

Perfluoroctan-/ Perfluorbutansulfonsäure (PFOS/PFBS)

Anwendbarkeit	Bestimmung in Plasma und Harn
Analyt. Messprinzip	Hochleistungsflüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrische Detektion (LC/MS/MS)
Abgeschlossen im	April 2003

Zusammenfassung

Das hier beschriebene Verfahren dient zur Quantifizierung von Perfluoroctansulfonsäure (PFOS) und Perfluorbutansulfonsäure (PFBS), sowie deren Ammonium- und Alkalisalzen in Plasma und Harn von beruflich oder umweltbedingt gegenüber diesen Substanzen exponierten Personen.

Dabei werden die beiden Perfluoralkansulfonsäuren unter Zusatz von Perfluordecan-1-sulfonat als Internem Standard und Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als Ionenpaarreagenz bei pH 10 aus Plasma bzw. Urin in *tert.*-Butylmethylether extrahiert.

Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird der Extraktionsrückstand in Methanol gelöst und die Analyten anschließend hochdruckflüssigkeitschromatographisch getrennt und mittels tandem-massenspektrometrischer Detektion quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgt analog den zu analysierenden Proben mit Vergleichsstandards, die in Humanplasma bzw. Poolharn von unbelasteten Personen angesetzt werden und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.



Plasma

Perfluoroctansulfonsäure (PFOS)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 4,5\%$; 3,7% bzw. 6,7%
	Streubereich $u = 10\%$; 8,3% bzw. 14,9%
	bei einer Konzentration von 10; 50 bzw. 100 μg PFOS pro Liter Plasma und jeweils $n = 10$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 6,7\%$; 5,0% bzw. 7,1%
	Streubereich $u = 14,9\%$; 11,1% bzw. 15,8%
	bei einer Konzentration von 10; 50 bzw. 100 μg PFOS pro Liter Plasma und jeweils $n = 10$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 116\%$ bei 10 $\mu\text{g/L}$ und 98% bei 100 $\mu\text{g/L}$
Bestimmungsgrenze:	10 μg Perfluoroctansulfonsäure pro Liter Plasma

Perfluorbutansulfonsäure (PFBS)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 4,9\%$; 4,9% bzw. 4,0%
	Streubereich $u = 10,9\%$; 10,9% bzw. 8,9%
	bei einer Konzentration von 10; 50 bzw. 100 μg PFBS pro Liter Plasma und jeweils $n = 10$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 5,3\%$; 4,9% bzw. 5,0%
	Streubereich $u = 11,8\%$; 10,9% bzw. 11,2%
	bei einer Konzentration von 10; 50 bzw. 100 μg PFBS pro Liter Plasma und jeweils $n = 10$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 93\%$ bei 10 $\mu\text{g/L}$ und 94% bei 100 $\mu\text{g/L}$
Bestimmungsgrenze:	10 μg Perfluorbutansulfonsäure pro Liter Plasma

Harn

Perfluoroctansulfonsäure (PFOS)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 9,5\%$; 5,1% bzw. 4,4%
	Streubereich $u = 21,2\%$; 11,4% bzw. 9,8%

	bei einer Konzentration von 10; 50 bzw. 100 µg PFOS pro Liter Harn und jeweils $n = 10$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 10,2\%$; 5,7% bzw. 5,5% Streubereich $u = 22,7\%$; 12,7% bzw. 12,3%
	bei einer Konzentration von 10; 50 bzw. 100 µg PFOS pro Liter Harn und jeweils $n = 10$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 108\%$ bei 10 µg/L und 110% bei 100 µg/L
Bestimmungsgrenze:	10 µg Perfluoroctansulfonsäure pro Liter Harn

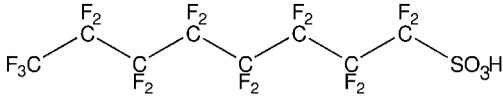
Perfluorbutansulfonsäure (PFBS)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 5,9\%$; 6,3% bzw. 6,6% Streubereich $u = 13,2\%$; 14,0% bzw. 14,7%
	bei einer Konzentration von 10; 50 bzw. 100 µg PFBS pro Liter Harn und jeweils $n = 10$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) $s_w = 8,2\%$; 6,5% bzw. 7,2% Streubereich $u = 18,3\%$; 14,5% bzw. 16,7%
	bei einer Konzentration von 10; 50 bzw. 100 µg PFBS pro Liter Harn und jeweils $n = 10$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate $r = 99\%$ bei 10 µg/L und 106% bei 100 µg/L
Bestimmungsgrenze:	10 µg Perfluorbutansulfonsäure pro Liter Harn

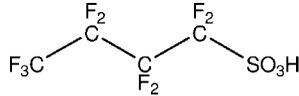
Perfluoroctansulfonsäure (PFOS) und Perfluorbutansulfonsäure (PFBS)

Perfluoroctansulfonsäure (PFOS) und Perfluorbutansulfonsäure (PFBS) sowie deren Ammonium- und Alkalisalze und Amide besitzen starke oberflächenaktive Eigenschaften. Sie werden in erheblichem Umfang zur Herstellung von Netzmitteln in Metallreinigern, bei der Metallbearbeitung, insbesondere aber zur Herstellung photographischer Filme und Papiere sowie zur wasser-, öl- und schmutzabweisenden Imprägnierung von Textilien, Papier und Leder eingesetzt [1].





Perfluoroctansulfonsäure



Perfluorbutansulfonsäure

Abb. 1. Strukturformeln von Perfluoroctansulfonsäure (PFOS) und Perfluorbutansulfonsäure (PFBS).

Zur Aufnahme und Elimination sowie zur Metabolisierung der Perfluoralkansulfonsäuren beim Menschen liegen selbst für das in großem Umfang weltweit eingesetzte PFOS nur wenige Untersuchungsdaten vor.

