

# 使用新型脂质去除吸附剂和 LC-MS/MS 分析生物体液中的全氟/ 多氟烷基化合物 (PFAS)

## 作者

Tarun Anumol、  
Joan Stevens、Xiaomi Xu  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

在执行多残留分析的环境污染研究实验室中，在全氟/多氟烷基化合物 (PFAS) 的 LC-MS/MS 分析之前进行高效的样品前处理是一个重要考虑因素。磷脂 (PPL) 已被确定为在血浆样品的 LC-MS/MS 分析中引起基质效应的主要来源。本应用简报介绍了血浆样品前处理以及 PFAS 的 LC-MS/MS 分析，样品前处理中使用孔内蛋白质沉淀法 (PPT)，之后用 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱去除 PPL。Captiva EMR-Lipid 过滤柱能够得到更洁净的洗脱液，去除血浆基质中 99% 以上不需要的 PPL，目标分析物的回收率高于 75%，RSD 均小于 14%。对 5 ng/mL PFAS 的分析得到了理想的峰形，并兼有良好的信噪比 (S/N)。处于 0.1-50 ng/mL 范围内的所有 PFAS 的校准曲线均呈线性，其中  $R^2$  高于 0.992。

## 前言

全氟/多氟烷基化合物 (PFAS) 是人工合成的化合物, 广泛用作表面活性剂、阻燃剂、防水剂以及防粘剂和不粘剂。它们的性质独特, 会长期大量地存在于环境和动物体内。研究发现, PFAS 可引起生殖和发育问题, 如肝脏、肾脏和免疫影响、肿瘤以及胆固醇的变化。当通过饮食摄入 PFAS 时, 它们很容易被机体吸收, 但清除过程缓慢, 可能在动物组织中发生积累。已有研究表明, 碳链中碳原子数大于七的 PFAS 的生物积累风险最高<sup>1</sup>。

在 PFAS 的 LC-MS/MS 分析之前的高效样品前处理, 是多残留分析过程中的一个重要考虑因素。样品前处理可用于减少系统污染, 改善数据完整性和方法选择性, 并提高分析灵敏度。血浆中存在的两种主要干扰物质为蛋白质和磷脂 (PPL)。PPL 已被确定为在 LC-MS/MS 生物分析中引起基质效应的主要来源, 因为它们会占用电喷雾电离 (ESI) 过程中形成的液滴表面上的空间<sup>2</sup>。

研究实验室中常用的血浆、血清和全血样品前处理技术包括蛋白质沉淀 (PPT)、固相萃取 (SPE)、液液萃取 (LLE) 和固相支持液相萃取 (SLE)。每种技术在速度、成本和生成数据的质量方面各有优劣。例如, PPT、LLE 和 SLE 无法去除 PPL, 而 SPE 执行起来更耗时且更复杂。而在这些技术中, PPT 应用最广泛。PPT 以规定的比例向生物体液样品中加入有机沉淀溶剂 (如乙腈 (ACN) 或甲醇 (MeOH)), 可轻松去除蛋白质。随着蛋白质的变性, 它们形成的沉淀可通过过滤或离心得以去除。PPT 无法去除 PPL, 因为 PPL 能够溶于有机沉淀溶剂中。

迫切需要一种样品前处理方法, 在省去某些样品前处理步骤 (包括离线 PPT、离心和稀释) 的同时实现简化的孔内 PPT 和 PPL 去除。本应用简报介绍了一种借助 Agilent Captiva EMR-Lipid 去除干扰物质 (特别是 PPL) 的方法, 该方法采用简单的直通形式, 不会引起分析物损失。所得的提取物更洁净, 减少了潜在的离子抑制以及色谱柱和质谱仪污染。

依次使用孔内 PPT 并使用 Captiva EMR-Lipid 过滤柱去除 PPL, 对血浆中的 PFAS 进行提取。随后使用 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统进行定量分析。对 PPL 去除效率进行了评估。还测定了所评估 PFAS 的方法重现性和回收率。

