应用简报

PFAS

Agilent

Trusted Answers

使用配备 Profinder 和 FluoroMatch 的 Agilent 6546 LC/Q-TOF 进行干血斑的非靶向 PFAS 分析

作者

Jeremy Koelmel，Elizabeth Lin，Paul Stelben，Krystal Pollitt

耶鲁大学

Emily Parry，Emma Rennie，James Pyke

安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报展示了 FluoroMatch Suite 在使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统和 Agilent 6546 LC/Q-TOF 质谱仪与迭代排除 (IE) 分析和鉴定全氟和多氟烷基化合物 (PFAS) 中的应用。将 FluoroMatch 应用于添加有 PFAS 标准品的干血斑，并介绍了两种工作流程：使用 FluoroMatch Flow 作为一体化解决方案，其中用户只需将 .d 文件拖动到界面上；以及使用 Agilent MassHunter 软件进行峰识别，并使用 FluoroMatch Modular 完成下游步骤。FluoroMatch Flow 包含文件转换、峰识别、空白过滤、标注、同系物检测和置信度报告，它还能提供交互式可视化，供用户验证结果并发现新的 PFAS。结果显示，干血斑的假阳性率和假阴性率都很低（使用 Profinder 和 FluoroMatch Modular 时分别为 4% 和 0%）。此外，在血液中发现了很少筛查的 PFAS，这些 PFAS 鲜少报道。与 FluoroMatch Suite 峰识别相比，使用 Profinder 的工作流生成的特征表更小，减少了伪峰和源内碎片，同时保持了相似的覆盖范围。

前言

在各种环境和人体样品中，估计未知 PFAS 的数量超过数千种同系物。总可吸附有机氟化合物已经表明，存在大量更多无法通过靶向筛查鉴定的 PFAS[1–3]。由于 PFAS 的来源、暴露和毒性尚不清楚，而且 PFAS 极有可能带来严重的环境和人体健康危害，因此表征和鉴定 PFAS 的未知部分至关重要[2]。为解决这一难题，高分辨率质谱提供了出色的灵敏度和通用性，适用于大部分 PFAS 测量。6546 LC/Q-TOF 提供了在采集数据时提高 PFAS 覆盖范围所必需的灵敏度、动态范围、分辨率和质量数准确度稳定性。此外，在采集数据依赖型 MS/MS 数据时，使用安捷伦迭代排除算法能够获得更大的 MS/MS 覆盖范围。由于碎裂是确认或估计 PFAS 结构以及确定特征是否为 PFAS 所必需的，因此 MS/MS 覆盖范围的增加将扩大 PFAS 覆盖范围。

目前的瓶颈在于数据处理，耶鲁大学的研究人员与 Innovative Omics 和安捷伦科技公司合作发布了一种开源解决方案：FluoroMatch Suite[4–6]，可简化数据处理过程。该软件包含文件转换、峰识别和对齐、空白过滤、标注、按同系物和置信度进行数据组织以及数据可视化，适用于确认和发现未知物。本应用简报展示了使用整个开源工作流程、以及单独使用来自 Agilent MassHunter Profinder 软件与 FluoroMatch Modular 相结合的结果的 FluoroMatch Flow 在使用 6546 LC/Q-TOF 采集的干血斑中的应用。干血斑的用途是唯一的，因为干血斑易于获得、运输和储存。美国几乎每名新生儿都会采集血斑卡，因此所得数据可用于了解人类暴露的 PFAS 范围，以及监测随时间推移的暴露情况。本应用简报对干血斑中的 90 多种潜在 PFAS 进行了检测和标注。将 21 种未标记的 PFAS 添加到卡上，以确定不同软件工作流程的假阳性率和假阴性率。使用 MassHunter Profinder、FluoroMatch Modular 和 FluoroMatch Visualizer 时，假阴性率和假阳性率均为 0%。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。

