

# 采用三重串联四极杆液质联用仪应对痕量全氟辛酸（PFOA）和全氟辛烷磺酸盐（PFOS）分析的挑战

## 应用

食品，环境

### 作者

Robert D. Voyksner  
LCMS Limited  
PO Box 27228  
Raleigh, NC 27611-7228  
美国

Chin-Kai Meng  
Agilent Technologies  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808  
美国

### 摘要

针对在复杂基质中很难实现的痕量全氟辛酸（PFOA）和全氟辛烷磺酸盐（PFOS）的定量分析，建立了一种液相色谱-串联质谱（LC/MS/MS）分析方法。该技术使用同位素标记的分析物实现精确定量分析（柱上量 0.4-400 pg）。重要的是，应认识到如果使用直链样品作为标准品进行校准，真实样品（支链和直链异构体的混合物）的定量分析结果将偏离至少 40%。

### 前言

全氟辛酸（PFOA）是一种工业表面活性剂，也是制造含氟聚合物时必需的一种加工助剂 [1]。含氟聚合物具有许多有价值的特性，包括耐火性和防止油类、污渍、油脂，以及水的吸

附全氟辛酸的一个主要用途是用于聚四氟乙烯（PTFE）的加工，它更广泛地被称为特氟隆®。全氟辛酸还是一些加工过程的副产物，如加工直接和间接接触食品的包装（例如微波爆米花袋、松饼或炸薯条袋、比萨包装盒衬垫、汉堡包盒和三明治包装等），以及具有防水和抗污功能的衣物制造。

全氟辛烷磺酸盐（PFOS）常以钠盐和钾盐的形式存在，统称为全氟辛烷磺酸盐。见图 1。

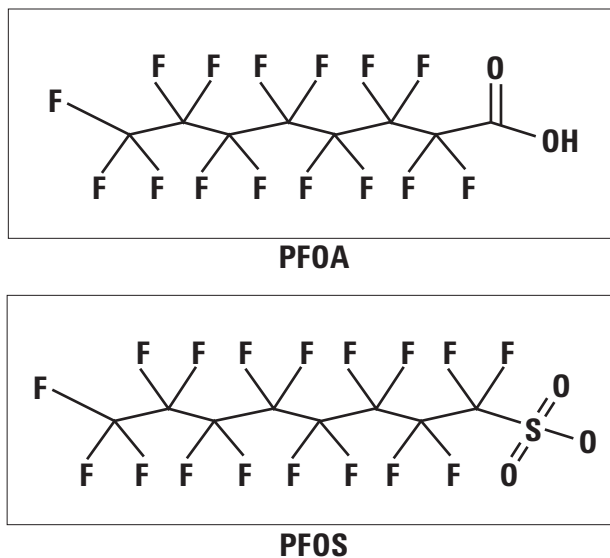


图 1. 全氟辛酸（PFOA）和全氟辛烷磺酸盐（PFOS）的化学结构。注意两者均含有 C8 链



## 全氟辛酸 (PFOA) 和全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 的分析方法

- 由于在复杂基质分析中具有高检测灵敏度和高专属性，所以液相色谱-串联质谱是首选的检测方法
- 采用多反应监测 (MRM) 模式进行定量分析，使用两个或更多子离子进行确证
- 检测限通常在 1-100 pg/mL (ppt) 范围，要求高灵敏度检测
- 在线或离线固相萃取 (SPE) 和富集技术对于实现低浓度水平 (1 pg/mL) 的检测是必要的

## 全氟辛酸 (PFOA) 和全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 检测

### 问题 1: 当采用直链标准品进行定量分析时, 应使用哪种 transitions 来获得最高的准确度?

虽然全氟辛酸 (PFOA) 和全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 的定量分析一般采用直链标准品, 但是在实际样品中除了含有直链异构体外, 还同时含有一系列支链异构体。这些异构体的比例随其在生物降解和工业加工过程中生成状态的不同而不同; 因此, 不太可能构造出一个与实际样品组成相似的标准品。MRM transitions 的相对强度也会随着支链异构体分支状况不同而不同, 这就使一些 transitions 的使用优于其它 transitions。异构体分支状况影响离子化效率和 CID 能量; 因此, 它会影响分析测定的准确度 [2]。

### 问题 2: 能够在基质中使用同位素标记的标准品来测定非标记的全氟辛酸 (PFOA) 和全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 吗?

大多数生物和环境样品基质都含有一定水平的全氟辛酸 (PFOA) 和全氟辛烷磺酸盐 (PFOS); 即使使用基质匹配的校准物也可以获得满意的结果, 提高准确度。添加标准品可以解决这个问题, 但这需要在分析中增加进样次数。样品基质可能含有不同强度的背景响应。添加标准品的方法并不适用于分析不同基质类型的样品。溶剂校准并不能校正基质效应。

## 实验部分

### 样品制备

- 所有溶剂标准品均使用甲醇制备

- 通过乙腈沉淀和离心制备血浆提取物, 取上层液用已知浓度的全氟辛酸 (PFOA) 或全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 溶液进行加标处理

### 液相色谱

- Agilent 1200 Rapid Resolution 液相色谱系统
- ZORBAX Eclipse Plus C18 快速分离高通量色谱柱 2.1 cm × 50 mm, 1.8- $\mu$ m 填料 (部件号 959741-902)
- 进样量为 20  $\mu$ L, 流速为 0.4 mL/min
- 10 min 内流动相 B 从 0% 升到 100%, A = 2 mM 乙酸铵水溶液; B = 甲醇

### 串联质谱

- 安捷伦三重串联四极杆质谱
- 负离子检测
- 毛细管电压为 3500 V, 干燥气流速为 9.5 L/min, 温度为 350 °C, 雾化器压力为 45 psi
- 碎裂电压、碰撞能量 (CE) 和 transitions 依实验情况而定

### 多反应监测 (MRM)

图 2 展示了一个在仪器内假设的离子 transitions 谱图特征序列之上的 Agilent 6410 QQQ 质谱仪剖面图。

离子源产生的离子显示在图的最左端。然后从这个离子混合物中选择目标母离子, 并通过作为质量过滤器的 Q1 四极杆分离。这类似于选择离子监测 (SIM)。通过 Q1 之后, 在碰撞池 (Q2, 尽管不是一个四极杆) 产生具有母离子专属结构特征的碎片离子。通过使用 Q3 四极杆, 这些碎片离子被筛选并被检测器测量。这是碰撞诱导裂解 (CID) 的选择形式, 称做串联质谱。针对碰撞池中存在的特定碎片离子, 通过设定 Q3, 可以从分析信号中去除几乎全部的化学或者背景噪音, 显著提高了信噪比。离子 210 为母离子, 而离子 158 和 191 为子离子。每一个 transitions (210→191 或 210→158) 都是对于特定目标物的反应。通常, QQQ 用于检测多种分析物或者质量 transitions, 因此被称为 MRM。离子 158 可被认为是定量离子, 因为它具有最大的响应强度, 而通过使用

