



Application Note AN-M-017

Analisi IC-MS/MS dell'acido trifluoroacetico secondo DIN 38407-53

TFA: un prodotto di degradazione pervasivo dei PFAS che desta crescente preoccupazione

L'acido trifluoroacetico (TFA) nelle acque superficiali e potabili solleva preoccupazioni a causa della sua persistenza, mobilità e limitate opzioni di mitigazione [1–3]. Essendo un prodotto di degradazione dei PFAS (sostanze perfluoroalchiliche e polifluoroalchiliche), il TFA viene rilasciato principalmente da siti industriali, mentre le fonti secondarie includono la degradazione di composti contenenti gruppi trifluorometilici (ad esempio, alcuni pesticidi e refrigeranti) [4–6]. Per garantire un monitoraggio affidabile, l'organismo di

normazione tedesco DIN ha avviato una bozza di standard per l'analisi del TFA utilizzando LC-MS/MS a iniezione diretta. Questo metodo quantifica il TFA nell'intervallo 0,1–3,0 µg/L ed è stato convalidato in 12 laboratori in Germania e Svizzera. [7,8].

Questa Application Note descrive la configurazione del metodo convalidato mediante cromatografia ionica (IC) con successiva rilevazione della massa mediante uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

BACKGROUND

L'acido trifluoroacetico (TFA) è un PFAS (sostanza perfluoroalchilica e polifluoroalchilica) a catena ultra corta appartenente al gruppo più tossico degli acidi perfluorooctanoici (**Figura 1**) [9]. Nel complesso, le concentrazioni di TFA sono significativamente più elevate rispetto a quelle di altri PFAS, poiché il TFA è un prodotto di degradazione di tali sostanze [3]. Ad esempio, il TFA rappresentava oltre il 90% dei PFAS totali misurati in varie acque potabili tedesche analizzate [9]. È emerso come una sostanza ubiquitaria e persistente con elevata mobilità a causa della sua mancanza di assorbimento e solleva diverse preoccupazioni ambientali e normative [3–6,10]. Le emissioni in corso di TFA stanno causando aumenti irreversibili della concentrazione, ad esempio, nell'acqua piovana, nei terreni e nell'acqua potabile,

ma anche nel siero umano, nelle piante e negli alimenti di origine vegetale [3]. Le concentrazioni mediane misurate di TFA nelle precipitazioni hanno raggiunto 0,29 µg/L negli Stati Uniti [11], 0,21 µg/L in Germania [1], e 0,70 µg/L in Cina [12]. Le concentrazioni mediane di TFA nell'acqua potabile, che vanno da 0,08 µg/L (Stati Uniti) a 0,5 µg/L (Svizzera) e persino fino a 1,5 µg/L (Germania), erano simili o superiori ai limiti proposti di PFAS totali nell'acqua potabile (0,5 µg/L) nella Direttiva UE sull'acqua potabile [9,13].

Le soglie per gli effetti irreversibili non sono chiare, ma gli studi sulla tossicità nei mammiferi suggeriscono che il TFA è dannoso anche per il fegato e la riproduzione [3].

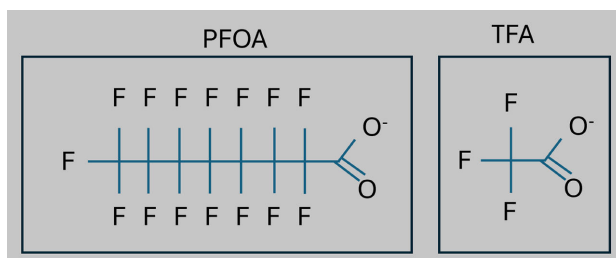


Figure 1. TFA e PFOA sono tipi di acidi carbossilici polifluorurati. Il PFOA, denominato «C8», contiene otto atomi di carbonio, mentre il TFA, il più piccolo in questo sottogruppo, ha due atomi di carbonio (adattato dopo Burtcher-Schaden et al [9]).

Poiché le tecnologie convenzionali di trattamento delle acque offrono un'efficienza di rimozione dei TFA scarsa o nulla, il rischio del loro accumulo è in crescita [3]. Di conseguenza, le agenzie ambientali e sanitarie chiedono misure normative più severe, come la limitazione dei pesticidi contenenti PFAS e dei gas fluorurati, per limitare l'ulteriore formazione di TFA

[3,8,9].

