



# 采用 UHPLC-三重四极杆串联质谱定量分析动物源性食品基质中的 PFOS 和 PFOA\*

## 应用简报

食品

### 作者

Dunming Xu, Shuang Zhou, Yu Zhou,  
厦门出入境检验检疫技术中心, 中国厦门  
361026

Meiling Lu, Shan Zhou, 安捷伦科技全  
球食品市场中国团队, 中国北京 100102

Xiaogang Chu, 中国检验检疫科学研究  
院, 中国北京 100123

### 摘要

采用 Agilent 1290 UHPLC-三重四极杆 6460 串联质谱开发了一个超高灵敏度的、可同时对食物中的全氟辛烷磺酸 (PFOS) 和全氟辛酸 (PFOA) 进行定量分析的方法。样品首先用甲醇提取, 然后用弱阴离子交换小柱进行净化。所得溶液采用反相 UHPLC 进行分离, 并且采用三重四极杆质谱在 MRM 模式下进行检测。PFOA 和 PFOS 的动态线性范围分别为 0.01–10 ng/mL 和 0.1–40 ng/mL, 线性相关回归系数不小于 0.999。PFOA 和 PFOS 的检测限 (LOD) [信噪比 (S/N) = 3] 分别为 0.002 和 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 其定量限 (LOQ) (S/N = 10) 分别为 0.01 和 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。鱼、虾和蛋类基质中三个浓度水平加标的平均回收率在 79.2%–113.1% 范围内, 其相对标准偏差 (RSD) 在 3.2%–10.7% 范围内 (n=6)。实验室间验证进一步确证了方法的准确度和可靠性。所建立的方法具有高灵敏度、高回收率以及良好的选择性等优势。因此, 它可用于动物源性食品中 PFOA 和 PFOS 的常规检验。

\*主要工作已在 2012 年全国有机质谱学术年会上交流。



Agilent Technologies

## 前言

全氟烷基物质 (PFAS) 是一大类高度氟化的脂肪族化合物, 具有高度的热稳定性和化学稳定性, 表面活性高 [1]。在过去几十年里, 它们已广泛应用于工业制造, 如制冷剂、麻醉剂、杀虫剂、除草剂、润滑剂和涂料等。PFAS 耐水解、光解和生物降解, 因此属于持久性有机污染物。工业制造带来的环境污染使 PFOA 和 PFOS 成为在食物链中发现得越来越多的两种主要化合物。它们已在许多基质中被检测到, 如水 [2,3]、沉积物和淤泥 [4]、禽类、鱼类、其它水生生命, 还有蛋清 [5,6] 等。生物积聚使人类暴露在 PFOA 和 PFOS 中的风险越来越大, 甚至在人乳中也已发现这两种化合物的存在 [3]。

对实验动物的研究已经证实, PFAS 会对健康造成多种不良影响, 包括肝脏毒性、发育毒性、神经行为毒性、免疫毒性、生殖毒性、肺脏毒性和激素效应等等 [1]。近来的一项流行病学研究表明, PFAS 暴露的增加与儿童常规免疫接种的体液免疫反应下降有关 [7]。2008 年, EFSA (欧洲食品安全局) 推荐了 PFOS 和 PFOA 的每日耐受摄入量 (TDI) 分别为每千克体重 150 ng 和每千克体重 1500 ng [8]。因此, 开发一个对食品中 PFAS 含量进行常规监测的高灵敏度、高选择性的可靠分析方法就非常重要。

为了测定食品中 PFAS 的含量, 我们已经主要针对环境设置开发了许多方法。我们努力开发了一种具有高灵敏度和准确性的快速参考方法, 用来监测全中国范围内动物源性食品中 PFOS 和 PFOA 的含量。

## 实验部分

### 试剂和材料

PFOA (MW: 414.10) 和 PFOS (MW: 538.22) 购自 AccuStandard 公司 (美国)。图 1 展示了其分子结构。 $^{13}\text{C}_8$ -PFOA 和 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 标准化合物分别购自 Wellington Laboratories 公司 (加拿大安大略省圭尔夫市) 和 Cambridge Isotope Laboratories 公司 (美国)。甲醇、乙酸铵、乙酸和氢氧化铵为 HPLC 级, 购自 Fisher Scientific 公司 (美国新泽西州费尔劳恩)。整个实验中使用 Mill-Q 超纯水。所有其它试剂均为分析级。

