



# 超高效液相色谱 / 电喷雾串联质谱 (UPLC/MS/MS) 分析全氟代化合物 (PFCs)

Antonietta Gledhill<sup>1</sup> Anna Kamran<sup>2</sup> Ingrid Ericson<sup>2</sup>  
Bert van Bavel<sup>2</sup> Gunilla Linström<sup>2</sup> Gordon Kearney<sup>1</sup>  
(1 沃特世公司, Atlas 公园, 曼彻斯特, 英国; 2 Örebro 大学, 瑞典)

近年来, 在全球范围内的环境和人体血液中检测到全氟代化合物 (PFCs) 增长的趋势, 引起了研究者和有关当局的关注. PFCs 同时具有亲水性和疏水性, 经常用于地毯、纤维、皮革的处理、纸张和食品包装物等, 也是塑料生产、灭火剂、抛光剂和杀虫剂的功能化学品. 实验研究表明, PFCs 可能干扰脂肪酸的代谢, 影响生殖系统以及导致肝损害. 将这些效应同 PFCs 的稳定性和生物累积性一起考虑, 暗示出 PFCs 可能对环境 and 人体具有潜在的毒害作用. 因此, 对环境及人体样品中 PFCs 进行精确和可重现的检测非常必要, 但也面临着诸多挑战. 来自实验室器材以及仪器的本底污染是分析 PFCs 常见的问题. 高效液相色谱 / 质谱 (HPLC / MS) 技术推动了全氟代酸类物质的选择性和灵敏性分析.

本文描述了使用超高效液相色谱 (UPLC<sup>®</sup>) 和串联质谱 (MS / MS) 的分析方法.

2004 年推出的沃特世 ACQUITY UPLC<sup>®</sup>, 使用具有 1.7 $\mu$ m 颗粒粒径固定相的色谱柱, 可以在高压下使用 (最大压力 15000psi). 高压与极细颗粒的结合提供了快速、高分离度的分离, 提高了灵敏度、减少了基质干扰. 使用 UPLC 分析 13 种 PFCs 方法仅需要 5min, 而常规 HPLC 分析时间需要 22min. 因此, UPLC 更快的运行时间不仅提高了仪器的高通量, 也减少了方法的开发时间.

本方法包括使用沃特世公司 Oasis<sup>®</sup> WAX 小柱的固相萃取 (SPE) 的萃取步骤并使用 ACQUITY UPLC 和沃特世 Quattro Premier<sup>™</sup> XE 在电喷雾负离子模式下分析 (UPLC / ES-MS / MS).

## 1 实验部分

### 1.1 标准物质

PFBS 四丁基铵盐 ( $\geq 98\%$ ), PFOS 钾盐 ( $\geq 98\%$ ), PFDA ( $> 97\%$ ), PFHxA ( $\geq 97\%$ ), 购买自 Fluka 公司 (施泰因海姆, 德国). PFHpA (99%), PFNA (97%), PFOA (96%), PFUnDA (95%), 购买自 Aldrich 公司 (施泰因海姆, 德国) 以及密尔沃基, 威斯康星, 美国). 7H-PFHpA (98%) 购买自 ABCR (卡尔斯鲁厄, 德国). PFHxS (98%) 购买自 Interchim 公司 (蒙特鲁肯, 法国). <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA, <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-PFNA 购买自威灵顿实验室 (安大略, 加拿大). 溶剂为 HPLC 纯 (Fisher Scientific).

### 1.2 萃取步骤

使用沃特世 Oasis WAX SPE 小柱. 参数: 2 mL 甲醇, 2 mL 水; 淋洗: 2 mL 40% 甲醇溶液至干; 洗脱: 1 mL 2% 氨水甲醇溶液; 氮吹浓缩提取液至 0.5 mL. 使用 0.2  $\mu$ m 聚丙烯滤膜过滤至进样瓶中. 加入回收率内标 (<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-PFNA 和 7H-PFHpA) 向 0.5 mL 血清或全血样品加入内标 (<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS 和 <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA), 混匀后加入 2 mL 5% (V/V) 蚁酸水溶液, 超声 15 min, 离心 30 min (10000 $\times$ g). 取出上清液使用沃特世 Oasis WAX SPE 小柱萃取.

