

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法同时测定血清中12种全氟化合物

王铮^{a, b}, 张济明^{a, b}, 郭剑秋^{a, b}, 张磊^{a, b}, 戴一鸣^{a, b}, 邬春华^{a, b}, 周志俊^{a, b}

复旦大学 a. 公共卫生学院 b. 教育部公共卫生安全重点实验室, 上海 200032

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20441

摘要:

[背景] 全氟化合物 (PFAS) 是一类具有潜在健康风险的新型持久性有机污染物, 建立生物样本中 PFAS 的检测方法, 对评估人群暴露负荷和健康效应具有重要意义。

[目的] 利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法, 建立同时测定人血清中6种全氟羧酸类化合物 (全氟庚酸、全氟辛酸、全氟壬酸、全氟癸酸、全氟十一烷酸、全氟十二烷酸)、5种全氟磺酸类化合物 (全氟丁基磺酸、全氟己基磺酸、全氟庚基磺酸、全氟辛基磺酸、全氟癸基磺酸) 和1种全氟磺酰胺类化合物 (全氟辛基磺酰胺) 质量浓度的方法。

[方法] 比较3种固相萃取柱 (ProElut PLS 柱、Oasis HLB 柱和 Supelclean ENVI-18 柱) 对 PFAS 的保留能力, 4种不同比例甲醇淋洗液和3种洗脱液 (甲醇、乙腈及异丙醇) 对固相萃取回收率的影响以及流动相中乙酸铵缓冲盐浓度对峰形的影响。通过增加预分离色谱柱消除背景值, 用同位素内标法定量, 将10倍信噪比浓度定义为方法的定量限。以加标回收率评价方法的准确度, 日内和日间相对标准偏差评价方法的精密度。将所建立的方法应用于20份脐带血清样本的检测, 以观察其应用效果。

[结果] Oasis HLB 柱以30% (体积分数) 甲醇为淋洗液, 异丙醇为洗脱液时可以获得较好的回收率 (39%~103%)。目标物以含有5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵的水-甲醇体系为流动相, 用 C₁₈ 色谱柱分离, 可以获得较好的色谱峰形和质谱响应。12种目标物校准曲线线性范围为0.01~10.00 μg·L⁻¹ (其中: 全氟庚酸和全氟辛基磺酸为0.10~10.00 μg·L⁻¹, 全氟癸基磺酸和全氟辛基磺酰胺为0.05~10.00 μg·L⁻¹); 方法定量限为0.01~0.10 μg·L⁻¹, 加标回收率在81.0%~123.7%之间, 日内和日间精密度分别为1.2%~14.8%和0.4%~16.1%。PFAS在20份实际样品中均有检出, 9种PFAS的检出率为100%。

[结论] 建立的方法具有线性范围宽, 检出限低, 可同时检测多种待测物等优点, 各方法学指标均能满足生物监测中快速、准确、同时测定血清中多种PFAS的需求。

关键词: 全氟化合物; 血清; 超高效液相色谱; 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 固相萃取

Determination of 12 perfluoroalkyl substances in human serum by UPLC-Q-Orbitrap HRMS
WANG Zheng^{a, b}, ZHANG Jiming^{a, b}, GUO Jianqiu^{a, b}, ZHANG Lei^{a, b}, DAI Yiming^{a, b}, WU Chunhua^{a, b}, ZHOU Zhijun^{a, b} (a.School of Public Health b.Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract:

[Background] Perfluoroalkyl substances (PFAS) are a novel type of persistent organic pollutants with potential human health effects. To establish a method for determination of PFAS in biological samples is of great significance for both exposure and health risk assessments.

[Objective] This methodological study aims to establish an ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) method for simultaneous determination of 6 perfluorinated carboxylic acids (perfluoroheptanoic acid, perfluorooctanoic acid, perfluorononanoic acid, perfluorodecanoic acid, perfluoroundecanoic acid, and perfluorododecanoic acid), 5 perfluorosulfonic acids (perfluorobutane sulfonate, perfluorohexane sulfonate, perfluoroheptane sulfonate, perfluorooctane sulfonate, and perfluorodecane sulfonate), and 1 perfluoroalkyl sulfonic acid (perfluorooctane sulfonamide) in human serum.

基金项目

上海市公共卫生三年行动计划重点学科建设项目 (GW-V-10.1-XK12); 复旦大学公共卫生学院“德隆学者”计划项目 (第九期)

作者简介

并列第一作者。

王铮 (1997—), 男, 硕士生;

E-mail: 20211020149@fudan.edu.cn

张济明 (1991—), 男, 博士, 在站博士后;

E-mail: zhangjiming@fudan.edu.cn

通信作者

周志俊, E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

邬春华, E-mail: chwu@fudan.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-09-28

录用日期 2021-01-07

文章编号 2095-9982(2021)03-0238-08

中图分类号 R114; O657.63

文献标志码 A

►引用

王铮, 张济明, 郭剑秋, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法同时测定血清中12种全氟化合物[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(3): 238-244, 253.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20441

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHOU Zhijun, E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

WU Chunhua, E-mail: chwu@fudan.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2020-09-28

Accepted 2021-01-07

►To cite

WANG Zheng, ZHANG Jiming, GUO Jianqiu, et al. Determination of 12 perfluoroalkyl substances in human serum by UPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(3): 238-244, 253.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20441

[Methods] Three solid phase extraction (SPE) columns, namely ProElut PLS, Oasis HLB, and Supelclean ENVI-18, were compared for their retention of PFAS. To obtain a better extraction recovery rate, methanol wash solutions with four different fractions and three eluents (acetonitrile, methanol, and isopropanol) were tested. Ammonium acetate buffer salt was added to improve the peak shape. A pre-separation column was used to reduce background noise. PFAS were quantified by isotopic internal standard method. The limits of quantification were determined at 10 times signal-to-noise ratio. The accuracy and precision were evaluated by recovery rate and intra- and inter-day relative standard deviations. The established method was applied to 20 umbilical cord serum samples.