样品前处理

样品前处理已在之前的出版物中进行了深入介绍[7]。简而言之，将空白全血（UTAK，产品编号 44600-WB(F)）点样到血斑卡 (QIAGEN QIAcard FTA classic) 上，并在通风橱中于室温风干 1 小时。从干血斑 (DBS) 卡上切下面积为 491 mm^2 的切片，并使用经甲醇（Fisher Scientific，HPLC 级）预清洗的不锈钢剪刀进行采集。还从干血斑邻近位置切下卡片空白部分的大小相近的切片，用于滤除由卡片、样品处理、运输、储存或采集引入的任何 PFAS。将 DBS 卡置于单独的 15 mL 聚丙烯 Falcon 管（Corning，产品编号 21008-918）中，并添加 21 种天然 PFAS 标准品的混合物 (AccuStandard) 和 ^{13}C 标记的内标 (Wellington Laboratories)（表 1）。将 DBS 置于加盖样品管中，在室温下干燥 30 分钟，然后储存于 -20 °C，直至提取。

DBS 样品提取包括将用甲醇 (1 mL) 制备的氢氧化钠 (Fisher Scientific, 20 mM) 加入样品管中。将样品用四个不锈钢微珠 (Spex SamplePrep, 2.8 mm) 振摇 30 min，超声处理 10 min，然后在室温下离心 20 min (4000 rpm)。将所得上清液转移至 2 mL 聚丙烯样品瓶（安捷伦，部件号 5191-8150）中，再提取两次（含 20 mM 氢氧化钠的 500 µL 甲醇）。使用预清洁的聚丙烯滤芯和 1000 µL 甲醇（Agilent Bond Elut 脂质萃取，部件号 5610-2041）将每个样品的合并上清液（每份采集的样品约 1500 µL）过滤三次，并使用正压处理装置（安捷伦，部件号 5191-4101）蒸干。将干燥样品用 50 µL 甲醇和 50 µL 超纯水 (Milli-Q Integral 5) 复溶。将复溶的样品在 10 °C 下以 14000 rpm 离心 10 min。将该上清液（约 90 µL）转移至安捷伦（部件号 5190-2242）聚丙烯样品瓶中，将内插管置于 LC/MS 样品瓶中，用安捷伦（部件号 5191-8151）盖密封，并储存于 -20 °C。将提取的空白和干血斑样品与空白和标准品加标溶剂样品一起分析。为制备用于分析的混合提取物，将 50 µL 的 9 份干燥血斑样品蒸发至小体积，并用 200 µL 1:1 甲醇水溶液复溶。

表 1. 干血斑分析中包含的 21 种 PFAS 天然标准品概述

化学类别	链	分析物	CAS	缩写	母离子分子式	分子离子精确质量数	保留时间 (min)
氟调聚物	4:2	1H,1H,2H,2H-全氟-1-己烷磺酸钠	27619-93-8	4:2 FTS	$C_6F_9H_4SO_2^-$	326.973	5.3
	6:2	1H,1H,2H,2H-全氟-1-辛烷磺酸钠	27619-94-9	6:2 FTS	$C_8F_{13}H_4SO_2^-$	426.969	7.4
	8:2	1H,1H,2H,2H-全氟-1-癸烷磺酸钠	27619-96-1	8:2 FTS	$C_{10}F_{17}H_4SO_2^-$	526.961	8.6
全氟烷烃磺酸	4	全氟-1-丁烷磺酸钾	29420-49-3	PFBS	$CF_3(CF_2)_3SO_3^-$	298.942	6.0
	5	全氟-1-戊烷磺酸钠	630402-22-1	PFPeS	$C_5F_{11}SO_3^-$	348.939	7.3
	6	全氟-1-己烷磺酸钾（直链和支链）	3871-99-6	PFHxS	$C_6F_{13}SO_3^-$	398.937	7.8
	7	全氟-1-庚烷磺酸钠	21934-50-9	PFHpS	$C_7F_{15}SO_3^-$	448.933	8.4
	8	全氟-1-辛烷磺酸钾（直链和支链）	2795-39-3	PFOS	$C_8F_{17}SO_3^-$	498.931	9.3
	9	全氟-1-壬烷磺酸钠	98789-57-2	PFNS	$C_9F_{19}SO_3^-$	548.926	9.8
	10	全氟-1-癸烷磺酸钠	2806-15-7	PFDS	$C_{10}F_{21}SO_3^-$	598.925	10.0
全氟烷基羧酸	4	全氟正丁酸	375-22-4	PFBA	$CF_3(CF_2)_2COO^-$	212.979	2.7
	5	全氟正戊酸	2706-90-3	PFPeA	$CF_3(CF_2)_3COO^-$	262.975	4.7
	6	全氟正己酸	307-24-4	PFHxA	$C_6F_{11}O_2^-$	312.973	5.9
	7	全氟正庚酸	375-85-9	PFHpA	$C_7F_{13}O_2^-$	362.970	7.2
	8	全氟正辛酸	335-67-1	PFOA	$CF_3(CF_2)_6COO^-$	412.966	7.7
	9	全氟正壬酸	375-95-1	PFNA	$CF_3(CF_2)_7COO^-$	462.963	8.2
	10	全氟正癸酸	335-76-2	PFDA	$C_{10}F_{19}O_2^-$	512.961	9.3
	11	全氟正十一酸	2058-94-8	PFUnA	$C_{11}F_{21}O_2^-$	562.957	9.9
	12	全氟正十二酸	307-55-1	PFDoA	$C_{12}F_{23}O_2^-$	612.955	10.4
	13	全氟正十三酸	72629-94-8	PFTrDA	$C_{13}F_{25}O_2^-$	662.950	10.8
	14	全氟正十四酸	376-06-7	PFTeDA	$C_{14}F_{27}O_2^-$	712.948	11.2