取购买的标准品用甲醇制备 PFOA、PFOS、 $^{13}\text{C}_8$ -PFOA 和 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 的储备标准溶液, 终浓度分别为 100.00、100.00、10.00 和 50.00 ng/mL。

取储备标准溶液 (100 ng/mL) 用甲醇稀释制备系列校准溶液, PFOA 的终浓度为 0.010、0.020、0.10、1.00、2.00 和 10.0 ng/mL, PFOS 的终浓度为 0.10、0.20、1.00、10.0、20.0 和 100.0 ng/mL。将  $^{13}\text{C}_8$ -PFOA 和 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 加入上述校准溶液中, 使其终浓度分别为 1.00 ng/mL 和 5.00 ng/mL。

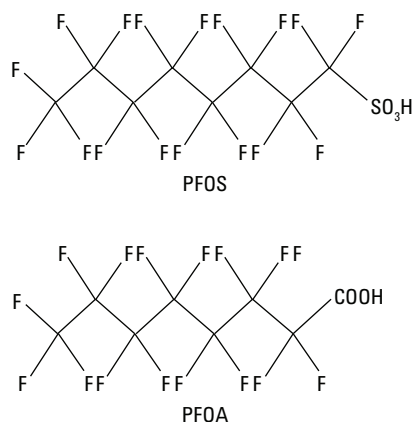


图 1. PFOS 和 PFOA 的分子结构

## 鱼、虾和蛋类样品

实验中采用的许多食物样品来自鱼、虾和蛋类这三种基质。将去掉外皮的这些基质样品首先在一个聚乙烯容器中搅匀，并放置在 -18 °C 下冷冻备用。测定基质样品中 PFOS 和 PFOA 的浓度。选 PFOS 和 PFOA 含量最低的基质作为回收率实验的空白基质。

## 样品制备

首先将 5.00 g ( $\pm 0.01$  g) 样品与 1.0 ng 的  $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 和 5.0 ng 的 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 混合，作为内标，用于校准。然后用 10 mL 甲醇提取样品，收集甲醇层。用 10 mL 甲醇再提取残渣两次，将所有甲醇层混合。混合甲醇提取液用氮气吹至 1 mL。然后将 5 mL 2% 甲醇加入浓缩提取液，净化前用超声处理 15 分钟。

采用弱阴离子交换 (WAX) 小柱对提取的样品进行净化。首先分别采用 2 mL 甲醇和 1 mL 水分别对小柱进行活化，再采用 2 mL 2% 甲酸溶液进行平衡。然后将超声处理过的样品转移到小柱上，采用 2 mL 2% 甲酸溶液进行淋洗，再依次采用 2 mL 甲醇和 4 mL 4% 氢氧化铵溶液进行洗脱。收集洗脱液并用氮气吹干。残渣用 1 mL 甲醇复溶待分析。

## LC 和 MS 条件

### LC 配置和条件

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1260 Infinity 高效自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1200 系列自动进样器恒温箱 (G1330B)
- Agilent 1200 系列柱温箱 SL (G1316B)

色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 $\mu\text{m}$
柱温	30 °C
进样体积	5 $\mu\text{L}$
进样针冲洗	冲洗口 (100% 甲醇), 5 秒
流动相	A = 5 mM 乙酸铵水溶液 B = 甲醇
梯度流速	0.2 mL/min

表 1 列出了梯度洗脱程序。

表 1. 梯度洗脱程序

时间	溶剂 A (%)	溶剂 B (%)
0	70	30
1.0	70	30
1.01	50	50
9.0	20	80
9.01	70	30
10.0	70	30

总运行时间: 10 分钟 (包括 1 分钟平衡时间)。

### MS 配置和条件

配备喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 离子源

离子化模式	负离子化
扫描模式	多反应监测 (MRM)
毛细管电压	-3500 V
喷嘴电压	-500 V
雾化器压力	45 psi
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	6 L/min
鞘气温度	260 °C
鞘气流速	11 L/min