Beim industriellen Umgang mit PFOS bzw. PFBS und seinen Derivaten dominieren die inhalative und perkutane Aufnahme. PFOS hat eine mittlere biologische Halbwertszeit von 9 Jahren [1]. Eigene Erfahrungen zeigen, dass die Halbwertszeit von PFBS im Bereich von einigen Wochen liegt. Die Ausscheidung der unveränderten Perfluorsulfonsäuren erfolgt sowohl über den Harn (insgesamt ca. 30% der Dosis bei Ratten) als auch über die Fäces [1].

Die Daten zur Toxikologie von PFOS wurden in einem ausführlichen Bericht zusammengestellt und von der OECD bewertet [2]. Zur Toxikologie von PFBS liegt derzeit keine Literatur vor.

Studien zeigen, dass die Persistenz von PFOS zu einer allgemeinen Verbreitung in der Umwelt geführt hat [1], woraus eine Hintergrundbelastung in der Bevölkerung gegenüber PFOS resultiert. Die meisten Erfahrungen hierzu kommen aus den USA. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die bisher in der Literatur beschriebenen Konzentrationen an PFOS und PFBS im Blut der Allgemeinbevölkerung. Die nachgewiesenen Konzentrationen an PFOS betragen dabei im Mittel ca. 40 µg/L Plasma (vgl. Tabelle 1). Zu PFBS sind bisher keine Daten veröffentlicht worden. Eigene Untersuchungen zeigen allerdings, dass keine Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung gegenüber PFBS oberhalb der bei 10 µg/L Plasma liegenden Nachweisgrenze besteht.

Im Gegensatz hierzu werden in der Arbeitsmedizin für PFBS mittlere Konzentrationen von 333 µg/L Blut gefunden (vgl. Tabelle 2). Tabelle 2 gibt einen kurzen Überblick über die im Rahmen von arbeitsmedizinischen Untersuchungen nachgewiesenen PFOS- bzw. PFBS-Konzentrationen.

Tab. 1. PFOS und PFBS-Konzentrationen im Plasma der Allgemeinbevölkerung.

Umweltmedizinische Untersuchungen			
Substanz	n	µg/L Plasma	Literatur
PFOS	599 Kinder Alter: 2–12	Mittelwert: 35 (Mädchen) 40 (Jungen) 95. Perz.: 515	[3]
	645 Erwachsene (Blutspender) Alter: 20–69	Mittelwert: 35 95. Perz.: 1656	[4]
	238 Personen Alter: 65–96	Mittelwert: 31 95. Perz.: 175	[5]
	15 Nabelschnurblut	Bereich: 1,6–5,3	[6]
PFBS	n = 356	Bereich: < 10	[7]

Tab. 2. Plasmakonzentrationen von PFOS und PFBS im Rahmen arbeitsmedizinischer Untersuchungen.

Arbeitsmedizinische Untersuchungen			
Substanz	n	µg/L Plasma	Literatur
PFOS	263	Mittelwert: 1320 Bereich: 60–10060	[8]
	178	Mittelwert: 2190 Maximum: 12830	[9]
PFBS	170	Mittelwert: 333 Bereich: < 10–2057	[7]

Autoren: *G. Leng, K. Willmersdorf*

Prüfer: *H. Kirchherr*



Perfluorooctan-/ Perfluorbutansulfonsäure (PFOS/PFBS)

Anwendbarkeit	Bestimmung in Plasma und Harn
Analyt. Messprinzip	Hochleistungsflüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrische Detektion (LC/MS/MS)
Abgeschlossen im	April 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlage des Verfahrens
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen
2.1	Geräte
2.2	Chemikalien
2.3	Lösungen
2.4	Vergleichsstandards
3	Probenahme und Probenvorbereitung
3.1	Probenaufbereitung
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen
4.1	Hochleistungsflüssigchromatographische Arbeitsbedingungen
5	Analytische Bestimmung
6	Kalibrierung
7	Berechnung der Analysenergebnisse
8	Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung
9	Beurteilung des Verfahrens
9.1	Präzision
9.2	Richtigkeit
9.3	Nachweisgrenzen
9.4	Störeinflüsse
10	Diskussion der Methode
11	Literatur

1 Grundlage des Verfahrens

Perfluorooctan- sowie Perfluorbutansulfonsäure werden unter Zusatz von Perfluor-decan-1-sulfonat als Internem Standard und Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als Ionenpaarreagenz bei pH 10 aus Plasma bzw. Urin in *tert.*-Butylmethylether extrahiert.

Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird der Extraktionsrückstand in Methanol gelöst und die Analyten anschließend hochdruckflüssigkeitschromatographisch getrennt und mittels tandem-massenspektrometrischer Detektion quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgt analog den zu analysierenden Proben mit Vergleichsstandards, die in Humanplasma bzw. Poolharn von unbelasteten Personen angesetzt werden und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

HPLC-System bestehend aus einer ternären Gradientenpumpe (z. B. Waters Alliance 2695), einer Vorrichtung zum Entgasen der Eluenten, einem Säulentermostat, einem Injektionsventil, einem automatischen Probengeber, einem tandem-massenspektrometrischen Detektor (z. B. Micromass Quattro Ultima) sowie einem PC-System zur Datenauswertung

HPLC- Säule:

Zorbax Eclipse XDB-C₈, Länge: 50 mm; innerer Durchmesser: 4,6 mm; Teilchendurchmesser: 5 µm (z. B. Agilent, Best.Nr.: 946975-906)

Einmalentnahmebesteck mit Antikoagulanzen (z. B. K-EDTA-Monovetten von Sarstedt)

Laborzentrifuge (z. B. Hettich Rotanta 460R)

Laborrüttler (z. B. IKA Vibrax VXR basic)

Analysenwaage (z. B. Mettler AE 200)

Magnetrührer (z. B. IKA IKAMAG RET-GS)

Vakuumentrifuge (z. B. Fa. Saur Vacuum-Concentrator BA-VC-300H)

Variabel einstellbare Pipetten 10–100 µL und 100–1000 µL (z. B. Transferpette, Fa. Brand)

13-mL-Polypropylen-Röhrchen mit Schraubdeckel (z. B. Sarstedt, Best.-Nr.: 60.541)

