

固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定人体血清中 26 种全氟及多氟烷基化合物

岳莹晓¹, 边雅婷¹, 成鱼帆¹, 贺露¹, 王丹¹, 闫佩霞⁴, 闫伟^{1,2,3},
刘桂英^{1,2,3}, 宋欢^{1,2,3}, 刘良坡^{1,2,3*}

(1. 山西医科大学公共卫生学院卫生检验教研室, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学煤炭环境致病与防治教育部重点实验室, 山西 太原 030001; 3. 山西医科大学黄河流域生态公共卫生安全研究中心, 山西 太原 030001; 4. 北京市昌平区疾病预防控制中心, 北京 102200)

摘要:全氟及多氟烷基化合物(PFASs)是一类由 C-F 键构成的人工化合物,具有高稳定性和难降解性,还具有生物累积性和多脏器毒性。因此,构建高通量、高灵敏度的检测方法,对于评估人体中 PFASs 的暴露水平至关重要。本研究采用商品化的高通量 HMR-Lipid 96 孔固相萃取板,结合高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS),建立了一种简便、高效且能够同时定量检测人体血清中 26 种 PFASs 的方法。血清样本采用 HMR-Lipid 96 孔固相萃取板进行前处理,采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)作为背景污染捕集柱,以 Accucore C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.4 mm, 2.6 μm)作为分析柱,以 2 mmol/L 醋酸铵缓冲溶液和甲醇溶液作为流动相进行梯度洗脱。采用电喷雾电离、负离子扫描(ESI⁻)模式,在多反应监测(MRM)模式下进行定量分析。方法学验证结果表明,26 种 PFASs 在 0.2~100 ng/mL 范围内线性关系良好,相关系数为 0.995 1~0.999 9,检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别为 0.01~0.15 ng/mL 和 0.02~0.47 ng/mL。在低(5 ng/mL)、中(10 ng/mL)、高(50 ng/mL)3 个加标水平下,26 种 PFASs 的回收率为 80.1%~119.5%,相对标准偏差(RSD)为 0.5%~11.9%。与传统固相萃取方法相比,本研究建立的方法具有灵敏度高、准确性好、操作简便、萃取速度快、试剂消耗少以及所需样品量小等优点,适用于大规模人群生物监测,为准确评估人体中 PFASs 的暴露情况及其潜在健康风险提供了科学的方法支撑。

关键词:HMR-Lipid 96 孔固相萃取板;高效液相色谱-串联质谱法;全氟及多氟烷基化合物;人体血清

中图分类号:O658

文献标识码:A

Determination of 26 perfluorinated and polyfluoroalkyl compounds in human serum by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YUE Yingxiao¹, BIAN Yating¹, CHENG Yufan¹, HE Lu¹, WANG Dan¹, YAN Peixia⁴,
YAN Wei^{1,2,3}, LIU Guiying^{1,2,3}, SONG Huan^{1,2,3}, LIU Liangpo^{1,2,3*}

(1. Department of Public Health Laboratory Sciences, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Key Laboratory of Coal Environmental Pathogenicity and Prevention, Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 3. Center for Ecological Public Health Security of Yellow River Basin, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 4. Beijing Changping District Center for Disease Prevention and Control, Beijing 102200, China)

Abstract: Perfluorinated and polyfluoroalkyl compounds (PFASs) represent a category of synthetic chemicals renowned for their environmental persistence. Owing to their hydrophobic, oleophobic, and high-temperature-resistant properties, PFASs are extensively utilized in industrial, agricultural,

收稿日期:2024-10-08

* 通讯联系人.Tel: (0351)4135167, E-mail: lpliu@sxmu.edu.cn.

基金项目:山西省应用基础研究计划项目(202203021221192);山西医科大学博士启动基金项目(XD1915).

Foundation item: Shanxi Province Applied Basic Research Program (No. 202203021221192); Doctor Start-up Fund from Shanxi Medical University (No. XD1915).

and civilian sectors, including applications in leather, textiles, flame-retardant materials, lubricants, and coatings, among others. PFASs can accumulate within the human body, exhibiting multi-organ toxicity. Continuous monitoring of PFASs with ambiguous toxicity profiles is vital for evaluating human exposure and associated health risks. Consequently, the establishment of a high-throughput and highly sensitive detection method is of paramount importance for accurately assessing the exposure levels of PFASs in the human body. In this study, a commercial high-throughput HMR-Lipid 96-well solid-phase extraction plate was adopted, combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), to establish a simple, efficient method that can simultaneously quantitatively detect 26 PFASs in human serum. Serum samples were extracted using the HMR-lipid 96-well solid-phase extraction plate. The Phenomenex C₁₈ chromatography column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used as the capture column and connected between the liquid chromatography mixer and the autosampler to avoid high background pollution. The target compounds were separated by the Accucore C₁₈ chromatography column (100 mm×2.4 mm, 2.6 μm) and analyzed using the electrospray ionization with negative ion scanning mode and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The methodological validation results indicated that the 26 PFASs had good linear relationships within the range of 0.2–100 ng/mL, with correlation coefficients (*r*) of 0.995 1–0.999 9. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were 0.01–0.15 ng/mL and 0.02–0.47 ng/mL, respectively. At three spiked levels of low, medium and high, the recoveries of the 26 PFASs ranged from 80.1% to 119.5%, and the relative standard deviations (RSDs) ranged from 0.5% to 11.9%. This method has the advantages of high sensitivity, good accuracy, simple operation, fast extraction speed, low reagent consumption and small sample volume required. It is suitable for large-scale population biological monitoring and provides a scientific method support for accurately assessing the exposure of PFASs in the human body and its potential health risks.