优化了定量和定性离子以及相关的碰撞能量，详见表 2。

表 2. 检测 PFOS 和 PFOA 的 MRM 参数

化合物	母离子	子离子	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	驻留时间 (ms)
PFOA	412.9	368.9*	-80	-4	100
		219.0	-80	-12	100
		169.0	-80	-16	100
PFOS	498.9	130.0*	-200	-50	100
		99.0	-200	-55	100
		80.0	-200	-90	100
$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	417.1	372.0*	-85	-3	100
		172.1	-85	-12	100
1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS	503.1	80.1*	-170	-65	100
		99.1	-170	-50	100

注: \* 表示定量离子。Q<sub>1</sub> 和 Q<sub>2</sub> 的分辨率设定为单位分辨率。

## 加标回收率

将 PFOA 和 PFOS 加到空白样品中, 共三个浓度水平, 每个加标样品中 PFOA 的浓度为 0.01、0.05 和 0.10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , PFOS 的浓度是 PFOA 的 10 倍 (0.1、0.5 和 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。然后在室温下涡旋加标样品 5 分钟。将 1.0 ng  $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 和 5.0 ng 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 加入加标样品中。所得样品再涡旋 5 分钟, 然后按照样品制备部分的步骤进行提取和净化, 最后进行液相色谱-三重四极杆质谱 MRM 测定。

## 结果与讨论

### LC/MS 分析条件

溶剂中 PFOS 和 PFOA 的浓度可能会高到足以影响分析准确度和灵敏度的程度。为了减少来自水性溶剂的干扰, 我们对 LC 系统稍加改进。将一根 C18 捕集柱 (30  $\times$  3.5 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 连接到水相泵通道与梯度泵的混合点之间 [9]。连接管为不锈钢管。经过这种改进, 来自 LC 系统的干扰显著减少。首先在负离子模式下对 PFOA 和 PFOS 标准溶液进行  $Q_1$  MS 扫描, 以找到这两种化合物合适的母离子。再对选择的母离子进行子离子扫描。标准化化合物的碎片离子见图 2 和图 3。

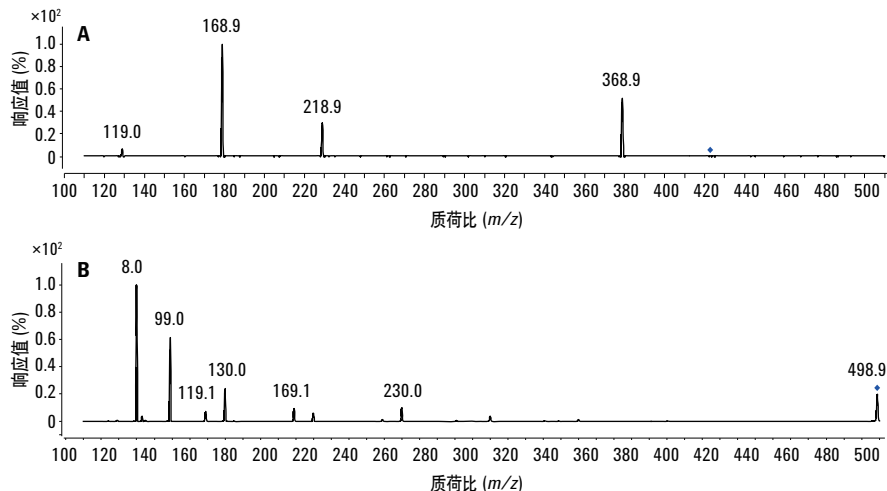


图 2. PFOA (A) 和 PFOS (B) 的子离子谱图

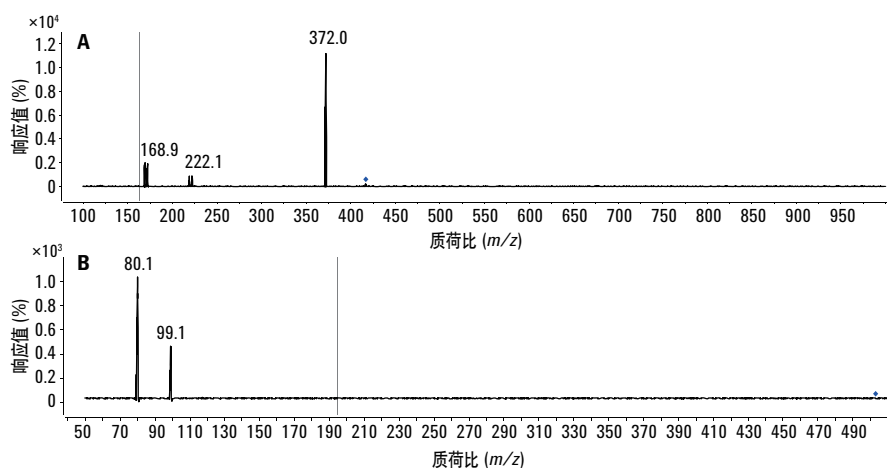


图 3.  $^{13}\text{C}_8$ -PFOA (A) 和 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS (B) 的子离子谱图