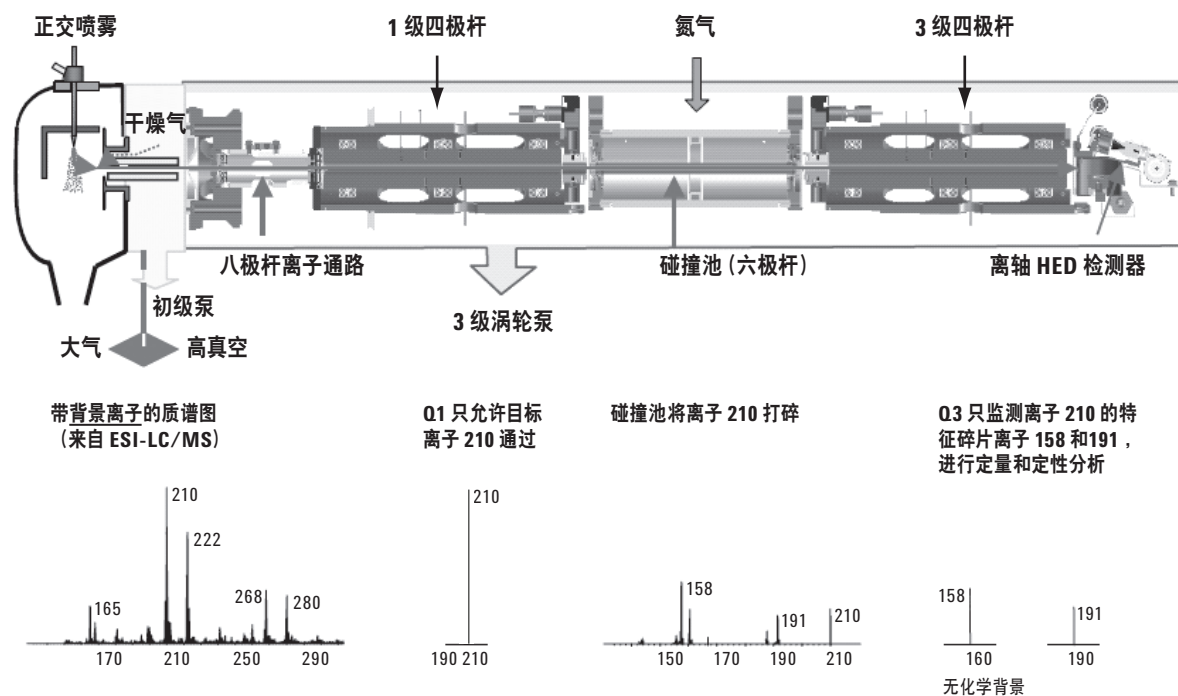


图 2. 仪器内假设样品的离子转换质谱图特征序列之上的 Agilent 6410 QQQ 质谱仪剖面图 (无 PFOA 或 PFOS)。注意最后的质谱图非常干净, 只包含所需的离子。(HED = 高能打拿极电子倍增器)

191 定性离子与 158 定量离子峰面积的比可作为确证判定标准, 来确证离子 191。通过使用 MRM, 大多数化学噪音在 Q1 中被消除, 并在 Q3 中被进一步消除, 从而可以使我们实现 ppt 级的检测。

碎裂电压是玻璃毛细管出口端的电压, 那里的气压约为 1 mTorr。需要对碎裂电压和碰撞能量进行优化。若碎裂电压太小, 将无法有足够的力量推动离子通过气体。若碎裂电压太大, 在真空中会导致母离子于分析前发生 CID, 从而降低检测灵敏度。最终的电压大小取决于化合物性质、质量数和所带电荷数, 因此电压需要优化以获得最高的检测灵敏度。碰撞池中的 CE 也需要优化, 以生成每种目标化合物最高强度的代表性子离子。碰撞池电压取决于化合物的键合强度、分子量, 以及离子形成的途径 (直接从母离子生成, 或者通过一系列中间过程生成)。通常每种子离子都会有最优的碰撞能量, 从而获得最高的信号丰度。

要求实验操作达到最优的条件, 一系列实验示例见图 3-5。

两化合物全氟辛酸 (PFOA) ( $m/z$  413) 和全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) ( $m/z$  499) 的  $[M-H]^-$  离子碎裂电压的优化见图 3。

请注意在全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 最佳的碎裂电压条件下 (200 V), 全氟辛酸 (PFOA) 几乎检测不到信号。离子 413 和 499 被称做母离子。PFOA 相对易碎裂, 它的母离子信号强度在 160 V 时即会下降。全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 比全氟辛酸 (PFOA) 较难碎裂, 它的最佳碎裂电压是 200 V。

通过实验可以确定子离子  $m/z$  369  $[M-CO_2H]^-$  和  $m/z$  169  $[C_3F_7]^-$  合适的碰撞能量, 并用于全氟辛酸 (PFOA) 的定量分析。见图 4。

任何情况下, 我们选择在分析中可获得每种离子最高强度峰的碰撞能量。全氟辛酸 (PFOA) 仅需要很小的碰撞能量即可碎裂产生离子  $m/z$  369 (6 V 时可获得最高强度)。