[Results] An optimal recovery rate (39%-103%) was achieved by using Oasis HLB column, washing with 30% methanol (v/v) and eluting with isopropanol. Good peak shape and mass response were obtained by using H₂O-methanol (containing 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate) as mobile phase and C₁₈ column as separation column. The linearity ranges of calibration curves of 12 analytes were from 0.01 to 10.00 µg·L⁻¹ (perfluoroheptanoic acid and perfluorooctane sulfonate: 0.10-10.00 µg·L⁻¹; perfluorodecane sulfonate and perfluorooctane sulfonamide: 0.05-10.00 µg·L⁻¹), with a limit of quantification between 0.01 and 0.10 µg·L⁻¹. The average recoveries of the analytes in spiked serum samples ranged from 81.0% to 123.7%. The relative standard deviations of the intra- and inter-day precision were from 1.2% to 14.8% and from 0.4% to 16.1%, respectively. PFAS were detected in all the 20 serum samples, and 9 kinds of PFAS were 100% detectable.

[Conclusion] The established method is featured with good linearity and a low limit of detection. Various methodological indicators show that the method can be applied to the simultaneous determination of multiple PFAS in serum samples accurately and rapidly.

Keywords: perfluoroalkyl substances; serum; ultra-high performance liquid chromatography; quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry; solid phase extraction

全氟化合物 (perfluoroalkyl substances, PFAS) 是一类人工合成的有机物, 因其碳链上所有氢原子被氟原子取代而得名。PFAS 具有亲水亲脂性、高表面活性、化学稳定性和热稳定性好等特点, 被广泛用于制造不粘锅、消防泡沫、食品包装防油涂层和衣物的防水涂层等, 也随之进入环境并造成了人群广泛暴露, 常见的 PFAS 包括全氟羧酸类化合物 (如全氟辛酸) 及全氟磺酸类化合物 (如全氟辛基磺酸) 等^[1]。研究表明, PFAS 暴露可能与多种不良健康效应如低出生体重、肥胖、甲状腺功能紊乱等有关^[2], 因此有必要对人群 PFAS 暴露负荷进行监测。然而目前 PFAS 的检测方法大多局限于环境样品, 有关生物样品中 PFAS 的检测方法较少, 所以建立快速准确的定量检测生物样品中多种 PFAS 的方法, 对监测人群 PFAS 暴露水平, 进而评估其暴露风险和可能的健康效应具有重要意义。

目前常见 PFAS 的分析方法主要包括色谱法和色谱-质谱联用法等, 其中液相色谱串联质谱法无须衍生, 结合固相萃取 (solid phase extraction, SPE)^[3]、加速溶剂萃取^[4]等预处理技术, 可使得血液中 PFAS 的检出限低至 ng·L⁻¹ 水平, 是检测生物样本中 PFAS 浓度的首选方法。本研究选取文献报道的环境^[5]及人体暴露^[6]中具有代表性的 6 种全氟羧酸类化合物 (全氟庚酸、全氟辛酸、全氟壬酸、全氟癸酸、全氟十一烷酸、全氟十二烷酸)、5 种全氟磺酸类化合物 (全氟丁基磺酸、全氟己基磺酸、全氟庚基磺酸、全氟辛基磺酸、全氟癸基磺酸) 以及 1 种全氟磺酰胺类化合物 (全氟辛基磺酰胺), 通过酶水解、乙腈沉淀蛋白和 SPE 等

方法对血清样品中的目标物进行提取、净化和富集, 应用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 建立快速准确同时检测血清中 12 种 PFAS 的方法, 以实现生物监测中大样本分析的需要, 为 PFAS 的暴露评估和相关研究的开展提供技术支撑, 12 种 PFAS 的结构如图 1。

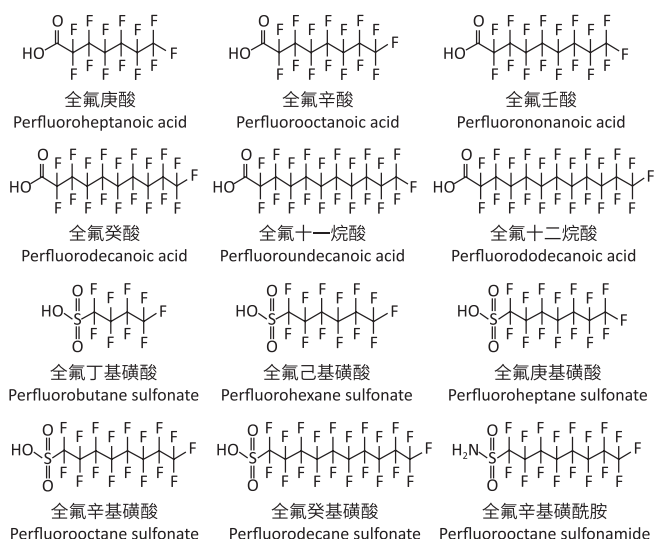


图 1 12 种 PFAS 的化学结构式
Figure 1 Structural formula of 12 PFAS

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 超高效液相色谱串联 Q-Exactive™ 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱系统 (ThermoFisher,

美国)；SpeedVac SPD1030 真空浓缩仪 (ThermoFisher, 美国)；Hypersil GOLD C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm, ThermoFisher, 美国)；Milli-Q 超纯水系统 (Merck, 德国)；Oasis HLB SPE 柱 (30 mg, 1 mL, Waters, 美国)；Supelclean ENVI-18 SPE 柱 (100 mg, 1 mL, Sigma-Aldrich, 美国)；ProElut PLS SPE 柱 (30 mg, 1 mL, Dikma, 中国)。