4-mL-Polypropylen-Röhrchen (z. B. Sarstedt, Best.-Nr.: 73.705)

Transfer-Pipetten (z. B. Sarstedt, Best.-Nr.: 86.1171)

10-, 100-, 250- und 500-mL-Messkolben

250-mL-Becherglas

1-mL-Probengläschen mit Bördelrand und teflonkaschierten Bördelkappen für HPLC-Autosampler (z. B. Macherey-Nagel)

2.2 Chemikalien

Kalium-heptadecafluoroctansulfonat (> 98%) (z. B. Fluka, Best.-Nr.: 77282)

Kalium-nonafluor-1-butansulfonat (> 97%) (z. B. Fluka, Best.-Nr.: 60418)

Ammonium-perfluor-1-decansulfonsäure (25% in Wasser/2-Butoxyethanol) (z. B. Aldrich, Best.-Nr.: 468150)

Methanol LiChrosolv (> 99,8%) (z. B. Merck, Best.-Nr.: 106018)

tert-Butylmethylether SupraSolv (z. B. Merck, Best.-Nr.: 101995)

Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (min. 98%) (z. B. Riedel-de-Haën, Best.-Nr.: 65305)

Ammoniumacetat (>97%) (z. B. Riedel-de-Haën, Best.-Nr.: 32301)

Natriumcarbonat wasserfrei, p. a. (>99%) (z. B. Merck, Best.-Nr.: 106392)

Natriumhydrogencarbonat p. a. (99,7–100,3%) (z. B. Merck, Best.-Nr.: 106329)

Natriumhydroxid p. a. (>99%) (z. B. Merck, Best.-Nr.: 106498)

Deionisiertes Wasser (z. B. über Millipore®-Technik)

Stickstoff, 99.996% (z. B. Linde)

Argon, 99.9993% (z. B. Linde)

2.3 Lösungen

10 M NaOH:

In einem 250-mL-Becherglas werden ca. 50 mL bidest. Wasser vorgelegt. Es werden vorsichtig insgesamt 40 g Natriumhydroxid zugegeben (Vorsicht: Hitzeentwicklung!). Die Lösung wird bis zur Klärung auf einem Magnetrührer durchmischt

und nach dem Abkühlen unter Nachspülen mit bidest. Wasser in einen 100-mL-Messkolben überführt und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

1 M NaOH:

In einem 100-mL-Messkolben werden ca. 50 mL Wasser vorgelegt und 10 mL der 10 M NaOH hinzupipettiert. Anschließend wird der Kolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

0,5 M Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Lösung (0,5 M TBAS):

In einem 250-mL-Becherglas werden 16,9 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat eingewogen und unter Rühren auf einem Magnetrührer in ca. 85 mL Wasser gelöst. Unter pH-Wert-Kontrolle (pH-Meter) und Rühren werden langsam ca. 4 mL der 10 M NaOH zudotiert, bis die Lösung einen pH-Wert von 10 aufweist. Dabei ist zu beachten, dass die letzten Tropfen langsam zudotiert werden, da der pH-Wert spontan umschlägt. Die Lösung wird anschließend mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL aufgefüllt.

0,25M Natriumcarbonat/Natriumhydrogencarbonat-Puffer:

In einem 250-mL-Becherglas werden 6,6 g Natriumcarbonat (wasserfrei) und 5,35 g Natriumhydrogencarbonat eingewogen und in ca. 200 mL bidest. Wasser gelöst. Die Lösung wird unter Nachspülen mit bidest. Wasser in einen 250-mL-Messkolben überführt und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Eluent C (100 mM Ammoniumacetat):

In einem 500-mL-Messkolben werden 3,85 g Ammoniumacetat eingewogen. Der Kolben wird unter zwischenzeitlichem Umschwenken mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Alle Lösungen sind bei Raumtemperatur mindestens 4 Wochen haltbar. Allerdings sollte der pH-Wert der 0,5 M TBAS-Lösung regelmäßig vor der Benutzung überprüft und gegebenenfalls mit 1 M Natronlauge auf pH 10 eingestellt werden.

2.4 Vergleichsstandards

Stammlösung:

Je ca. 112,4 mg Kalium-nonafluor-1-butansulfonat und ca. 107,4 mg Kalium-heptadecafluoroctansulfonat werden in einem 100-mL-Messkolben genau eingewogen. Der Kolben wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration der Perfluorbutansulfonsäure bzw. Perfluoroctansulfonsäure beträgt jeweils $c = 1 \text{ g/L}$.

Arbeitslösung A:

500 µL der Stammlösung werden in einem 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (50 mg/L).

Arbeitslösung B:

1,0 mL der Arbeitslösung A werden in einem 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (5 mg/L).

Arbeitslösung C:

1,0 mL der Arbeitslösung B werden in einem 10-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (500 µg/L).

Lösung des Internen Standards (ISTD)

Ausgangslösung des Internen Standards:

Als Ausgangslösung des Internen Standards dient die käuflich erhältliche Ammoniumperfluor-1-decansulfonsäure-Lösung (25% in Wasser/2-Butoxyethanol).

Stammlösung des Internen Standards:

400 µL der Ausgangslösung des Internen Standards werden in einen 100-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt ($c = 1 \text{ g/L}$).

Dotierlösung des Internen Standards:

1 mL der Stammlösung des Internen Standards wird in einen 100-mL-Messkolben pipettiert. Der Kolben wird anschließend mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt ($c = 10 \text{ mg/L}$).

Die Stammlösungen der Vergleichsstandards sowie des Internen Standards sind bei 4 °C ca. 6 Monate stabil. Die Verdünnungen sollten jedoch für jede Versuchsreihe neu angesetzt werden, da adsorptive Effekte am Glas nicht auszuschließen sind.

Vergleichsstandards:

Die Vergleichsstandardlösungen für die Bestimmung in Harn bzw. Plasma werden in Mischharn bzw. gepooltem Plasma von unbelasteten Probanden angesetzt. Zur Herstellung des Mischharns werden Spontanharnproben der Probanden in einem geeigneten Gefäß gesammelt bzw. gut durchmischt und bis zur Herstellung der Standards und des Kontrollmaterials bei -20 °C gelagert.