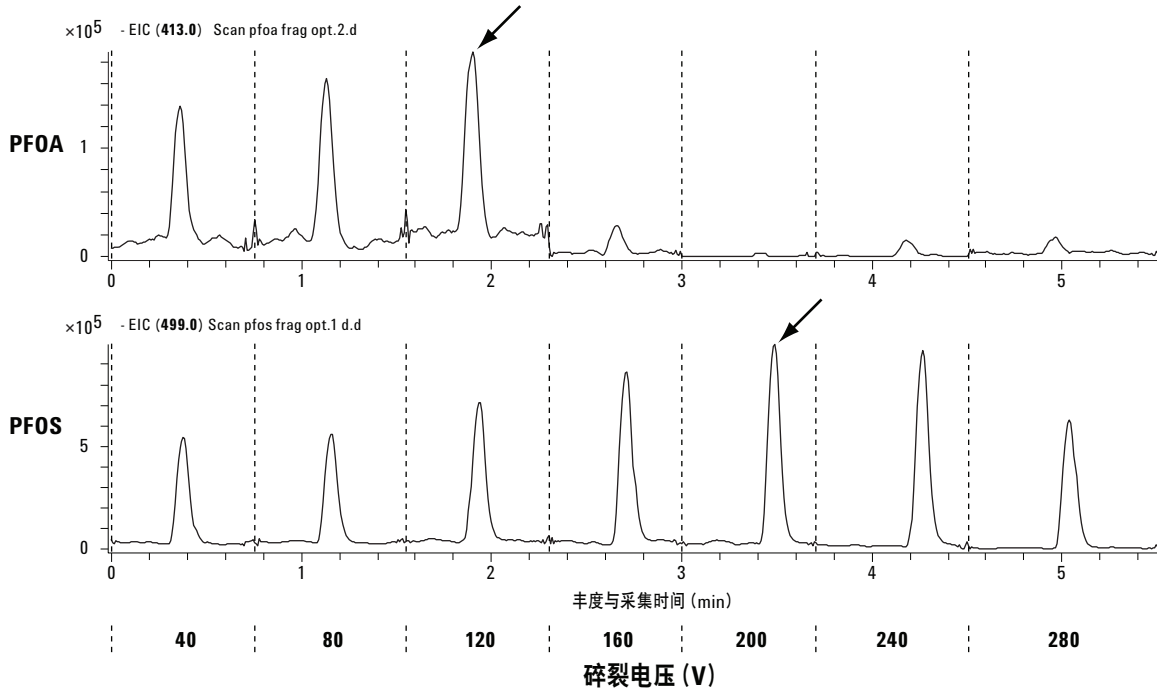


图 3. 通过对系列信号强度与施加电压作图，确定最佳的碎裂电压

为获得  $m/z$  169 时最高的离子强度，碰撞能量需设为 16 V。

使用 QQQ 软件可以非常快速地转换碰撞能量。所以在方法优化中，可以为每个离子的 transition 选择最佳碰撞电压。

全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 的子离子  $m/z$  169、99 和 80 也以相同的方式通过实验测得并用于其定量分析。三个离子 transitions 的最佳碰撞能量分别是 45 V、50 V 和 70 V。见图 5。

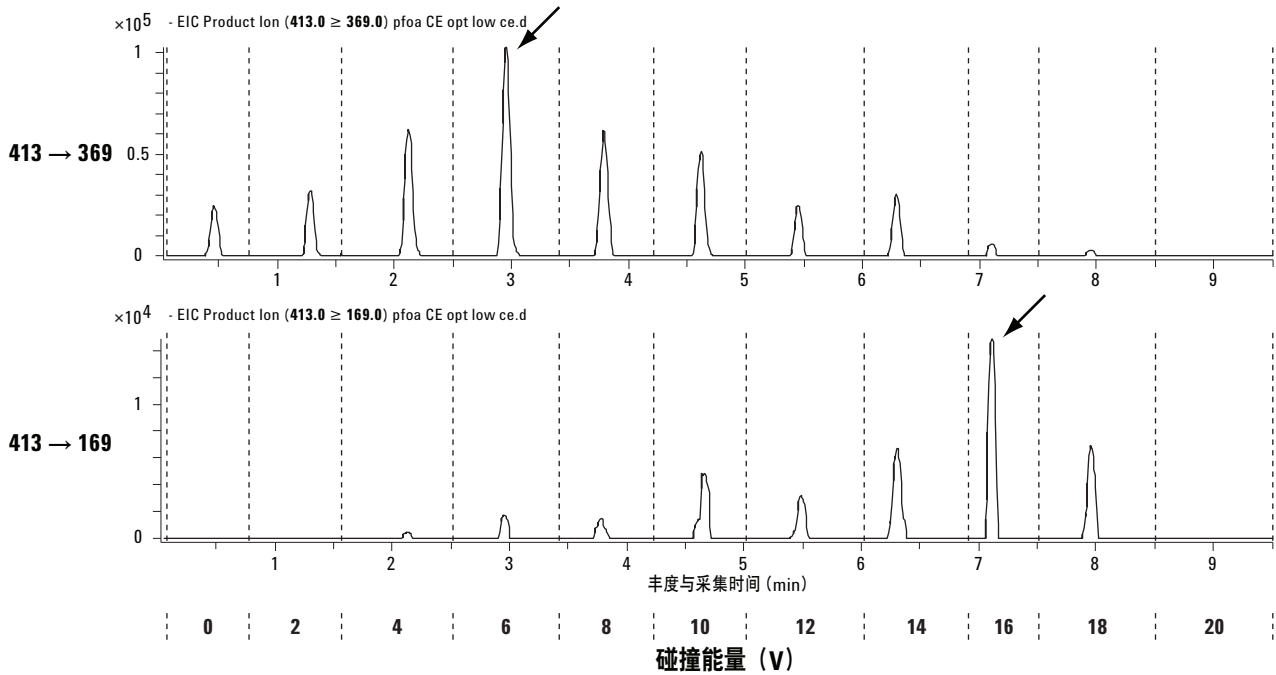


图 4. 信号强度表征全氟辛酸 (PFOA) 子离子  $m/z$  369  $[M-CO_2H]^-$  和  $m/z$  169  $[C_3F_7]^+$  的碰撞能量

值得注意的是，全氟辛酸（PFOA）（6-16 V）与全氟辛烷磺酸盐（PFOS）（45-70 V）两者间的碰撞能量差异很大。从碎裂电压的优化可以看出，与全氟辛烷磺酸盐（PFOS）相比，全氟辛酸（PFOA）相对来说更易碎，其最佳碎裂电压分别为 120 V 和 200 V。CE 也在这方面有所加强。

用于定量分析全氟辛酸（PFOA）和全氟辛烷磺酸盐（PFOS）的特定子离子的校准曲线见图 6。分析人员也可以利用这些 MRM transitions 的强度加合来获得校准曲线。

这五个 transitions 的线性相关系数大于 0.998，在三个数量级范围内可实现良好的定量分析。请注意最低的柱上量是 0.4 pg。

**关于问题 1：当采用直链标准品进行定量分析时，应使用哪种 transitions 来获得最高的准确度？**

可以利用图 7-9 来加以说明。

图 7 展示了全氟辛酸（PFOA）和全氟辛烷磺酸盐（PFOS）的直链标准品和包含支链异构体样品（10 min 的梯度洗脱）的代表性 transitions 的色谱图。