### 1.3 UPLC 方法

使用沃特世 ACQUITY UPLC. 流动相 A: 2 mmol L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液; 流动相 B: 甲醇 + 2 mmol L<sup>-1</sup> 醋酸铵; 流动相残渣过滤器 (MPRT) (图 1). 色谱柱: ACQUITY BEH C18 2.1 $\times$ 50 mm, 1.7  $\mu$ m (P/N 186002350); 柱温: 50 $^{\circ}$ C; 流速: 0.4 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>; 进样体积: 10  $\mu$ L. UPLC 梯度: 0.00 min 70% A 30% B; 0.50 min 70% A 30% B; 5.00 min 10% A 90% B; 5.10 min 0% A 100% B; 6.00 min 0% A 100% B; 7.00 min 70% A 30% B; 10.00 min 70% A 30% B.

### 1.4 MS 方法

使用沃特世三重四极杆 Quattro Premier XE, 电喷雾负离子化模式. 多离子反应检测方式使用的锥孔电压和碰撞能量见表 1.



图 1 改进 UPLC 系统减少流动相 PFC 干扰

表 1 ES模式下 PFCs的 MRM 转换离子对参数

	保留时间	PFC	母离子	子离子	停留时间	锥孔电压	碰撞能量
功能窗口 1 10.00-3.10	2.09	PFBuS	299.00	80.00	0.20	45.00	29.00
	2.50	7H-PFH pA	345.00	281.00	0.20	16.00	10.00
	2.81	PFH xA	313.00	269.00	0.20	15.00	10.00
功能窗口 2 3.10-3.85	3.45	PFH pA	363.00	319.00	0.05	16.00	10.00
	3.51	PHH xS	399.00	80.00	0.05	45.00	35.00
功能窗口 3 3.75-4.10	3.88	THPFOS	427.00	80.00	0.05	45.00	40.00
	3.90	PFOA	413.00	369.00	0.05	17.00	11.00
	3.90	13C-PFOA	417.00	372.00	0.05	17.00	11.00
功能窗口 4 3.80-5.00	4.26	PFNA	463.00	419.00	0.05	16.00	11.00
	4.26	13C-PFNA	468.00	423.00	0.05	16.00	11.00
	4.28	PFOS	499.00	80.00	0.05	45.00	40.00
	4.28	13C-PFOS	503.00	80.00	0.05	45.00	40.00
功能窗口 5 4.40-5.20	4.56	PFDA	513.00	469.00	0.05	17.00	12.00
	4.83	PFUnDA	563.00	519.00	0.05	18.00	12.00

## 2 结果与讨论

### 2.1 UPLC / MS / MS分析

表 2 给出了本次报告使用的所有 PFCs 的缩写和全名。定量过程使用了两种内标 7H-PFH pA 和  $^{13}\text{C}$ -PFNA,  $^{13}\text{C}$ -PFOA 和  $^{13}\text{C}$ -PFOS 作为回收率内标。开始时实验使用水和甲醇, 没有使用缓冲相, 但是发现化合物在色谱柱上有残留, 为了保证良好的峰形, 需要在流动相中加入  $2\text{ mmol L}^{-1}$  醋酸铵溶液。

表 2 本实验分析 PFCs 清单

全氟代化合物	缩写	分子式	全氟代化合物	缩写	分子式
全氟丁基磺酸盐	PFBuS	$\text{C}_4\text{F}_9\text{SO}_3$	全氟壬酸	PFNA	$\text{C}_8\text{F}_{17}\text{CO}_2\text{H}$
全氟己基磺酸盐	PFHxS	$\text{C}_6\text{F}_{13}\text{SO}_3$	全氟癸酸	PFDA	$\text{C}_9\text{F}_{19}\text{CO}_2\text{H}$
全氟辛基磺酸盐	PFOS	$\text{C}_8\text{F}_{17}\text{SO}_3$	全氟十一烷酸	PFUnDA	$\text{C}_{10}\text{F}_{21}\text{CO}_2\text{H}$
全氟己酸	PFHxA	$\text{C}_5\text{F}_{11}\text{CO}_2\text{H}$	7H-全氟庚酸*	7H-PFH pA	$\text{HC}_6\text{F}_{12}\text{CO}_2\text{H}$
全氟庚酸	PFHpA	$\text{C}_6\text{F}_{13}\text{CO}_2\text{H}$	全氟辛基磺酸盐*	$^{13}\text{C}$ -PFOS	$^{13}\text{C}_8\text{F}_{17}\text{SO}_3$
全氟辛酸	PFOA	$\text{C}_7\text{F}_{15}\text{CO}_2\text{H}$	全氟辛酸*	$^{13}\text{C}$ -PFOA	$^{13}\text{C}_7\text{F}_{15}\text{CO}_2\text{H}$