Nel 2020, l'Agenzia federale tedesca per l'ambiente (UBA) ha fissato un valore guida per la salute di 60 µg/L per i TFA nell'acqua potabile, ma raccomanda di non superare i 10 µg/L a scopo precauzionale [14]. Altri paesi hanno fissato limiti simili, come 9 µg/L in Danimarca e 2,2 µg/L nei Paesi Bassi [15,16].

Riconoscendo la necessità di un monitoraggio affidabile, l'organizzazione di standardizzazione tedesca DIN ha iniziato a sviluppare una bozza di standard per l'analisi TFA [7]. Questo metodo utilizza l'iniezione diretta, ovvero la cromatografia liquida con spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), per quantificare il TFA nell'intervallo 0,1–3,0 µg/L ed è stato convalidato da 12 laboratori in Germania e Svizzera. [8].

A differenza della maggior parte degli standard, la norma DIN 38407-53 consente l'utilizzo di diverse tecniche LC, come l'HPLC con colonne HILIC, a

modalità mista e a fase inversa (RP), nonché approcci cromatografici ionici [7,8]. Metrohm ha migliorato e adattato il metodo per l'analisi IC-MS/MS per soddisfare i requisiti delineati nella norma DIN 38407-53 [7,8]. Questa nota applicativa descrive la configurazione del metodo utilizzando un cromatografo ionico Metrohm, una colonna di separazione Metrosep A Supp 17 e la rivelazione di massa con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo 6475 di Agilent (m/z 113 e 69). Il metodo ha soddisfatto tutti i requisiti ed è stato validato con successo durante la sperimentazione interlaboratorio.

CAMPIONE E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Otto campioni sono stati inclusi nel set di campioni: due campioni di acqua di falda, un campione di acqua piovana, un campione di acqua potabile, due campioni di acqua superficiale e due campioni di acqua superficiale arricchiti con concentrazioni nominali di 1,18 µg/L e 2,87 µg/L di TFA [8]. I

campioni sono stati trasportati in un frigorifero e refrigerati a 4 °C prima dell'analisi. Tutti i campioni sono stati analizzati entro sette giorni. Non è stato utilizzato alcun standard interno per l'ulteriore fortificazione di campioni e standard.

ANALISI

Standard e campioni sono stati iniettati direttamente senza ulteriori fasi di preparazione (Figura 2). Dopo la separazione su una colonna a scambio anionico, il TFA è stato rilevato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo 6475 di Agilent.

La manipolazione dei campioni e degli standard è stata eseguita utilizzando il rapido 889 IC Sample Center, raffreddato, per aumentare la stabilità dei liquidi da misurare. È stata eseguita un'iniezione full-loop di 100 µL. Tutte le misurazioni, inclusi gli standard, i bianchi (0,1% di metanolo in acqua ultrapura) e i campioni, sono state eseguite in triplicato.

La separazione del TFA da altre specie anioniche è stata ottenuta su una colonna Metrosep A Supp 17 – 150/4.0 dotata di una colonna Metrosep RP2 Guard/3.5 per migliorare ulteriormente la separazione dai composti organici anionici. Sono state utilizzate condizioni isocratiche insieme a un eluente carbonatico fortificato con metanolo (ovvero 5 mmol/L di Na₂CO₃, 0,2 mmol/L di NaHCO₃ e 10% di metanolo) per migliorare l'evaporazione durante la ionizzazione elettrospray (ESI).