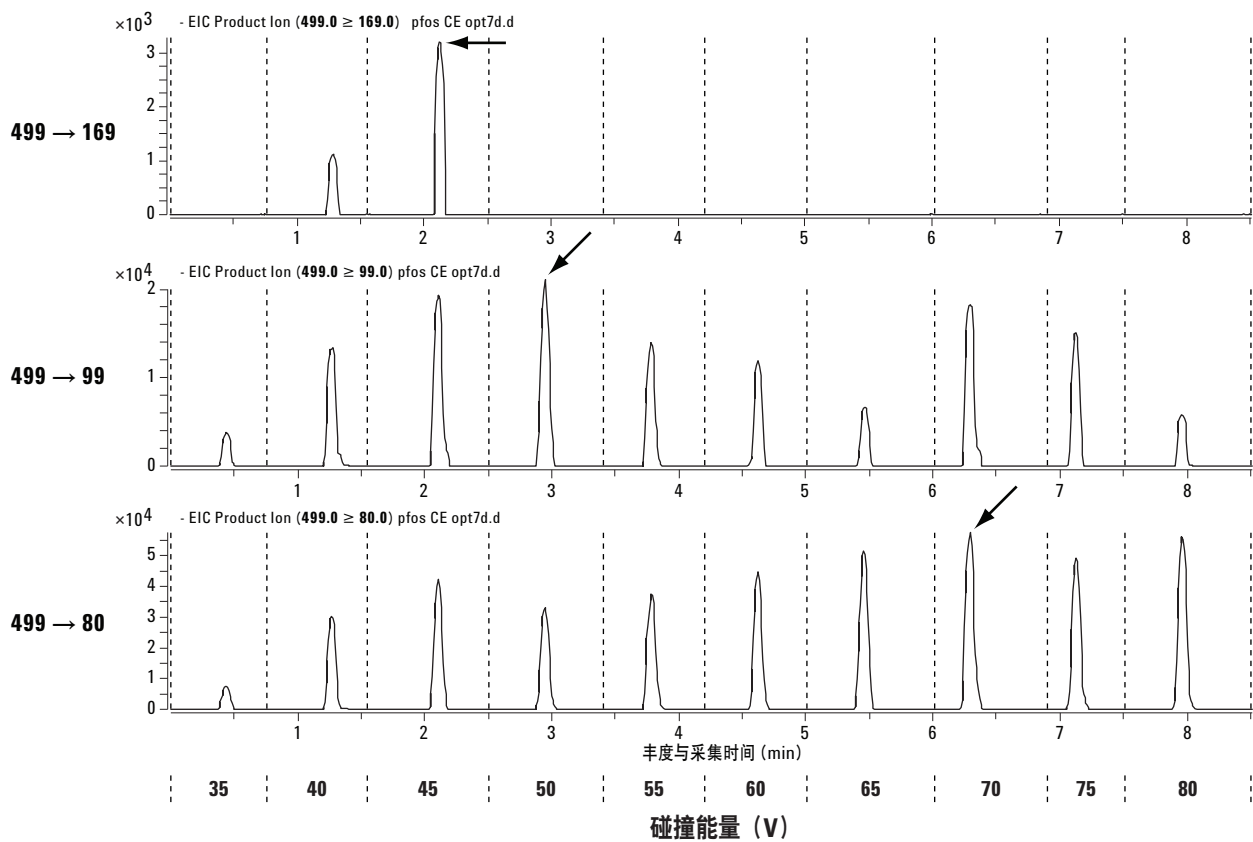
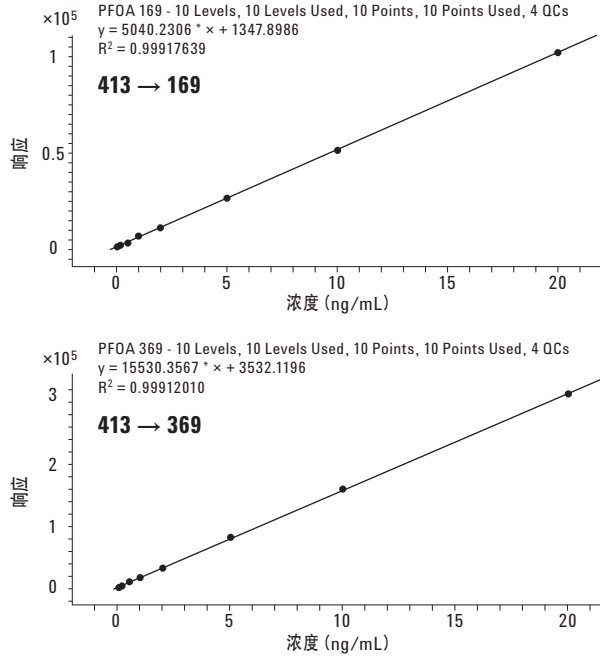
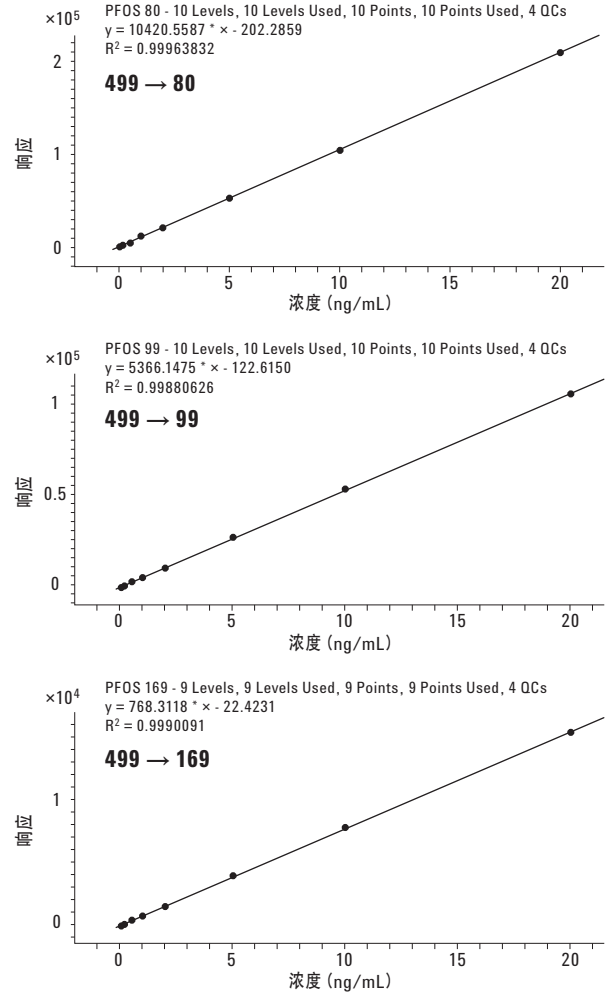


图 5. 信号强度表征 PFOS 子离子  $m/z$  169、99 和 80 的碰撞能量

## PFOA



## PFOS



浓度范围 0.02-20 ng/mL (柱上进样量 0.4-400 pg)

图 6. 用于测定 PFOA 和 PFOS 的子离子的校准曲线

由于实际样品是在制造过程、新陈代谢和降解过程中产生的，所以应该通过支链异构体来检测。图 7 顶部的色谱图仅显示了标准品的直链化合物。底部色谱图显示的是一个来自环境中的实际样品。在色谱图中能看出来自支链异构体的附加峰（肩峰）。