\* 为内标及回收率内标。

TargetLynx<sup>TM</sup> 是沃特世公司 MassLynx<sup>TM</sup> 工作站中的可选数据处理软件, 用于血清和全血样品中的化合物数据的处理和定量。所有化合物的线性都十分良好 ( $r^2 > 0.99$ )。本报告给出了 PFOS 校正曲线 (图 2)。图 3 给出了使用 ACQUITY UPLC / Quattro Premier XE PFC 的色谱图。

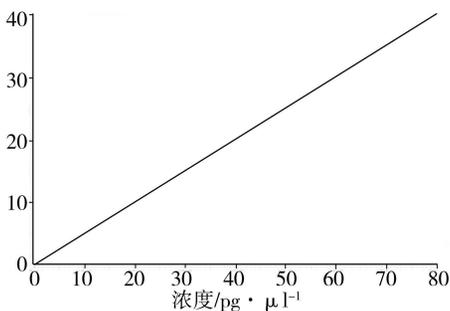
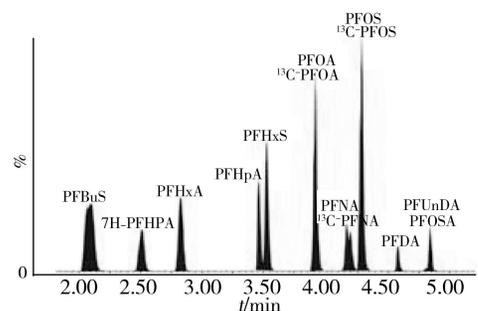
图 2 0.01—80  $\text{pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  浓度范围内 PFOS 的校正曲线

图 3 PFCs 的 UPLC / MS / MS 分析谱图

图 4 将 UPLC 同传统的 HPLC 进行比较, 从运行时间和色谱峰宽来看色谱性能都有提高。(HPLC 数据使用 LC / MS, 而 UPLC 数据使用 LC / MS / MS)。使用 HPLC 分析这 13 种化合物的时间是 22 min, 使用 UPLC 则缩短为 5 min。

UPLC 的快速分析时间具有很多好处, 如减少了方法开发时间, 色谱峰宽度更小。图 3 中, PFOS 的色谱峰宽从

20.3s减少为4.2s,从而减少了共流出峰的可能,增加了异构体分离从而提高灵敏度。

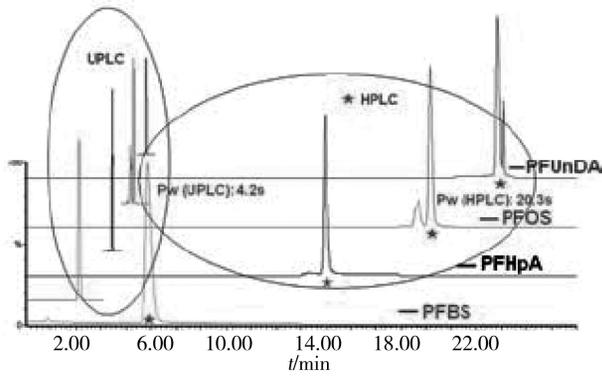


图4 比较UPLC和传统HPLC的运行时间和色谱峰宽

2.2 回收率

表3给出了仪器和方法的检出限,仪器检出限定义为产生信噪比(S/N)为3的浓度,0.5ml血液样品方法检出限由向血液样品中添加低浓度的待测物测得,定义为信噪比为3的浓度。

通过向血和血清样品中添加已知剂量的PFCs估计萃取步骤回收率和重现性(表4A部分),回收率通过比较样品萃取液和标准溶液中的面积进行体积校正后计算,可接受的回收率为70%—130%之间,(对部分长链PFCs而言,血浆样品回收率略低,这些化合物的标准偏差也略高,通常比短链PFC更难于定量)。

按本方法萃取未添加PFCs的样品,在仪器进样前(SPE萃取后)向萃取液中添加已知剂量的PFCs,从而评估电喷雾离子化模式下的可能的离子抑制或加强(表4B部分)。

表3 实验检出限 (pg·μl<sup>-1</sup>)