Key words: HMR-lipid 96-well solid-phase extraction plate; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); perfluorinated and polyfluoroalkyl compounds (PFASs); human serum

全氟及多氟烷基化合物(PFASs)是一类具备热稳定性和化学稳定性的人造化合物,在自然环境中极难发生降解,因而被称作永久化学品^[1]。PFASs自出现至今已近 70 年,目前有超过 1 400 种 PFASs 被广泛应用于各个领域,涵盖食品包装材料、消防泡沫、快餐容器、防污织物、不沾涂层以及灭火泡沫等^[2-4]。这些化合物主要通过工业排放^[5]、大气传输^[6]、水体扩散^[7]、土壤渗透^[8]以及室内粉尘沉降^[9]等途径进入人体。鉴于传统 PFASs 具有多脏器毒性^[10],我国已对部分 PFASs 实施限制措施^[11]。为

满足工业需求,开发并应用其替代品是应对全球 PFASs 监管要求的必要举措。目前,全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸钾(PFOS)已在人体血液^[12]、尿液^[13]、头发^[14]、胎盘组织^[15]、精液^[16]、母乳^[17]等多种生物介质中被检出。新型 PFASs 不断涌现,但其人体暴露水平仍不明确。流行病学研究显示,PFASs 及其新型替代物具有生殖毒性、内分泌毒性以及神经毒性^[18-20],且与乳腺癌患病风险增加有关^[21]。为及时识别和预防 PFASs 暴露引发的健康风险并评估其暴露水平,建立简便、高效的 PFASs

引用本文:岳莹晓,边雅婷,成鱼帆,贺露,王丹,闫佩霞,闫伟,刘桂英,宋欢,刘良坡.固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定人体血清中 26 种全氟及多氟烷基化合物.色谱,2025,43(9):1005-1013.

YUE Yingxiao, BIAN Yating, CHENG Yufan, HE Lu, WANG Dan, YAN Peixia, YAN Wei, LIU Guiying, SONG Huan, LIU Liangpo. Determination of 26 perfluorinated and polyfluoroalkyl compounds in human serum by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(9): 1005-1013.

检测方法至关重要。

目前,针对人体血清中 PFASs 的检测,主要采用液液萃取(LLE)^[22]和固相萃取(SPE)^[23]方法进行前处理,高效去除磷脂,并结合液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)进行定量分析^[24-26]。LLE 作为一种经典的前处理技术,具有操作简便、无需特殊装置的优点,通过选择合适的萃取剂,可实现对特定化合物的选择性提取。例如,Liu 等^[25]以甲基叔丁基醚(MTBE)为萃取液,提取人体血清中的 PFASs,并建立了 LC-MS/MS 检测方法。然而,该方法需对样品进行蛋白沉淀和碱化处理,并反复加萃取液萃取3次,过程繁琐耗时,且易引发交叉污染。随着现代样品前处理技术的发展,SPE 技术已广泛应用于环境分析、生物样品分析、食品分析等领域,成为一种高效的样品前处理手段,能够快速实现样品的富集和净化。目前,亲水亲脂平衡固相萃取(SPE-HLB)和弱阴离子交换固相萃取(SPE-WAX)技术是常用的 SPE 方法^[27],但通常需要对萃取柱进行活化、平衡和淋洗除杂等步骤,导致样品消耗量大且有机试剂用量较多。HMR-Lipid 96 孔固相萃取板作为一种创新型的无机固相萃取材料,采用通过式净化处理方式,无需进行活化、平衡、淋洗等步骤,操作过程简便、快捷。同时,通过在高比表面积的无机骨架上修饰对磷脂具有选择性吸附作用的官能团,HMR-Lipid 96 孔固相萃取板能够去除基质干扰的同时不会吸附目标分析物,净化效果好。因此,HMR-Lipid 96 孔固相萃取板在人体生物样品中 PFASs 及其他污染物的前处理方面展现出潜在的应用前景。

基于此,本研究采用商品化的高通量 HMR-Lipid 96 孔固相萃取板,结合高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS),建立了一种简便、高效且能够同时测定人体血清中 26 种 PFASs 的方法,以期为准确评估人体中 PFASs 的暴露情况及其潜在健康风险提供科学的方法支撑。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

高效液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS 8050,日本 Shimadzu 公司);固相萃取正压装置(美国 Waters 公司);96 孔氮吹仪、Anavo HMR-Lipid 超效分体 96 孔固相萃取板(10 mg/1 mL,北京纳鸥科技有限公司);台式高速离心机(德国 Hettich 公

司);涡旋振荡仪(北京大龙兴创实验仪器股份公司);XX40 真空过滤系统、0.45 μm 水系滤膜(德国 Merck Millipore 公司);GM-0.33A 隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司)。