Für die Herstellung von gepooltem Humanplasma wird unbelasteten Probanden ca. 5 mL Blut mit Hilfe einer EDTA-Monovette entnommen und das Plasma gemäß Abschnitt 3 abgetrennt. Die Plasmaproben der Probanden werden in einem geeigneten Gefäß durchmischt und bis zur Herstellung der Standards und des Kontrollmaterials bei -20°C gelagert.

In einem 13 mL Polypropylen-Röhrchen mit Schraubdeckel werden 1 mL unbelasteter Mischharn bzw. unbelastetes Poolplasma gemäß dem in Tabelle 3 aufgelisteten Pipettierschema mit Standard und internem Standard dotiert. Der Kalibrierbereich ist von der zu erwartenden Konzentration in den realen Proben abhängig. In der Praxis hat sich ein Bereich von 5 bis 250 $\mu\text{g/L}$ bewährt.

Für Plasma- bzw. Harnproben, deren Gehalt mehr als 250 $\mu\text{g/L}$ beträgt, werden lediglich 0,1 mL des Probenmaterials zur Probenaufbereitung nach Abschnitt 3.1 eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgt analog mit 0,1 mL des unbelasteten Mischharns bzw. Poolplasmas entsprechend dem Pipettierschema in Tabelle 3 (vgl. auch Abschnitt 9.4).

Zur Bestimmung eventueller Leerwerte werden zu jeder Analysenserie eine Wasserprobe als Reagenzienleerwert und eine Harn- bzw. Plasmaleerwertprobe parallel aufgearbeitet.

Die Proben werden anschließend auf einem Laborrüttler (Vortex) 15 Sekunden intensiv geschüttelt und gemäß Abschnitt 3.1. weiter behandelt.

Tab. 3. Pipettierschema zur Herstellung von Vergleichsstandards in Mischharn bzw. gepooltem Humanplasma.

Volumen der Arbeitslösung			Volumen der Dotierlösung des ISTDs	Volumen des Mischharns bzw. Poolplasmas	Wasser	Konzentration des Vergleichsstandards
A	B	C	[μL]	[mL]	[mL]	[$\mu\text{g/L}$]
[μL]	[μL]	[μL]				
–	–	–	10	1	–	Leerwert
–	–	10	10	1	–	5
–	–	20	10	1	–	10
–	5	–	10	1	–	25
–	10	–	10	1	–	50
–	20	–	10	1	–	100
5	–	–	10	1	–	250
–	10	–	10	0,1*	0,9	500
–	20	–	10	0,1*	0,9	1000
–	50	–	10	0,1*	0,9	2500
–	10	–	10	0,01*	0,99	5000

* Im Arbeitsmedizinischen Bereich empfiehlt sich die Verdünnung der Analysenproben mit entsprechend geringerer Dotierung (vgl. Abschnitt 5 und 9.4).

3 Probenahme und Probenvorbereitung

Blut:

Ca. 5 mL Blut werden mit einem Einmalentnahmesystem mit Antikoagulantzusatz (z. B. EDTA-K-Monovetten, Sarstedt) durch langsame Aspiration entnommen. Die Blutprobe wird möglichst sofort bei 1200 g für 10 Min. zentrifugiert. Die obere Plasmaphase wird mit einer Transferpipette in ein verschließbares Polypropylenröhrchen überführt.

Harn:

Die Harnprobe wird ohne weitere Zusätze gleichfalls in ein verschließbares Polypropylenröhrchen überführt.

Sowohl die Plasmaproben als auch die Harnproben sind bei +4 °C einen Monat und bei -20 °C mindestens sechs Monate stabil.

3.1 Probenaufbereitung

Vor der Analyse werden die Proben gegebenenfalls aufgetaut und gut durchmischt. 1 mL Plasma bzw. 1 mL Harn werden in ein 13-mL-Polypropylen-Röhrchen mit Schraubdeckel pipettiert, gemäß dem Pipettierschema in Tabelle 3 (Abschnitt 2.4) mit 10 µL der Dotierlösung des Internen Standards versetzt und für 15 s am Laborrüttler (Vibrax) durchmischt.

Anschließend werden 200 µL der 0,5 M Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Lösung sowie 1 mL des 0,25 M Natriumcarbonat/Natriumhydrogencarbonat-Puffers zugegeben. Die Probe wird mit 3 mL *tert.*-Butylmethylether versetzt und für 20 min intensiv auf dem Laborrüttler (Vortex) geschüttelt.

Nach der Zentrifugation (2000 g, 20 min) werden 2,5 mL der oberen organischen Phase abgehoben und in ein neues 4 mL Polypropylen-Zentrifugengefäß überführt. Die Lösung wird anschließend in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt.

Der Rückstand wird in 500 µL Methanol aufgenommen und für 30 s am Laborrüttler (Vibrax) durchmischt. Anschließend wird die Probe zusätzlich für 15 min in ein Ultraschallbad gesetzt, um eine vollständige Auflösung des Rückstandes zu erreichen. Danach wird das Zentrifugengefäß für 5 min bei 2000 g zentrifugiert und der klare Überstand in ein Autosampler-Vial überführt, verschlossen und bei +4 °C bis zur Analyse gelagert.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgten an einer Gerätekopplung bestehend aus einem HPLC-Gradientenpumpe Waters 2695 und einem Quattro-Ultima-LC/MS/MS-System der Firma Micromass.

Hochleistungsflüssigchromatographische Arbeitsbedingungen

Trennsäule:	Material:	Stahl
	Länge:	50 mm
	innerer Durchmesser:	4,6 mm
	Säulenfüllung:	Zorbax Eclipse XDB-C ₈ , 5 µm
Trennprinzip:	Reversed phase	
Temperatur:	30 °C	
Detektion:	Tandem-Massenspektrometrischer Detektor	
Mobile Phase:	Eluent A: Methanol	
	Eluent B: Wasser	
	Eluent C: 100 mM NH ₄ Acetat	
	<i>(Die Eluenten sind vor ihrem Einsatz zu entgasen!)</i>	
Gradient:	siehe Tabelle 4	

Tab. 4. Programm der Gradientenpumpe.

