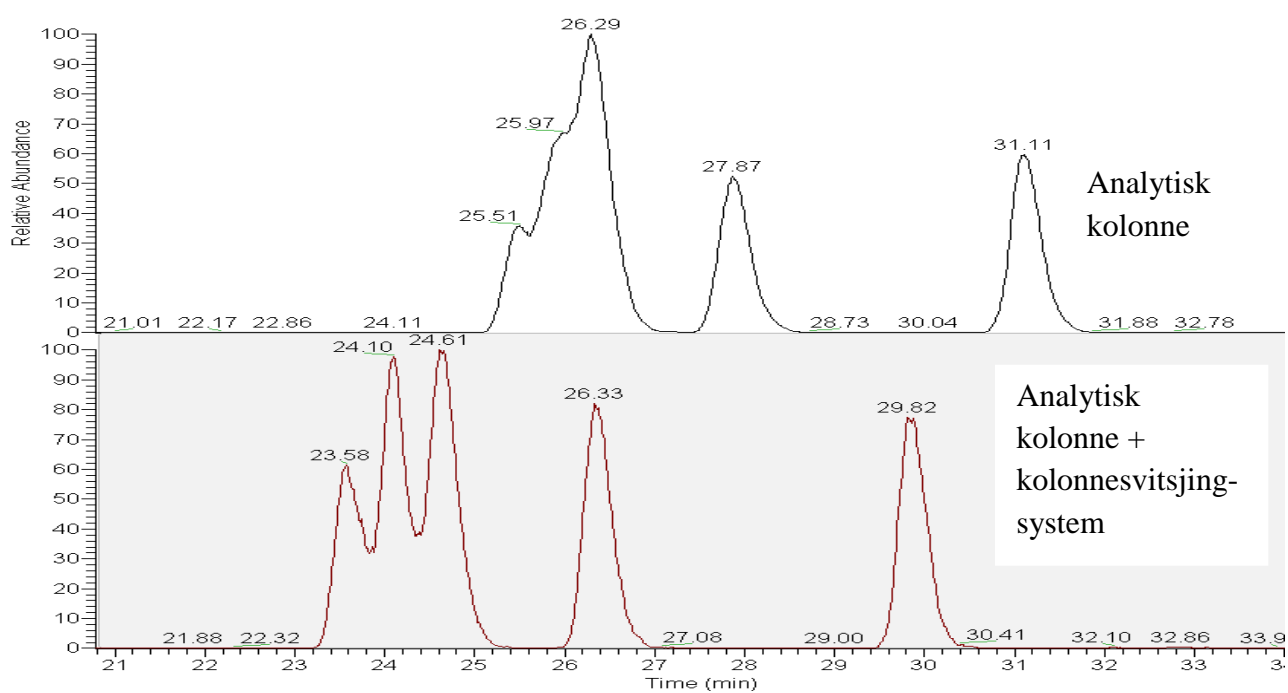
*Tabell 10: Oversikt over identifiserte topper, deres retensjonstid og navn på forbindelser fra Figur 8.*

| <i>Forbindelse</i> | <i>Retensjonstid(min)</i> |
|--------------------|---------------------------|
| L-PFOS             | 28,17                     |
| 1m-PFOS            | 23,94                     |
| 2m-PFOS            | 23,97                     |
| 3m-PFOS            | 23,32                     |
| 4m-PFOS            | 23,72                     |
| 5m-PFOS            | 24,14                     |
| 6m-PFOS            | 25,72                     |

1m-PFOS+5m-PFOS og 2m-PFOS+4m-PFOS vil gi en overlapp her også.

### **3.3.2 Resultater for forsøk med PFO kolonne tilkoblet for-kolonne for blanding av alle utvalgte forbindelser**

En blanding av L-PFOS, 1m-PFOS, 2m-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS ble analysert. Denne blandingen gir 5 topper til sammen på kromatogrammet, se Figur 9 og tilhørende Tabell 11. Det vises at en blanding av alle 7 utvalgte isomerene gir en dårligere separasjon enn for blanding i Figur 7. Grunnen til dette kan være at 1m-PFOS og 2m-PFOS gjør det enda vanskeligere å gi en separasjon mellom alle 7 utvalgte isomere, se Figur 10.



**Figur 9:** Sammenligning av kromatogram for blanding av L-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS ved kolonnesvitsjing (konsentrasjon var ca. 2 pg/μL) med kromatogrammet fra Figur 7. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499 →499.

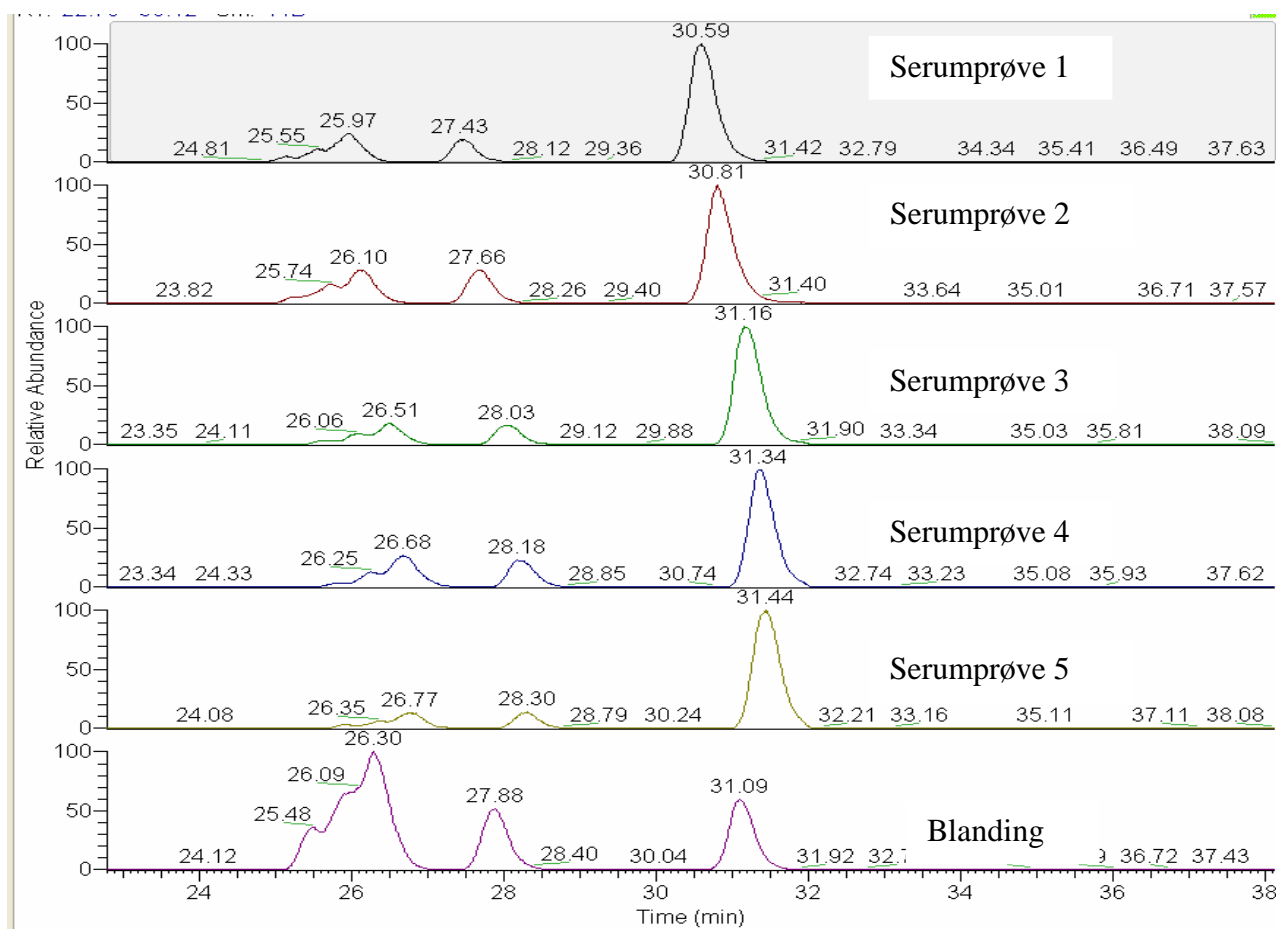
**Tabell 11:** Oversikt over identifiserte topper, deres retensjonstid og på forbindelser i Figur 9.