12 种 PFAS 标准品：全氟庚酸、全氟辛酸、全氟壬酸、全氟癸酸、全氟十一烷酸、全氟十二烷酸、全氟丁基磺酸、全氟辛基磺酸 (纯度分别为 99%、分析纯、分析纯、98%、96%、分析纯、97%、96.4%，Sigma-Aldrich,

美国)，全氟己基磺酸 (分析纯, Apollo Scientific, 英国)，全氟庚基磺酸、全氟辛基磺酰胺 (纯度分别为 95.3% 和 96.0%，Dr. Ehrenstorfer GmbH, 德国)，全氟癸基磺酸 (分析纯, Chiron AS, 挪威)；2 种 PFAS 同位素内标：¹³C₈-全氟辛酸和 ¹³C₈-全氟辛基磺酸 (纯度均为 99%，Cambridge Isotope Laboratories, 美国)；β-葡萄糖醛酸酶 (Sigma-Aldrich, 美国)；乙酸-乙酸铵缓冲液 (pH=5, 厦门海标科技有限公司, 中国)；胎牛血清 (Sigma-Aldrich, 美国)；甲醇、乙腈、异丙醇、乙酸及乙酸铵 (色谱级, Sigma-Aldrich, 美国)。

12 种目标物的定量离子和质荷比如表 1 所示。

表 1 12 种目标物的定量离子和质荷比
Table 1 Quantitative ions and mass-to-charge ratios of 12 analytes

目标物 Analyte	内标 Internal standard	理论质量数 Theoretical mass	定量离子 Ion identification	定量质荷比 m/z
全氟庚酸 (Perfluoroheptanoic acid)	¹³ C ₈ -全氟辛酸	364.062 44	[M-H] ⁻	362.969 62
全氟辛酸 (Perfluorooctanoic acid)	¹³ C ₈ -全氟辛酸	414.070 29	[M-H] ⁻	412.966 43
全氟壬酸 (Perfluorononanoic acid)	¹³ C ₈ -全氟辛酸	464.078 13	[M-H] ⁻	462.963 23
全氟癸酸 (Perfluorodecanoic acid)	¹³ C ₈ -全氟辛酸	514.085 97	[M-H] ⁻	512.960 04
全氟十一烷酸 (Perfluoroundecanoic acid)	¹³ C ₈ -全氟辛酸	564.093 82	[M-H] ⁻	562.956 84
全氟十二烷酸 (Perfluorododecanoic acid)	¹³ C ₈ -全氟辛酸	614.101 66	[M-H] ⁻	612.953 65
全氟丁基磺酸 (Perfluorobutane sulfonate)	¹³ C ₈ -全氟辛基磺酸	300.099 10	[M-H] ⁻	298.942 99
全氟己基磺酸 (Perfluorohexane sulfonate)	¹³ C ₈ -全氟辛基磺酸	400.114 78	[M-H] ⁻	398.936 60
全氟庚基磺酸 (Perfluoroheptane sulfonate)	¹³ C ₈ -全氟辛基磺酸	450.122 62	[M-H] ⁻	448.933 41
全氟辛基磺酸 (Perfluorooctane sulfonate)	¹³ C ₈ -全氟辛基磺酸	500.130 47	[M-H] ⁻	498.930 22
全氟癸基磺酸 (Perfluorodecane sulfonate)	¹³ C ₈ -全氟辛基磺酸	600.146 15	[M-H] ⁻	598.923 83
全氟辛基磺酰胺 (Perfluorooctane sulfonamide)	¹³ C ₈ -全氟辛基磺酸	499.146 22	[M-H] ⁻	497.946 20
¹³ C ₈ -全氟辛酸 (¹³ C ₈ -perfluorooctanoic acid)	—	422.008 79	[M-H] ⁻	420.993 23
¹³ C ₈ -全氟辛基磺酸 (¹³ C ₈ -perfluorooctane sulfonate)	—	508.068 97	[M-H] ⁻	506.956 84

1.2 标准溶液、校准曲线及质控样品的配制

将 12 种标准品和 2 种同位素内标用甲醇配制成质量浓度 (后简称, 浓度) 为 10 mg·L⁻¹ 的单标储备液, 置于 -20℃ 冰箱保存。标准储备液用甲醇稀释成 2 mg·L⁻¹ 的工作液。分别取一定量各标准工作液和内标工作液, 用甲醇稀释成 0.1 mg·L⁻¹ 的混标溶液和 0.1 mg·L⁻¹ 的内标混合液, 置于 4℃ 冰箱保存。

用 50% (体积分数) 甲醇溶液稀释混标溶液, 配制含 10 个浓度水平 (0、0.01、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 μg·L⁻¹) 的标准曲线 (其中全氟庚酸和全氟辛基磺酸实际纳入标准曲线计算的为 8 个浓度水平, 不含 0.01 μg·L⁻¹ 和 0.05 μg·L⁻¹；全氟癸基磺酸和全氟辛基磺酰胺实际纳入标准曲线计算的为 9 个浓度水平, 不含 0.01 μg·L⁻¹)。在胎牛血清中加入混标溶液, 配制与标准曲线相同浓度水平的工作曲线及低、中、高 3 个浓度 (0.20、1.00、5.00 μg·L⁻¹) 的质控样

品, 置于 4℃ 冰箱保存。

1.3 样品预处理

将源自某出生队列研究对象的脐带血清样品 [项目获得复旦大学公共卫生学院伦理委员会批准 (批准号: IRB#2016-12-0607), 取样时均征得孕妇及家属知情同意] 从 -80℃ 冰箱中取出, 室温解冻。震荡混匀后取 200 μL 样品置于 1.5 mL 尖底离心管, 随后依次加入 0.1 mg·L⁻¹ 同位素内标 10 μL, pH=5.0 的乙酸-乙酸铵缓冲溶液 100 μL, β-葡萄糖醛酸酶 15 μL, 漩涡混匀后于 37℃ 水浴 6 h。冷却至室温后加入 200 μL 乙腈漩涡混匀, 在 4℃ 下以 21 380×g 离心 10 min。取上清液上样于经 1 mL 甲醇和 1 mL 超纯水活化后的 SPE 柱, 再用 1 mL 超纯水和 1 mL 淋洗液淋洗, 最后用 2 mL 洗脱液洗脱。分别比较应用 3 种 SPE 柱 (ProElut PLS 柱、Oasis HLB 柱和 Supelclean ENVI-18 柱)、4 种不同比例甲醇淋洗液 (体积分数分别为 10%、30%、50% 和 70%) 和 3 种洗