Zeit (min)	Eluent A vol.%	Eluent B vol.%	Eluent C vol.%
0	50	40	10
0,5	90	0	10
9,5	90	0	10
10,5	50	40	10
12	50	40	10

Stopzeit:	14 Minuten
Flussrate:	0,25 mL/min
Injektionsvolumen:	10 µL

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

4.1 Massenspektrometrische Arbeitsbedingungen

Einstellungen der Ionenquelle:

Ionisationsmodus:	ESI negativ
Source-Temperature:	120 °C
Desolvation Temperature:	200 °C
Cone Gas Flow (L/h):	42
Desolvation Gas Flow (L/h):	510
Capillary (kV):	2,99
Cone (V):	100
Hex 1 (V):	0
Aperture (V):	0
Hex 2 (V):	0

Einstellungen des Analysers:

LM 1 Resolution:	14,0
HM 1 Resolution:	14,0
Ion Energy 1:	1,0
Entrance:	-1
Collision:	42
Exit:	5
LM 2 Resolution:	14,0
HM 2 Resolution:	14,0
Ion Energy 2:	1,0
Multiplier (V):	650

Die aufgelisteten Messbedingungen sind für die eingesetzte Gerätekonfiguration ermittelt worden und müssen für Geräte anderer Hersteller gemäß deren Angaben optimiert werden.



5 Analytische Bestimmung

Von den nach Abschnitt 3.1 aufgearbeiteten Plasma- bzw. Harnproben werden jeweils 10 µL in das HPLC-Gerät injiziert.

Bei jeder Analysenserie werden eine Qualitätskontrollprobe, zwei Reagenzienleerwerte sowie jeweils ein Plasma- bzw. Harnleerwert mitanalysiert. Liegen die ermittelten Messwerte außerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierkurve, werden die Plasma- bzw. Harnproben mit hochreinem Wasser 1:10 verdünnt und mit einer gleich verdünnten Vergleichsreihe erneut aufgearbeitet (vgl. Abschnitt 2.4).

Es werden die zeitlichen Verläufe der in Tabelle 5 aufgeführten Ionenübergänge im MRM-Modus des Tandem-Massenspektrometers (ESI-negativ-Modus) aufgezeichnet:

Tab. 5. Retentionszeiten und detektierte Ionenübergänge.

Analyt	Retentionszeit [min]	Ionenübergänge (MS/MS, ESI-neg-Modus)	
		Q 1	Q 3
Perfluorbutansulfonsäure (PFBS)	5,38	298,8	80,3*
Perfluoroctansulfonsäure (PFOS)	6,63	498,8	80,3 99,3* 130,3
Perfluordecansulfonsäure (ISTD)	7,31	599,0	80,0*

Die mit * gekennzeichneten Massen werden zur quantitativen Auswertung herangezogen.

Die in Tabelle 5 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten HPLC-Säule und des daraus resultierenden Retentionsverhaltens der Substanzen zu überzeugen.

In Abbildung 2 ist beispielhaft das Chromatogramm eines mit je 50 µg/L PFOS und PFBS dotierten, aufgearbeiteten Kalibrierstandards in gepooltem Humanplasma abgebildet. Abbildung 3 zeigt das Chromatogramm einer Harnprobe, der je 50 µg/L PFOS und PFBS zudotiert wurden.

6 Kalibrierung

Die nach Abschnitt 2.4 angesetzten Vergleichsstandards in Plasma bzw. Harn werden wie die Plasma- bzw. Harnproben nach Abschnitt 3.1 aufbereitet und entsprechend den in Abschnitt 4.1 und 4.2 aufgelisteten Geräteparametern analysiert. Es werden 10 µL der aufgearbeiteten Vergleichsstandards in das HPLC-Gerät injiziert. Die benötigten Reagenzienleerwerte werden wie unter Abschnitt 3.1 beschrieben aufgearbeitet, wobei bidest. Wasser als Probe verwandt wird.

Man erstellt die Kalibrierkurven, indem die Konzentrationen der Vergleichsstandards gegen den Quotienten aus den Peakflächen der PFBS bzw. PFOS und des internen Standards Perfluordecansulfonsäure aufgetragen werden. Die Regressionskoeffizienten der Kalibrierkurve werden mithilfe der Gerätesoftware (z. B. MassLynx, Waters) berechnet. Dabei sollten auftretende Reagenzienleerwerte und die Leerwerte des zur Kalibrierung verwendeten Plasmas bzw. Harns gegebenenfalls

berücksichtigt und subtrahiert werden. Bei Einsatz von 1 mL Probe wurde an dem beschriebenen Analysengerät für beide Substanzen ein linearer Messbereich von 5–100 µg/L ermittelt. Zu jeder Analysenserie wird eine neue Kalibrierkurve erstellt, wobei eventuelle Verdünnungen der Proben speziell berücksichtigt werden müssen (siehe Abschnitt 9.4 Störeinflüsse).

Abbildung 4 zeigt beispielhaft die Kalibrierkurven für PFOS bzw. PFBS in Humanplasma.

7 Berechnung der Analysenergebnisse

Die Berechnung der Konzentration in Plasma- bzw. Harnproben erfolgt gegen die jeweils erstellten Kalibrierkurven (vgl. Abschnitt 6). Mit den ermittelten Quotienten der Peakflächen von PFBS bzw. PFOS und des internen Standards geht man in die entsprechende Kalibrierkurve ein und berechnet die dazugehörige Konzentration in µg/L Plasma bzw. Harn. Gegebenenfalls kann diese Berechnung ebenfalls über die Auswertesoftware des LC/MS/MS-Systems erfolgen (z. B. MassLynx, Waters).