| Forbindelse     | Retensjonstid(min) |
|-----------------|--------------------|
| L-PFOS          | 31,09              |
| 1m-PFOS+5m-PFOS | 26,30              |
| 2m-PFOS+4m-PFOS | 25,98-26,09        |
| 3m-PFOS         | 25,48              |
| 6m-PFOS         | 27,88              |

### 3.3.3 Forsøk med PFO kolonne tilkoblet for-kolonne for reelle serum prøver

For å teste om metoden beskrevet i 2.4 er tilfredsstillende for reelle prøver, ble det analysert 5 serum prøver fra BROFLEX studien (6). Kromatogrammene fra alle disse fem prøvene og

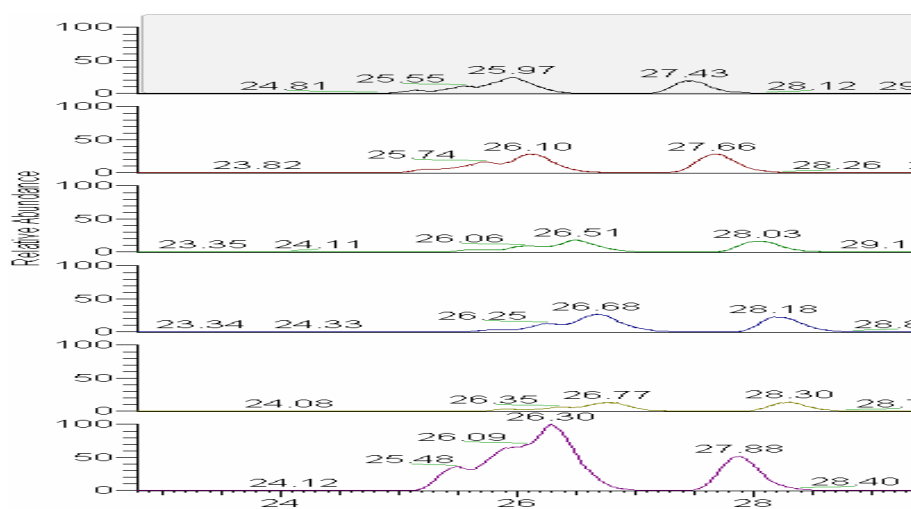
blandingen fra Figur 9 (analytisk kolonne+ kolonnesvitsjing system) er presentert i Figur 10. Etter en sammenligning med blandingen (nederste kromatogram på Figur 9) visste det seg at det finnes mest av L-PFOS i disse reelle prøvene, men det finnes også noe mengde av de andre isomerene, for å se variasjon i mengden av alle andre isomerene enn L-PFOS, se Figur 11 og Tabell 12. Det var ikke mulig å separere 2m-PFOS og 4m-PFOS for seg siden disse gav en overlapp, og det samme gjelder 1m-PFOS og 5m-PFOS.



*Figur 10: Kromatogrammene for 5 serum prøver og blandingen av alle isomere. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$ 499.*

*Tabell 12: Oversikt over identifiserte topper, deres retensjonstid og navn for forbindelser i Figur 10.*

| <i>Forbindelse</i> | <i>Topp (nr)</i> |
|--------------------|------------------|
| L-PFOA             | 5                |
| 1m-PFOS            | 3                |
| 2m-PFOS            | 1                |
| 3m-PFOS            | 2                |
| 4m-PFOS            | 1                |
| 5m-PFOS            | 3                |
| 6m-PFOS            | 4                |



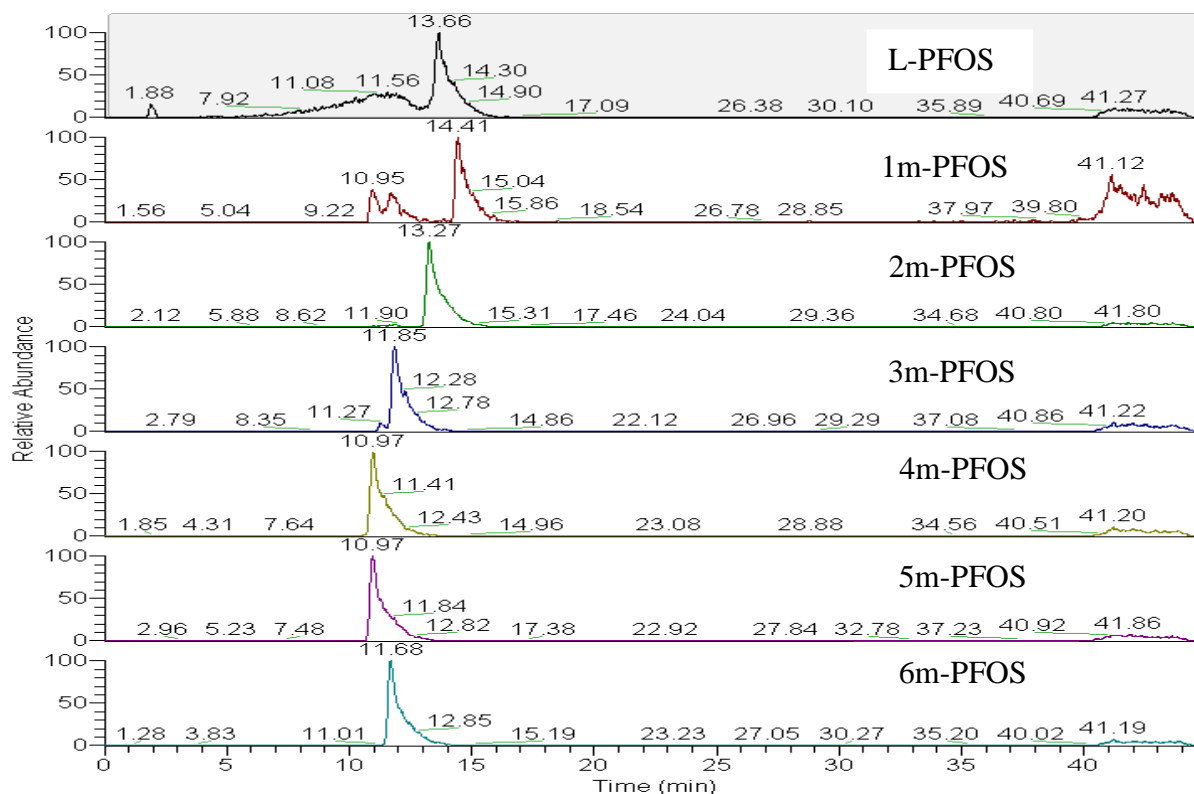
*Figur 11: Kromatogrammene for 5 serum prøver og blandingen av alle isomere for 1m-PFOS, 2m-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS for tilhørende Tabell 12. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$  499.*

### 3.4 Resultater fra C30 kolonne

På grunn av koeluering mellom 2m-PFOS og 4m-PFOS og 1m-PFOS og 5m-PFOS med PFO kolonne, ble C30 kolonne testet for å se om vi kunne få separasjon mellom disse isomerene. Analyse metoden beskrevet i 2.4 ble brukt for analyse av de utvalgte isomerene på C30 kolonnen.