26 种 PFASs 标准品(纯度 88.7%~100%): PFOA、PFOS、全氟丁酸(PFBA)、全氟己酸(PFHxA)、全氟壬酸(PFNA)、全氟癸酸(PFDA)、全氟十一烷酸(PFUdA)、全氟十二烷酸(PFDoA)、全氟己烷磺酸钾(PFHxS)、全氟庚烷磺酸钠(PFHpS)、全氟十三烷酸(PFTriDA)、全氟十四烷酸(PFTeDA)、全氟戊酸(PFPeA)、全氟庚酸(PFHpA)、全氟丁基磺酸钾(PFBS)、全氟戊烷磺酸钠(PFPeS)、辛基磺酰胺(PFOSA)、全氟壬烷磺酸钠(PFNS)、全氟癸烷磺酸钠(PFDS)、己烷磺酸钠(4:2 FTS)、辛烷磺酸钠(6:2 FTS)、癸烷磺酸钠(8:2 FTS)、2-(*N*-乙基全氟辛烷磺酰氨基)乙酸(*N*-EtFOSAA)和 2-(*N*-甲基全氟辛烷磺酰氨基)乙酸(*N*-MeFOSAA)购于美国 Accustandard 公司;6:2 氯代多氟醚基磺酸(6:2 Cl-PFESA)和 8:2 氯代多氟醚基磺酸(8:2 Cl-PFESA)购于北京百灵威科技有限公司。9 种 PFASs 同位素内标(纯度均为 98% 以上):¹³C₄-PFBA、¹³C₂-PFHxA、¹³C₄-PFOA、¹³C₅-PFNA、¹³C₂-PFDA、¹³C₂-PFUdA、¹³C₂-PFDoA、¹⁸O₂-PFHxS 和 ¹³C₄-PFOS 购于北京百灵威科技有限公司。乙腈和甲醇(均为 HPLC 级,美国 Honeywell 公司);醋酸铵(分析纯,美国 Alfa Aesar 公司);屈臣氏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

本研究已经获得山西医科大学医学伦理委员会批准(批准文件编号:2023SJL35)。人群招募及血清样品采集:研究招募了某地区的 25 名成人志愿者,并向所有志愿者告知了研究目的,整个研究过程严格遵守伦理准则,25 名志愿者均签署了知情同意书。采用不含抗凝剂的采血管采集血液,采集后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 4 h,在 4 000 r/min 下离心 10 min,取出上清液,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

1.2 溶液的配制

混合标准溶液:准确称取各 PFASs 标准品,用甲醇溶解并定容,配制成质量浓度为 500 ng/mL 的 26 种 PFASs 混合标准储备溶液;之后用甲醇逐级稀释混合标准储备溶液,配制成系列质量浓度(10、20、100 ng/mL)的 26 种 PFASs 混合标准溶液。

混合内标储备溶液:准确称取各内标标准品,用甲醇溶解并定容,配制成质量浓度为 50 ng/mL

的 9 种 PFASs 混合内标储备溶液。

混合标准工作液:分别准确移取 100 μL 混合标准储备溶液和 100 μL 混合内标储备溶液,置于 1.5 mL 离心管中,加入 300 μL 的 50% 甲醇水溶液,得到含有 26 种 PFASs 和 9 种内标的混合标准中间液,其中 PFASs 的质量浓度均为 100 ng/mL,内标的质量浓度均为 10 ng/mL;用 50% 甲醇水溶液逐级稀释混合标准中间液,配制质量浓度分别为 0、0.2、1、5、10、25、50、100 ng/mL 的系列混合标准工作液,其中内标的质量浓度均为 10 ng/mL。将配制好的混合标准工作液转移至聚丙烯进样瓶中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2 mmol/L 醋酸铵缓冲溶液(pH 7.0):准确称取 154.0 mg 醋酸铵,置于 1 L 容量瓶中,用蒸馏水溶解并定容,混匀后用 0.45 μm 滤膜过滤,并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.3 样品前处理

采用 HMR-Lipid 96 孔固相萃取板对血清样品中的目标分析物进行提取,具体步骤如下:首先,将血清样品从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下解冻。解冻后,移取 50 μL 血清至 1.5 mL 离心管中,随后加入 50 μL 同位素内标混合标准溶液(10 ng/mL),充分混匀后,将离心管置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 1 h;接着,在 5 500 r/min 下离心 3 min,将上清液全部转移至 HMR 净化管中,然后沿净化管壁加入 200 μL 乙腈,静置 5 min;采用正压装置对净化管施加 700 Pa 的压力,待管内液体逐滴滴下,再次沿管壁加入 200 μL 乙腈,并继续施加正压,直至净化管内无液体残留;将收集到的洗脱液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至干,加入 50 μL 的 50% 甲醇水溶液复溶,涡旋

混匀后转移至进样瓶(带塑料内衬管)中,待测定。

1.4 仪器分析条件

1.4.1 色谱条件

将 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , 美国 Phenomenex 公司)连接在液相色谱混合器与自动进样器之间,用作捕集柱;选用 Accucore C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.4 mm, 2.6 μm , 美国 Thermo Scientific 公司)作为分析柱,并在分析柱前端连接 Accucore C₁₈ 保护柱(10 mm $\times$ 4 mm, 5 μm , 美国 Thermo Scientific 公司);柱温箱温度为 35 $^{\circ}\text{C}$;进样体积为 5.0 μL ;洗脱速率为 0.45 mL/min。流动相 A 为 2 mmol/L 醋酸铵缓冲溶液,流动相 B 为甲醇,采用线性梯度洗脱方式,具体洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure

Time/min	Elution velocity/(mL/min)	$\varphi(\text{A})/\%$	$\varphi(\text{B})/\%$
0	0.45	70	30
5.0	0.45	0	100
15.0	0.45	0	100
15.5	0.45	70	30
25.0	0.45	70	30

A: 2 mmol/L ammonium acetate buffer solution; B: methanol.