通过逐步提高碎裂电压以获得最佳母离子转换，优化碰撞能量以优化碎片离子生成，转换离子通道 498.9/130 和 412.99/368.9 分别被选定用于 PFOS 和 PFOA 的定量分析，同时其它的离子转换通道被选择用于确证，详见表 2。表 2 还列出了所建立的同位素

标准品的离子转换通道。在 MRM 选择性监测模式下得到的 PFOS 和 PFOA 典型色谱图见图 4。PFOS 标准品的双峰表明 PFOS 标准品以线性和分支两种结构形式存在。因此，PFOS 的定量分析基于这两个峰面积的和进行。

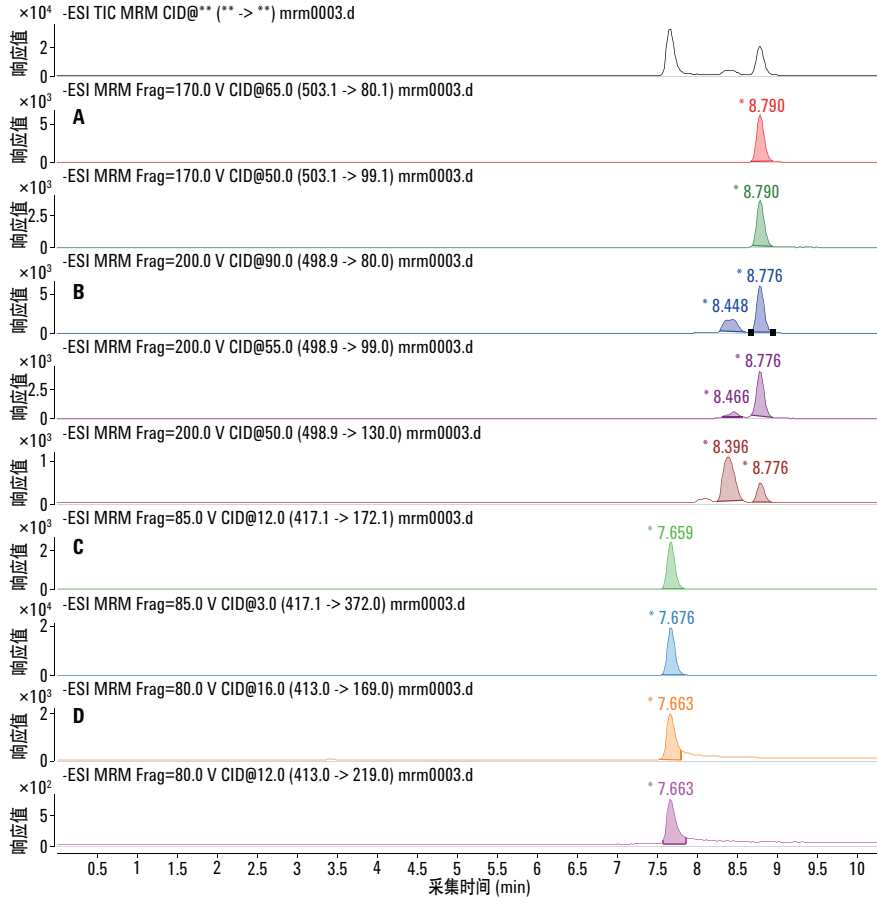


图 4. 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS (A)、PFOS (B)、 $^{13}\text{C}_8$ -PFOA (C) 和 PFOA (D) 的 MRM 色谱图

## 校准曲线和检测灵敏度

采用贮备标准溶液制备校准溶液，PFOA 的浓度从 0.010 到 10 ng/mL，PFOS 的浓度从 0.1 到 40 ng/mL。在实验条件下，将基于相应同位素标准品得到的定量离子峰面积对化合物浓度作图。如图 3 所示，我们获得了良好的线性校准曲线，回归系数不小于 0.999。