## 实验部分

### 试剂与化学品

表 1 列出了所分析的 PFAS。所有标准品和内标均购自 Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada)。LC-MS 级乙酸铵购自 Sigma-Aldrich。所有溶剂均为 LC-MS 级或更高级别, 均购自 Burdick and Jackson (Muskegon, MI, USA)。

表 1. 所分析的 PFAS 和 IS 及其对应的三重四极杆 MRM 采集参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)	保留时间 (min)
PFTTrDA	663	618.7	8	3.16
PFDaA	613	268.7	20	2.92
PFDaA- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	614.9	570	5	2.92
N-EtFOSAA	584	526	20	3.40
10:2 FTA	577	463	6	2.51
N-MeFOSAA	570	511.8	24	3.23
N-MeFOSAA d <sub>3</sub>	573	515	24	3.23
PFUdA	563	519	8	2.70
PFDA	513	468.6	8	2.48
PFDA	513	218.7	16	2.48
PFDA- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	514.9	469.9	5	2.48
PFOS	498.9	99	50	2.61
PFOS	498.9	80	50	2.61
PFOS- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	502.9	80	50	2.61
8:2 FTA	477	393	14	2.12
PFNA	462.9	418.9	5	2.25
PFNA	462.9	169	17	2.25
PFOA	412.9	368.9	5	2.00
PFOA- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	416.0	371.9	5	2.00
PFHxS	398.9	99	45	2.10
PFHxS- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	401.9	79.8	52	2.10
6:2 FTA	377	293	18	1.51
PFHpA	362.9	319	5	1.67
PFHxA	313	268.6	4	1.07
PFHxA- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	314.9	269.9	5	1.07
PFBS	298.9	98.9	29	1.15
PFPeA	263	218.7	0	0.63
PFBA	213	168.7	4	0.47
PFTeDA	712.9	668.5	8	3.33

## 溶液

在甲醇中配制浓度为 10 µg/mL 的 PFAS 的混标工作溶液。将同位素标记的 PFAS 混合到工作溶液中，浓度为 10 µg/mL（溶于甲醇中），并用作内标 (IS)。所有工作溶液均储存于带卡口盖和聚丙烯内衬隔垫的聚丙烯样品瓶中，以防 PFAS 粘附到玻璃上并避免污染。

## 校准标样和质量控制样品

在预加标质量控制 (QC) 样品中加入适当浓度的标准工作溶液，平行配制七份。QC 样品为低浓度 QC (LQC)、中等浓度 QC (MQC) 和高浓度 QC (HQC)，分别对应于血浆中 1、5、20 ng/mL 的浓度。在每种浓度的 QC 样品中，加入浓度为 10 ng/mL 的内标。

在经过 Captiva EMR-Lipid 净化的空白基质中后加标相应的工作溶液，使 PFAS 的浓度达到 1、10、20 ng/mL。加入 IS，使最终浓度达到 10 ng/mL，平行配制五份。

基质匹配校准曲线由标准工作溶液制得。对经过 Captiva EMR-Lipid 净化的空白基质进行后加标，加标浓度对应于血浆中 0.1、1、5、10、25、50 ng/mL 的浓度。在每个校准浓度中，加入浓度为 10 ng/mL 的内标。

## 设备与仪器

表 2 列出了用于分析的设备与仪器。

## LC-MS/MS 分析

采用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱与 Agilent 6495 三重四极杆质谱的联用系统进行 LC-MS/MS 分析。表 3 和表 4 列出了液相色谱和质谱条件。将样品提取物 (4 µL) 直接进样至液相色谱系统中。

表 1 列出了用于所监测各种 PFAS 化合物的三重四极杆动态多反应监测 (DMRM) 采集参数。为评估 Captiva EMR-Lipid 的 PPL 去除率，对 11 种主要 PPL 化合物母离子以及  $m/z$  184 处的子离子碎片进行监测，如表 5 所示。