1.4.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI)源;扫描方式:负离子扫描;接口电压:3 kV;脱溶剂温度:250 $^{\circ}\text{C}$;接口温度:300 $^{\circ}\text{C}$;加热块温度:400 $^{\circ}\text{C}$;加热气体流量:10.0 L/min;雾化气体流量:3.0 L/min;干燥气体流量:10.0 L/min;驻留时间:20 ms。采用多反应监测(MRM)模式进行定量分析。质谱参数详见表 2。

表 2 26 种 PFASs 及 9 种同位素内标的保留时间和质谱参数
Table 2 Retention times and MS parameters of the 26 PFASs and nine isotope internal standards (ISs)

Compound	$M_r/(\text{g/mol})$	t_R/min	Transition	CE/eV	IS
Perfluoro- <i>n</i> -butanoic acid (PFBA)	214.04	4.65	213.05>169.00*	12	¹³ C ₄ -PFBA
Perfluoro- <i>n</i> -pentanoic acid (PFPeA)	264.65	10.00	263.05>218.95*	9	¹³ C ₂ -PFHxA
Potassium perfluoro-1-butanedisulfonate (PFBS)	300.00	10.26	299.00>80.00*	35	¹⁸ O ₂ -PFHxS
Perfluoro- <i>n</i> -hexanoic acid (PFHxA)	314.05	10.75	313.05>269.05*	10	¹³ C ₂ -PFHxA
Sodium perfluoro-1-pentadisulfonate (PFPeS)	350.00	10.81	349.00>80.00*	45	¹⁸ O ₂ -PFHxS
			349.00>99.00	31	
Sodium 1 <i>H</i> , 1 <i>H</i> , 2 <i>H</i> , 2 <i>H</i> -perfluoro-1-hexadisulfonate (4:2 FTS)	328.00	10.88	327.00>307.00*	19	¹³ C ₄ -PFOS
Sodium perfluoro-1-heptadisulfonate (PFHpS)	450.00	11.00	449.00>80.00*	49	¹⁸ O ₂ -PFHxS
			449.00>99.00	39	
Perfluoro- <i>n</i> -heptanoic acid (PFHpA)	364.06	11.13	363.05>319.10*	11	¹³ C ₄ -PFOA
			363.05>119.20	22	

表 2 (续)
Table 2 (Continued)

Compound	M_r /(g/mol)	t_R /min	Transition	CE/eV	IS
Potassium perfluoro-1-hexanesulfonate (PFHxS)	400.00	11.13	399.00>79.95*	46	$^{18}\text{O}_2$ -PFHxS
			399.00>99.00	35	
Sodium 1 <i>H</i> , 1 <i>H</i> , 2 <i>H</i> , 2 <i>H</i> -perfluoro-1-octanesulfonate (6:2 FTS)	450.15	11.40	449.15>80.00*	45	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS
			449.15>99.00	38	
Perfluoro- <i>n</i> -octanoic acid (PFOA)	414.07	11.40	413.05>369.00*	11	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA
			413.05>169.05	19	
Perfluoro- <i>n</i> -nonanoic acid (PFNA)	464.08	11.63	463.05>419.00*	12	$^{13}\text{C}_5$ -PFNA
			463.05>218.90	19	
Potassium perfluoro-1-octanesulfonate (PFOS)	500.00	11.63	499.00>80.00*	49	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS
			499.00>99.05	41	
6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate acid (6:2 Cl-PFESA)	531.58	11.73	530.55>350.90*	27	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS
			530.55>83.05	30	
Sodium perfluoro-1-nonanesulfonate (PFNS)	550.00	11.82	549.00>79.90*	55	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS
			549.00>98.85	46	
Perfluoro- <i>n</i> -decanoic acid (PFDA)	514.08	11.83	513.05>468.95*	13	$^{13}\text{C}_2$ -PFDA
			513.05>218.95	18	
Sodium perfluoro-1-decanesulfonate (PFDS)	600.00	12.00	599.00>79.90*	55	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS
			599.00>99.10	52	
Sodium 1 <i>H</i> , 1 <i>H</i> , 2 <i>H</i> , 2 <i>H</i> -perfluoro-1-decanesulfonate (8:2 FTS)	528.00	12.01	527.00>506.95*	27	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS
Perfluoro- <i>n</i> -undecanoic acid (PFUdA)	564.09	12.01	563.10>519.00*	13	$^{13}\text{C}_2$ -PFUdA
			563.10>269.10	20	
8:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate acid (8:2 Cl-PFESA)	631.60	12.07	630.60>450.90*	30	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS
			630.60>83.05	45	
<i>N</i> -Methylperfluorooctanesulfonamidoacetic acid (<i>N</i> -MeFOSAA)	571.00	12.12	570.00>418.85*	22	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA
			570.00>219.00	27	
Perfluoro- <i>n</i> -dodecanoic acid (PFDoA)	614.10	12.17	613.10>568.95*	14	$^{13}\text{C}_2$ -PFDoA
			613.10>169.20	29	
<i>N</i> -Ethylperfluorooctanesulfonamidoacetic acid (<i>N</i> -EtFOSAA)	585.24	12.22	584.25>419.00*	22	$^{13}\text{C}_2$ -PFUdA
			584.25>218.90	20	
Perfluoro- <i>n</i> -tridecanoic acid (PFTriDA)	664.10	12.31	663.10>618.90*	13	$^{13}\text{C}_2$ -PFDoA
			663.10>269.20	20	
Perfluoro- <i>n</i> -tetradecanoic acid (PFTeDA)	714.11	12.44	713.10>668.85*	15	$^{13}\text{C}_2$ -PFDoA
			713.10>218.90	25	
Perfluorooctane sulfonamide (PFOSA)	499.15	13.05	498.15>78.00*	45	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS
			498.15>169.05	30	
$^{13}\text{C}_4$ -PFBA	218.00	4.64	217.00>172.05*	12	/
$^{13}\text{C}_2$ -PFHxA	316.00	10.75	315.00>270.00*	11	/
$^{18}\text{O}_2$ -PFHxS	404.00	11.14	403.00>84.00*	43	/
$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	418.00	11.40	417.00>371.90*	12	/
$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	504.00	11.63	503.00>80.00*	53	/
$^{13}\text{C}_5$ -PFNA	469.00	11.64	468.00>423.00*	12	/
$^{13}\text{C}_2$ -PFDA	516.00	11.83	515.00>469.95*	13	/
$^{13}\text{C}_2$ -PFUdA	566.00	12.02	565.00>519.85*	15	/
$^{13}\text{C}_2$ -PFDoA	616.00	12.17	615.00>570.00*	15	/