#### 3.4.1 Resultater for forsøk med C30 kolonne ved pH 4

De første standardene som ble analysert var fortynnet med 50% bufferløsning (15 mM ammoniumacetat i vann) og hadde pH 4.



*Figur 12:* Kromatogrammer for L-PFOS, 1m-PFOS, 2m-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS for C30 kolonne med pH. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$  499 (konsentrasjon var ca 10 pg/ $\mu$ L).

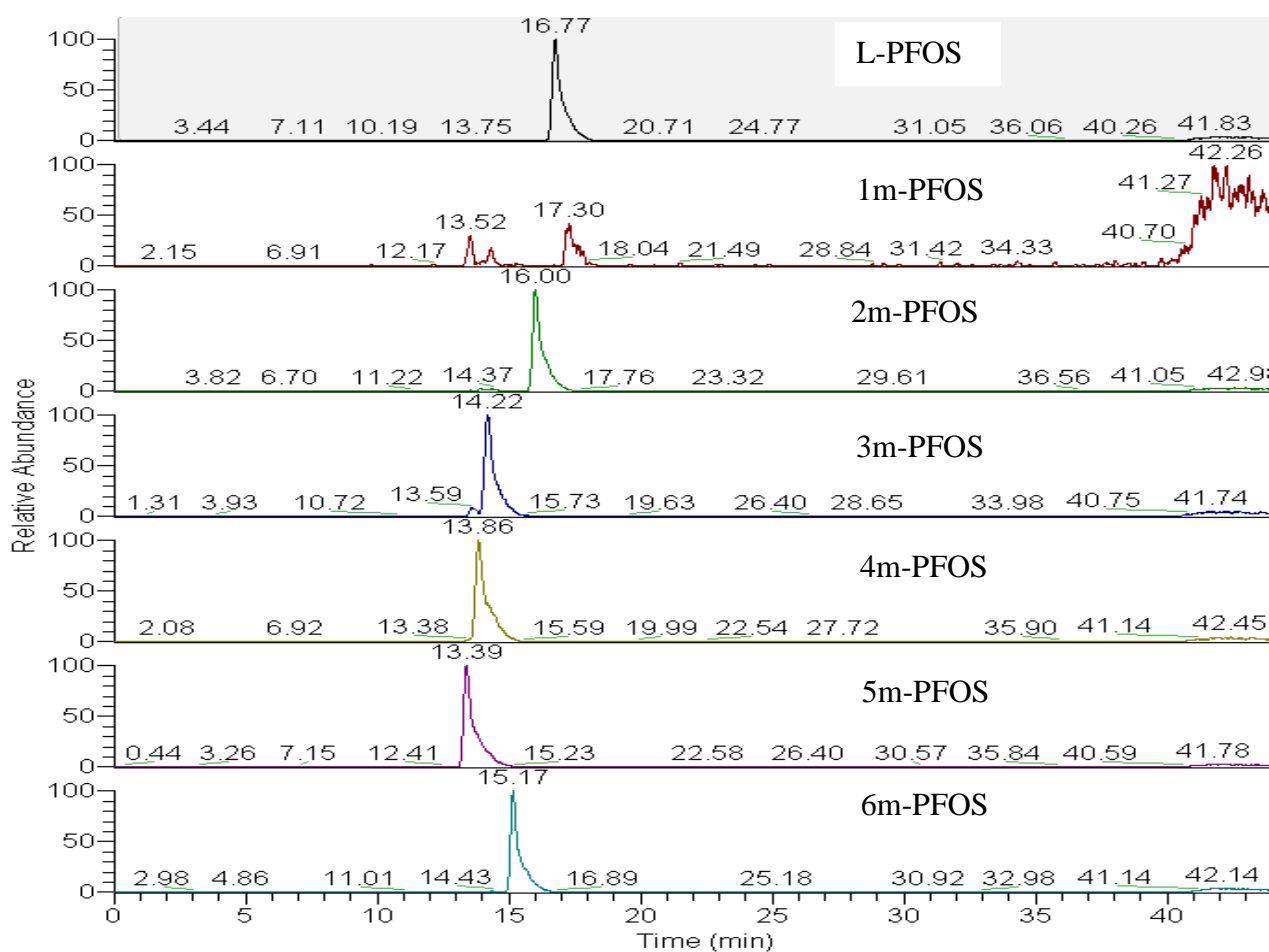
*Tabell 13: Oversikt over identifisert topper, derers retensjonstid og navn på forbindelser fra Figur 12.*

| <i>Forbindelser</i> | <i>Retensjonstid (min)</i> |
|---------------------|----------------------------|
| L-PFOS              | 13,66                      |
| 1m-PFOS             | 14,41                      |
| 2m-PFOS             | 13,27                      |
| 3m-PFOS             | 11,65                      |
| 4m-PFOS             | 10,97                      |
| 5m-PFOS             | 10,97                      |
| 6m-PFOS             | 11,68                      |

Resultater fra C30 kolonne viste seg å ha en god del “tailing”, se Figur 12 og Tabell 13. Det ble antatt at lav pH kunne være årsaken til “tailing”, se Figur 12. L- PFOS hadde nesten lik retensjonstid som på 2m-PFOS med en retensjonstid på 13,66 minutter. 1m-PFOS hadde en retensjonstid på 14,41 minutter og hadde en tydelig separasjon fra de andre, men på grunn av “tailing” hadde den også vært vanskelig å separere fra de andre i en blanding. 3m-PFOS hadde en retensjonstid på 11,65 minutter og 6m-PFOS hadde en retensjonstid på 11, 68 minutter. Disse to ville ha en overlapp i en blanding. 4m-PFOS og 5m-PFOS ville også ha overlapp i en blanding.

### **3.4.2 Resultater fra forsøk med C30 kolonne ved pH 7**

For å unngå “tailing” problemet, som var antatt å være forårsaket av lav pH, ble det laget ny buffer løsning med pH 7. Prøvene ble nå fortynnet med 50 % buffer (15 mM ammoniumacetat i vann) løsning med pH 7. Det viste seg at “tailing” ble litt mindre ved å ha prøvene i pH 7 og analyttene eluerte litt senere enn med pH 4, men rekkefølgen på elueringen var den samme som nevnt i 3.4.1, se Figur 13 og tilhørende Tabell 14.



*Figur 13: Kromatogrammer for L-PFOS, 1m-PFOS, 2m-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS for C30 kolonne med pH 7. Deteksjon skjedde ved "pseudo" MRM og masseovergang var  $m/z$  499  $\rightarrow$  499 (konsentrasjon var ca 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).*



*Tabell 14: Oversikt over identifisert topper, derers retensjonstid og navn på forbindelser i Figur 13.*

| <i>Forbindelser</i> | <i>Retensjonstid (min)</i> |
|---------------------|----------------------------|
| L-PFOS              | 16,77                      |
| 1m-PFOS             | 17,30                      |
| 2m-PFOS             | 16,00                      |
| 3m-PFOS             | 14,22                      |
| 4m-PFOS             | 13,86                      |
| 5m-PFOS             | 13,39                      |
| 6m-PFOS             | 15,17                      |

Spesielt dårlig separasjon for L-PFOS og mye “tailing”, var ulempene med C30 kolonnen som gjorde denne kolonna uegnet til separasjon på noen av isomerne, derfor ble det ikke gjort noen forsøk med blanding av alle de utvalgte isomere på C30 kolonne.

