Tina Branting, Försvarets Materielverk (FMV)
Håkan Johansson, Försvarsmakten
Andreas Woldegiorgis, Intersolia Sverige AB

Validering av TOP-metoden för kvantifiering av PreFAS i fluorfria släckskum

FORTIFIKATIONSVERKET

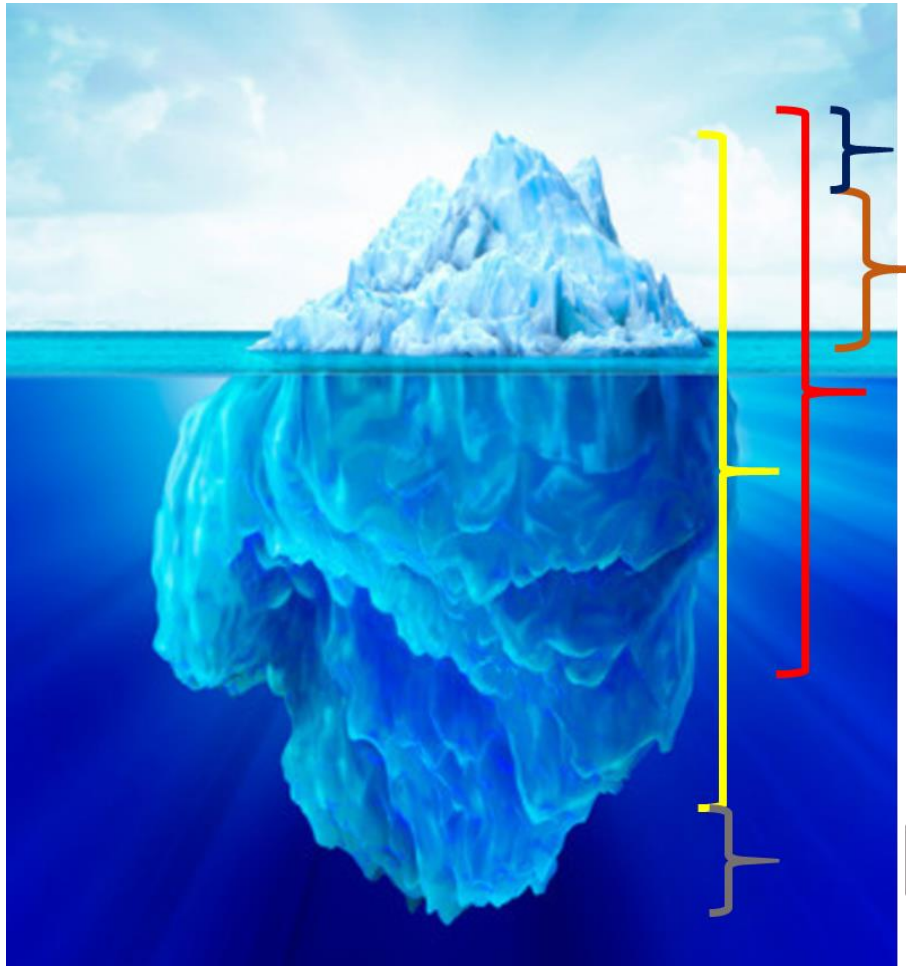
FÖRSVARSMAKTEN

FMV

Agenda

- Problemformulering
- TOP-metoden
  - Förutsättningar för validering
  - Optimering av TOP-metoden
  - Fastställd TOP-metod
  - Metodvalidering genom ILS
- Resultat
  - ANOVA
  - Bestämning av TOP-metodens precision (repeterbarhet och reproducerbarhet)
  - Vad betyder resultaten?
- Diskussion kring resultat

Problemformulering; olika former av fluor



Ultra-short chain PFAS

Known PFAS included in the 55-65 homologues that is included in the most versatile LC-MS/MS analysis method

PFCA precursors accessible for TOP-oxidation

Total contents of organic fluorine

Total contents of inorganic fluorides

Potentiellt ca 4 700 olika ämnen

"Klammrarnas" längd i bilden är godtycklig men anger ungerfärliga proportioner av olika former av fluor i fluorfria skumvätskor (F3 = fluorine free foam).