* Quantitative ion pair; CE: collision energy; /: no value.

2 结果与讨论

2.1 仪器条件优化

2.1.1 质谱参数优化

采用自动进样器分别对 26 种 PFASs 混合标准储备溶液(500 ng/mL)及 9 种 PFASs 混合内标储备溶液(50 ng/mL)进样分析,以优化质谱条件。实验选取全扫描(Q1 Scan)模式,设置流速为 0.2 mL/min,柱温箱温度为 35 ℃,检测时间为 2 min。在此条件下,分别对母离子、子离子、碰撞能量等参数进行自动优化,挑选信号响应较高且干扰较小的碎片离子作为定量离子,最终确定了 26 种 PFASs 及 9 种同位素内标的质谱条件(表 2)。

2.1.2 色谱条件优化

预实验结果发现,PFOS、PFHxS 和 PFHpA 存在较高的背景值,这会对待测物的含量分析产生干扰。已有研究报道了全氟类化合物 LC-MS/MS 检测过程中仪器污染的处理方法,即在混合器和自动进样器之间连接一根捕集柱,以此达到排除背景污染的目的,该方法所获得的加标回收率为 66.8%~111.9%^[28]。本研究旨在排除仪器背景干扰的同时进一步提高方法的灵敏度与准确度,从而实现人体血清中 PFASs 更准确的定量分析。为此,实验分别选用 Diamonsil C₁₈(2)色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 北京迪科马科技有限公司)、Agilent C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent Technologies 公司)和 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)作为捕集柱开展预实验,考察它们对背景污染的去除效果以及对待测物的分离效果。经实验发现,与另两种色谱柱相比,当采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱作为背景污染捕集柱时,能够

有效消除背景污染(流动相为 100% 有机相),实现对目标待测物的准确测定。

在 1.4 节条件下,26 种 PFASs 的总离子色谱图见图 1,可以看出,26 种 PFASs 的色谱峰形和响应强度均较为理想。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围、回归方程、检出限与定量限

采用本方法对系列质量浓度的混合标准工作液进行 LC-MS/MS 分析。以目标待测物与对应同位素内标的定量离子峰面积之比为纵坐标(Y),目标待测物与对应同位素内标的质量浓度之比为横坐标(X),绘制相应的标准曲线。结果显示,26 种 PFASs 在 0.2~100 ng/mL 范围内线性关系良好,相关系数(*r*)为 0.995 1~0.999 9。在低质量浓度校准曲线下确定检出限(LOD)和定量限(LOQ),用 3 倍信噪比(*S/N*)计算 LOD,10 倍 *S/N* 计算 LOQ。结果表明,26 种 PFASs 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.01~0.15 ng/mL 和 0.02~0.47 ng/mL,相关数据见表 3。与 Liu 等^[25]报道的血清中 24 种 PFASs 的检测方法(LOD 和 LOQ 分别为 0.01~0.25 ng/mL 和 0.03~0.75 ng/mL)相比,本方法的 LOD 和 LOQ 更低,说明本方法更加灵敏。

2.2.2 回收率和精密度

通过在空白血清中添加不同水平(5、10、50 ng/mL)的 26 种 PFASs 混合标准工作液来考察方法的准确度与精密度。每个加标水平设置 6 个平行样本,同时设置质量控制样品(程序空白组和血清空白组)。将质量控制样品与加标血清样品一同进行处理,并在加标血清样本测定过程中穿插进行质量控制样品的 LC-MS/MS 分析,以此来评估方法的准确度与精密度。结果表明,在 3 个加标水平

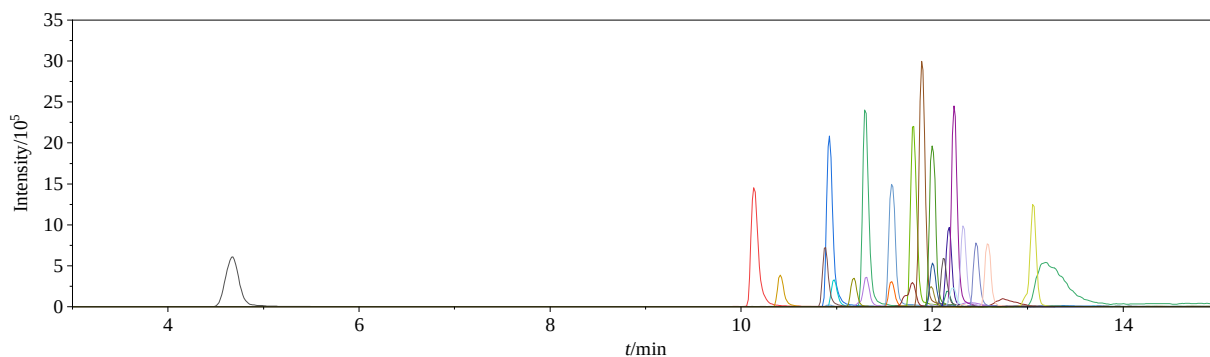


图 1 26 种 PFASs 混合标准溶液(25 ng/mL)的总离子色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the mixed standard solution of the 26 PFASs (25 ng/mL)