脱液(甲醇、乙腈和异丙醇)对SPE回收率的影响,优化SPE条件。收集洗脱液置于真空浓缩仪,浓缩2 h至近干。加入200 μ L 甲醇-水溶液(1:1, 体积比)复溶,漩涡混匀后移至进样小瓶,待测。

1.4 仪器条件

色谱分析条件如下。色谱柱:Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;流速:0.4 mL $\cdot$ min⁻¹;进样量10 μ L;流动相:分别考察3种流动相体系,水溶液(A)-甲醇溶液(B)、含1 mmol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵的水溶液(A)-含1 mmol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵的甲醇溶液(B)和含5 mmol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵的水溶液(A)-含5 mmol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵的甲醇溶液(B)。在混合器和进样环之间增加1根色谱柱(Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 柱, 100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μ m)。流动相梯度洗脱程序为0~1 min, 5% B;1~2 min, 5%~30% B;2~6 min, 30%~90% B;6~7 min, 90%~100% B;7~8 min, 100%~5% B;8~10 min, 5% B。

质谱分析条件如下。加热电喷雾离子源:负离子模式监测;离子传输管温度:320 $^{\circ}$ C;喷雾电压:-3.0 kV;鞘气流速:40 arb (Thermo 质谱任意单位,仅适用于Thermo 质谱,后同);辅助气流速:15 arb;辅助气温度:300 $^{\circ}$ C;扫描方式:全扫描;扫描范围(质

荷比):150~1000;分辨率:70000(半峰宽);C-trap容量(AGC target):3 $\times$ 10⁶;C-trap 注入时间:200 ms。

2 结果

2.1 SPE条件的确定

如表2所示,本研究以空白加标样品和标准品响应的比值计算绝对回收率。比较了10 μ g $\cdot$ L⁻¹空白加标样品经Supelclean ENVI-18 SPE柱、ProElut PLS SPE柱和Oasis HLB SPE柱预处理后的回收率,发现Oasis HLB SPE柱对长链和中长链PFAS都具有较好的保留,除全氟庚酸外绝对回收率均超过50%,因此实验最终选用Oasis HLB SPE柱。本研究还考察了四种不同比例的甲醇淋洗液对Oasis HLB SPE柱回收率的影响,用10%和30%(体积分数)的甲醇淋洗后用异丙醇洗脱回收率为39%~103%,用50%(体积分数)甲醇淋洗时短链PFAS如全氟庚酸和全氟丁基磺酸基本无回收,而用70%(体积分数)甲醇淋洗时除全氟癸基磺酸和全氟辛基磺酰胺外的目标物都几乎不回收,因此本研究最终选用30%(体积分数)甲醇作为淋洗液。实验还发现以30%(体积分数)的甲醇淋洗Oasis HLB SPE柱后应用乙腈、甲醇和异丙醇三种不同极性的洗脱液均有较好的绝对回收率,因此选择了急性毒性较小的异丙醇作为洗脱液。

表2 不同SPE条件对绝对回收率的影响

Table 2 Absolute recovery rates under various SPE conditions

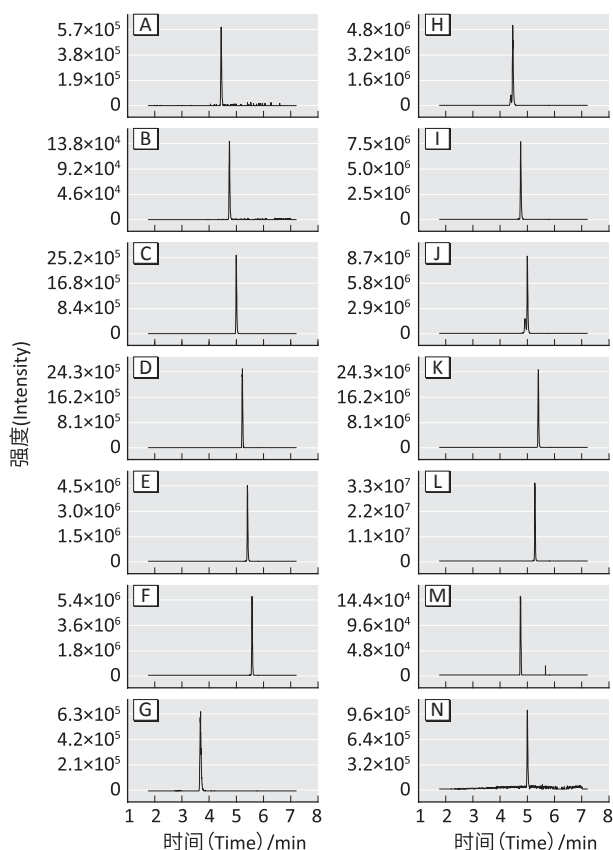
单位 (Unit) : %										
目标物 Analyte	SPE 柱 SPE column			甲醇占比/% Methanol fraction/%				洗脱溶剂 Eluent		
	Supelclean ENVI-18	ProElut PLS	Oasis HLB	10	30	50	70	甲醇 Methanol	乙腈 Acetonitrile	异丙醇 Isopropanol
全氟羧酸类 (Perfluorocarboxylic acid)										
全氟庚酸 (Perfluoroheptanoic acid)	2	50	39	41	39	8	0	41	38	36
全氟辛酸 (Perfluorooctanoic acid)	40	63	58	55	58	33	0	54	52	51
全氟壬酸 (Perfluorononanoic acid)	108	75	79	72	79	62	1	73	71	70
全氟癸酸 (Perfluorodecanoic acid)	91	77	89	83	89	82	2	87	84	83
全氟十一烷酸 (Perfluoroundecanoic acid)	65	65	78	75	78	77	3	76	77	75
全氟十二烷酸 (Perfluorododecanoic acid)	46	56	67	63	67	67	7	66	66	64
全氟磺酸类 (Perfluoroalkyl sulfonicacid)										
全氟丁基磺酸 (Perfluorobutane sulfonate)	1	49	59	65	59	6	1	66	62	50
全氟己基磺酸 (Perfluorohexane sulfonate)	5	74	89	87	89	65	1	93	90	82
全氟庚基磺酸 (Perfluoroheptane sulfonate)	70	83	103	100	103	95	3	104	103	94
全氟辛基磺酸 (Perfluorooctane sulfonate)	94	88	102	100	102	99	5	101	102	94
全氟癸基磺酸 (Perfluorodecane sulfonate)	70	79	85	82	85	85	31	85	84	81
全氟磺酰胺类 (Perfluorosulfonamide)										
全氟辛基磺酰胺 (Perfluorooctane sulfonamide)	83	118	52	46	52	55	47	68	69	65