LOD 和 LOQ 通过逐步减少空白样品中标准品的浓度来测定。LOD 取 S/N=3 时的浓度，LOQ 取 S/N=10 时的浓度。如表 3 所示，PFOS 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.02 和 0.1 µg/kg，而 PFOA 的相应

值低 10 倍，表明该方法检测所研究食物基质中的 PFOS 和 PFOA 具有高灵敏度。

## 方法的准确度和精密度

在包括鱼、虾和蛋类的三种基质中进行加标试验。在最佳的 LC/MS 条件下，分析物可与基质完全分离，表明背景干扰较小。两种化合物在三种基质中三个加标水平的平均回收率范围为 86.2%–111.6%，相对标准偏差为 3.2%–10.7%，说明所开发的方法可靠性强，满足残留分析的要求。

表 3. 校准曲线和检测灵敏度

分析物	线性范围 (µg/L)	线性方程	R <sup>2</sup>	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
PFOA	0.01–10	$Y = 1.798e3x + 4501.1$	0.9990	0.002	0.01
PFOS	0.1–40	$Y = 6.819e2x + 383.92$	0.9993	0.02	0.1

表 4. 鱼、虾和蛋类基质中 PFOA 和 PFOS 的加标回收率和精密度 (n=6)

分析物	PFOA			PFOS		
	加标 (µg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)	加标 (µg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
鱼	0.01	87.2~113.1	6.0	0.1	82.2~90.6	8.2
	0.05	92.8~101.0	3.2	0.5	79.9~97.2	5.8
	0.1	85.8~102.5	4.5	1.0	81.0~99.6	6.0
虾	0.01	95.7~107.2	6.3	0.1	79.2~88.8	10.7
	0.05	96.3~111.2	6.6	0.5	80.2~89.2	8.12
	0.1	85.2~101.6	6.5	1.0	85.0~88.4	6.0
蛋类	0.01	85.7~98.6	4.8	0.1	89.7~93.4	7.6
	0.05	95.2~108.8	8.8	0.5	88.3~93.6	6.9
	0.1	84.2~111.6	7.1	1.0	90.8~112.0	4.2

## 实验室间验证

五个独立实验室分别对该方法进行了进一步验证。对三种基质中三个加标水平的加标回收率和精密度进行了评估。表 5 表明总体平均回收率在 87.1%–105.8% 范围内，总体 RSD 在 10.8%–31.4% 范围内。结果表明所开发的方法满足作为参考标准方法的要求。

## 实际样品分析

进一步将所开发的方法用于实际样品分析。随机选择的鱼、虾和蛋类样品购自当地的食物杂货店，每种基质 50 份样品。在总共 150 份样品中，10 份样品里发现含 PFOS，鱼类中阳性率最高，蛋类的相对较低。阳性样品中 PFOS 的含量在 0.04 - 3.0 µg/kg 范围内。