FMV

“PFAS-fritt” - vad menar vi egentligen?

- Inga kända PFAS för vilka vi har analysmetoder ($PFAS_{55}$)?
- “Låga halter” av oxiderbara PFCA-precursorer? D v s “liten” skillnad mellan PFAS-halten före och efter en TOP-assay?
- “Låga” halter total-organiskt fluor?
- Hur låga är “låga” halter?
- Rättsäkerhet i bedömningen? – Hur skall en skumtillverkare kunna känna sig trygg med att hens F3-skum inte diskrimineras vid en upphandling?
- **Hur skall “PFAS-fritt” tekniskt verifieras?**

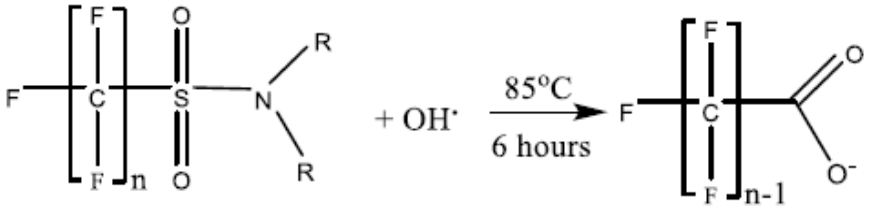
TOP-metoden ('TOP-assay')

- TOP = Total Oxidisable Precursor.
- Metoden bygger på att skumprovet analyseras på konventionellt vis (HPLC-MS/MS). Ett delprov oxideras sedan under 'tuffa' betingelser, och analyseras på nytt.

$$S_2O_8^{2-} + heat \rightarrow 2SO_4^-$$

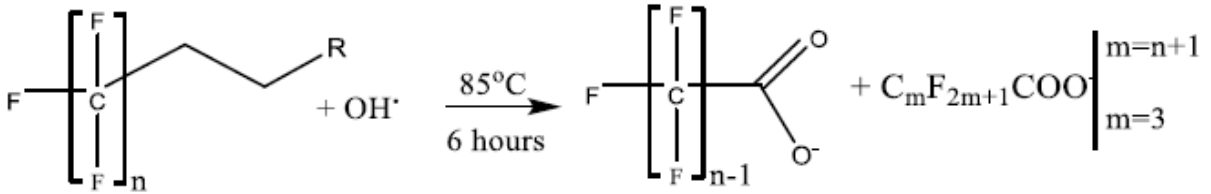
$$2SO_4^- + OH^- \rightarrow 2SO_4^{2-} + \cdot OH$$

Metodiken utvecklad av Houtz & Sedlak, 2012



ECF based C_n precursors

C_n PFCA



n:2 Fluorotelomer based precursors

C_n PFCA

C_{n+1} and shorter PFCAs

Fördelar TOP

- Ger möjlighet att kvantifiera dolda PreFAS (PFAS som vi idag inte har analysmetoder för).
- Kräver ingen ny tekniskt platform eller nya instrument.
- Har mycket hög känslighet (låga LOQ) för de PFAS som ingår i HPLC-MS/MS-metoden

Nackdelar TOP

- “Black Box”, vi vet ingenting om den kemiska identiteten för den PreFAS som omvandlas till kända PFAS.
- Vi har ingen aning om det finns PreFAS som i oxidationen, transformeras till oorganiskt fluor, eller “kokas” bort.
- **Hur bra är en TOP-assay’s precision och riktighet för matrisen för s k F3-skum?**

F3 = Fluorine-Free Foams, skumkoncentrat som tillverkaren deklarerar är fluor-fria/PFAS-fria.

FMV

Validering av TOP-metoden via ILS

- Analytisk riktighet (“Accuracy”) består av dels metodens “recovery” och dels metodens precision. Bestäms vanligen med s k Certifierat Referensmaterial (CRM).
- Certifierat referensmaterial m a p F3-skum saknas och lär inte heller dyka upp i närtid…
- Validering av metodprestanda genom att flera labb får analysera flera olika F3-skum enligt en precis, väldefinierad metod.