C30 kolonne ble benyttet , fordi den har vært brukt i en tidligere tysk studie for akkurat dette formålet (62), men i den tyske studien ble en Prontosil C30 kolonne fra en annen leverandør og det ble benyttet andre instrumentelle betingelser som pH verdi og temperatur, som kan være en av grunnene til å gi bedre separasjon, enn de interumentelle betingelsene som ble brukt under denne oppgaven.

### **3.5 Diskusjon av analyseresultater**

Denne metoden er den første metoden som operer med kolonnesvitsjing system for separasjon av PFOS isomere og de tidligere studiene som analyserte PFOS isomere har ikke brukt kolonnesvitsjing system (7;12;14;38;39;63-64). Det har ikke vært mulig å separere alle de utvalgte PFOS isomere ved bruk av denne metoden. Separasjon av alle utvalgte isomere i en annen studie har tidligere vært mulig ved å separere PFOS isomerene med hensyn på

masser istedenfor retensjonstid (39), det var ikke mulig under denne studien. Det ble kun brukt masseovergangen  $m/z$  499→499 under denne studien på grunn av for dårlig følsomhet med andre masser som for eksempel  $m/z$  80 og  $m/z$  99.

Benskin o. a. har brukt lengre program enn det programmet som har gitt de beste resultatene under denne studien (39). Det kan være årsaken til at det ikke er en samsvar mellom separasjons resultater for denne studien og studien til Benskin o.a. (39).

C30 kolonne ble brukt under denne studien var ikke helt lik som en i annen tysk studie, som det ble tatt utgangspunktet i, for å teste en C30 kolonne under denne studien (62). I tillegg ble det brukt andre instrumentelle betingelser som pH og temperatur i den tyske studien som kan ha hatt en betydning i forhold til separasjon av PFOS isomerene (62). Den tyske studien hadde også dårlig separasjon med L-PFOS (62). C30 kolonnen brukt under denne studien gav dårlig separasjon og mye “tailing”. Det var noe separasjon mellom noen av isomerene, men på grunn av “tailing” og dårlig separasjon mellom enkelte isomere, ble ikke disse isomerene analysert i en blanding.

PFO kolonne egner seg som analyse kolonne for denne metoden og har gitt seprasjon mellom mange isomere. Det er vanskelig å sammenligne resultater fra denne studien med noen tidligere studier. De tidligere studiene har ikke brukt alle utvalgte monometyl PFOS isomerene som har blitt testet under denne studien og dermed er det ikke lett å sammenligne resultatene (7;12;14;38;39;63;64). Separasjon av PFOS isomere har vært krevende i de nevnte tidligere studiene (7;12;14;38;39;63;64).

Ettersom det ble separasjon mellom mange de utvalgte isomerene, regnes denne metoden som god nok for kvalitativ identifisering av L-PFOS, 3m-PFOS og 6m-PFOS . Denne metoden ble ikke kvalitativ  
reelle serumprøver analyseres

## 4. KONKLUSJON

Denne metoden er den først til å operere med kolonnesvitsjing system for separasjon av PFOS isomer.

I andre studier har det vært brukt andre masseoverganger som har gjort det mulig å separere PFOS isomere ved hjelp av masseforskjell ( $m/z$ ) (39;63). En slik tilnærming har ikke vært mulig under denne oppgaven. Kollisjonsenergi 40 eV viste seg å være optimal for isomer separasjon under denne studien. Masseovergang  $m/z$  499 (både som foreldre og datter ion) gir det beste resultatet selv om studien til Benskin o.a. (39) opererer med andre masser enn bare  $m/z$  499.

Separasjon av PFOS isomere ble hoveddelen av denne studien, og en større del av arbeidet på laboratoriet ble brukt til å få til separasjon av disse isomere. Denne separasjonen har vært utfordrende i tidligere studier også (12;39;40). Kolonnesvitsjing system viste seg å være et egnet analyseverktøy for analyse av PFOS isomere.

C30 kolonne gav dårlig separasjon mellom PFOS isomere og mye ”tailing” som gjorde denne kolonnen uegnet for analyse metoden under denne studien.

Resultatene viser at PFO kolonne gir en separasjon mellom flere av PFOS isomerene, men ikke alle. Det var mulig å få separasjon mellom L-PFOS, 3m-PFOS, 4m-PFOS, 5m-PFOS og 6m-PFOS, Men koeluering mellom 2m og 4m-PFOS og 1m og 5m PFOS viser at optimering og modifisering av metoden er nødvendig for framtidige undersøkelser.

Resultatene fra forsøk med PFO kolonne med tilkobling av for-kolonne viste seg at for-kolonne skapte ingen betydelige forskjeller på separasjonen av PFOS isomerene og dermed kunne denne metoden brukes videre til serum prøver analyser.

Resultatene av serum prøver viste at metoden utviklet under denne studien egner seg for separasjon av PFOS isomere separasjon i reelle prøver.

## 5. VIDERE ARBEID

Denne utviklingen av denne kvalitative metoden for separasjon av PFOS isomere har stort sett vært vellykket, men pga mangel på tid var det ikke mulig å videreutvikle metoden, kvantifisere metoden og analysere prøvene på nytt.

### 5.1 Videre utvikling av metoden

For videre utvikling av metoden kan andre kolonner testes ut som for eksempel C30 for å se om det kan forbedre separasjonen. Andre instrumentelle betingelser kan også brukes som for eksempel endring i pH og teste flere gradient programmer.

Det kan gjøres forsøk for å forbedre separasjonen for PFOS isomerene. Det kan gjøres arbeid med å optimalisere en metode for analyse av PFOS isomerene på et LC instrument med kolonne oven som kan gi bedre fragmentering og kanskje det vil gi en mulighet for å separere PFOS isomere med hensyn på  $m/z$  i tillegg til retensjonstid.

### 5.2 Kvantifisering av metoden

Neste trinn i PFOS isomeranalysene vil være å lage standardkurver ved å analysere kjente konsentrasjoner av PFOS isomere på kolonnesvitsjing systemet. Disse kan da brukes til å kvantifisere PFOS isomerene i prøvene.

Deretter kan det følgende gjøres:

- Testing av LOD- deteksjonsgrenser
- Testing av linearitet
- Testing av instrument nøyaktighet
- Testing av robusthet av metoden

### 5.3 Analysering av prøvene

Etter kvantifiseringen av metoden skal reelle serumprøver analyseres på nytt.