2.2 色谱条件的确定

本实验选用Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱进行目标物的分离,考察3种不同的流动相体系(水-甲醇、

含1 mmol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵的水-甲醇以及含5 mmol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵的水-甲醇),实验表明应用含5 mmol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵的水-甲醇体系做流动相时,目标物在色谱柱上分离较

好, 峰形对称, 如图2所示。



[注] A: 全氟庚酸; B: 全氟辛酸; C: 全氟壬酸; D: 全氟癸酸; E: 全氟十一烷酸; F: 全氟十二烷酸; G: 全氟丁基磺酸; H: 全氟己基磺酸; I: 全氟庚基磺酸; J: 全氟辛基磺酸; K: 全氟癸基磺酸; L: 全氟辛基磺酰胺; M: $^{13}\text{C}_8$ -全氟辛酸; N: $^{13}\text{C}_8$ -全氟辛基磺酸。流动相为含 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵的水-甲醇体系。

[Note] A: Perfluoroheptanoic acid; B: Perfluorooctanoic acid; C: Perfluorononanoic acid; D: Perfluorodecanoic acid; E: Perfluoroundecanoic acid; F: Perfluorododecanoic acid; G: Perfluorobutane sulfonate; H: Perfluorohexane sulfonate; I: Perfluoroheptane sulfonate; J: Perfluorooctane sulfonate; K: Perfluorodecane sulfonate; L: Perfluorooctane sulfonamide; M: $^{13}\text{C}_8$ -Perfluorooctanoic acid; N: $^{13}\text{C}_8$ -Perfluorooctane sulfonate. Mobile phases consist of $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ammonium acetate in water-methanol.

图2 质控样品12种PFAS及2种同位素内标的提取离子流图
Figure 2 Extracted ion chromatogram of 12 PFAS and 2 isotope internal standards in quality control samples

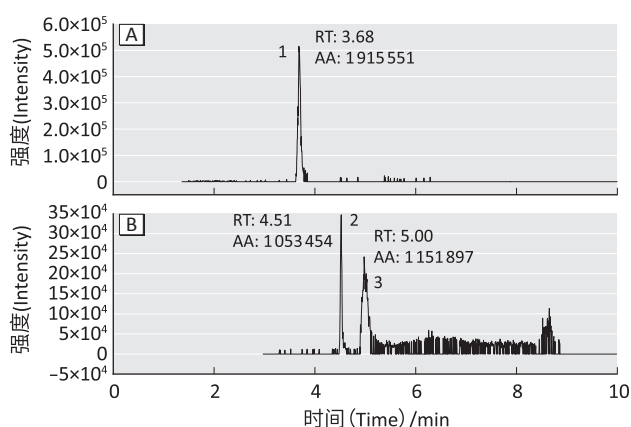
2.3 背景值的消除

应用预分离色谱柱分离背景干扰与样品中的目标物。以全氟庚酸为例, 在进样全氟庚酸标准溶液后, 样品中全氟庚酸峰与仪器析出的全氟庚酸峰完全分离, 如图3所示。

2.4 校准曲线和定量限

以 $^{13}\text{C}_8$ -全氟辛酸作为全氟羧酸类化合物的内标, $^{13}\text{C}_8$ -全氟辛基磺酸作为全氟磺酸类及全氟磺酰胺类化合物的内标, 以目标化合物浓度为横坐标, 目标化

合物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标绘制标准曲线, 各目标物标准曲线线性良好。以同样方法绘制工作曲线, 全氟庚酸和全氟辛基磺酸的线性范围为 $0.10\sim 10.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 全氟癸基磺酸和全氟辛基磺酰胺的线性范围为 $0.05\sim 10.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余8种待测目标物的工作曲线线性范围均为 $0.01\sim 10.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 相关系数 r 均大于0.996。以10倍信噪比浓度定义方法定量限 (limit of quantitation, LOQ), 12种PFAS的工作曲线及LOQ如表3所示。



[注] 1: 改进前样品与背景全氟庚酸共流出; 2: 改进后样品全氟庚酸; 3: 改进后背景全氟庚酸; RT: 保留时间; AA: 峰面积。

[Note] 1: The sample and background perfluoroheptanoic acid are eluted together before modifying; 2: The sample perfluoroheptanoic acid after modifying; 3: The background perfluoroheptanoic acid after modifying; RT: Retention time; AA: Area.