仪器

液相色谱系统

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪，包括：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- 配备恒温箱的 Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent InfinityLab 无 PFC HPLC 转换工具包（部件号 5004-0006）

质谱系统

配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6546 LC/Q-TOF。

方法

利用液相色谱法在 1290 Infinity II 液相色谱系统上分离 PFAS。完整的 LC 方法参数见表 2。简而言之，在 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱上进行分析分离，使用 Agilent InfinityLab PFC 延迟柱延迟背景。流动相由 2 mM 乙酸铵水溶液和 95:5 乙腈:水组成。梯度分离在 12 min 内进行，使用逐渐升至 100% 有机相的梯度（表 2）。将干血斑卡提取物 (10 µL) 进样至色谱柱中，流速为 0.4 µL/min，柱温保持在 40 °C。

表 2. 色谱条件

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	
参数	**值**
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm
延迟柱	Agilent InfinityLab PFC 延迟柱，4.6 × 30 mm
柱温	40 °C
进样量	10 µL
自动进样器温度	6 °C
进样针清洗	IPA:乙腈
流动相	A) 2 mM 乙酸铵水溶液 B) 95:5 乙腈:水
流速	0.4 mL/min
梯度程序	时间 (min) B (%) 0.0 15 1.0 15 1.5 25 7.0 60 10.0 100 12.0 100 12.1 15
停止时间	12.5 min
后运行时间	3 min

在 Agilent 6546 LC/Q-TOF 上以负离子模式采集 *m/z* 范围为 40–1000 的高分辨率质谱数据。完整的 MS 方法参数见表 3。使用安捷伦数据依赖型迭代排除分析采集样品的 5 次重复进样结果，以增加 MS/MS 覆盖范围（迭代 MS/MS）。在碰撞能量 10 V 和 40 V 下采集 MS/MS 谱图（表 3）。

软件

Innovative Omics FluoroMatch Suite 包含多种软件和工作流程选项，可用于实施 PFAS 数据处理、标注和可视化。在本研究中，实施并比较了两种工作流程：

1. 使用 Agilent MassHunter Profinder 进行递归峰识别、加合物、二聚体等伪峰去除功能，用 Microsoft Excel 软件进行空白过滤，并使用 FluoroMatch Modular 软件进行标注、评分和同系物分组
2. 使用 FluoroMatch Flow 进行峰识别、空白过滤、标注、评分和同系物分组