## REFERANSER

- (1) Hundley SG, Sarrif AM, Kennedy GL. Absorption, distribution, and excretion of ammonium perfluorooctanoate (APFO) after oral administration to various species. *Drug and Chemical Toxicology* 2006;29(2):137-45.
- (2) Renner R. Growing Concern Over Perfluorinated Chemicals. *Environmental Science & Technology* 2001 1;35(7):154A-60A.
- (3) Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences* 2007;99(2):366-94.
- (4) Kennedy GL, Butenhoff JL, Olsen GW, O'Connor JC, Seacat AM, Perkins RG, Biegel LB.; Murphy SR.; Farrar DG. The toxicology of perfluorooctanoate. *Critical Reviews in Toxicology* 2004;34(4):351-84.
- (5) Schultz MM, Barofsky DF, Field JA. Fluorinated alkyl surfactants. *Environmental Engineering Science* 2003;20(5):487-501.
- (6) Haug LS. Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds-comparing exposure estimates with biomarkers of exposure. Faculty of mathematics and Natural Sciences, University of Oslo. 16-2-2011
- (7) Benskin JP, Holt A, Martin JW. Isomer-Specific Biotransformation Rates of a Perfluorooctane Sulfonate (PFOS)-Precursor by Cytochrome P450 Isozymes and Human Liver Microsomes. *Environmental Science & Technology* 2009;43(22):8566-72.
- (8) Haug LS, Thomsen C, Becher G. A sensitive method for determination of a broad range of perfluorinated compounds in serum suitable for large-scale human biomonitoring. *Journal of Chromatography A* 2009;1216(3):385-93.
- (9) Houde M, Martin JW, Letcher RJ, Solomon KR, Muir DCG. Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substances: A Review. *Environmental Science & Technology* 2006 4;40(11):3463-73.
- (10) Reagen WKL, K.R., Jacoby, C.B., Purcell, R.G. Kestner, T.A., Payfer, R.M. Miller, J.W. 2007. Environmental characterization of 3M electrochemical fluorination derived perfluorooctanoate and perfluoroktanesulfonate. In Society of Environmental Toxicology and Chemistry 28<sup>th</sup> North American Meeting Platform Presentation, Milwaukee, WI, 11-15. 2007.
- (11) Rayne S, Forest K, Friesen KJ. Congener-specific numbering systems for the environmentally relevant C4 through C8 perfluorinated homologue groups of alkyl sulfonates, carboxylates, telomer alcohols, olefins, and acids, and their derivatives. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 2008 12;43(12):1391-401.
- (12) Riddell N, Arsenault G, Benskin JP, Chittim B, Martin JW, McAlees A, McCrindle R. Branched Perfluorooctane Sulfonate Isomer Quantification and Characterization in Blood Serum Samples by HPLC/ESI-MS(/MS). *Environmental Science & Technology* 2009;43(20):7902-8.

- (13) Martin JW, Asher BJ, Beesoon S, Benskin JP, Ross MS. PFOS or PreFOS? Are perfluorooctane sulfonate precursors (PreFOS) important determinants of human and environmental perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure? *Journal of Environmental Monitoring* 2010;12(11):1979-2004.
- (14) Langlois I, Oehme M. Structural identification of isomers present in technical perfluorooctane sulfonate by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006;20(5):844-50.
- (15) Han X, Snow TA, Kemper RA, Jepson GW. Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins. *Chemical Research in Toxicology* 2003;16(6):775-81.
- (16) Seacat AM, Thomford PJ, Hansen KJ, Olsen GW, Case MT, Butenhoff JL. Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys. *Toxicological Sciences* 2002;68(1):249-64.
- (17) Seacat AM, Thomford PJ, Hansen KJ, Clemen LA, Eldridge SR, Elcombe CR, Butenhoff JL. Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats. *Toxicology* 2003;183(1-3):117-31.
- (18) Olsen GW, Hansen KJ, Stevenson LA, Burris JM, Mandel JH. Human Donor Liver and Serum Concentrations of Perfluorooctanesulfonate and Other Perfluorochemicals. *Environmental Science & Technology* 2003 1;37(5):888-91.
- (19) Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environmental Health Perspectives* 2007;115(9):1298-305.
- (20) Steenland K, Fletcher T, Savitz DA. Epidemiologic Evidence on the Health Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Environmental Health Perspectives* 2010 1;118(8) 1100–1108.
- (21) Olsen GW, Butenhoff JL, Zobel LR. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: An epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reproductive Toxicology* 2009;27(3-4):212-30.
- (22) [http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en\\_US/PFOS/PFOA/Information/phase-out-technologies/](http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/PFOS/PFOA/Information/phase-out-technologies/) (Tilgjengelig 29.11.2012)
- (23) Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). 2009. <http://chm.pops.int/> (Tilgjengelig 27.09.2011)
- (24) eurlex.europa.eu. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:372:0032:0034:en:PDF> (Tilgjengelig 15.09.2011)
- (25) Regjeringen.no. <http://www.regjeringen.no/nb/dep/md/presesenter/pressemeldinger/2007/forbyr-miljogiften-pfos.html?id=462603> (Tilgjengelig 18.09.2011)

- (26) OECD. Draft assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts: complete assessment. ENV/JM/RD 17/final. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2002.
- (27) Stock NL, Lau FK, Ellis DA, Martin JW, Muir DCG, Mabury SA. Polyfluorinated Telomer Alcohols and Sulfonamides in the North American Troposphere. *Environmental Science & Technology* 2004;8;38(4):991-6.
- (28) Begley TH, White K, Honigfort P, Twaroski ML, Neches R, Walker RA. Perfluorochemicals: Potential sources of and migration from food packaging. *Food Additives and Contaminants* 2005;1;22(10):1023-31.
- (29) Sinclair E, Kim SK, Akinleye HB, Kannan K. Quantitation of Gas-Phase Perfluoroalkyl Surfactants and Fluorotelomer Alcohols Released from Nonstick Cookware and Microwave Popcorn Bags. *Environmental Science & Technology* 2007;10;41(4):1180-5.
- (30) Emmett EA, Zhang H, Shofer FS, Freeman D, Rodway NV, Desai C, Shaw LM. Community exposure to perfluorooctanoate: Relationships between serum levels and certain health parameters. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 2006;48(8):771-9.
- (31) Skutlarek D, Exner M, Farber H. Perfluorinated surfactants in surface and drinking water. *Environmental Science and Pollution Research* 2006;13(5):299-307.
- (32) Haug LS, Thomsen C, Bechert G. Time Trends and the Influence of Age and Gender on Serum Concentrations of Perfluorinated Compounds in Archived Human Samples. *Environmental Science & Technology* 2009;43(6):2131-6.
- (33) Haug LS, Thomsen C, Brantsaeter AL, Kvale HE, Haugen M, Becher G, Alexander J, Meltzer HM, Knutsen HK. Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans. *Environment International* 2010;36(7):772-8.
- (34) Harrad S, de Wit CA, Abdallah MAE, Bergh C, Bjorklund JA, Covaci A, Darnerud PO, de Boer J, Diamond M, Huber S, Leonards P, Mandalakis M, Oestman C, Haug LS, Thomsen C, Webster TF. Indoor Contamination with Hexabromocyclododecanes, Polybrominated Diphenyl Ethers, and Perfluoroalkyl Compounds: An Important Exposure Pathway for People? *Environmental Science & Technology* 2010;44(9):3221-31.
- (35) Kubwabo C, Stewart B, Zhu J, Marro L. Occurrence of perfluorosulfonates and other perfluorochemicals in dust from selected homes in the city of Ottawa, Canada. *Journal of Environmental Monitoring* 2005;7(11):1074-8.
- (36) Vestergren R, Cousins IT, Trudel D, Wormuth M, Scheringer M. Estimating the contribution of precursor compounds in consumer exposure to PFOS and PFOA. *Chemosphere* 2008;73(10):1617-24.
- (37) Beesoon S, Webster GM, Shoeib M, Harner T, Benskin JP, Martin JW. Isomer Profiles of Perfluorochemicals in Matched Maternal, Cord, and House Dust Samples: Manufacturing Sources and Transplacental Transfer. *Environ Health Perspect* 2011;14;119(11):1659-64.