全氟化合物	仪器	全血	血清	全氟化合物	仪器	全血	血清
PFBuS	0.0003	0.001—0.002	0.002	PFOA	0.0031	0.038—0.044	0.017—0.023
PFHxS	0.0006	0.002	0.003—0.005	PFNA	0.0021	0.013	0.018—0.035
PFOS	0.0035	0.035	0.018—0.025	PFDA	0.0110	0.026—0.032	0.067—0.083
PFHxA	0.0045	0.028—0.034	0.016—0.023	PFUnDA	0.0022	0.018—0.024	0.032—0.042
PFHpA	0.0016	0.008	0.009—0.011				

获得的峰面积进行体积校正后除以相应标准溶液的面积,比值>1时说明样品介质增强了信号,比值<1时说明样品介质抑制了信号,结果值除全血样品中的PFUnDA高达为2.47外,都接近于1(理想值)。

表4 全血和血清样品的回收率和重现性

全氟代化合物	A部分: 回收率和重现性						B部分: 基质效应		
	全血 (n=5)			血清 (n=5)			全氟代化合物	全血 (n=1) 均值	血清 (n=3) 均值
	平均值 %	标准偏差	RSD %	平均值 %	标准偏差	RSD %			
PFBuS	77	0.045	6	77	0.031	4	PFBuS	0.86	0.89
PFHxA	92	0.035	4	83	0.027	3	PFHxA	1.11	0.97
PFHpA	82	0.039	5	79	0.011	1	PFHpA	0.98	0.92
PFHxS	70	0.045	6	77	0.037	5	PFHxS	0.79	0.88
PFOA	82	0.063	8	94	0.083	9	PFOA	0.94	1.04
PFNA	86	0.037	4	99	0.048	5	PFNA	1.07	1.09
PFOS	78	0.032	4	65	0.061	9	PFOS	0.91	0.77
PFDA	92	0.130	14	70	0.246	35	PFDA	1.37	0.93
PFUnDA	124	0.307	25	64	0.212	33	PFUnDA	2.47	0.95

2.3 检测 PFCs的污染

当分析PFCs类化合物时,污染是常见的问题,并在很多化合物分析中存在(表5),本文设计了一组实验来检测污染源: 1) 空白空气注射+梯度洗脱; 2) 无注射梯度洗脱; 3) 甲醇注射(溶剂空白); 4) 方法空白注射,在预进

样器前 (来自使用溶剂或仪器部件) 和进样器发现了 PFOA 和 PFNA 的污染, 当甲醇用量升高时, 出现了污染的色谱峰. 为减少污染干扰, 在泵后和预进样器前加入了一根色谱柱, 从而将干扰峰从样品峰中分离. 当流动相停止时这些化合物可能在色谱柱头累积 (可能由甲醇或 UPLC 系统的部件导致). 为了避免这种情况的发生, 在运行序列分析前或等待下一次序列分析时将溶剂流速设置在  $0.050 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . 分析了两个在不同时间制备的方法空白. 方法空白比溶剂空白污染程度更大. 在某些情况下观测到的污染可能来自内标. 对略显偏高的污染的另一解释是来自玻璃器皿和接触溶剂的污染. 对来自萃取过程的污染使用每 12 个血液样品萃取过程中加入一个 MilliQ 水样品 (空白), 来自仪器的污染使用在样品分析序列中引入多次甲醇进样来评价.

表 5 检测 PFCs 的污染 1) 来自溶剂 / 检测器; 2) 来自处理步骤

全氟代化合物	溶剂空白		操作空白		全氟代化合物	溶剂空白		操作空白	
	水: 甲醇 (65: 35)		60103	20051027		水: 甲醇 (65: 35)		60103	20051027
PFBU S	×		√		PFNA <sup>1)</sup>	~ 0.023		~ 0.05	
PFH xA	×		~ 0.002	~ 0.002	PFOS <sup>2)</sup>	×		√	
PFH pA	×		~ 0.001	~ 0.001	ISTD				
PFH xS	×			×	PFDA			×	~ 0.05
PFOA	~ 0.0065		~ 0.1	~ 0.4	PFUnDA	×		×	×

×: 未检出, √: 检出但未定量, : 可能痕量存在; 1) 污染来源于仪器及内标, 大约 50%: 50%; 2) 污染来源于内标.

### 3 结论

使用沃特世公司 UPLC / MS / MS 可快速灵敏分析 PFCs 样品. 该方法将传统 HPLC 分析时间 (22 min) 减少至低于 5 min. 使用 0.5 mL 全血及血清样品的检出限分别为  $0.002\text{--}0.04 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  和  $0.002\text{--}0.08 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . 将这个方法拓展至更长的长链 PFCs 化合物需要进一步的研究. 在本文中省略了一些不太成功的长链化合物的初步结果.