可在图 8 中更详细地检查这些峰。

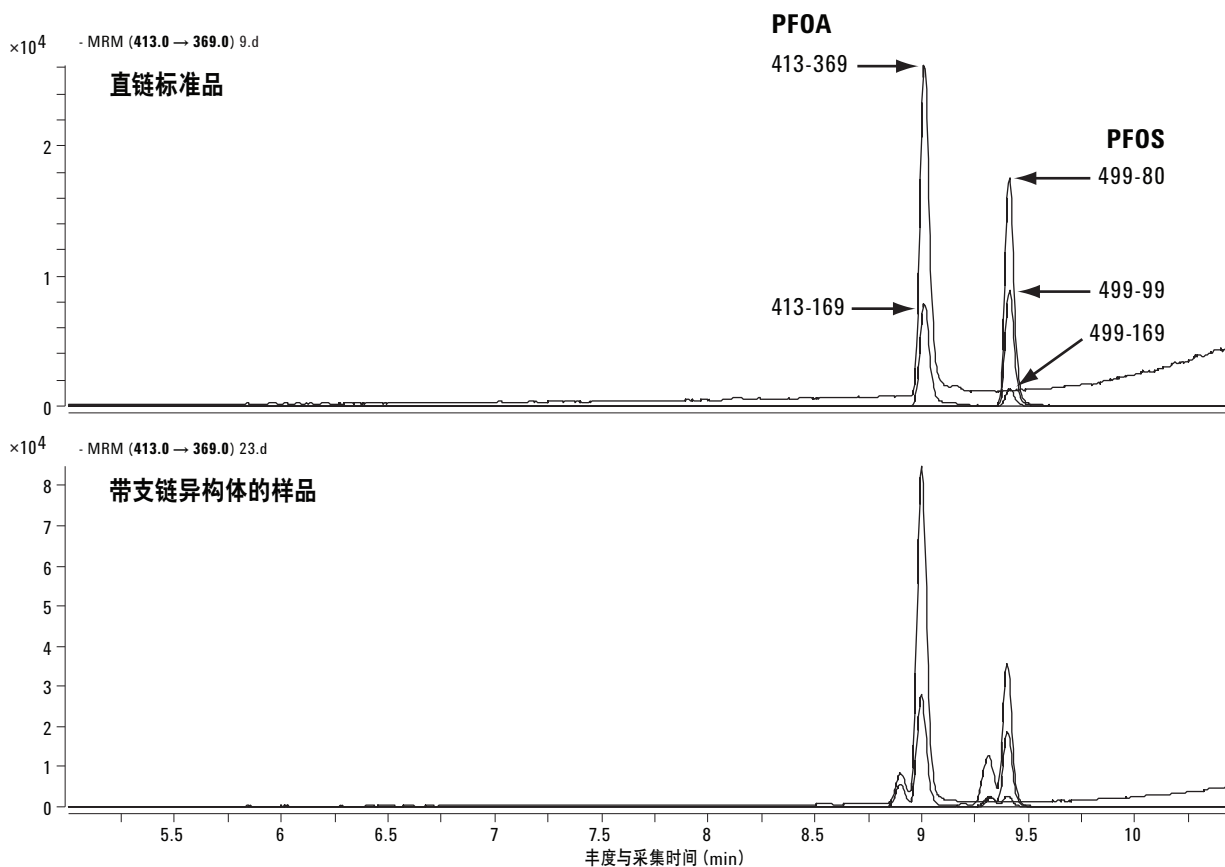


图 7. PFOA 和 PFOS 的直链和支链样品的 MRM 色谱图

每个 MRM transitions 的相对丰度大小取决于化合物的分支位置和特定质量 transitions。图 8 展示了一个 10 min 的运行分析。直链和支链异构体可以实现色谱分离。支链样品是一个典型的带有甲基侧链的 C7 链（异辛基异构体）。分析

中最有趣的是，支链化合物的离子比例与直链化合物的非常不同 [3,4,5]。对于直链全氟辛酸（PFOA），离子  $m/z$  169 大约是离子 369 的 30%-40%，而支链异构体的这个比例是 90%-100%。