- (38) Kärrman A, Langlois I, van Bavel B, Lindström G, Oehme M. Identification and pattern of perfluorooctane sulfonate (PFOS) isomers in human serum and plasma. *Environment International* 2007;33(6):782-8.
- (39) Benskin JP, Bataineh M, Martin JW. Simultaneous characterization of perfluoroalkyl carboxylate, sulfonate, and sulfonamide isomers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2007;79(17):6455-64.
- (40) Chu S, Letcher RJ. Linear and Branched Perfluorooctane Sulfonate Isomers in Technical Product and Environmental Samples by In-Port Derivatization-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 2009;29;81(11):4256-62.
- (41) Arsenault G, Chittim B, Gu J, McAlees A, McCrindle R, Robertson V. Separation and fluorine nuclear magnetic resonance spectroscopic (<sup>19</sup>F NMR) analysis of individual branched isomers present in technical perfluorooctanesulfonic acid (PFOS). *Chemosphere* 2008 ;73(1):53-59.
- (42) Arsenault G, Chittim B, McAlees A, McCrindle R, Riddell N, Yeo B. Some issues relating to the use of perfluorooctanesulfonate (PFOS) samples as reference standards. *Chemosphere* 2008;70(4):616-25.
- (43) Langlois I, Berger U, Zencak Z, Oehme M. Mass spectral studies of perfluorooctane sulfonate derivatives separated by high-resolution gas chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21(22):3547-53.
- (44) Van Leeuwen SPJ, de Boer J. Extraction and clean-up strategies for the analysis of poly- and perfluoroalkyl substances in environmental and human matrices. *Journal of Chromatography A* 2007;1153(1-2):172-85.
- (45) Hansen KJ, Clemen LA, Ellefson ME, Johnson HO. Compound-specific, quantitative characterization of organic: Fluorochemicals in biological matrices. *Environmental Science & Technology* 2001;35(4):766-70.
- (46) Kärrman A, van Bavel B, Jarnberg U, Hardell L, Lindstrom G. Development of a solid-phase extraction-HPLC/single quadrupole MS method for quantification of perfluorochemicals in whole blood. *Analytical Chemistry* 2005;77(3):864-70.
- (47) Kuklennyik Z, Reich JA, Tully JS, Needham LL, Calafat AM. Automated solid-phase extraction and measurement of perfluorinated organic acids and amides in human serum and milk. *Environmental Science & Technology* 2004;38(13):3698-704.
- (48) Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Measurement of 18 perfluorinated organic acids and amides in human serum using on-line solid-phase extraction. *Analytical Chemistry* 2005;77(18):6085-91.
- (49) Holm A, Wilson SR, Molander P, Lundanes E, Greibrokk T. Determination of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in human plasma by large volume injection capillary column switching liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 2004;27(13):1071-9.
- (50) Inoue K, Okada F, Ito R, Kawaguchi M, Okanouchi N, Nakazawa H. Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonylamide in human plasma by column-switching liquid chromatography-electrospray mass

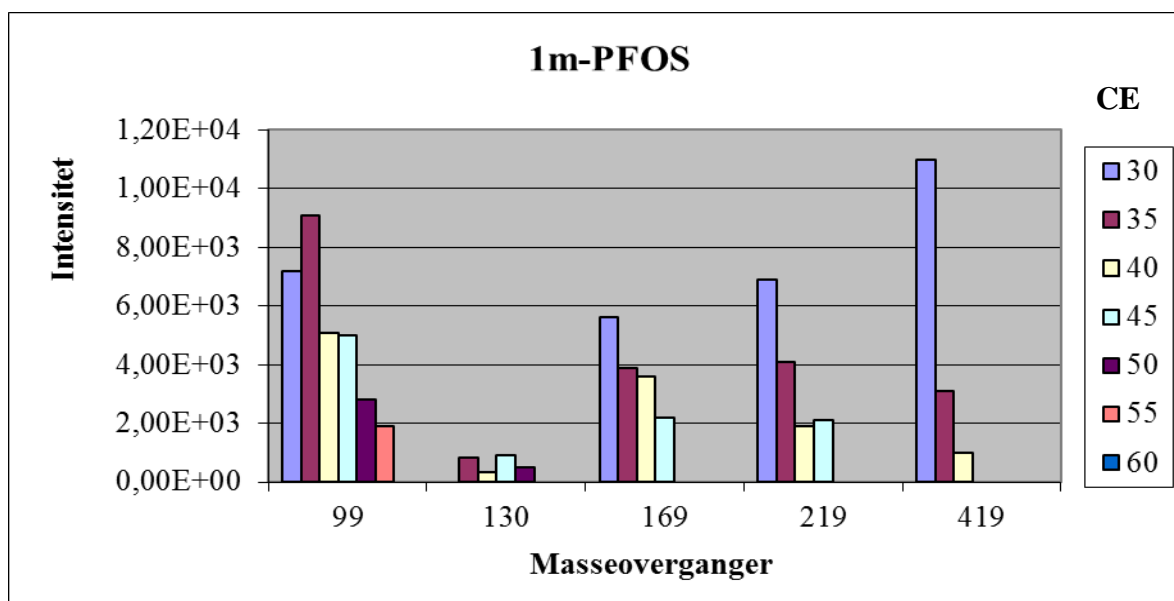


- spectrometry coupled with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004;810(1):49-56.
- (51) Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE, Karlsen J. *Kromatografi: Separasjon og deteksjon*. 2005. Universitetsforlaget: 1-300.
- (52) Martin JW, Kannan K, Berger U, De Voogt P, Field J, Franklin J, Giesy JP, Harner T, Muir DCG, Scott B, Kaiser M, Jarnberg U, Jones KC, Mabury SA, Schroeder H, Simcik M, Sottani C, van Bavel B, Karrman A, Lindstrom G, Van Leeuwen, S.. Analytical challenges hamper perfluoroalkyl research. *Environmental Science & Technology* 2004;38(13):248-55.
- (53) Villagrasa M, López de Alda M, Barcelo D. Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006;1;386(4):953-72.
- (54) Flaherty JM, Connolly PD, Decker ER, Kennedy SM, Ellefson ME, Reagen WK, Szostek B. Quantitative determination of perfluorooctanoic acid in serum and plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005;819(2):329-38.
- (55) Powley CR, George SW, Ryan TW, Buck RC. Matrix Effect-Free Analytical Methods for Determination of Perfluorinated Carboxylic Acids in Environmental Matrixes. *Analytical Chemistry* 2005;3;77(19):6353-8.
- (56) Esind.com. [http://esind.com/pages/products/products\\_05\\_2b.tpl](http://esind.com/pages/products/products_05_2b.tpl) (Tilgjengelig 25.09.2011)
- (57) Wang Y, Arsenault G, Riddell N, McCrindle R, McAlees A, Martin JW. Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Precursors Can Be Metabolized Enantioselectively: Principle for a New PFOS Source Tracking Tool. *Environmental Science & Technology* 2009;43(21):8283-9.
- (58) Ymc.de.  
[http://www.ymc.de/ymceurope/products/analyticalLC/analyticalColumns/YMC30\\_prop.htm](http://www.ymc.de/ymceurope/products/analyticalLC/analyticalColumns/YMC30_prop.htm). (Tilgjengelig 25.06.2011)
- (59) Sander LC, Wise SA. Shape selectivity in reversed-phase liquid chromatography for the separation of planar and non-planar solutes. *Journal of Chromatography A* 1993;17;656(1-2):335-51.
- (60) Sander LC, Sharpless KE, Craft NE, Wise SA. Development of Engineered Stationary Phases for the Separation of Carotenoid Isomers. *Analytical Chemistry* 1994 ;1;66(10):1667-74.
- (61) Voogt Pd, Saez Mn. Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances. *Trac- Trends in Analytical Chemistry* 2006 ;25(4):326-42.
- (62) Abstract, Dioxin, Bruxelles, Belgium 2011
- (63) Benskin JP, De Silva AO, Martin LJ, Arsenault G, McCrindle R, Riddell N, Mabury SA, Martin JW. Disposition of perfluorinated acid isomers in sprague-dawley rats; Part 1: Single dose. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2009;28(3):542-54.