图3 改进前 (A)、后 (B) $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品中全氟庚酸的提取离子流图

Figure 3 Extracted ion chromatograms of perfluoroheptanoic acid before (A) and after (B) modification in $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ standard sample

表3 血清中12种PFAS的工作曲线、相关系数和定量限
Table 3 Working curve, correlation coefficient, and limit of quantification of 12 PFAS in serum

目标物 Analyte	回归方程 Regression equation	r	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
全氟羧酸类 (Perfluorocarboxylic acid)			
全氟庚酸 (Perfluoroheptanoic acid)	$\hat{Y}=0.0116+0.0607X$	0.9980	0.10
全氟辛酸 (Perfluorooctanoic acid)	$\hat{Y}=0.0364+0.229X$	0.9988	0.01
全氟壬酸 (Perfluorononanoic acid)	$\hat{Y}=-0.0277+0.486X$	0.9982	0.01
全氟癸酸 (Perfluorodecanoic acid)	$\hat{Y}=-0.0234+0.511X$	0.9961	0.01
全氟十一烷酸 (Perfluoroundecanoic acid)	$\hat{Y}=-0.0383+0.617X$	0.9977	0.01
全氟十二烷酸 (Perfluorododecanoic acid)	$\hat{Y}=-0.168+0.754X$	0.9974	0.01
全氟磺酸类 (Perfluoroalkyl sulfonic acid)			
全氟丁基磺酸 (Perfluorobutane sulfonate)	$\hat{Y}=0.00511+0.00868X$	0.9968	0.01
全氟己基磺酸 (Perfluorohexane sulfonate)	$\hat{Y}=-0.00839+0.164X$	0.9990	0.01
全氟庚基磺酸 (Perfluoroheptane sulfonate)	$\hat{Y}=0.00641+0.172X$	0.9998	0.01
全氟辛基磺酸 (Perfluorooctane sulfonate)	$\hat{Y}=0.317+0.235X$	0.9992	0.10
全氟癸基磺酸 (Perfluorodecane sulfonate)	$\hat{Y}=-0.0334+0.325X$	0.9979	0.05
全氟磺酰胺类 (Perfluorosulfonamide)			
全氟辛基磺酰胺 (Perfluorooctane sulfonamide)	$\hat{Y}=-0.0212+0.199X$	0.9991	0.05

2.5 精密度和准确度

以空白样品加标回收率表示方法的准确度,以相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 表示方法的精密度。对低、中、高三个浓度 (0.2、1.0、5.0 μg·L⁻¹) 的质控样品进行预处理和分析,每一个浓度水平进行5次平行测定,计算各目标物的加标回收率和日内精

密度。连续3d重复上述操作,计算各目标物的日间精密度。目标化合物平均回收率在81.0%~123.7%之间,日内RSD在1.2%~14.8%之间,日间RSD在0.4%~16.1%之间。12种PFAS的平均回收率及日内和日间RSD见表4。结果显示本方法回收率高,精密度良好,可以用于血清中12种PFAS的准确定量。

表4 3种质量浓度质控样品检测方法的准确度和精密度 (n=5)
Table 4 Accuracy and precision of established method in quality control samples at different concentrations (n=5)
单位 (Unit): %

目标物 Analyte	平均回收率 Average recovery rate			日内RSD Intra-day RSD			日间RSD Inter-day RSD		
	0.2 μg·L ⁻¹	1.0 μg·L ⁻¹	5.0 μg·L ⁻¹	0.2 μg·L ⁻¹	1.0 μg·L ⁻¹	5.0 μg·L ⁻¹	0.2 μg·L ⁻¹	1.0 μg·L ⁻¹	5.0 μg·L ⁻¹
全氟羧酸类 (Perfluorocarboxylic acid)									
全氟庚酸 (Perfluoroheptanoic acid)	100.7	104.2	94.1	14.8	12.2	2.1	3.7	9.4	8.0
全氟辛酸 (Perfluorooctanoic acid)	122.4	107.5	94.4	4.2	5.8	1.2	11.4	15.8	1.0
全氟壬酸 (Perfluorononanoic acid)	116.4	102.5	90.7	4.7	2.8	3.2	4.0	3.5	5.7
全氟癸酸 (Perfluorodecanoic acid)	109.5	93.7	84.1	7.2	5.8	1.8	3.2	4.3	4.1
全氟十一烷酸 (Perfluoroundecanoic acid)	121.4	92.9	82.9	6.8	1.7	2.5	1.5	4.7	3.4
全氟十二烷酸 (Perfluorododecanoic acid)	101.7	101.0	79.7	7.9	2.7	2.9	16.1	1.0	0.4
全氟磺酸类 (Perfluoralkyl sulfonic acid)									
全氟丁基磺酸 (Perfluorobutane sulfonate)	104.1	81.0	101.2	6.3	4.9	4.5	12.4	7.0	0.9
全氟己基磺酸 (Perfluorohexane sulfonate)	123.4	95.1	94.3	3.1	1.4	3.4	4.4	1.1	1.2
全氟庚基磺酸 (Perfluoroheptane sulfonate)	102.4	98.2	97.1	7.3	1.4	3.3	2.4	3.2	4.2
全氟辛基磺酸 (Perfluorooctane sulfonate)	93.3	87.5	92.2	5.9	1.8	1.4	3.8	1.6	1.1
全氟癸基磺酸 (Perfluorodecane sulfonate)	119.0	90.2	86.9	2.8	1.5	2.6	5.0	1.8	0.5
全氟磺酰胺类 (Perfluorosulfonamide)									
全氟辛基磺酰胺 (Perfluorooctane sulfonamide)	123.7	84.6	90.5	2.3	1.6	2.4	1.5	1.4	1.1