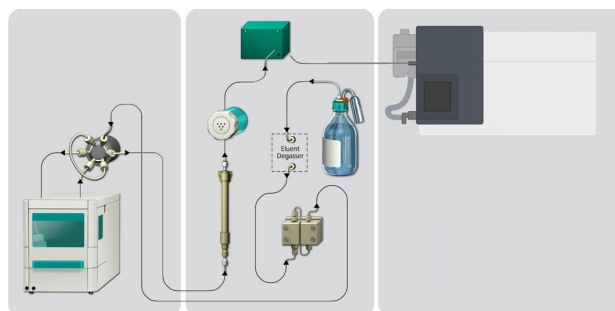


Figure 2. Configurazione per l'analisi TFA in campioni d'acqua con un 889 IC Sample Center – cool (a sinistra) per l'introduzione e il raffreddamento del campione, un Metrohm 940 Professional IC e un 6475 TQMS di Agilent Technologies (a destra). Il rivelatore di conducibilità è opzionale ma altamente raccomandato per lo sviluppo del metodo, in quanto consente un monitoraggio efficace di alte concentrazioni di composti anionici per prevenirne l'ingresso nell'ESI-MS/MS.

Il circuito integrato è stato controllato tramite il software MagIC Net, che consente la rilevazione degli anioni principali, oltre all'acido trifluoroacetico target, tramite misure di conducibilità. Il segnale MS è stato registrato utilizzando un sistema MS Agilent 6475 TQ con una tensione di frammentazione di 65,0 V per separare gli ioni a m/z 113 e 69. L'acquisizione dei dati è stata eseguita utilizzando il software Agilent

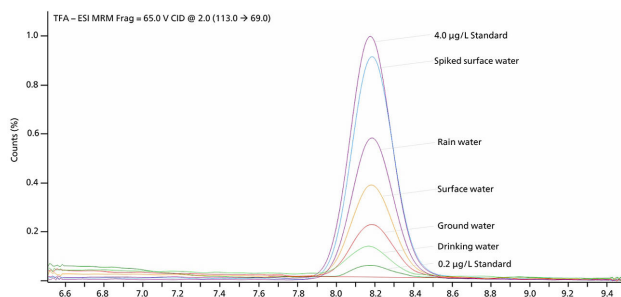


Figure 3. Sovrapposizione di cromatogrammi di vari campioni d'acqua e standard TFA da 0,2 µg/L e 4,0 µg/L. I cromatogrammi sono stati registrati in modalità MS/MS utilizzando un Agilent 6475 TQ in modalità dMRM con una tensione di frammentazione di 65,0 V (dissociazione indotta da collisione, CID) e un frazionamento di massa da 113,0 a 69,0.

RISULTATI

Le curve di calibrazione per il segnale MS hanno mostrato relazioni lineari, come richiesto dal metodo DIN, con un valore R^2 di 0,9998. L'accuratezza calcolata per gli standard, basata sulla correlazione tra concentrazione target e concentrazione misurata, variava dal 98,1% al 110,1%. I limiti di rilevabilità (LOD) e i limiti di quantificazione (LOQ) sono stati determinati rispettivamente a 0,017 µg/L e 0,062 µg/L, in conformità con la norma DIN 32645 [17].

Dopo l'analisi triplicata dei campioni, le concentrazioni misurate di TFA variavano da 0,38 µg/L nell'acqua potabile a 1,93 µg/L nell'acqua piovana (Tabella 1). I campioni di acqua superficiale addizionati presentavano concentrazioni nominali di 1,18 µg/L e 2,87 µg/L. I risultati del test di validazione

MassHunter Workstation (LC/TQ). Per sincronizzare i due dispositivi, è obbligatorio un box remoto.

Il sistema è stato calibrato nell'intervallo da 0,2 a 4,0 µg/L (Figura 3). Tuttavia, l'estensione dell'intervallo di calibrazione a 6,0 µg/L ha dimostrato un'adeguata linearità nel segnale della spettrometria di massa (MS).

sono stati di $1,28 \pm 0,01$ µg/L e $2,92 \pm 0,01$ µg/L, indicando recuperi rispettivamente del 109% e del 102%.

La variazione nelle misurazioni triplicate dei campioni variava dallo 0,3% al 2%. Il tempo di ritenzione (RT) del TFA era in media di 8,2 minuti, con una variazione inferiore allo 0,1%.

Per gli standard di controllo qualità (QC) a concentrazioni di 0,6 µg/L e 2,0 µg/L, i tassi di recupero in tre determinazioni replicate all'interno della misurazione della serie di campioni sono stati rispettivamente del 100% e del 99%.

Tutti i risultati hanno soddisfatto i requisiti della sperimentazione interlaboratorio, che serve a convalidare il metodo.