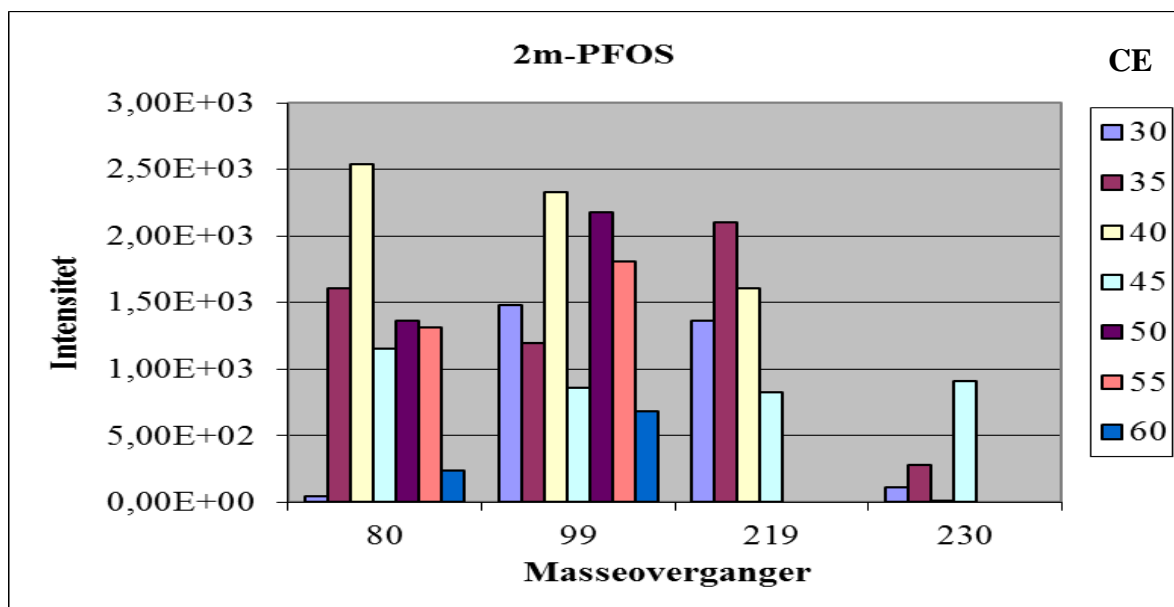
(64) De Silva AO, Benskin JP, Martin LJ, Arsenault G, McCrindle R, Riddell N, Martin JW, Mabury SA. Disposition of perfluorinated acid isomers in sprague-dawley rats; Part 2: Subchronic dose. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2009;28(3):555-67.

## VEDLEGG:

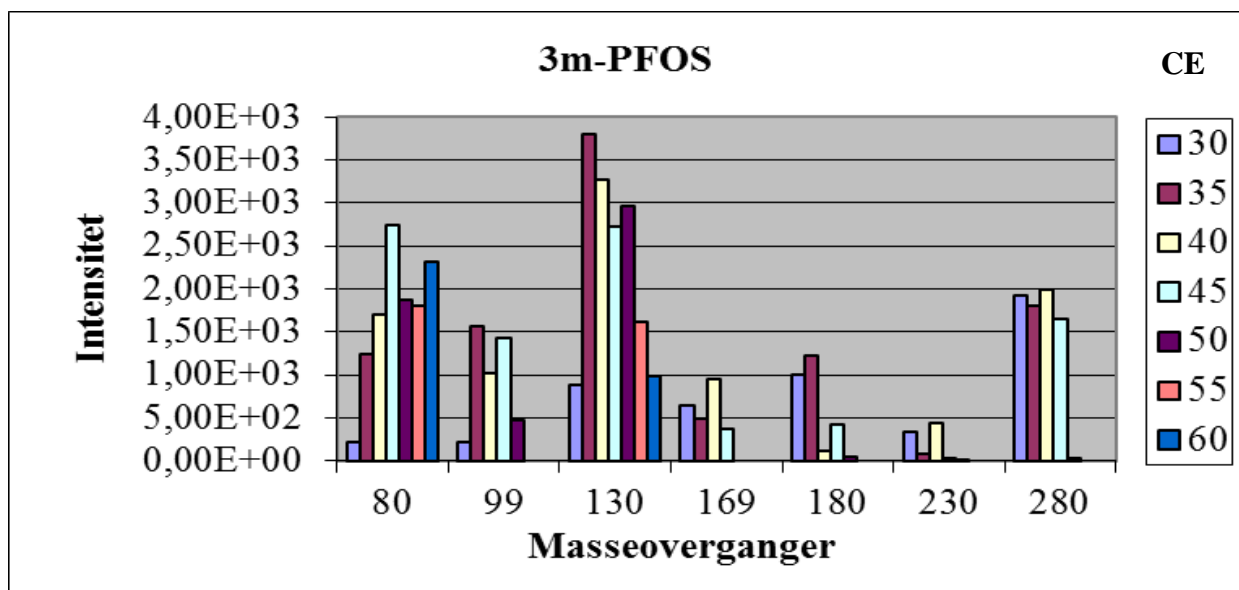
Resultater for masseovergangstest og kollisjonsenergi presentert i grafer



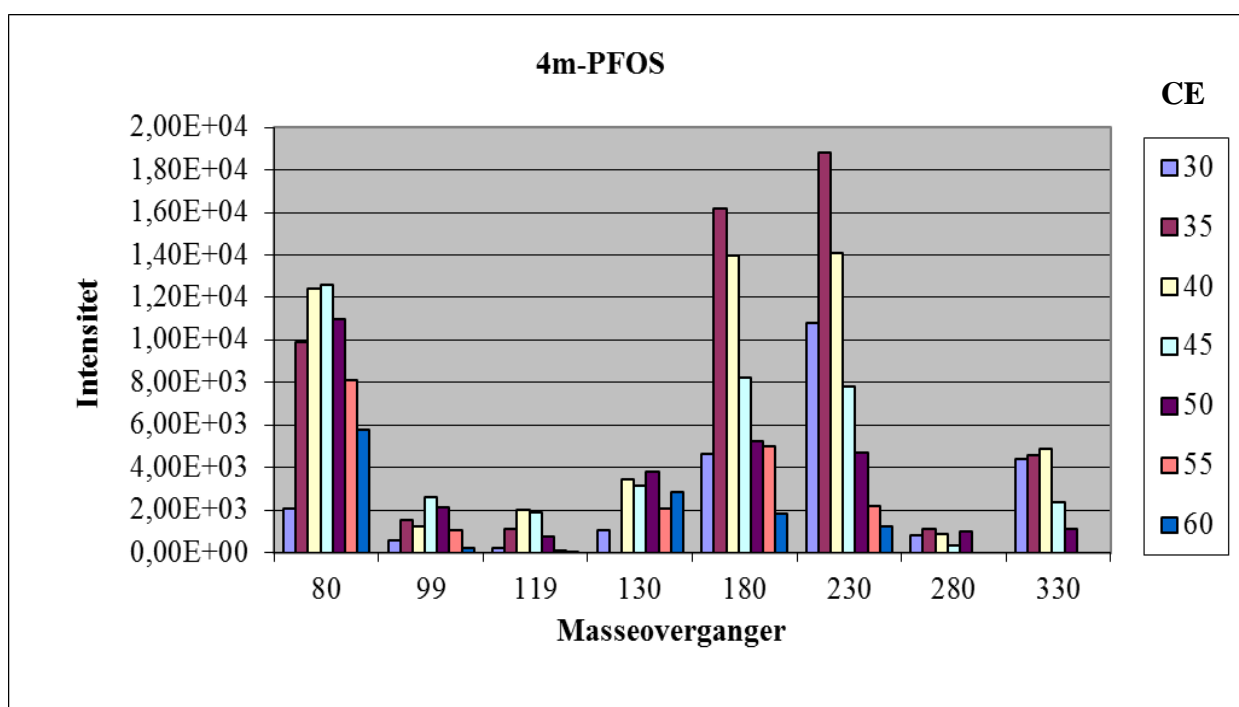
*Figur 14: Oversikt over masseoverganger og kollisjonsenergi for 1m-PFOS, m/z 419 var foreldreion.*