  (ILS = Interlaboratory Study)
- ANOVA- Variansanalys
- Bestämningar av metodprecision (repeterbarhet och reproducerbarhet).
- **Kan vi sätta något “fail-pass criteria” PFAS-fritt, för F3-skum utifrån metodens prestanda? D v s, vad menar vi med “låga halter PFAS efter TOP”?**

Är Houtz & Sedlaks TOP-parametrar optimala för F3-skum?

- Ska man bara nyttja Houtz och Sedlaks originalrecept för TOP även för F3-skum?
- Projektet beslöt att optimera utbytet i TOP-oxidationen m a p ∑PFAS11 genom att systematiskt testa nedan parametrar i ett s k 2^{4-1}-försök med centrumpunkt (d v s på tre olika nivåer, +, 0, -).
  - “halt persulfate”
  - “halt NaOH”
  - “Tid”
  - “Temperatur
- ALS Global utförde allt experimentellt optimeringsarbete.

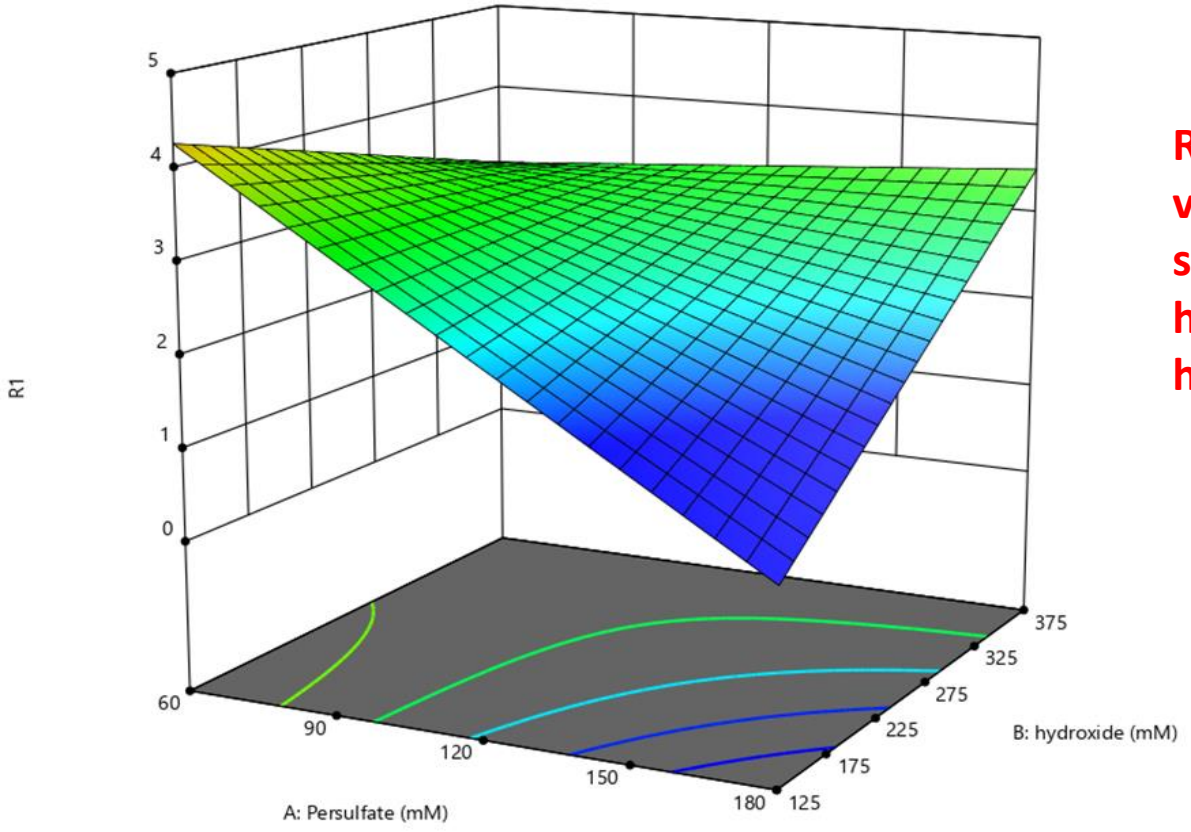
Experiment	$[K_2S_2O_8]$ (mM)	[NaOH] (mM)	Temperature, °C	Time, hr
1	Low (-)	Low (-)	Low (-)	Low (-)
2	High (+)	Low (-)	Low (-)	Low (-)
3	Low (-)	High (+)	Low (-)	Low (-)
4	High (+)	High (+)	High (+)	Low (-)
5	Low (-)	Low (-)	High (+)	High (+)
6	High (+)	Low (-)	High (+)	High (+)
7	Low (-)	High (+)	Low (-)	High (+)
8	High (+)	High (+)	High (+)	High (+)
9	Centrum (0)	Centrum (0)	Centrum (0)	Centrum (0)
10	Centrum (0)	Centrum (0)	Centrum (0)	Centrum (0)
11	Centrum (0)	Centrum (0)	Centrum (0)	Centrum (0)
12	Centrum (0)	Centrum (0)	Centrum (0)	Centrum (0)