表 2. 样品前处理和分析所用的设备与仪器

组件	部件号
<b>样品前处理</b>	
Agilent Captiva EMR-Lipid, 1 mL 过滤柱	5190-1002
Agilent Vac Elut SPS 20 多管装置, 配备可容纳 13 个 100 mm 试管的收集架	12234101
VWR 13 个 100 mm 聚丙烯培养管, 8 mL	
Eppendorf 移液管和重复用移液器 (VWR, NJ, USA)	
<b>液相色谱系统</b>	
Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	
Agilent ZORBAX Eclipse Plus 95Å C18 色谱柱, 4.6 × 50 mm, 3.5 µm (延迟柱)	959943-902
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm	699775-902T
Agilent 1290 在线过滤器, 0.3 µm	5067-6189
钳口/卡口聚丙烯样品瓶, 1.0 mL, 100/包	5182-0567
带聚丙烯隔垫的钳口/卡口盖, 100/包	5182-0542
<b>质谱系统</b>	
采用 iFunnel 技术的 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统	
Agilent MassHunter 软件 (08.00 版)	

表 3. 液相色谱条件

参数	值										
流速	0.5 mL/min										
柱温	50 °C										
自动进样器温度	5 °C										
进样量	4 µL										
流动相	A) 5 mM 乙酸铵水溶液 B) 乙腈										
进样针清洗: 多重清洗	S1) H <sub>2</sub> O S2) H <sub>2</sub> O:ACN (50:50) S3) ACN 每次清洗 10 秒										
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>4.5</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0.0	30	0.5	30	3.5	90	4.5	100
时间 (min)	%B										
0.0	30										
0.5	30										
3.5	90										
4.5	100										
停止时间	5.0 分钟										
后运行时间	1.5 分钟										

表 4. 质谱条件

参数	值
电离模式	负离子模式, ESI
干燥气温度	130 °C
干燥气流速	15 L/min
雾化器压力	35 psi
鞘气温度	375 °C
毛细管电压	2000 V
充电电压	500
Delta 电子倍增器电压 (EMV)	200
极性	负

表 5. PPL 的三重四极杆 MRM 采集参数

母离子 ( $m/z$ )	子离子 ( $m/z$ )	碰撞能量 (eV)
808.4	184.4	30
806.4	184.4	30
786.4	184.4	30
784.4	184.4	30
760.4	184.4	30
758.4	184.4	30
704.4	184.4	30
524.4	184.4	30
522.4	184.4	30
520.4	184.4	30
496.4	184.4	30

使用 Agilent MassHunter 软件 (08.00 版) 进行仪器控制以及定性和定量数据处理和分析。对采用该方法得到的 PFAS 的重现性和回收率进行测定。

### 样品前处理过程

#### 从血浆中提取 PFAS

1. 将 400  $\mu\text{L}$  ACN (含 1% 甲酸 (FA)) 加入 Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱中
2. 加入 100  $\mu\text{L}$  经过预混合的加标或空白人血浆
3. 进行孔内混合
4. 施加 2–4 psi 的低真空, 实现每 3–5 秒 1 滴的受控流速
5. 将提取物收集到聚丙烯试管中
6. 使用聚丙烯自动进样器样品瓶, 将提取物直接进样至 LC-MS/MS 系统中

由于采用 MeOH 形成的沉淀颗粒小于采用 ACN 得到的沉淀颗粒, 因此推荐使用 ACN 最大程度实现 PPT, 并避免在 Captiva EMR-Lipid 处理之前发生胶凝。推荐使用 1:3 至 1:5 的样品/溶剂比。在沉淀溶剂之后加入血浆样品。酸 (甲酸) 有助于分解蛋白质并最大程度减少蛋白质结合。