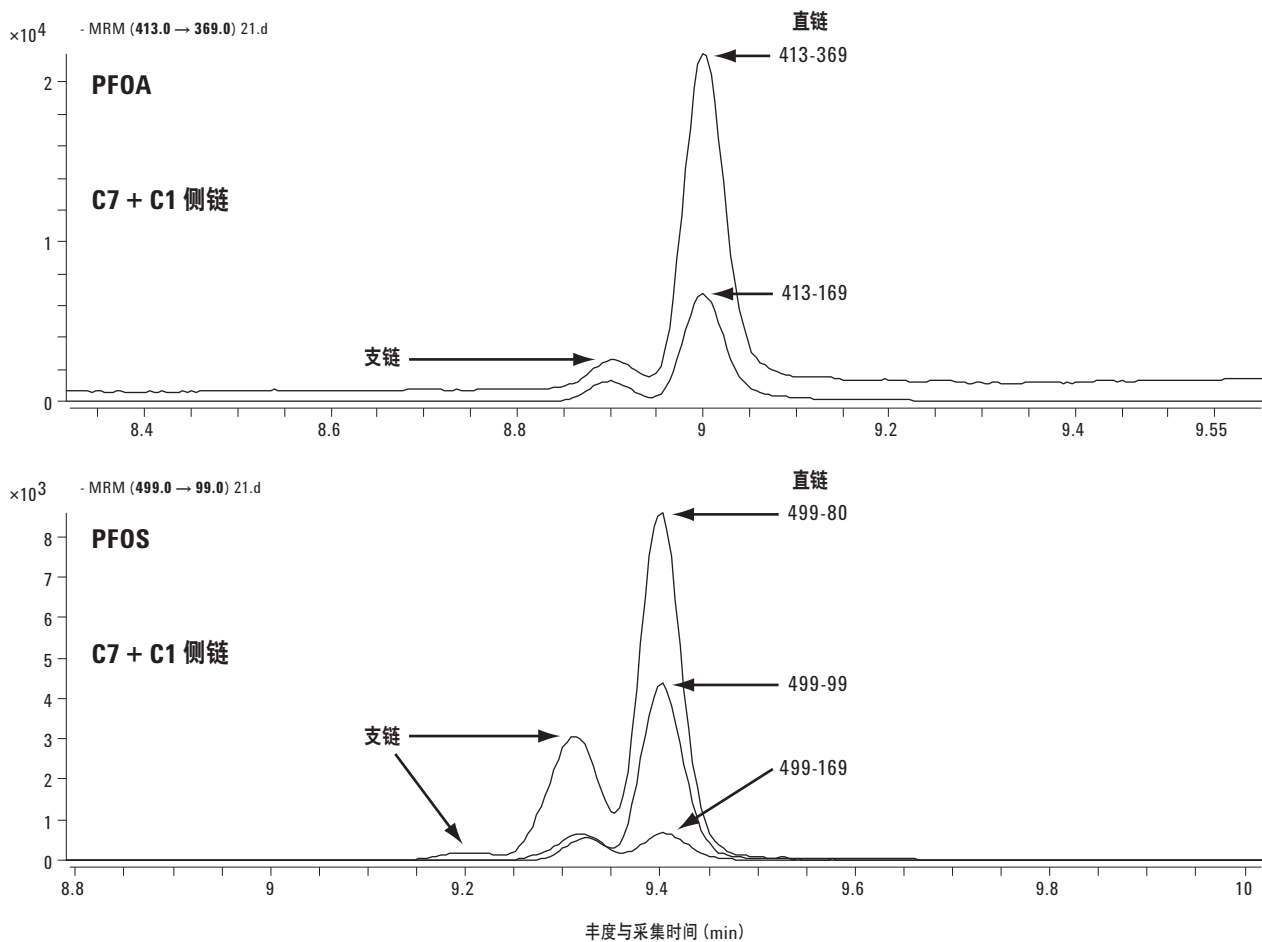


图 8. PFOA 和 PFOS 直链和支链样品的 MRM 色谱图

分析中的另一个变量是梯度洗脱时间。图 9 比较了 3 min 与 10 min 梯度洗脱的效果。

在快速洗脱的情况下（右图），分支异构体（虚线）没有与直链异构体（实线）分离，导致测量值出现显著误差（PFOS 最为明显）。

左边的两张色谱图与图 8 中的相同。它们在这儿用来与右图未分离的分析物（3 min 的运行分析）进行比较。虽然希望能够减少分析时间，但支链和直链异构体必须实现分离以获得准确的定量结果。

两个样品浓度相同。一个样品是纯粹的直链异构体，而另一个则混有支链异构体。假如其 MRM 响应（离子比例）相同，即使这些异构体未分开，它们也可以获得相同的结果。但实例显示，当这些异构体未分开时，其响应不同。如果分别加入同一样品带侧链的分析物和直链分析物的响应，每个离子 transitions 的响应面积则与纯直链分析物的不同，如右侧两张色谱图所示，全氟辛烷磺酸盐（PFOS）最明显。假如使用直链样品作为标准品进行校准，真实样品（支链和直链异构体的混合物）的定量分析结果将偏离至少 40%（见表 1）。定量分析将会失败。

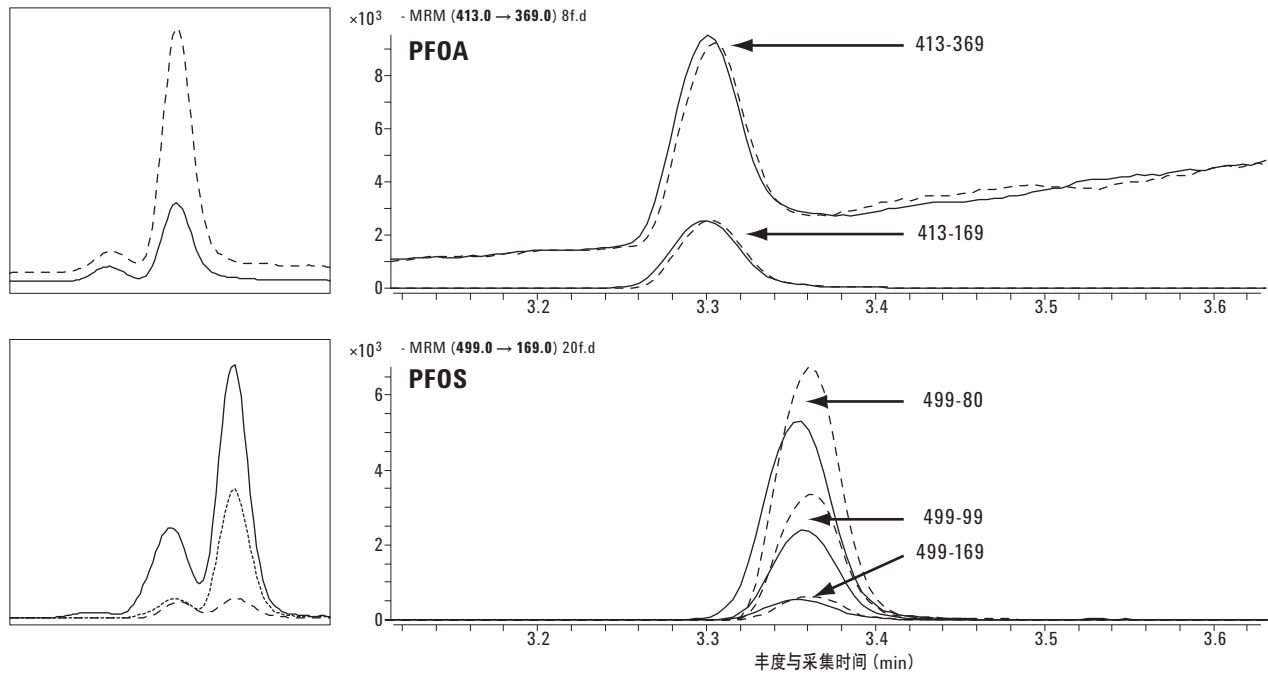


图 9. 对分别采用 10 min 和 3 min 梯度洗脱得到的 PFOA 和 PFOS MRM 色谱图进行对比。右图为运行 3 min 时梯度洗脱的色谱图

与每个 MRM transition 的直链标准品相比，含支链样品的总 PFOA 和 PFOS 测量准确度（非离子比例）的影响见表 1。

表 1. 测量准确度（目标物为 100%）与化合物、transition 及运行时间的关系

化合物	MRM transition	百分比响应 (n = 8)	
		运行 10 min	运行 3 min
PFOA	413→369	105.9	108.2
	413→169	96.4	89.4
PFOS	499→169	102.5	112.2
	499→99	75.0	73.3
	499→80	59.3	61.1

最佳的 MRM 离子用粗体表示。最佳的 PFOA 分析结果可通过两个 MRM 离子的响应平均值获得

离子比例不合适会导致定量失败。对于全氟辛酸（PFOA），运行 3 min 抑或 10 min 影响不大：离子 369 transition 的响应总是较高，而离子 169 transition 的响应总是较低。运行 3 min 的分析误差较大。PFOS 分析的偏差更大。在文献中，PFOS 分析监测了离子 80 transition，但它的结果偏差很大，可低至 60%，见表 1。499→169 是用于定量分析的理想 transition。它非常准确，但与 499→80 相比，其检测灵敏度较低。

**关于问题 2：能够在基质中使用同位素标记的标准品来测量非标记的全氟辛烷磺酸盐（PFOS）和全氟辛酸（PFOA）吗？**

可以利用图 10-12 来说明。

关于不同基质对信号响应的影响见图 10。较高的曲线反映了甲醇中全氟辛酸（PFOA）的响应。当相同量的全氟辛酸（PFOA）加到血浆提取物中后，响应出现下降。

基质效应（通常采用电喷雾离子化）会导致信号抑制或增强；因此，为实现准确的定量分析，需要采用基质匹配的标准品进行校准。由于全氟辛烷磺酸盐（PFOS）和全氟辛酸（PFOA）基质背景水平不同，无法使用基质匹配的标准品进行校准并定量分析所研究样品中全氟辛烷磺酸盐（PFOS）或全氟辛酸（PFOA）的浓度。而且，添加标准品的方法对于含不同水平目标分析物的多种基质来说也不实用。