在这两种情况下，均使用 FluoroMatch Visualizer 实现所得特征、标注和碎裂数据的可视化。

表 3. Agilent 6546 Q-TOF 迭代自动 MS/MS 参数

Agilent 6546 LC/Q-TOF	
参数	**值**
气体温度	120 °C
气体流速	10 L/min
雾化器 (psig)	25
鞘气温度	390 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	2000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	135 V
截取锥	65 V
八极杆 RF Vpp	750
参比质量	*m/z* 119.03632，*m/z* 980.016375 (–)
MS 和 MS/MS 范围	*m/z* 40–1000 (150–1200)，(67–1000)
MS 和 MS/MS 最小采集速率	2 幅谱图/秒（8 幅谱图/秒，3 幅谱图/秒）
分离峰宽	中等
碰撞能量	10 eV，40 eV
每个循环的最大母离子数	3
基于母离子丰度的扫描速度	是
使用 MS/MS 累积时间限	是
剔除未达到目标 TIC 的母离子	否
MS/MS 阈值	1000 或 0.001%
启用主动排除	是
纯度	100%，50%
同位素模型	常见有机分子
母离子排序	仅按丰度
静态排除范围	未使用，但 *m/z* 112.9856、980.01638 和 119.0363 被排除在优选列表之外
迭代 MS/MS：质量数误差范围	±20 ppm
迭代 MS/MS：RT 排除范围	± 0.1 min

在两种工作流程中，均使用迭代排除数据（干血斑样品的五次迭代进样）进行峰识别和标注。对于 FluoroMatch Modular 和 FluoroMatch Flow 两者，有关设置和运行软件的说明可在 YouTube 教程中获取，网址如下：

https://innovativeomics.com/software/

（导航至 FluoroMatch 或其他感兴趣的软件，向下滚动至教程部分）。

1. 对于 FluoroMatch Flow，请从 innovativeomics.com/software 下载并安装软件
2. 双击 **FluoroMatch_Flow.bat** 打开界面（图 1）。警告消息可能指示 Java 的版本错误。应按照手册和视频教程中的说明安装 64 位 Java
3. 在通过将供应商 .d 文件拖动到界面上导入文件之前，应当对不符合特定命名规则的文件进行重命名。所有文件都应以 _Neg.d 结尾，用于 MS/MS 标注的文件的名称中应包含 ddMS2（无论是靶向 MS/MS 数据、迭代排除数据还是传统的数据依赖型数据）

对于用于峰识别的全扫描数据，如果供应商文件正用于非靶向峰识别步骤，则应当对供应商文件进行重命名，在文件名中纳入目标物。FluoroMatch Flow MZmine 峰识别策略包含两步。首先，它使用文件名（其名称中包含目标物），以非靶向方式确定样品中的所有峰。然后，它定位所有样品中的这些峰（包括名称中包含目标物的峰）。在本例中，所有文件均用于非目标峰识别步骤，并用目标物标记。通常推荐 5 至 15 个目标物文件，通常是预期含有大部分 PFAS 的混合样品或其他参考样品。因此，在剩余样品中，将发现大多数峰都是目标峰。包含的样品越多，将确定的峰就越多，但软件运行所需的时间也就越长。

请注意，在本例中，由于还使用迭代排除数据进行峰识别，因此会复制文件。其中一个在名称中用 ddMS2 和 _Neg.d 命名用于标注，而另一个在名称中用 target 和 _Neg.d 命名以用于峰识别。只要针对大多数峰至少采集 10 至 15 次全扫描结果，MS/MS 实验也可用于峰识别。将空白过滤参数设置为样品的第 80 百分位数，必须大于提取空白的平均值（干血斑卡的空白面积）加上提取空白的三倍标准偏差。