表 3 26 种 PFASs 的回归方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限
Table 3 Regression equations, correlation coefficients (*r*), linear ranges, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of the 26 PFASs

Compound	Regression equation	<i>r</i>	Linear range/(ng/mL)	LOD/(ng/mL)	LOQ/(ng/mL)
PFBA	$Y=0.91X+0.0033$	0.9999	0.2-100	0.13	0.38
PFHxA	$Y=0.84X+0.0035$	0.9996	0.2-100	0.03	0.10
PFOA	$Y=0.73X+0.0033$	0.9989	0.2-100	0.08	0.23
PFNA	$Y=0.88X+0.0057$	0.9958	0.2-100	0.03	0.09
PFDA	$Y=0.84X+0.0028$	0.9971	0.2-100	0.03	0.08
PFUdA	$Y=0.53X-0.0008$	0.9981	0.2-100	0.04	0.12
PFDoA	$Y=0.53X-0.0001$	0.9988	0.2-100	0.04	0.12
PFHxS	$Y=0.95X+0.0094$	0.9998	0.2-100	0.05	0.15
PFHpS	$Y=0.81X-0.0025$	0.9990	0.2-100	0.11	0.35
PFOS	$Y=0.98X+0.0045$	0.9951	0.2-100	0.13	0.41
PFTriDA	$Y=0.37X+0.0026$	0.9964	0.2-100	0.04	0.11
PFTeDA	$Y=0.37X-0.0047$	0.9956	0.2-100	0.04	0.13
PFPeA	$Y=0.70X+0.0062$	0.9981	0.2-100	0.05	0.15
PFHpA	$Y=1.04X+0.0010$	0.9994	0.2-100	0.09	0.27
PFBS	$Y=0.96X+0.0001$	0.9997	0.2-100	0.05	0.15
6:2 Cl-PFESA	$Y=6.45X+0.0038$	0.9999	0.2-100	0.01	0.03
8:2 Cl-PFESA	$Y=5.11X-0.0072$	0.9996	0.2-100	0.01	0.03
PFPeS	$Y=0.80X+0.0007$	0.9998	0.2-100	0.15	0.47
PFOSA	$Y=2.80X+0.0096$	0.9983	0.2-100	0.01	0.03
PFNS	$Y=0.50X+0.0016$	0.9984	0.2-100	0.10	0.29
PFDS	$Y=0.41X-0.0022$	0.9997	0.2-100	0.07	0.22
4:2 FTS	$Y=1.57X+0.0059$	0.9978	0.2-100	0.02	0.06
6:2 FTS	$Y=0.67X-0.0007$	0.9986	0.2-100	0.15	0.44
8:2 FTS	$Y=1.16X+0.0048$	0.9962	0.2-100	0.02	0.07
N-EtFOSAA	$Y=0.16X+0.0007$	0.9983	0.2-100	0.01	0.02
N-MeFOSAA	$Y=0.29X-0.0010$	0.9993	0.2-100	0.01	0.05

Y: peak area ratio of PFASs to ISs; X: mass concentration ratio of PFASs to ISs.

下,26 种 PFASs 的加标回收率为 80.1%~119.5%,相对标准偏差(RSD)为 0.5%~11.9%,具体结果见表 4。与 Liu 等^[25]报道的血清中 24 种 PFASs 检测方法相比(加标回收率为 64.0%~124%,RSD 为 0.74%~11.2%),本方法具有更高的准确度。

2.3 不同检测方法比较

将本方法与已报道的 PFASs 前处理方法进行比较,比较参数包括血清样本用量、萃取时间、有机试剂用量、LOD、LOQ 和回收率等,具体见表 5。Liu 等^[25]采用经典的 LLE 前处理方式,在前处理过程中,血清样本需分别进行蛋白沉淀和碱化处理,之后用 MTBE 反复萃取 3 次,有机试剂用量大且前处理耗时较长;Gao 等^[29]采用乙腈沉淀法从血清样品中提取 PFASs,该方法虽能够沉淀蛋白质,但无法完全去除样品中的其他干扰物(如脂类和色素等),后续还需对样品进行进一步纯化,所得到的 LOQ

较高;Yan 等^[30]和杨觅等^[23]分别采用 Oasis HLB 固相萃取和 Oasis WAX 固相萃取方法对血清中的 PFFASs 进行前处理,这两种方法均需对萃取柱进行活化、平衡和淋洗除杂等步骤,前处理耗时较长且有机试剂用量较大。相比之下,本研究所建立的 HMR-Lipid 96 孔固相萃取法仅需 50 μL 血清样品,且无需活化和平衡操作。HMR-Lipid 96 孔固相萃取板具备通过式净化的优势,能一步完成蛋白沉淀和磷脂去除,具有净化高效、操作简便、前处理耗时短、准确度与精密度良好等特点,是一种高通量且易于操作的血清中 PFASs 前处理方法。