Ermittelte Reagenzienleerwerte sind von den Analysenergebnissen der Realproben zu subtrahieren.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Die Qualitätssicherung der Analysenergebnisse erfolgt gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer [10] und den speziellen Vorbemerkungen dieses Werkes. Präzisionskontrollen werden mit gespikten Plasma- bzw. Harnkontrollproben durchgeführt, die eine konstante Konzentration der Analyten aufweisen. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu versetzt man Plasma bzw. Mischharn mit einer definierten Menge der Analyten PFBS und PFOS. Von diesem Kontrollmaterial wird ein Halbjahresbedarf in verschließbare 13-mL-Polypropylen-Röhrchen mit Schraubdeckel aliquotiert und tiefgefroren aufbewahrt. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (an 20 Tagen je eine Analyse des Kontrollmaterials) ermittelt [11, 12].

9 Beurteilung des Verfahrens

9.1 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurde jeweils 1 mL Plasma bzw. Harn mit PFBS- und PFOS-Konzentrationen zwischen 10 µg/L und 100 µg/L dotiert, aufgearbeitet und gemäß den vorhergehenden Abschnitten analysiert. Bei der 10fachen Bestimmung dieser Plasma- bzw. Harnproben ergaben sich die in Tabelle 6 dokumentierten Präzisionen in der Serie.

Tab. 6. Präzisionen in der Serie für die Bestimmung von PFBS und PFOS in Plasma bzw. Harn ($n = 10$).

Konzentration [µg/L]	Plasma		PFOS		Harn		PFOS	
	PFBS Stdabw. (rel.) [%]	Streu- bereich [%]	Stdabw. (rel.) [%]	Streu- bereich [%]	PFBS Stdabw. (rel.) [%]	Streu- bereich [%]	Stdabw. (rel.) [%]	Streu- bereich [%]
10	4,9	10,9	4,5	10,0	5,9	13,2	9,5	21,2
50	4,9	10,9	3,7	8,3	6,3	14,0	5,1	11,4
100	4,0	8,9	6,7	14,9	6,6	14,7	4,4	9,8

Darüber hinaus wurde die Präzision von Tag zu Tag bestimmt. Hierzu wurde das gleiche Material wie zur Bestimmung der Präzision in der Serie eingesetzt. Diese Plasma- bzw. Harnproben wurden an 10 verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelten Präzisionen sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab. 7. Präzisionen von Tag zu Tag für die Bestimmung von PFBS und PFOS in Plasma bzw. Harn ($n = 10$).

Konzentration [µg/L]	Plasma		PFOS		Harn		PFOS	
	PFBS Stdabw. (rel.) [%]	Streu- bereich [%]	Stdabw. (rel.) [%]	Streu- bereich [%]	PFBS Stdabw. (rel.) [%]	Streu- bereich [%]	Stdabw. (rel.) [%]	Streu- bereich [%]
10	5,3	11,8	6,7	14,9	8,2	18,3	10,2	22,7
50	4,9	10,9	5,0	11,1	6,5	14,5	5,7	12,7
100	5,0	11,2	7,1	15,8	7,2	16,7	5,5	12,3

9.2 Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dazu wurde gepooltes Humanplasma bzw. Mischharn mit PFBS und PFOS in Konzentrationen zwischen 10 und 100 µg pro Liter versetzt. Diese Plasma- bzw. Harnproben wurden anschließend entsprechend Abschnitt 3.1 je 10mal aufgearbeitet und analysiert. Der Bereich der dabei ermittelten relativen Wiederfindungsraten ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8. Relative Wiederfindungsraten für PFBS und PFOS in dotierten Mischharn- bzw. Plasma-proben.

Konzentration [µg/L]	Plasma Relative Wiederfindung [%]		Harn Relative Wiederfindung [%]	
	PFBS	PFOS	PFBS	PFOS
10	91 – 105	108 – 123	91 – 109	83 – 114
50	80 – 95	91 – 101	90 – 108	111 – 130
100	87 – 100	94 – 115	94 – 116	100 – 116

Im Rahmen der Methodenevaluierung wurde darüber hinaus die Richtigkeit des Verfahrens in einem Ringversuch zwischen 3 Laboratorien anhand von nativen Humanplasmaproben untersucht. Die Einzelwerte der in den Laboratorien für die einzelnen Proben ermittelten Konzentrationen sind in Tabelle 9 gegenübergestellt.

Tab. 9. Einzelergebnisse eines anhand von Realproben durchgeführten Ringversuchs zur Bestimmung von PFBS und PFOS im Plasma.

Probe	PFBS [µg/L]			PFOS [µg/L]	
	Labor 1*	Labor 2	Labor 3	Labor 3	Labor 2
1	2045	1770	1767	47	47
2	42	103	46	242	336
3	< 5	2	< 10	848	700
4	< 5	1	< 10	55	51
5	1001	1070	1058	1008	875
6	9	12	< 10	451	685
7	< 5	1	< 10	49	78
8	< 5	1	< 10	41	80
9	< 5	2	< 10	< 10	34
10	1693	1280	1241	22	42

* Labor 1: nur Bestimmung von PFBS



9.3 Nachweisgrenzen

Unter den angegebenen Bedingungen lag die Nachweisgrenze, ermittelt aus dem dreifachen Signal/Rausch-Verhältnis des analytischen Störuntergrundes in der zeitlichen Umgebung des Analytsignals bei 5 µg/L für PFBS und PFOS, sowohl für die Matrix Plasma als auch für die Matrix Harn. Wegen der ubiquitären Verbreitung dieser Substanzen und den damit verbundenen Leerwerten hat sich die erreichbare Nachweisgrenze in der Praxis nicht bewährt. Aus dieser Beobachtung heraus kann eine Bestimmungsgrenze von 10 µg/L Plasma angegeben werden.