Utfall från TOP-metodoptimeringen

- Optimeringen tvingades utföras på ett AFFF-skum istället för ett F3-skum.
- Högst utbyte av ∑PFAS11 erhölls med parameterinställningarna;

  Låg , låg, låg och h

85° C, 6 timmars koktid



Responsyta för variabeln ∑PFAS11 som funktion av halten Persulfat och halten NaOH.

Fastställd TOP-metod

- Analys av PFAS innan TOP; deltagande lab får nyttja in-house metod så länge som metoden är fullt validerad och bygger på etablerade analysmetoder för PFAS såsom EPA method 537.1 eller ISO/DIS 21675.
- Skummen späds 1:10 000 med MQ, 50 µl internstandard TOP tillsätts 25 ml spätt skum (vanligen D2-inmärkt 4:2 FTS, D2-inmärkt MeFOSE-alcohol eller D2-inmärkt EtFOSE-alcohol som internstandard).
- 25 ml TOP cocktail tillsätts (120 mM $K_2S_2O_8$, 250 mM NaOH)
- Provet sätts på vattenbad eller i ett värmeblock, 80°C, 12 h.
- TOP-steget termineras genom att 200 µl 98 % (w/w) myrsyra tillsätts.
- Provrören behandlas med ultra-ljud i 3 min.
- Proverna centrifugeras 3 min, 3 000 rpm
- Valfri internstandard tillsätts för kvantifiera recovery vid filtrering
- Proverna filtreras genom 0,20 µm cellulosafilter.
- PFAS bestäms med labbets egna in-house metod.

Metodvalidering via ILS

- 3 deltagande kommersiella labb (Eurofins, ALS Global och SGS Analytics).
- 5 st F3-skum som tillverkarna uppgivit skall vara PFAS-fria.
- 1 AFFF-skum (ej PFAS-fritt).
- Varje labb gör 4 replikata TOP-assays på varje skumkoncentrat.
- Rapporterar sedan in resultaten via Excel.
- Deltagande labb har ingen kunskap om vilka skum som ingår i studien.

Resultat

Laboratory	Foam #	Average concentration of $\sum PFAS_{11}$, µg/l	Median concentration of $\sum PFAS_{11}$, µg/l	Standard deviation
Foam 2				
SGS Analytics/Synlab	2	8 254	8 009	862,0
Eurofins	2	8 270	8 205	364,0
ALS Global	2	9 932	9 911	139
Foam 3				
SGS Analytics/Synlab	3	400	398	39,67
Eurofins	3	347,5	344,9	61,27
ALS Global	3	230	229	8,36
Foam 5				
SGS Analytics/Synlab	5	413,0	416,0	11,4
Eurofins	5	355,1	350,0	44,3
ALS Global	5	285,7	282,0	2,3

Foam 1; Ett av 3 labb rapporterade $\sum PFAS_{11}$ ~ 48 µg/l i ett av fyra replikata TOP-oxidationer → **PFAS-fritt**

Foam 4; < LOD för $\sum PFAS_{11}$ gällande alla 3 labben → **PFAS-fritt**

Lägg märke till de i sammanhanget mycket låga standardavvikelsen som varje lab genererat.

Då Foam 5 innehåller minst 255 ggr så höga halter PFAS jmf. övriga F3-skum, är det av störst intresse att studera varianserna för detta skum.