优先使用大口径移液枪头进行主动孔内混合。真空促使液流通过 Captiva EMR-Lipid 过滤柱。推荐使用每 3–5 秒一滴的受控流速, 以实现最佳脂质去除。在样品从过滤柱洗脱后, 施加更高的真空度以最大程度提高样品回收率。强烈推荐使用聚丙烯收集管和自动进样器样品瓶, 以防止由于 PFAS 粘附到玻璃表面上造成的损失。

### PPL 去除率评估 (仅采用 PPT)

1. 将 400  $\mu\text{L}$  ACN (含 1% FA) 加入试管中
2. 加入 100  $\mu\text{L}$  经过预混合的空白血浆
3. 在 Heidolph Multi Reax 上以 800–1000 rpm 的转速涡旋混合 5 分钟
4. 以 5000 rpm 的转速离心 5 分钟
5. 移取上清液至聚丙烯自动进样器样品瓶中, 进行 LC-MS/MS 分析

## 结果与讨论

### 去除不需要的脂质基质

在研究实验室中, EMR-Lipid 方法简便, 通用于极性、中等极性和非极性目标分析物的分析, 可消除基质效应并改善分析物回收率。EMR-Lipid 吸附剂通过体积排阻作用和疏水相互作用选择性捕集脂类 (图 1)。无支链烃链 (脂类) 进入吸附剂孔内, 而体积较大的分析物并不进入其中。然后, 进入吸附剂中的脂链通过疏水相互作用被捕集。

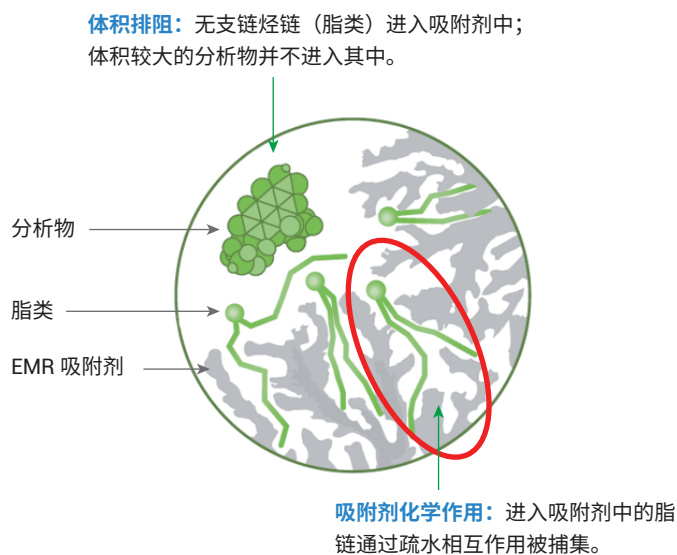


图 1. EMR-Lipid 机制: 体积排阻和疏水相互作用

尽管图 2 所示的 PFAS 结果包含较长的直碳链，但由于碳与氟原子相连，因此在空间上大于无支链烃链。所以，这些物质进入 EMR-Lipid 吸附剂的孔内时，将受到空间位阻。