表 5. 五个独立实验室分别测定的鱼、虾和蛋类基质中 PFOS 和 PFOA 的含量，以及测定的准确度和精密度

样品	分析物	加标浓度 (µg/kg)	来自五个独立实验室的定量分析结果 (µg/kg)										平均浓度 (µg/kg)	平均平均 (%)	RSD (%)
			A	A	B	B	C	C	D	D	E	E			
鱼	PFOA	0.01	0.0086	0.0091	0.0076	0.0088	0.0089	0.0096	0.012	0.0112	0.012	0.018	0.01	105.8	28.43
	PFOS	0.1	0.108	0.099	0.111	0.107	0.068	0.073	0.096	0.095	0.099	0.112	0.10	101.3	15.67
	PFOA	0.05	0.048	0.047	0.045	0.047	0.0511	0.0508	0.0513	0.0508	0.0302	0.0395	0.05	92.1	14.45
	PFOS	0.5	0.451	0.485	0.496	0.509	0.514	0.518	0.396	0.372	0.458	0.483	0.47	93.6	10.65
	PFOA	0.1	0.068	0.079	0.089	0.087	0.075	0.086	0.087	0.096	0.101	0.103	0.09	87.1	12.73
	PFOS	1	1.02	1.12	1.04	1.05	1.13	1.14	0.88	0.86	0.79	0.76	0.98	97.9	14.71
虾	PFOA	0.01	0.0096	0.0099	0.0079	0.0068	0.0102	0.0097	0.0093	0.0086	0.0094	0.0096	0.01	96.8	11.48
	PFOS	0.1	0.088	0.089	0.103	0.108	0.083	0.078	0.087	0.085	0.105	0.112	0.09	92.3	12.76
	PFOA	0.05	0.045	0.048	0.043	0.047	0.0501	0.0509	0.0508	0.0511	0.0399	0.0368	0.05	92.5	10.83
	PFOS	0.5	0.463	0.483	0.476	0.502	0.504	0.049	0.456	0.468	0.498	0.483	0.44	87.6	31.43
	PFOA	0.1	0.097	0.089	0.069	0.077	0.102	0.113	0.097	0.086	0.091	0.103	0.09	92.4	14.02
	PFOS	1	0.86	0.96	0.96	0.96	1.13	1.04	0.87	0.76	0.99	0.86	0.94	93.9	11.22
蛋类	PFOA	0.01	0.0076	0.0081	0.0086	0.0089	0.0086	0.0098	0.0102	0.0112	0.0086	0.0095	0.01	87.8	11.75
	PFOS	0.1	0.088	0.079	0.103	0.106	0.078	0.083	0.096	0.103	0.105	0.112	0.10	83.3	12.98
	PFOA	0.05	0.0478	0.0467	0.0358	0.0372	0.0501	0.0508	0.0515	0.0513	0.0487	0.0495	0.05	93.9	12.18
	PFOS	0.5	0.481	0.496	0.466	0.369	0.514	0.512	0.397	0.482	0.512	0.516	0.47	94.9	10.85
	PFOA	0.1	0.097	0.089	0.076	0.079	0.105	0.096	0.112	0.096	0.111	0.118	0.10	97.9	14.24
	PFOS	1	1.12	1.03	1.17	0.963	0.896	0.789	0.868	0.856	0.792	0.765	0.92	92.5	15.34

## 结论

建立了一个采用 LC/MS/MS MRM 技术和弱阴离子交换小柱净化, 以同位素内标校准, 测定鱼、虾和蛋类中 PFOA 和 PFOS 的分析方法。方法的动态线性范围达到三个数量级, 线性相关系数不小于 0.999。PFOS 和 PFOA 的 LOD 分别为 0.002 µg/kg 和 0.02 µg/kg, 其 LOQ 分别为 0.01 µg/kg 和 0.1 µg/kg。在 LOQ、5 倍 LOQ 和 10 倍 LOQ 水平的加标试验表明, 该方法准确度高, 加标回收率在 79.2%–113.1% 范围内, RSD 在 3.2%–10.7% 范围内 (n=6)。实验室间验证进一步证明了方法的可靠性, 总体加标回收率在 87.1%–105.8% 范围内, RSD 在 10.8%–31.4% 范围内。采用所开发的方法定量分析 150 个样品, 阳性率为 6.7%。该方法具有高灵敏度、高回收率和良好精密度的优势, 因此, 它可用于动物源性食品基质的常规检查。

## 参考文献

1. European Food Safety Authority (EFSA). *EFSA Journal* 2012;10 (6):2743.
2. J.M. Shipley, C.H. Hurst, S.S. Tanaka, *Toxicological Sciences*, 2004, 80: 151-160.
3. K. Inoue, F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, *et al. Environ. Health Perspect.* 2004, 112(11): 1204-1207.
4. C.P. Higgins, J.A. Field, C.S. Criddle, R.G. Luthy, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39: 3946-3956.
5. R. Loos, G. Locoro, T. Huber, *et al. Chemosphere*, 2008, 71:306–313.
6. X. Sun, J. Jin, Y. Wang, *Environ. Pollution and Prevention (Chinese)*, 2007, 29(3):216-220.
7. P. Grandjean, E.W. Andersen, E. Budtz-Jorgensen, *et al. JAMA*. 2012, 307(4): 391-397.
8. European Food Safety Authority (EFSA). EFSA, 2008, 653.
9. J.W. Stone P, L. Côté, J. Gushue, R.J. Letcher, S. Chu, 安捷伦应用简报, 2010, 5990-5313CHCN.

## 更多信息

这些数据代表了典型的结果。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)。

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本材料可能存在的错误, 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, 2013  
中国印刷  
2013年3月4日  
5991-1948CHCN



**Agilent Technologies**