9.4 Störeinflüsse

Es wurden relativ hohe Reagenzienleerwerte (bis ca. 10 µg/L) beobachtet. Deshalb sollten zu jeder Kalibrierung zwei Reagenzienleerwerte sowie ein Plasma- bzw. Harnleerwert bestimmt werden, die von den Kalibrierstandards subtrahiert werden müssen. Die hier beschriebene doppelt endcappte Zorbax Eclipse XDB-C₈ HPLC-Säule zeigte als einzige von mehreren getesteten RP18-Phasen ein inertes und reproduzierbares Trennverhalten. Bei den anderen Phasen wurden Memoryeffekte beobachtet, die auf eine zu hohe Restaktivität des Trennmaterials hinweisen. In Abweichung zu der von der Firma 3M erstellten Methodenvorlage [13] wurde die Menge des zudotierten Tetrabutylammoniumhydrogensulfats verringert, da das überschüssige Phasentransferreagenz ebenfalls Verschleppungen der Zielsubstanzen auf der Trennphase verursachen kann.

Außerdem wurden Matrixabhängigkeiten beobachtet, wenn Proben wegen hoher Befunde verdünnt werden mussten. In diesem Fall verursacht die verdünnte Matrix deutlich höhere Abweichungen von der mit konzentrierter Matrix erstellten Kalibrierung. Daher muss eine Verdünnung der Analysenprobe auch bei den Kalibrierstandards berücksichtigt werden.

Inwieweit möglicherweise die Einnahme von Medikamenten oder Drogen zu falsch positiven Ergebnissen führt, wurde zwar nicht systematisch geprüft, ist aber eher unwahrscheinlich.

Im Rahmen der Qualitätssicherung ist darauf zu achten, dass die konzentrierten Vergleichsstandards nicht an dem gleichen Ort aufbewahrt werden, an dem die Proben aufgearbeitet oder gelagert werden, da es sonst zu erhöhten Leerwerten kommen kann.

10 Diskussion der Methode

Mit der vorgelegten Analysenmethode wird die arbeits- und umweltmedizinisch relevante Perfluorbutansulfonsäure und Perfluorooctansulfonsäure schnell und sicher erfasst. Ein im Rahmen der Methodenevaluierung durchgeführter Ringversuch zwischen 3 Laboratorien mit nativen Plasmaproben ergab eine sehr gute Übereinstimmung der Messergebnisse.

Die Verfahrenskenndaten sind als sehr gut zu bezeichnen. Die Zuverlässigkeitskriterien des Verfahrens konnten vom Prüfer der Methode problemlos nachgestellt werden.

Nach den Erfahrungen des Prüfers kann die Extraktion der PFBS und PFOS anstatt mit 3 mL *tert.*-Butylmethylether auch mit 5 mL Diethylether erfolgen. Hier wurden jedoch lediglich 0,5 mL Plasma eingesetzt und die aufgearbeitete Probe in einem Endvolumen von 200 µL Methanol aufgenommen. Als Ionenpaar-Reagenz kann nach den Angaben des Prüfers anstatt des von den Autoren verwendeten Tetrabutylammoniumhydrogensulfats auch Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (20%) (Merck, Nr. 8.18759) verwendet werden.

Auch wenn die hier vorgestellte Methode sowohl für die Matrix Urin als auch für die Matrix Plasma geeignet ist, sollte wegen der toxikologischen Eigenschaften der Substanzen (Kumulation) die Bestimmung in Plasma bevorzugt werden.

Die von der Firma 3M publizierten Analysen wurden ebenfalls mit einer LC/MS/MS-Methode durchgeführt. Diese von Hansen et al. entwickelte PFOS-Methode [13] ließ sich mit den dort beschriebenen Angaben nicht etablieren. Deshalb wurde die Methode in einigen Punkten modifiziert. Es stellte sich heraus, dass die Menge des Ionenpaarreagenzes erheblichen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hatte. Die in der Vorlage beschriebene Menge führte auf der HPLC-Säule zu starken Adsorptionseffekten, die erst durch eine deutliche Reduzierung des Reagenzes zu reproduzierbaren und validen Ergebnissen führte.

Verwendete Messgeräte:

HPLC 2695 von Waters mit integriertem Probengeber, tandem-massenspektrometrischer Detektor Quattro Ultima von Micromass, Auswertungssoftware: MassLynx, Waters.

11 Literatur

- [1] 3M Company: SIDS initial report: perfluorooctane sulphonic acid and its salts. US EPA public docket AR-226. Saint Paul: 3M Company, 2000. Erhältlich unter: <http://www.epa.gov/opptintr/pfoa/>

- [2] OECD: Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and its salts. Organisation for economic co-operation and development. Paris 2004. <http://www.oecd.org/dataoecd/23/18/2382880.pdf>.
- [3] *G.W. Olsen, T.R. Church, T.R. Hansen et al.*: Quantitative evaluation of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and other fluorochemicals in the serum of children. *J. Children's Health* 2, 53–76 (2004).
- [4] *G.W. Olsen, T.R. Church, J.P. Miller, J.M. Burris, K.J. Hansen, J.K. Lundberg, J.B. Armitage, R.M. Herron, Z. Medhdizadehkashi, J.B. Nobiletti, E.M. O'Neill, J.H. Mandel und L.R. Zobel*: Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross adult blood donors. *Environ. Health Perspect.* 111, 1892–1901 (2003).
- [5] *G.W. Olsen, T.R. Church, E.B. Larson, G. van Belle, J.K. Lundberg, K.J. Hansen, J.M. Burris, J.H. Mandel und L.R. Zobel*: Serum concentrations of PFOS and other fluorochemicals in an elderly population from Seattle, Washington. *Chemosphere* 54, 1599–1611 (2004).
- [6] *K. Inoue, F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, S. Nakajima, A. Uno, Y. Saijo, F. Sata, Y. Yoshimura, R. Kishi und H. Nakazawa*: Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 112, 1204–1207 (2004).
- [7] *G. Leng*: Unveröffentlichte Ergebnisse. Arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen. Bayer Leverkusen 2001–2004.
- [8] *G.W. Olsen, J.M. Burris, M.M. Burlew und J.H. Mandel*: Epidemiologic assessment of workers serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *J. Occup. Environ. Med.* 45, 260–270 (2003).
- [9] *G.W. Olsen, J.M. Burris, J.H. Mandel und L.R. Zobel*: Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees. *J. Occup. Environ. Med.* 41, 799–806 (1999).
- [10] *Bundesärztekammer*: Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dt. Ärztebl.* 100, A3335–A3338 (2003).
- [11] *J. Angerer und G. Lehnert*: Anforderungen an arbeitsmedizinisch-toxikologische Analysen – Stand der Technik. *Dt. Ärztebl.* 37, C1753–C1760 (1997).
- [12] *J. Angerer, Th. Göen und G. Lehnert*: Mindestanforderungen an die Qualität von umweltmedizinisch-toxikologischen Analysen. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 3, 307–312 (1998).
- [13] *K. J. Hansen, L. A. Clemen, M. E. Ellefson und J. O. Johnson*: Compound-specific, quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices. *Environ. Sci. Technol.* 35, 766–770 (2001).