2.4 实际样品检测

为进一步评估该方法在实际样品测定中的可行性,将该方法应用于 25 份人体血清样本的测定。结果如表 6 所示,26 种 PFASs 中有 10 种 PFASs 的检出率为 100%,包括 PFOA、PFOS、PFHxS、

表 4 26 种 PFASs 的回收率和相对标准偏差 ($n=6$)
Table 4 Recoveries and RSDs of the 26 PFASs ($n=6$)

Compound	5 ng/mL		10 ng/mL		50 ng/mL		Compound	5 ng/mL		10 ng/mL		50 ng/mL	
	Recov- ery/%	RSD/ %	Recov- ery/%	RSD/ %	Recov- ery/%	RSD/ %		Recov- ery/%	RSD/ %	Recov- ery/%	RSD/ %	Recov- ery/%	RSD/ %
PFBA	93.2	4.8	91.1	3.5	93.9	1.6	PFHpA	87.3	1.6	86	3.6	82.4	0.7
PFHxA	98.6	4.6	96.5	5	91.6	2	PFBS	99.7	4.2	98.6	1.1	99.4	2.7
PFOA	92.4	0.6	85.3	4.1	85.8	2.7	6:2 Cl-PFESA	93.3	4	87.3	4.6	86.1	1
PFNA	90.5	4.3	89.4	2.6	87	1.3	8:2 Cl-PFESA	111.2	3.1	100.2	11.9	101.2	3.9
PFDA	81	3	80.1	3.5	82	3.3	PFPeS	98.2	1.3	93	3.2	89.7	3.3
PFUdA	92.1	8.5	100.4	11.6	91.6	1.2	PFOSA	80.9	11	80.9	9	83.7	7.3
PFDoA	100.6	11.9	104.6	8.7	98.1	2.9	PFNS	96.5	10.9	85.4	9.5	91.9	0.9
PFHxS	101	5.3	100.8	4.1	94.7	1.8	PFDS	107.5	7.5	92.2	7.9	99.7	4.8
PFHpS	103.4	2.8	96.8	3.9	94.9	1.9	4:2 FTS	114.4	6.2	111.5	2.8	106.7	5.2
PFOS	91.1	3.6	93.6	0.5	86.9	2.3	6:2 FTS	93.1	5.5	96.9	4.2	87.1	2
PFTriDA	114.8	2.6	118.3	7	111.6	3.2	8:2 FTS	102.1	1	93	7.6	84.1	1.3
PFTeDA	112	8.7	116.1	2.3	115.9	5.5	N-EtFOSAA	116.4	5	119.5	9.7	119.2	4.3
PFPeA	102.3	7.8	96.9	2.4	98	2	N-MeFOSAA	108.9	3.6	103.1	9.6	106.5	4.4

表 5 血清样品中 PFASs 的前处理方法比较
Table 5 Comparison of pretreatment methods for PFASs in serum samples

Pretreatment method	Numbers of PFASs	Sample dosage/ μL	Pretreatment time/h	Organic reagent dosage/ mL	LOD/ (ng/mL)	LOQ/ (ng/mL)	Recovery/%	Ref.
LLE	24	500	2.5	1400	0.01–0.25	0.03–0.75	64.0–124.0	[25]
Acetonitrile precipitation	46	50	0.4	10	–	0.10–1	68.9–115.7	[29]
Oasis HLB SPE	33	100	1.5	332	0.002–0.016	0.006–0.051	80.1–116.0	[30]
Oasis WAX SPE	12	500	1.5	1575	0.01–0.02	0.03–0.07	76.0–110.2	[23]
HMR-Lipid SPE	26	50	0.5	39	0.01–0.15	0.02–0.47	80.1–119.5	this study

–: not given.

表 6 人体血清样本中 PFASs 的测定结果 ($n=25$)
Table 6 Determination results of PFASs in human serum samples ($n=25$)

Compound	Arithmetic mean (SD)	Geometric mean	Minimum	25th	50th	75th	Maximum	Detection rate/%
PFOA	7.67 (1.31)	7.56	5.96	6.35	7.98	8.83	9.61	100
PFOS	5.46 (2.59)	4.80	2.54	2.69	6.86	7.78	8.76	100
PFHxS	0.95 (0.40)	0.87	0.49	0.56	0.94	1.40	1.60	100
PFNA	0.88 (0.27)	0.84	0.55	0.61	0.87	1.14	1.29	100
PFDA	0.66 (0.15)	0.64	0.43	0.51	0.68	0.77	0.91	100
PFBA	0.08(0.01)	0.08	0.07	0.08	0.08	0.09	0.10	100
PFUdA	0.42 (0.07)	0.41	0.33	0.35	0.39	0.47	0.59	100
6:2Cl-PFESA	1.25 (0.53)	1.14	0.66	0.78	1.24	1.73	2.37	100
PFHpS	0.24 (0.12)	0.22	0.11	0.15	0.23	0.30	0.57	100
PFPeA	0.90 (0.12)	0.89	0.64	0.81	0.94	0.99	1.11	100
PFTriDA	0.16 (0.05)	0.15	0.10	0.12	0.15	0.17	0.28	60
6:2FTS	0.28 (0.09)	0.26	0.15	0.18	0.32	0.34	0.40	52
PFPeS	0.22 (0.04)	0.22	0.17	0.18	0.22	0.26	0.27	24

SD: standard deviation.