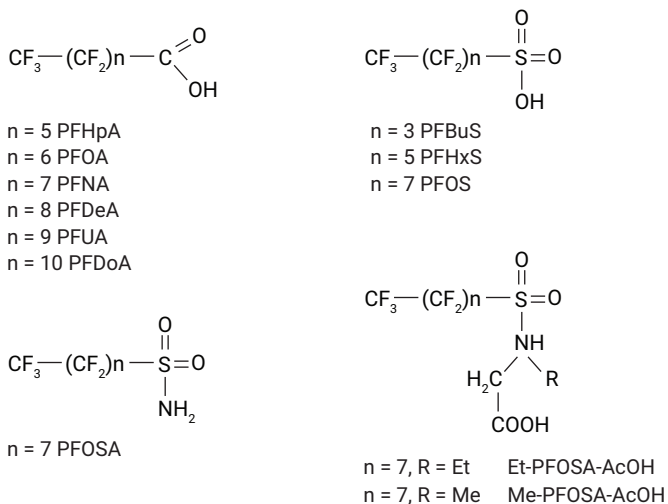


图 2. PFAS 的分子结构

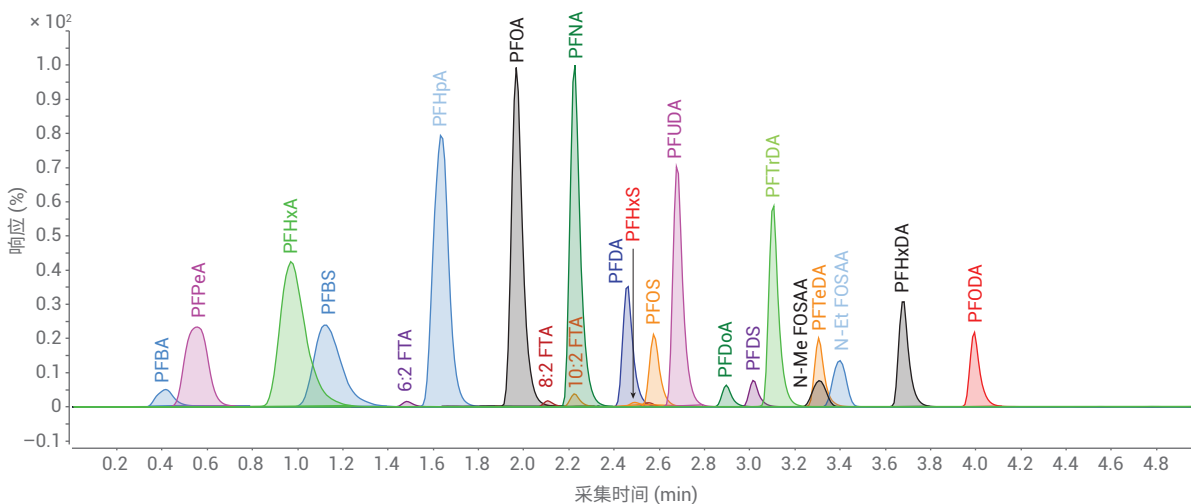


图 3. 加标浓度为 5 ng/mL 的血浆的 MRM 色谱图

### 色谱性能

加标浓度为 5 ng/mL 的血浆 MRM 色谱图 (图 3) 显示了使用 EMR-Lipid 方案所获得的色谱性能。即使在 5 ng/mL 的浓度下，由于基质效应和干扰的降低，理想峰形有助于获得良好的分离度和信噪比 (S/N)，可实现准确积分。在血浆中 PFAS 的分析中，使用 6495 三重四极杆液质联用系统能够对浓度为 0.1 ng/mL 及更低的分析物实现准确的检测和定量。

### PPL 去除

PPL 是细胞膜的主要成分，也是引起显著基质效应的主要化合物类别<sup>3,4</sup>。甘油磷酸胆碱和溶血磷脂酰胆碱分别占总血浆 PPL 的 70% 和 10%<sup>5</sup>，是基质效应的主要来源。为确定使用 Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化产品去除血浆中 PPL 的效率，对 11 种天然存在的 PPL 化合物进行监测。具体而言，利用 *m/z* 184 处的离子碎片来监测经 PPT 和 Captiva EMR-Lipid 去除之后的血浆提取物中的 PPL。

如图 4 所示，所监测 PPL 中约有 99%（基于峰面积比较结果）从提取的血浆样品中消除，相比之下，单独使用 PPT 时，一些 PPL 将与目标分析物发生共洗脱。图 4 中示出的相对丰度较高的 PPL（红色迹线）可能使检测器达到饱和，并可能影响定量分析结果质量。此外，高丰度 PPL 可能随时间推移而污染 LC-MS 系统。