Autoren: *G. Leng, K. Willmersdorf*

Prüfer: *H. Kirchherr*

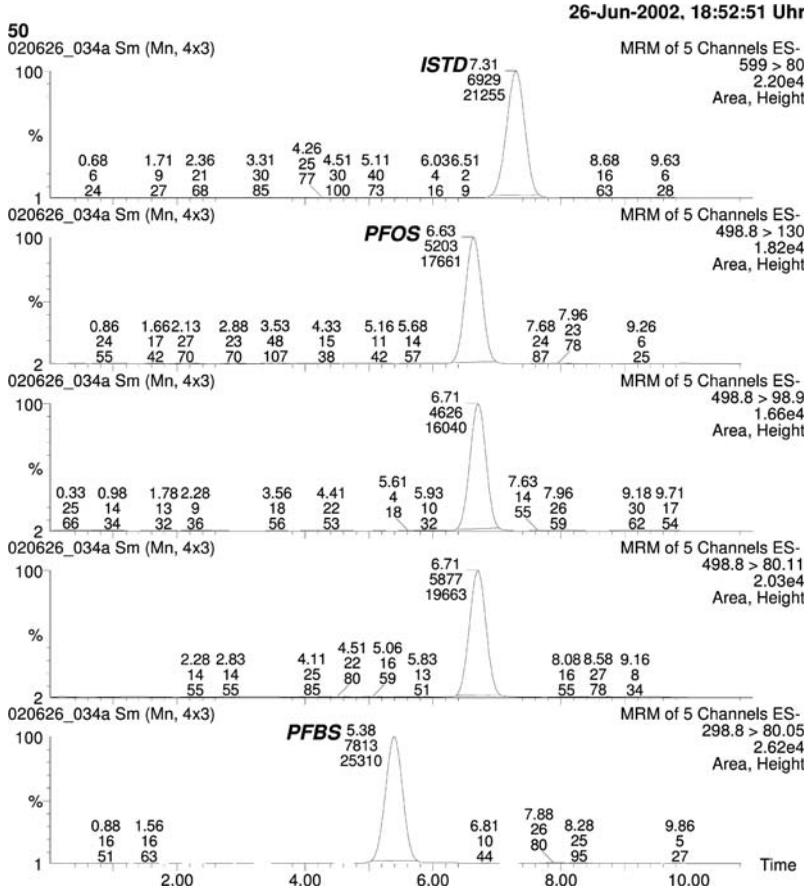


Abb. 2. Beispielchromatogramm einer mit je 50 µg/L PFBS und PFOS dotierten Plasmaprobe.

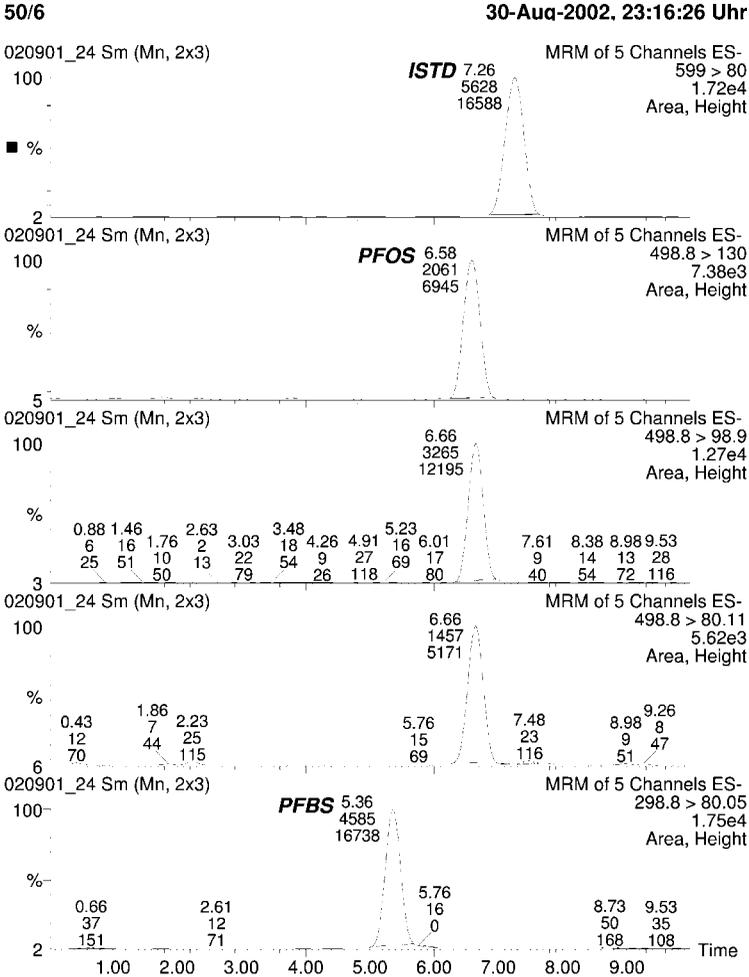


Abb. 3. Beispielchromatogramm einer mit je 50 µg/L PFBS und PFOS dotierten Harnprobe.