为了实现实用性，考察了采用同位素标记的基质匹配的标准品测量全氟辛酸（PFOA）的方法。结果见图 11 和 12。

图 11 表明，同位素标记的标准品可在 0.02-20 ng/mL（柱上量 0.4-400 pg）定量范围内得到良好的线性校准曲线。并且得到优异的线性相关系数（ $\geq 0.9994$ ）。

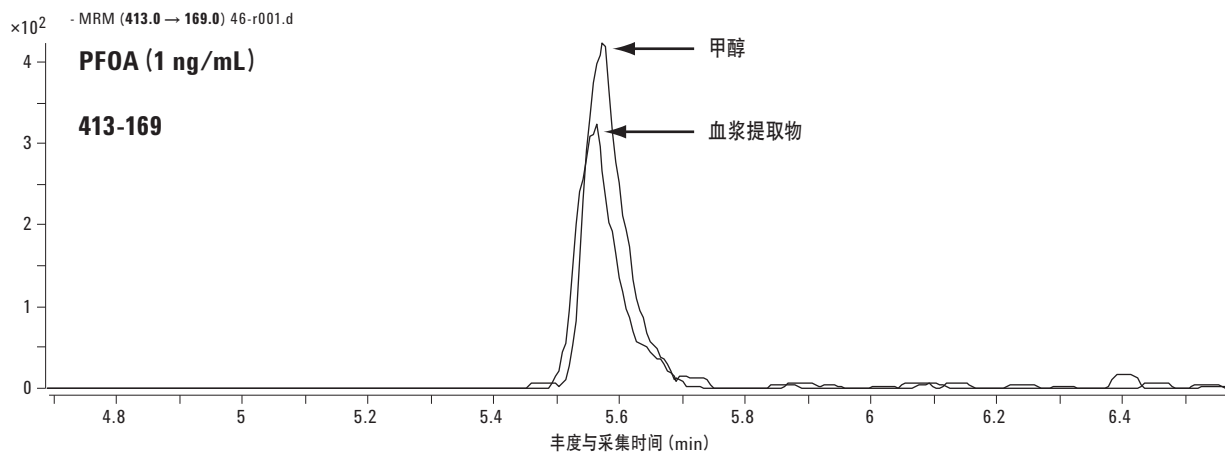
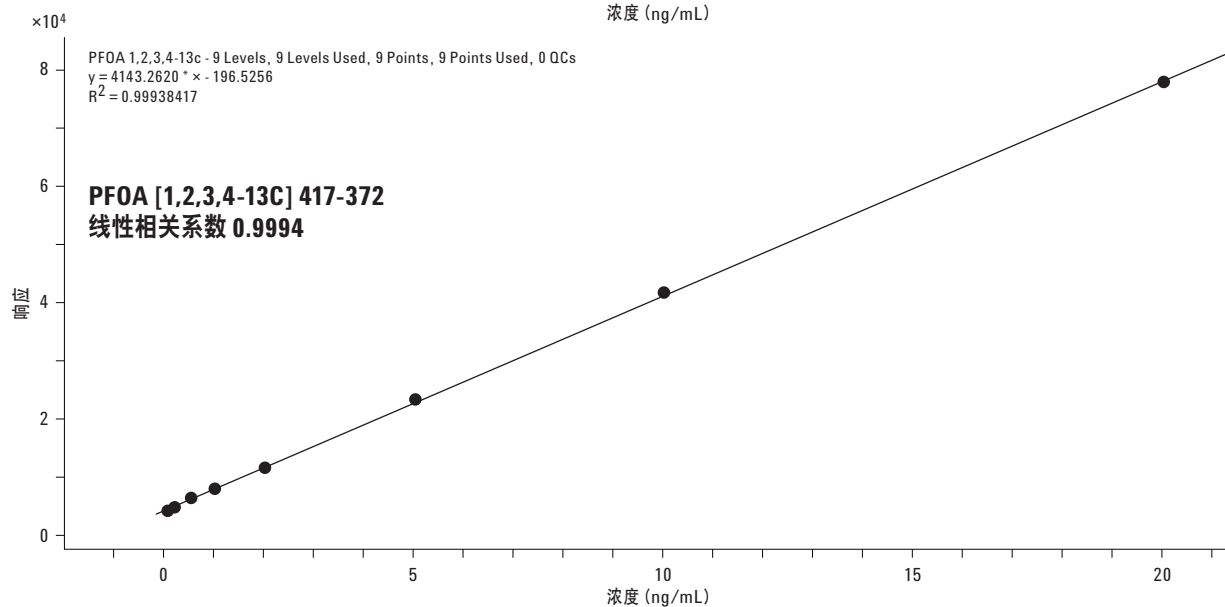
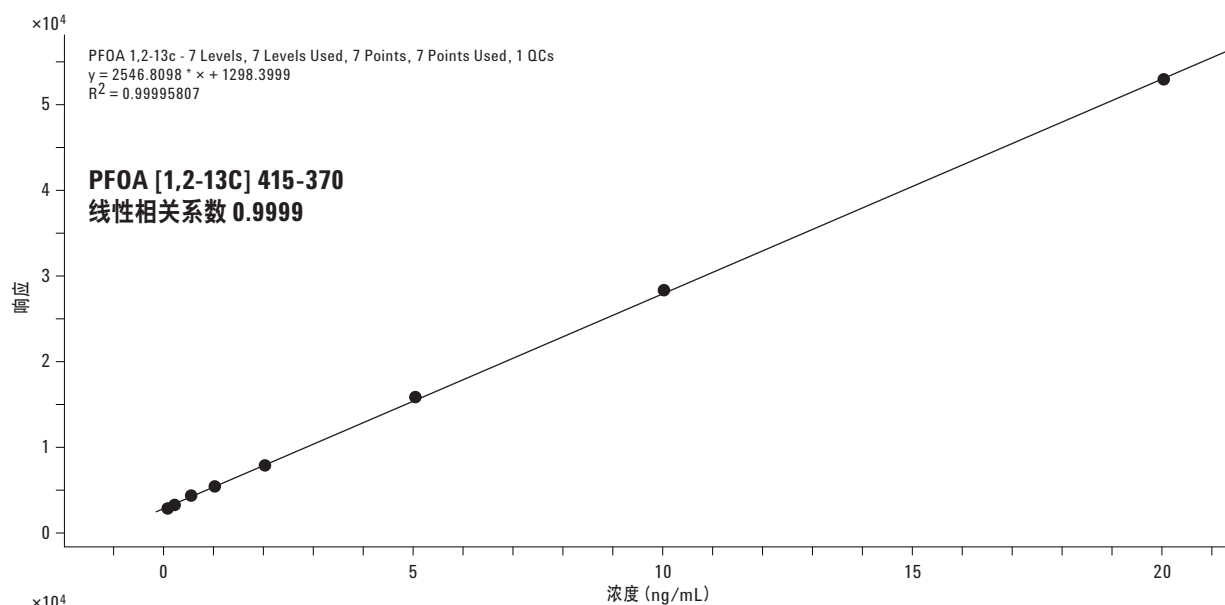