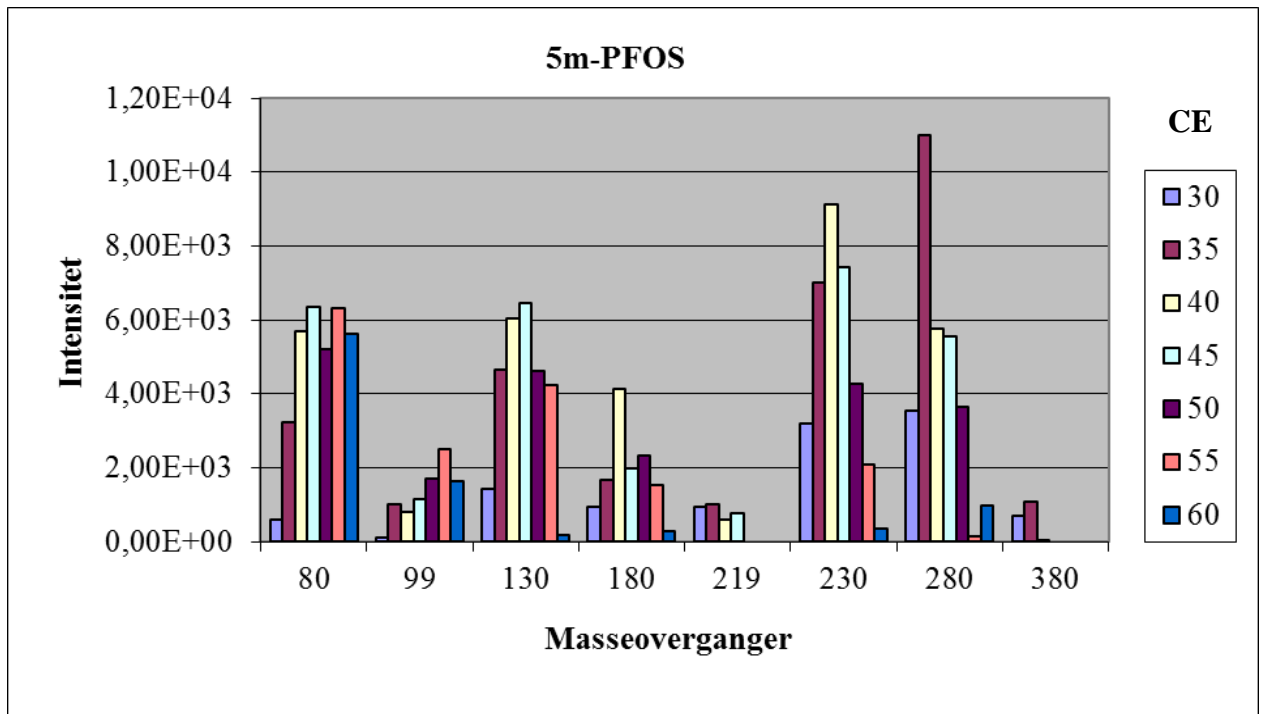
*Figur 15: Oversikt over masseoverganger og kollisjonsenergi for 2m-PFOS, m/z 419 var foreldreion.*



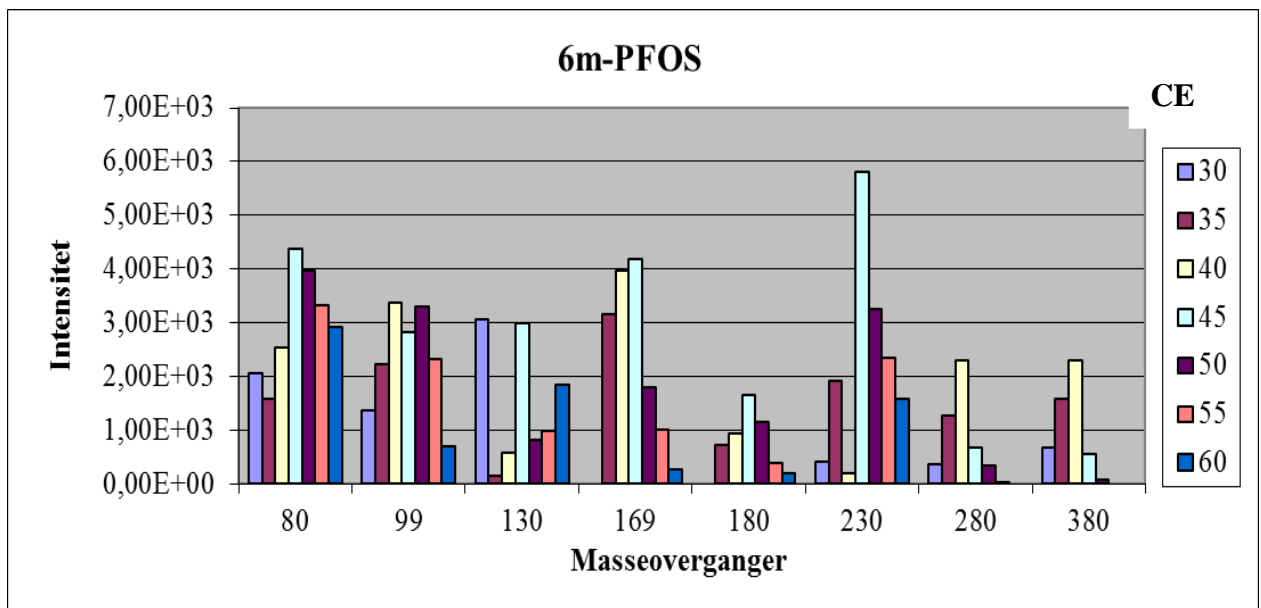
*Figur 16: Oversikt over masseoverganger og kollisjonsenergien for 3m-PFOS, m/z 419 var foreldreion.*



*Figur 17: Oversikt over masseoverganger og kollisjonsenergien for 4m-PFOS, m/z 419 var foreldreion.*



*Figur 18: Oversikt over masseoverganger og kollisjonsenergien for 5m-PFOS, m/z 419 var foreldreion.*



*Figur 19: Oversikt over masseoverganger og kollisjonsenergien for 6m-PFOS, m/z 419 var foreldreion.*