Tabella 1. Risultati dell'analisi triplicata dell'acqua e recupero calcolato di TFA per i campioni arricchiti.

| Campione | R1 [µg/L] | R2 [µg/L] | R3 [µg/L] | Mean [µg/L] | SD [µg/L] |
|--|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| Groundwater | 0.7058 | 0.7031 | 0.6922 | 0.7004 | 0.01 |
| Groundwater | 0.7745 | 0.7728 | 0.7602 | 0.7692 | 0.01 |
| Rainwater | 1.9488 | 1.9382 | 1.9116 | 1.9329 | 0.02 |
| Drinking water | 0.3812 | 0.3796 | 0.3856 | 0.3821 | 0.00 |
| Surface water | 1.2145 | 1.2214 | 1.2165 | 1.2175 | 0.00 |
| Surface water | 0.9859 | 0.9649 | 0.9478 | 0.9662 | 0.02 |
| Spiked surface water (1.18 µg/L TFA spike) | 1.2930 | 1.2820 | 1.2732 | 1.2827 | 0.01 |
| Spiked surface water (2.87 µg/L TFA spike) | 2.9365 | 2.9203 | 2.9139 | 2.9236 | 0.01 |

CONCLUSIONE

Lo sviluppo e la validazione della norma DIN 38407-53 mediante IC-MS/MS segna un significativo progresso nei metodi analitici per IC abbinati alla spettrometria di massa tandem (MS/MS). In particolare, l'IC-MS/MS presenta notevoli vantaggi nell'analisi di composti fluorurati a catena corta, come il TFA, grazie all'elevata resistenza della matrice e alla

lunga durata della colonna. Ciò rende l'IC-MS/MS un approccio alternativo convalidato ai metodi HPLC tradizionali.

Il metodo sviluppato soddisfa i requisiti della norma DIN 38407-53. Funzioni automatizzate come la diluizione in linea migliorano ulteriormente la praticità dell'uso dell'IC per l'analisi dell'acido trifluoroacetico.