FMV

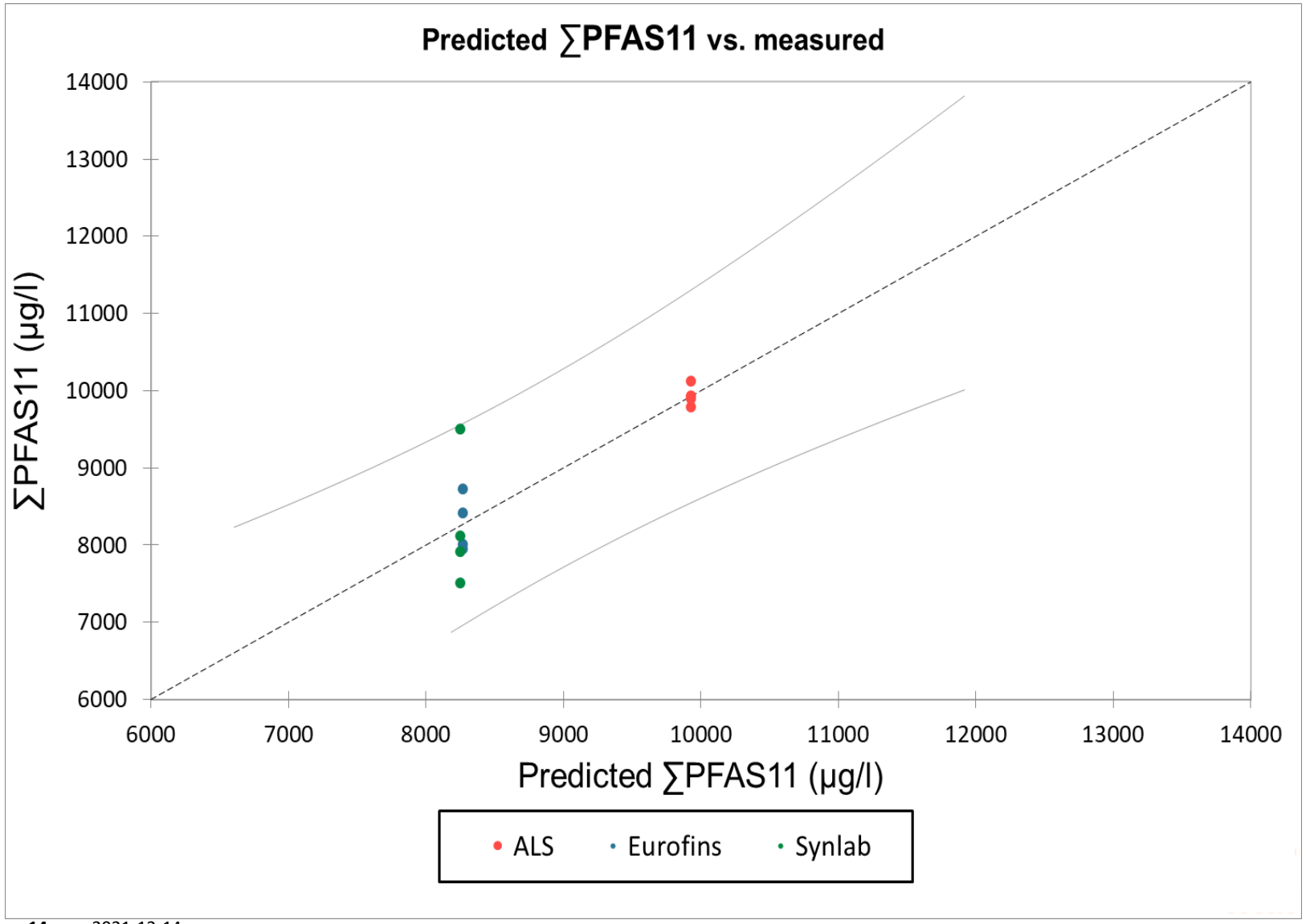
ANOVA –Variansanalys för Foam 2

Statistisk metodik för att jämföra medelvärden.