2.6 实际样品分析

应用本方法,检测了20份新生儿脐带血清中12种PFAS浓度,结果如表5所示,低于定量限的值以根号二分之定量限计算。PFAS在所有样品中均有检出,浓度变

异较大,不同PFAS的检出率不同,除全氟癸基磺酸和全氟辛基磺酰胺的检出率低于20%外,其他10种PFAS的检出率≥90%。全氟辛酸和全氟辛基磺酸是检出浓度最高的两种PFAS,中位数分别为3.53 μg·L⁻¹和2.03 μg·L⁻¹。

表5 20份脐带血样品中12种PFAS检出率及质量浓度分布
Table 5 Distribution of 12 PFAS positive rates and concentrations in 20 cord blood serum samples

目标物 Analyte	检出率 /% Positive rate/%	检测值 (Detection value) / (μg·L ⁻¹)					
		几何均值±几何标准差 GM±GSD	最小值 Min	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	最大值 Max
全氟羧酸类 (Perfluorocarboxylic acid)							
全氟庚酸 (Perfluoroheptanoic acid)	100	0.21±1.24	0.15	0.18	0.21	0.25	0.31
全氟辛酸 (Perfluorooctanoic acid)	100	3.00±2.77	0.08	2.77	3.53	5.00	8.98
全氟壬酸 (Perfluorononanoic acid)	100	0.21±3.58	0.03	0.06	0.23	0.63	3.12
全氟癸酸 (Perfluorodecanoic acid)	100	1.01±2.71	0.16	0.42	1.26	2.27	4.69
全氟十一烷酸 (Perfluoroundecanoic acid)	100	0.74±2.07	0.09	0.45	0.78	1.19	3.15
全氟十二烷酸 (Perfluorododecanoic acid)	100	0.15±1.75	0.05	0.10	0.16	0.21	0.58
全氟磺酸类 (Perfluoralkyl sulfonicacid)							
全氟丁基磺酸 (Perfluorobutane sulfonate)	90	0.11±1.30	—	0.09	0.11	0.13	0.19
全氟己基磺酸 (Perfluorohexane sulfonate)	100	0.11±1.56	0.05	0.09	0.10	0.13	0.40
全氟庚基磺酸 (Perfluoroheptane sulfonate)	100	0.08±1.50	0.04	0.07	0.08	0.09	0.22
全氟辛基磺酸 (Perfluorooctane sulfonate)	100	2.25±1.57	0.99	1.74	2.03	2.88	6.70
全氟癸基磺酸 (Perfluorodecane sulfonate)	5	0.09±1.00	—	—	—	—	0.09
全氟磺酰胺类 (Perfluorosulfonamide)							
全氟辛基磺酰胺 (Perfluorooctane sulfonamide)	10	0.09±2.23	—	—	—	—	0.16

[注 (Note)] — : <LOQ。

3 讨论

本研究通过对血清样品预处理和仪器分析条件的优化,同时通过增加预分离色谱柱消除仪器背景干扰,建立了基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的快速、准确、同时测定血清中12种PFAS浓度的方法,方法定量限为 $0.01\sim 0.10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,12种目标物平均回收率在81.0%~123.7%之间,日内和日间RSD分别为1.2%~14.8%和0.4%~16.1%。将方法应用于新生儿脐带血清样本的检测,PFAS在所有样品中均有检出,此方法可以满足日常检测的需要。

由于血清样品基质复杂,PFAS含量低微,对目标物提取和富集是样品预处理的重要环节。PFAS易与血清中的白蛋白结合而在血液中蓄积^[7],因此实验采用 β -葡萄糖醛酸酶水解结合态PFAS,加入乙腈振荡离心以沉淀蛋白后再经SPE柱提取净化。SPE技术具有溶剂用量少、分离效果好、操作简便重现性好等优点,然而不同SPE柱的品牌及填料类型、淋洗溶剂及洗脱溶剂等条件对SPE的回收率有较大影响。相较于 C_{18} 柱(Supelclean ENVI-18 SPE柱),亲水亲脂柱(ProElut PLS SPE柱和Oasis HLB SPE柱)对PFAS的保留能力更好。随着淋洗液中甲醇比例的增加,淋洗液的洗脱能力增强,50%和70%(体积分数)甲醇淋洗液的洗脱能力过强,会将PFAS从SPE柱上洗脱,造成较低的绝对回收率。

色谱柱和流动相的选择是分离复杂基质中多种目标物的关键。PFAS作为一类极性物质,本研究根据文献报道选择了最常用的 C_{18} 反相色谱柱,以水-甲醇流动相体系进行分离。考虑到本研究主要检测的目标物为羧酸及磺酸类物质,添加缓冲盐可以有效地调节流动相pH,抑制目标物解离,改善峰形,因此在流动相体系中加入一定量的乙酸铵调节流动相pH和离子浓度。

低背景值是获得准确定量的前提条件,由于PFAS具有亲水亲脂性和高表面活性,其多聚物如聚四氟乙烯常被用于液相色谱管路的制作,既有研究表明PFAS在仪器空白中有较高检出^[8]。与孙瑞^[9]的报道相似,本研究仪器的背景值主要为泵前聚四氟乙烯管路中析出的全氟辛酸和全氟庚酸。为解决这一问题,参照现有研究^[10]在混合器和进样环之间增加一根色谱柱,使得泵前析出的PFAS在前端色谱柱上先进行分离,使仪器析出的PFAS的出峰时间相比实际样品中PFAS出峰时间延长,成功实现对目标物的分离并准确定量。

UPLC-Q-Orbitrap HRMS作为近年来新研发的高分

辨率质谱,以其优越的性能被广泛用于定性检测,同时其在定量分析上也有较好的表现^[11]。研究显示在定量检测如PFAS等痕量化学物质时,Orbitrap高分辨率质谱与三重四极杆质谱相比,检出限、精密度和准确度相近^[12]。本方法与现有方法^[13-15]相比,具有定量限低、样品用量少、分析时间短等优点,应用本方法在20份脐带血样本中均检出了PFAS,大部分目标物的检出率为100%,可满足大样本生物监测中快速、准确、同时测定血清中多种PFAS的实际需求。