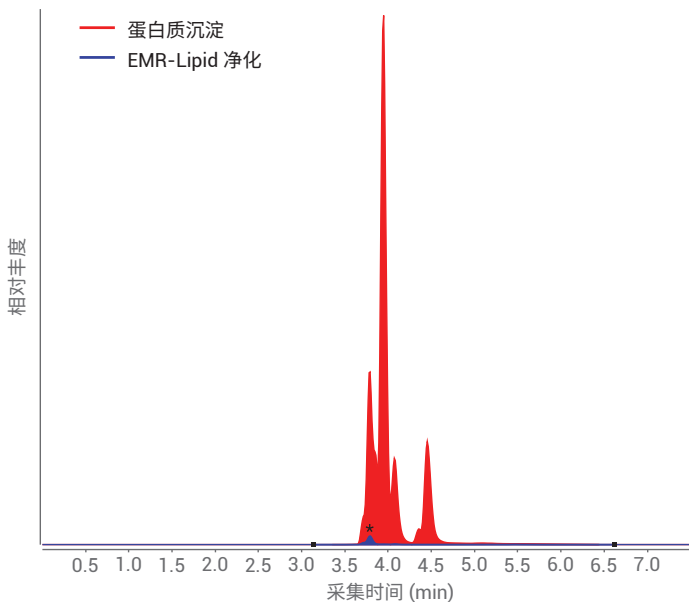


图 4. 在仅经过 PPT 处理（红色）和经过 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化（蓝色）后，在  $m/z$  184 处监测到的 11 种 PPL 的 MRM 色谱图叠加

## 定量性能

评估校准曲线线性。图 5 显示了 PFOA 和 PFOS 的校准曲线。在测试的六种浓度水平（0.1 至 50 ng/mL）下，每种情况下所得的结果中均观察到良好的响应线性。采用线性拟合和  $1/x$  加权得到所研究的所有 PFAS 的平均相关系数 ( $R^2$ ) 均高于 0.992，并在 0.1 至 50 ng/mL 的浓度范围内保持线性。

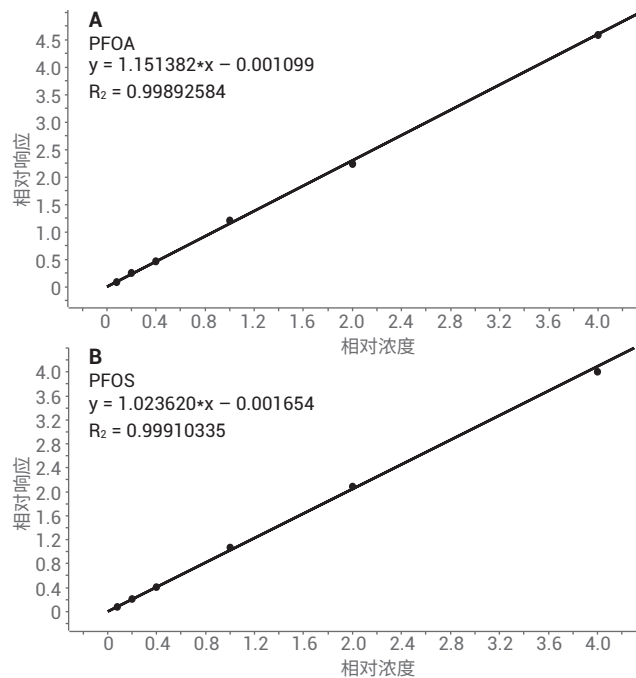


图 5. 校准曲线。A) PFOA, B) PFOS。依次使用蛋白质沉淀法和 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化，血浆中的浓度范围为 0.1–50 ng/mL