图 10. 相同浓度下, PFOA 在甲醇和血浆提取物中的响应



0.02-20 ng/mL 范围的血浆基质校准曲线

图 11. 采用两种不同的同位素标记校准标准品实现的 PFOA 的线性相关性

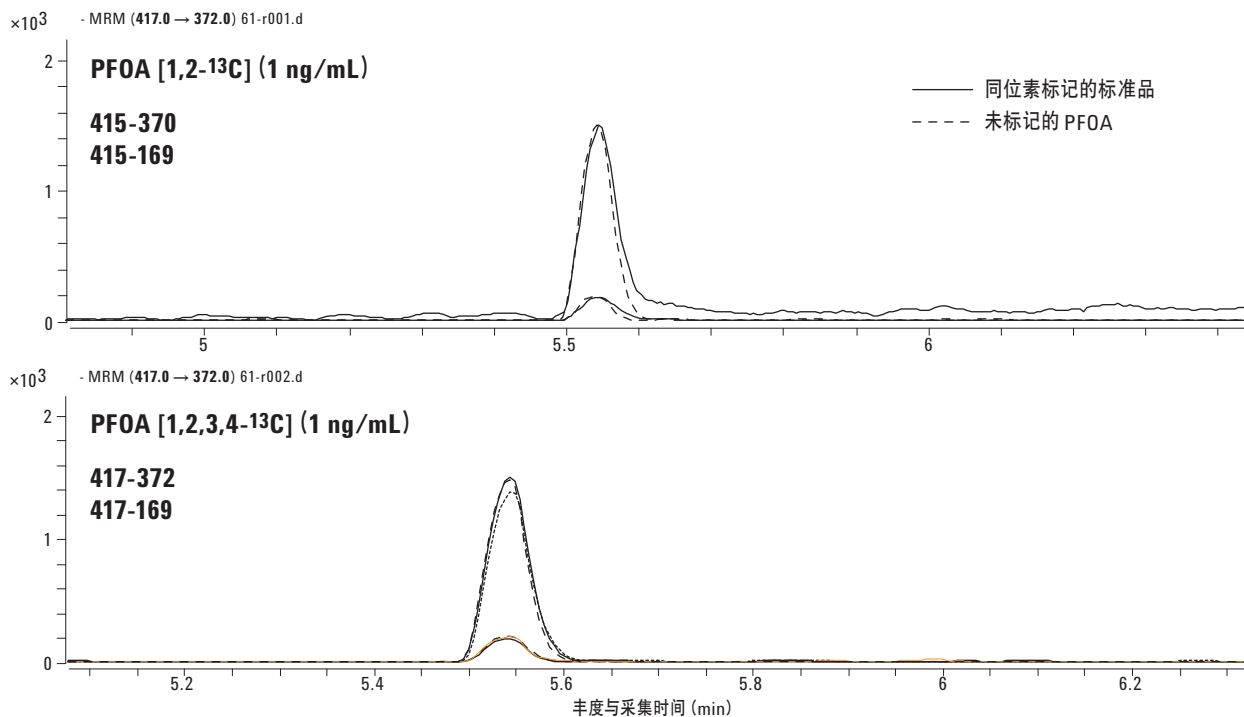


图 12. 两种同位素标记的 PFOA 化合物与未标记的 PFOA 具有良好的相关性。标记和未标记的 PFOA 使用了相同的 transitions

表 2. 测定血浆中的 PFOA 时不同基质匹配的校准效果比较

校准标准品	校准用基质	血浆样品响应 (标准偏差)
1 PFOA	MeOH	71 (± 33%)
2 PFOA [1,2- <sup>13</sup> C]	Plasma	100.4 (± 3.1%)
3 PFOA [1,2,3,4- <sup>13</sup> C]	Plasma	97.3 (± 5.1%)

采用同位素标记的 PFOA 进行基质匹配校准效果良好

第 1 行数据中，校准标准品采用甲醇作为溶剂，由于基质抑制效应，血浆样品仅显示了 71% 的响应。因此，我们不能使用甲醇溶解的校准标准品来定量分析含基质的样品，因为偏差达到将近 30%。第 2 和第 3 行数据表明，如果在基质中使用同位素标记的化合物进行校准，实际血浆样品就可以得到准确的分析结果：100% 和 97%。

## 结论

- 安捷伦三重串联四极杆液质联用仪 (LC/QQQ) 是定量分析复杂基质中痕量目标化合物的理想仪器
- 用于分析的最佳 transitions 需要通过实验确定
- 碎裂电压和碰撞能量需要通过实验确定和优化
- 在 QQQ 中使用 MRM 可以获得复杂基质样品分析中最低的检测限
- 如果不进行校正, 支链 PFOA/PFOS 可使定量准确度偏离 40%
- 基质抑制效应可导致定量分析结果的准确度下降 30%。使用同位素标记的分析物能够准确定量基质中不同背景水平的全氟辛酸 (PFOA) /全氟辛烷磺酸盐 (PFOS), 效果良好

## 参考文献

1. Perfluorooctanoic Acid (PFOA), USEPA, <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/>
2. T. J. Wallington, M. D. Hurley, J. Xia, D. J. Wuebbles, S. Sillman, A. Ito, J. E. Penner, D. A. Ellis, J. Martin, S. A. Mabury, O. J. Nielsen, and M. P. Sulbaek Andersen, "Formation of C<sub>7</sub>F<sub>15</sub>COOH (PFOA) and Other Perfluorocarboxylic Acids During the Atmospheric Oxidation of 8:2 Fluorotelomer Alcohol," *Environ. Sci. Technol.*, 40 (3), 924–930, 2006

3. Jonathan P. Benskin, Mahmoud Bataineh, and Jonathan W. Martin, "Simultaneous Characterization of Perfluoroalkyl Carboxylate, Sulfonate, and Sulfonamide Isomers by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, 79 (17), 6455–6464, 2007
4. I. Langlois and M. Oehme, "Structural identification of isomers present in technical perfluorooctane sulfonate by tandem mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 844–850, 2006
5. Amila O. De Silva and Scott A. Mabury, "Isomer Distribution of Perfluorocarboxylates in Human Blood: Potential Correlation to Source," *Environ. Sci. Technol.* 40, 2903–2909, 2006

## 致谢

衷心感谢 3M 公司环境实验室 (圣保罗, 明尼苏达州) 提供的支持和本研究所用的标准品。

## 更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

安捷伦对本资料可能存在的错误, 或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明及技术指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2008

2008 年 4 月 23 日, 中国印刷

5989-7790CHCN