参考文献

- [1] LINDSTROM AB, STRYNAR MJ, LIBELO EL. Polyfluorinated compounds: past, present, and future [J]. Environ Sci Technol, 2011, 45 (19): 7954-7961.
- [2] LIEW Z, GOUDARZI H, OULHOTE Y. Developmental exposures to perfluoroalkyl substances (PFASs): an update of associated health outcomes [J]. Curr Environ Health Rep, 2018, 5 (1): 1-19.
- [3] 肖永华, 梁高道, 革丽亚, 等. 固相萃取-超高效液相色谱/串联质谱法测定人体血清中7种全氟化合物 [J]. 分析科学学报, 2015, 31 (5): 646-650.
XIAO YH, LIANG GD, GE LY, et al. Determination of seven perfluorinated compounds in human serum by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with solid phase extraction [J]. J Analyt Sci, 2015, 31 (5): 646-650.
- [4] 宋小飞, 施召才, 马伟文, 等. 液相色谱-质谱联用法测定血液中全氟化合物 [J]. 分析试验室, 2020, 39 (1): 53-56.
SONG XF, SHI ZC, MA WW, et al. Determination of perfluorinated compounds in blood by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2020, 39 (1): 53-56.
- [5] TAN KY, LU GH, PIAO HT, et al. Current contamination status of perfluoroalkyl substances in tapwater from 17 cities in the eastern China and their correlations with surface waters [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2017, 99 (2): 224-231.
- [6] WANG B, CHEN Q, SHEN L, et al. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in cord blood of newborns in Shanghai, China: implications for risk assessment [J]. Environ Int, 2016, 97: 7-14.

(下转第253页)

- [35] CARTER WG, RYAN MC, GAHR PJ. Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin $\alpha 3\beta 1$ in epithelial basement membranes [J]. *Cell*, 1991, 65 (4) : 599-610.
- [36] WANG H, CAI J, Du S, et al. LAMC2 modulates the acidity of microenvironments to promote invasion and migration of pancreatic cancer cells via regulating AKT-dependent NHE1 activity [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 391 (1) : 111984.
- [37] MOON YW, RAO G, KIM JJ, et al. LAMC2 enhances the metastatic potential of lung adenocarcinoma [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22 (8) : 1341-1352.
- [38] PEI YF, LIU J, CHENG J, et al. Silencing of *LAMC2* reverses epithelial-mesenchymal transition and inhibits angiogenesis in cholangiocarcinoma *via* inactivation of the epidermal growth factor receptor signaling pathway [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189 (8) : 1637-1653.
- [39] MCMAHON B, KWAAN HC. The plasminogen activator system and cancer [J]. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2008, 36 (3/4) : 184-194.
- [40] PAN JX, QU F, WANG FF, et al. Aberrant SERPINE1 DNA methylation is involved in carboplatin induced epithelial-mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 296 (6) : 1145-1152.
- [41] AZIMI I, PETERSEN RM, THOMPSON EW, et al. Hypoxia-induced reactive oxygen species mediate N-cadherin and SERPINE1 expression, EGFR signalling and motility in MDA-MB-468 breast cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1) : 15140.
- [42] YANG JD, MA L, ZHU Z. SERPINE1 as a cancer-promoting gene in gastric adenocarcinoma : facilitates tumour cell proliferation, migration, and invasion by regulating EMT [J]. *J Chemother*, 2019, 31 (7/8) : 408-418.

(英文编辑：汪源；责任编辑：王晓宇)

(上接第 244 页)

- [7] FORSTHUBER M, KAISER A M, GRANITZER S, et al. Albumin is the major carrier protein for PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA and PFDA in human plasma [J]. *Environ Int*, 2020, 137 : 105324.
- [8] CHIESA LM, NOBILE M, PASQUALE E, et al. Detection of perfluoroalkyl acids and sulphonates in Italian eel samples by HPLC-HRMS Orbitrap [J]. *Chemosphere*, 2018, 193 : 358-364.
- [9] 孙瑞. 全氟化合物在上海市典型环境介质和非暴露人群血清中赋存及污染特征研究 [D]. 上海：上海大学, 2017.
- SUN R. Preliminary studies on perfluorinated compounds in various typical environmental media and non-occupational human serum of shanghai [D]. Shanghai : Shanghai University, 2017.
- [10] KOPONEN J, RUDGE J, KUSHON S, et al. Novel volumetric adsorptive microsampling technique for determination of perfluorinated compounds in blood [J]. *Anal Biochem*, 2018, 545 : 49-53.
- [11] SOLLIEC M, ROY-LACHAPPELLE A, SAUVÉ S. Quantitative performance of liquid chromatography coupled to Q-Exactive high resolution mass spectrometry (HRMS) for the analysis of tetracyclines in a complex matrix [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 853 : 415-424.
- [12] LIN Y, LIU R, HU F, et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of fluoroalkyl sulfonates in riverine water by liquid chromatography coupled with Orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1435 : 66-74.
- [13] WU M, SUN R, WANG M, et al. Analysis of perfluorinated compounds in human serum from the general population in Shanghai by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *Chemosphere*, 2017, 168 : 100-105.
- [14] KÄRRMAN A, VAN BAVEL B, JÄRNBERG U, et al. Development of a solid-phase Extraction-HPLC/Single quadrupole MS method for quantification of perfluorochemicals in whole blood [J]. *Anal Chem*, 2005, 77 (3) : 864-870.
- [15] KOPONEN J, RANTAKOKKO P, AIRAKSINEN R, et al. Determination of selected perfluorinated alkyl acids and persistent organic pollutants from a small volume human serum sample relevant for epidemiological studies [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1309 : 48-55.

(英文编辑：汪源；责任编辑：丁瑾瑜)