以 5 ng/mL 和 20 ng/mL 的浓度将标准品加入血浆中并重复测定五次，由此测定对 22 种 PFAS 的方法回收率和重现性 (RSD)。总体回收率表现优异，结果处于 75% 至 125% 之间 (图 6)。多数 PFAS 具有 90%–110% 的回收率。在血浆的两种加标浓度下，广泛研究的 PFAS、PFOS 和 PFOA 分别有  $92.7 \pm 6.6\%$  和  $93.1 \pm 5.0\%$  的平均回收率。相对标准偏差处于可接受范围内，在加标浓度为 5 ng/mL 和 20 ng/mL 的条件下均处于 0.8% 至 14% 的范围内。

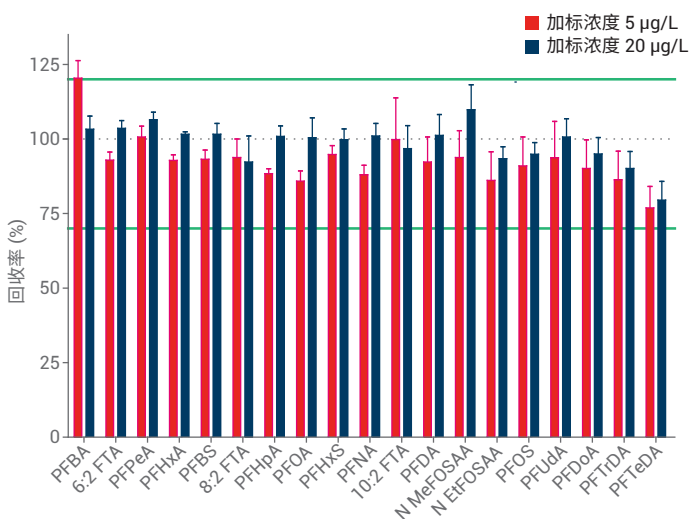


图 6. 在 5 ng/mL 和 20 ng/mL 下评估得到的 PFAS 的回收率和 RSD

## 结论

本应用简报介绍了一种简便而快速的工作流程，适用于对血浆样品进行前处理，以通过 LC-MS/MS 分析其中的 PFAS。依次使用孔内 PPT 并使用直通形式的 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱去除 PPL，对血浆中的 22 种 PFAS 进行提取。Captiva EMR-Lipid 能够高效去除血浆基质中 99% 以上不需要的 PPL，并使目标分析物获得优异的回收率。所得到的样品提取物比单独使用 PPT 得到的提取物更洁净，从而减小了离子抑制以及 LC-MS/MS 系统污染和停机的可能。孔内 PPT 具有减少样品处理和转移的优点。

对 5 ng/mL PFAS 的分析得到了理想的色谱峰形和良好的 S/N。六种浓度 (0.1–50 ng/mL) 下的 PFAS 的响应呈线性，重现性<sup>2</sup> 高于 0.992。在所测试的 PFAS 中，回收率均大于等于 75%，RSD 小于 14%。结果表明该方法适用于 PFAS 的多残留提取和分析。

Captiva EMR-Lipid 方法可轻松融入现有的研究实验室工作流程中，无需额外的样品前处理装置或玻璃器皿。在 96 孔板或 1 mL 过滤柱形式中，Captiva EMR-Lipid 可兼容自动化系统，适用于高通量应用。滤芯设计可轻松高效洗脱样品，不易发生堵塞。

## 参考文献

1. United States Environmental Protection Agency. Research on Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS). Retrieved October 11, 2017. <https://www.epa.gov/chemical-research/research-and-polyfluoroalkyl-substances-pfas>
2. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, *75*(13), 3019-3030
3. Little, J. L.; Wempe, M. F.; Buchanan, C. M. Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma. *J. Chromatogr. B* **2006**, *833*, 219
4. Ismaiel, O. A.; et al. Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma. *J. Chromatogr. B* **2007**, *859*, 84-93
5. Chambers, E.; et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J. Chromatogr. B* **2007**, *852*, 22–34

查找当地的安捷伦客户中心：

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

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

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

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。