Source	Degrees of Freedom (DF)	Sum of Squares	Mean squares	F-value	Pr>F
Variance between laboratories	2	7 431 603,04	3 715 801,52	12,46	**0,003**
Variance within laboratories	9	2 684 824,32	298 313,81		
Total variance	11	1 011 6427,4			
Calculated against model Y=Mean(Y)					

Slutsats; på signifikansnivån 95 %, skiljer sig medelvärden mellan labb då den systematiska variansen är hög.

Modell baserad på ANOVA koefficienter



Predikterad halt $\sum PFAS_{11}$ i foam 2, plottat mot uppmätt halt.

Extremt låg varians m a p ALS men är resultaten biased jmf. m övriga labb?

Beräkning av ensidiga konfidensintervall för medelvärde $\sum PFAS_{11}$

- **The Tukey's honestly significant difference (TSD), konfidensintervall som bygger på Studentized range distribution:**

Uppmätt medelvärde $\sum PFAS_{11}$ – konfidensintervall > 0 → ej PFAS-fritt skum (oavsett vilket lab som gör TOP-analysen)

Uppmätt medelvärde $\sum PFAS_{11}$ - 1 552,1 µg/l > 0 → **bedöms som ej PFAS-fritt skum!**

Student's T-fördelning

Uppmätt medelvärde $\sum PFAS_{11}$ – konfidenintervall > 0 ej PFAS-fritt skum (oavsett vilket lab som gör TOP-analysen)

Uppmätt medelvärde $\sum PFAS_{11}$ – 419 µg/l l > 0 → **bedöms som ej PFAS-fritt skum!**

Konfidensnivå 95 % (med 5 % risk att avfärda skummet som ej PFAS-fritt fast det kanske är det).

Användandet av konfidensintervallet

- Under antagandet att alla tänkbara F3-skum kan representeras av de 6 st F3-skum som ingick i studien, och att alla kommersiella lab kan representeras av de 3 deltagande labben i denna studie, kan vi nyttja konfidensintervallet (Tukey's eller Student's) för att ge alla F3-skum en 'statistisk rabatt'om **1 552 µg/l** m a p halten $\sum PFAS_{11}$.

Foam nr	Reported grand average, µg/l	Standard deviation from the measurements	Reported grand average adjusted with "statistical discount" of 414,8, µg/l	Reported grand avera adjusted with "statisti discount" of 1 552,1 µ from the one-sided confidence interval of Tukey's honestly significant difference (from the Studentized range distribution).
2	8818,637	958,997	8403,837	7 266,5
3	325,914	83,619	-88,886	-1 226,2
5	351,267	59,573	-63,533	-1 200,8

Foam 2 bedöms som "ej PFAS-fritt skum" (efter att 'statistisk rabatt' avräknats)
Sannolikheten att vi har fel i den utsagan är 5 %.

Foam 1, Foam 3, Foam 4 och Foam 5, bedöms som "PFAS-fria skum" (efter att 'statistisk rabatt' avräknats), oavsett vilket labb som analyserar dem via TOP.

Viktigt att notera

- Att foam 2 “utpekas” som ej “PFAS-fritt”
  - innebär inte att vi påstår att PFAS avsiktligt har tillsatts i foam 2 i syfte att förbättra skummets prestanda (i form av filmbildande effekt).
  - vi uttalar oss endast om Foam 2 ska bedömas som “PFAS-fritt” eller inte, enligt vår egen definition i studien.

- Halterna av PFAS som påträffas i foam 2 är bedömt för låga ($\sum PFAS_{11}$ 8 816 **µg/l**) för att skapa en filmbildande effekt
  - Detta illustreras av resultatet för analyserat AFFF-skum (foam 7):
    - $\sum PFAS_{11}$ –halt om 5,07 – 6,5 **mg/l** innan TOP
    - 1,13 – 3,85 **g/l** efter TOP-steget

- Ett typiskt AFFF-skum innehåller således 128 -437 ggr mer $PFAS_{11}$ än Foam 2.