PFNA、PFDA、PFBA、6:2 Cl-PFESA、PFHpS、PFPeA 和 PFUDA; PFTriDA 的检出率为 60%, 6:2 FTS 检出率为 52%, PFPeS 的检出率为 24%, 其余 13 种 PFASs 未检出。尽管 PFOS 和 PFOA 分别于 2009 年和 2019 年相继在全球范围内被禁用, 但由于它们具有生物蓄积性和较长的半衰期^[31], PFOS (检出平均水平为 5.46 ng/mL) 和 PFOA (检出平均水平为 7.67 ng/mL) 仍是人体血清中检出率和检出水平最高的 PFASs。Wen 等^[32]对美国成年人血清中 PFASs 的检测结果显示, PFOS 和 PFOA 是暴露水平最高的 PFASs。此外, 6:2 Cl-PFESA 是除 PFOS 和 PFOA 以外人体中暴露水平最高的 PFASs 污染物, 其平均暴露水平达到 1.25 ng/mL。目前, PFASs 对人类健康的风险已成为学术研究热点, 然而对于新型 PFASs 的环境存在、人体暴露及健康风险, 我们仍缺乏足够的认识。本研究所建方法可为人体污染物暴露与健康风险评估提供可靠的检测技术支持。

3 结论

本研究将高通量的 HMR-Lipid 96 孔固相萃取板与 LC-MS/MS 技术结合, 建立了一种可同时测定人体血清中 26 种 PFASs 的方法。该方法具有操作简便、快速的特点, 同时具备高灵敏度、良好的准确度与精密度, 可应用于大批量实际血清样品的检测, 能为全面评估人体内新型 PFASs 的暴露情况与健康风险提供方法学支持。

参考文献:

- [1] Zheng J, Liu S, Yang J J, et al. *Sci Total Environ*, 2024, 953: 176158
- [2] Evich M G, Davis M J B, McCord J P, et al. *Science*, 2022, 375(6580): eabg9065
- [3] Meegoda J N, Kewalramani J A, Li B, et al. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(21): 8117
- [4] Xing Y N, Li Z, Wang J H, et al. *Environ Int*, 2024, 184: 108459
- [5] Qie M J, Jia X, Li X T, et al. *Sci Total Environ*, 2024, 930: 172766
- [6] Paris-Davila T, Gaines L G T, Lucas K, et al. *Am J Ind Med*, 2023, 66(5): 393
- [7] Li Y, Niu Z G, Zhang Y. *Chemosphere*, 2022, 287 (Pt 4): 132409
- [8] Bolan N, Sarkar B, Vithanage M, et al. *Environ Int*, 2021, 155: 106600
- [9] Wang B, Yao Y M, Wang Y, et al. *Environ Sci Technol*, 2022, 56(10): 6036
- [10] Tsuda S. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(Special): Sp27
- [11] Huang R Q, Jin Z L, Tang R J, et al. *Gazette of the State Council of the People's Republic of China*, 2023(5): 19
黄润秋, 金壮龙, 唐仁健, 等. 中华人民共和国国务院公报, 2023(5): 19
- [12] Zheng X L, Pan Y T, Qu Y L, et al. *Environ Sci Technol*, 2024, 58(29): 12875
- [13] He A N, Li J, Li Z, et al. *Environ Sci Technol*, 2023, 57(43): 16244
- [14] Piva E, Giorgetti A, Ioime P, et al. *Toxicology*, 2021, 458: 152849
- [15] Groisman L, Berman T, Quinn A, et al. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 262: 115165
- [16] Cui Q Q, Pan Y T, Wang J H, et al. *Environ Pollut*, 2020, 266(Pt 2): 115330
- [17] Zheng G, Schreder E, Dempsey J C, et al. *Environ Sci Technol*, 2021, 55(11): 7510
- [18] Christensen K Y, Raymond M, Meiman J. *Int J Hyg Environ Health*, 2019, 222(1): 147
- [19] Zhou Y H, Li Q, Wang P P, et al. *Environ Int*, 2023, 173: 107850
- [20] Song X F, Tang S Y, Zhu H M, et al. *Environ Int*, 2018, 113: 50
- [21] Dou Q, Bai Y N, Li Y J, et al. *Environ Res*, 2024, 262(Pt 2): 119909
- [22] Xie L N, Zhang H J, Hou S S, et al. *Journal of Environmental Hygiene*, 2019, 9(5): 494
谢琳娜, 张海婧, 侯沙沙, 等. 环境卫生学杂志, 2019, 9(5): 494
- [23] Yang M, Zhao X, Huang X Y, et al. *Modern Preventive Medicine*, 2022, 49(10): 1867
杨冕, 赵璇, 黄馨仪, 等. 现代预防医学, 2022, 49(10): 1867
- [24] Liu L P, Yan P X, Liu X, et al. *J Hazard Mater*, 2024, 466: 133501
- [25] Liu L P, Yan P X, Lv J F, et al. *J Chromatogr B*, 2022, 1207: 123365
- [26] Yu C H, Patel B, Palencia M, et al. *J Chromatogr A*, 2017, 1480: 1
- [27] Kaiser A M, Aro R, Kärrman A, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(3): 865
- [28] Liu L P, She J W, Zhang X Q, et al. *J Sep Sci*, 2015, 38(2): 247
- [29] Gao X Y, Wang Y X, Chen D W, et al. *J Chromatogr B*, 2022, 1212: 123484
- [30] Ao Y, Nian M, Tang W F, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415(3): 457
- [31] Shi W S, Zhang Z L, Li M, et al. *Environ Res*, 2024, 250: 118485
- [32] Wen X, Wang M, Xu X W, et al. *Environ Health Perspect*, 2022, 130(6): 67007