RIFERIMENTI

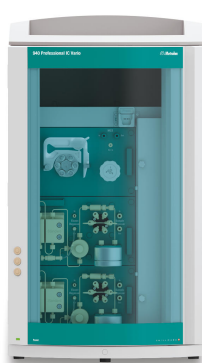
1. Freeling, F.; Björnsdotter, M. K. Assessing the Environmental Occurrence of the Anthropogenic Contaminant Trifluoroacetic Acid (TFA). *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2023**, *41*, 100807. DOI:10.1016/j.cogsc.2023.100807
2. de los Angeles Garavagno, M.; Holland, R.; Khan, M. A. H.; et al. Trifluoroacetic Acid: Toxicity, Sources, Sinks and Future Prospects. *Sustainability* **2024**, *16* (6), 2382. DOI:10.3390/su16062382
3. Arp, H. P. H.; Gredelj, A.; Glüge, J.; et al. The Global Threat from the Irreversible Accumulation of Trifluoroacetic Acid (TFA). *Environ. Sci. Technol.* **2024**, *58* (45), 19925–19935. DOI:10.1021/acs.est.4c06189
4. Freeling, F.; Behringer, D.; Heydel, F.; et al. Trifluoroacetate in Precipitation: Deriving a Benchmark Data Set. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (18), 11210–11219. DOI:10.1021/acs.est.0c02910
5. Scheurer, M.; Nödler, K.; Freeling, F.; et al. Small, Mobile, Persistent: Trifluoroacetate in the Water Cycle – Overlooked Sources, Pathways, and Consequences for Drinking Water Supply. *Water Res.* **2017**, *126*, 460–471. DOI:10.1016/j.watres.2017.09.045
6. Joerss, H.; Freeling, F.; van Leeuwen, S.; et al. Pesticides Can Be a Substantial Source of Trifluoroacetate (TFA) to Water Resources. *Environ. Int.* **2024**, *193*, 109061. DOI:10.1016/j.envint.2024.109061
7. DIN. DIN 38407-53: German Standard Methods for the Examination of Water, Waste Water and Sludge – Jointly Determinable Substances (Group F) – Part 53: Determination of Trifluoroacetic Acid (TFA) in Water – Method Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection (LC-MS/MS) after Direct Injection (F 53), 2024. DOI:10.31030/3581402
8. Dorgerloh, U.; Becker, R.; Freeling, F.; et al. Standardising the Quantification of Trifluoroacetic Acid in Water: Interlaboratory Validation Trial Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometric Detection (LC-MS/MS). *Accreditation Qual. Assur.* **2025**. DOI:10.1007/s00769-025-01640-2
9. Burtscher-Schaden, H.; Clausing, P.; Lyssimachou, A.; Roynel, S. *TFA - A Forever Chemical in the Water We Drink*; PAN Europe Report, 10 July 2024; PAN Europe: Brussels, Belgium, 2024; p 32.
10. ECHA. *Trifluoroacetic acid*. ECHA Chemicals Database. <https://chem.echa.europa.eu/100.000.846/overview?searchText=trifluoroacetic> (accessed 2025-06-17).
11. Pike, K. A.; Edmiston, P. L.; Morrison, J. J.; et al. Correlation Analysis of Perfluoroalkyl Substances in Regional U.S. Precipitation Events. *Water Res.* **2021**, *190*, 116685. DOI:10.1016/j.watres.2020.116685
12. Sun, B.; Wang, J. Food Additives. In *Food Safety in China: Science, Technology, Management and Regulation*, Joseph J. Jen, Junshi Chen (Eds.); John Wiley & Sons Ltd, 2017.
13. European Parliament. DIRECTIVE (EU) 2020/2184 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2020 on the Quality of Water Intended for Human Consumption, 2020.
14. Umweltbundesamt. Ableitung Eines Gesundheitlichen Leitwertes Für Trifluoressigsäure (TFA). *UBA Ger.* 20201305.
15. Ministry of the Environment and Gender Equality. Executive Order on Water Quality and Supervision of Water Supply Facilities, BEK Nr 1023 of 29/06/2023. **2023**.
16. Dutch National Institute for Public Health. Appendix to RIVM Letter to ILT: "Advice Indicative Drinking Water Guideline Value Trifluoroacetic Acid (TFA)." *Natl. Inst. Public Health Environ. RIVM* 20230704 **2023**.
17. DIN. DIN 32645:2008-11: Chemical Analysis - Decision Limit, Detection Limit and Determination Limit under Repeatability

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



940 Professional IC Vario TWO/SeS/PP

Il 940 Professional IC Vario ONE/SeS/PP è l'intelligente strumento IC a **due canali** con **soppressione sequenziale** (un canale) e una **pompa peristaltica** per la rigenerazione del soppressore. Lo strumento può essere impiegato con qualsiasi metodo di separazione e di rilevamento.

Campi d'impiego tipici:

- Strumento standard per determinazioni parallele di anioni e cationi
- Analisi delle tracce per anioni e cationi
- Monitoraggio in linea per anioni e cationi



889 IC Sample Center – cool

L'889 IC Sample Center – cool è la soluzione di automazione idonea quando disponete solo di una quantità molto ridotta di campione. Rispetto all'889 IC Sample Center dispone inoltre di una funzione di raffreddamento e pertanto è il campionatore ideale per campioni rilevanti dal punto di vista biochimico o per campioni termicamente instabili.



Metrosep A Supp 17 - 150/4,0

La colonna di separazione Metrosep A Supp 17 - 150/4,0 è la colonna d'elezione per la determinazione degli anioni che richiedono una buona prestazione di separazione e tempi brevi di separazione a temperatura ambiente. La portata massima di 1,4 mL/min fornisce proprio la possibilità di ottimizzare la determinazione. Le colonne Metrosep A Supp 17 convincono con un buon rapporto prezzo / prestazioni.



Metrosep RP 2 Guard/3,5

La Metrosep RP 2 Guard/3,5 è una colonna di protezione universalmente impiegabile che protegge efficacemente la colonna di separazione dai contaminanti. Particelle minuscole, tracce di ossido ferroso o batteri vengono rimossi in modo sicuro. La Metrosep RP 2 Guard/3,5 aiuta a risparmiare costi perché il disco filtrante può essere sostituito in pochi attimi.