Bestämning av precision för TOP-metoden

- Man bör skilja på två olika mått av precision;
- **Repeterbarhet;** *grad av överensstämmelse mellan resultaten av upprepade mätningar av samma mätstorhet genomförda under samma mätförhållanden (samma labb.)*
- **Reproducerbarhet;** *grad av överensstämmelse mellan resultaten av mätningar av samma mätstorhet, genomförda under olika mätförhållanden (olika labb).*
- Bägge precisionsmåtten mäts vanligen i form av standardavvikelse eller relativ standardavvikelse.
- Utifrån ASTM E691-99 "*Standard practice for Conducting a Interlaboratory study to determine Precision of a Test Method*", har TOP-metodens precision beräknats.

Statistiska beräkningar

$$\bar{x} = \sum_{1}^{n} x/n \qquad s = \sqrt{\sum_{1}^{n} (x - \bar{x})^2/(n-1)} \qquad \bar{\bar{x}} = \sum_{1}^{p} \bar{x}/p \qquad d = \bar{x} - \bar{\bar{x}} \qquad s_{\bar{x}} = \sqrt{\sum_{1}^{p} d^2/(p-1)} \qquad s_r = \sqrt{\sum_{1}^{p} s^2/p}$$

$$(s_R)^* = \sqrt{(s_{\bar{x}})^2 + (s_r)^2 (n-1)/n} \qquad h = d/s_{\bar{x}} \qquad k = s/s_r$$

..... *O S V* →

Foam #	s_r (µg/l)	$(s_R)^*$ (µg/l)	r (µg/l)	R (µg/l)
2	546,18	959,40	1 513,9	2 659,3
3	42,42	83,92	117,6	232,6
5	27,01	59,93	74,9	166,1

r ; repeterbarheten, ***R***; reproducerbarheten för metoden

Man kan fritt tolka resultaten som att om man gör några bestämningar av $\sum PFAS_{11}$ på Foam 2 på ett och samma lab, och om två mätningar skiljer sig mer än 1 514 µg/l, så är det något fel på någon av bestämningarna (instrumentellt fel eller handhavandefel).

Intressant att konstatera att för Foam 2 är repterbarhetsprecisionen (***r***) i samma storleksordning som det ensidiga konfidens-intervallet för medelhalten $\sum PFAS_{11}$ för Foam 2 när vi genomförde ANOVA-beräkningarna (1 552 µg/l)

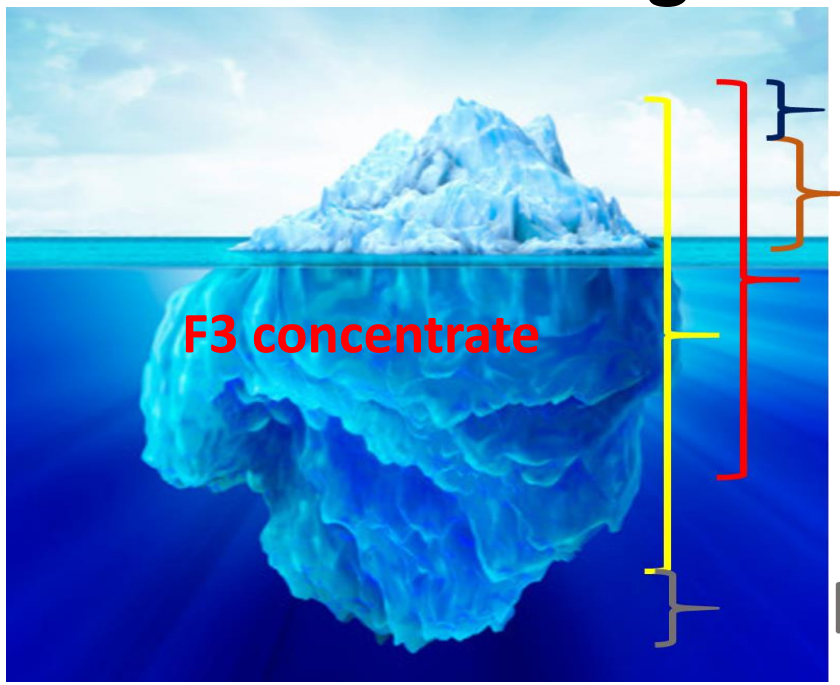
Vad betyder dessa resultat?

- Givet de antaganden vi gör gällande representativitet så har vi nu en metod för att verifiera “PFAS-fritt” vad gäller F3-skum – oavsett labb och oavsett F3-skum.
- Med 5 % sannolikhet att vi gör ett s k Typ I-fel, d v s vi “fäller” ett F3-skum som vi borde “fria” utifrån frågan “PFAS-fritt eller ej?” (signifikansnivå 95 %).
- **Vi har statistiskt besvarat frågan vad “låga halter PFAS” är i ett F3-skum m a p resultat ifrån TOP.**
- Kan metoden/definitionen av ”PFAS-fritt” accepteras av branschen (tillverkare av F3, upphandlande organisationer, andra intressenter)?
- Behöver signifikansnivån höjas? 99%? – expandera i så fall studien med fler F3-skum, fler deltagande lab, fler replikat, ett tydligare analysprotokoll, mindre frihetsgrader för labben.
- Hur påverkar detta lagstiftning, gränsvärden, definitioner av “PFAS-fritt”?

Analysmetod vs. regulatoriskt perspektiv

- Det kan konstateras att det inte finns en global definition av “PFAS-fritt skum”, olika definitioner sätts av myndigheter/andra stakeholders. Exempel:
  - PFHxA och PFHxS (EU): **25 ppb (25 µg/l)**
  - National Defense Authorization Act 2020 (U.S. Department of Defense): **max 1 ppb PFAS (1 µg/l)**
  - EU begränsningsförslag för PFAS i brandskum förväntas i oktober 2021: **? µg/l PFAS**
- Hur förhålla sig till olika gränsvärden för “PFAS-fritt skum” utan att ha säkerställt att det finns analysmetodik som med viss statistisk säkerhet kan verifiera gränsvärdena?
- Utan att göra några anspråk på att vi skulle ha utvecklat något unikt i denna studie: bedömningen är att TOP-metodiken sannolikt inte kommer kunna verifiera halter om 1 µg/l eller 25 µg/l om vi samtidigt behöver ge alla bestämningar en “cut-off rabatt” om 1 552 µg/l.

Men kom ni ihåg “isberget”?



Ultra-short chain PFAS	< 40 mg/l to < 400 µg/l
Known PFAS included in the 55-65 homologues that is included in the most versatile LC-MS/MS analysis method	$\sum PFAS_{25}$ ~ 20 – 200 µg/l
PFCA precursors accessible for TOP-oxidation	$\sum PFAS_{11}$ upp till 7 270 µg/l* (6st F3-skum)
Total contents of organic fluorine	20***- 219 mg/l**(LOD~ 5-10 µg/l)
Total contents of inorganic fluorides	µg/l-halter?

* Refererar till medelkoncentrationen $\sum PFAS_{11}$ i Foam 2, justerad med den ‘statistiska rabatten’ om 1 552 µg/l

** Refererar till SPE-TOF-CIC-analys av TOP-oxiderat Foam 5.

***Refererar till TOF-CIC- analys av Foam 2. Resultatet avspeglar halt totalorganiskt fluor + fluorider.

- Inget av F3-skummen eller AFFF-skummet innehåller några ultra-korta PFAS (verifierat av Inger Ericson, Örebro Universitet)
- Halterna av PFAS i icke-oxiderade skum verifierat i denna studie är låga (ALS, Eurofins, SGS Analytics)
- Halter av PFAS efter TOP välkaraktäriserat i denna studie, upp till 8 818 – 1 552 = 7 270 µg/l
- Men hur mycket organiskt fluor missar vi med TOP?
- TOF-CIC:resultaten är svårtydda men preliminära resultat indikerar att halten organiskt fluor är betydligt **högre** än halterna $\sum PFAS_{11}$ efter TOP (Foam 2 och Foam 5).
- Hur mycket ökar halterna av fluorid efter TOP-steget?

Stort tack för ett givande samarbete;

- Patrik Karlsson & Patrik van Hees, Eurofins
- Kent Utterström, Marie Suchanová och Ivan Trešl, ALS Global
- Ida Crusell, SGS Analytics (f.d. Synlab)
- Ingrid Ericson Jogsten, Örebro Universitet

Frågor och funderingar?