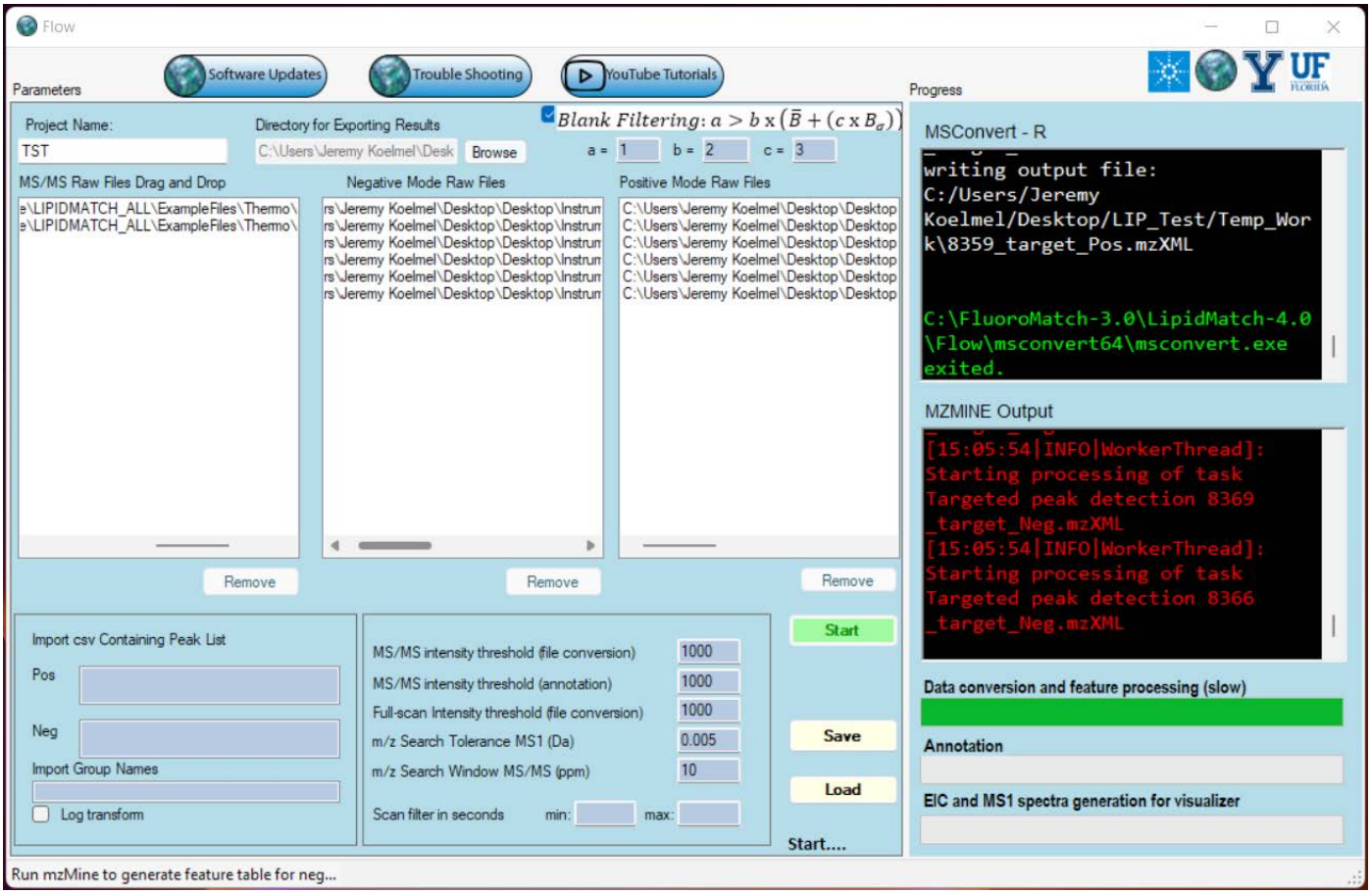


图 1. 在 Innovative Omics FluoroMatch Flow 界面中，原始供应商文件（本例中为 .d 文件）已按照正确的命名规则拖动到界面上

在本应用简报中没有使用但可能有用的功能包括：统计分析、已知化合物的目标峰检测以及 EIC、MS1 谱图、同位素标记和统计数据的可视化。

对于 MassHunter Profinder 软件，选择 Batch Recursive Feature Extraction 后使用表 4 中列出的参数。

表 4. Agilent MassHunter Profinder 软件参数

Profinder 参数	值
所用峰的峰高 ≥	600
离子形态	−H、+Cl、+CH_3COO
中性丢失	H_2O、CO_2、SO_3、CO_2F、SO_3F
电荷态限制	1–2
对齐 RT 容差	0.1 min
对齐质量数容差	5 mDa/20 ppm
MFE 评分 ≥	70
MFE 过滤器匹配（取决于实验设计）	至少一个样品组中 50% 的文件
预期数据变化 MS 质量数	2.0 mDa，5.6 ppm
预期数据变化 MS 同位素丰度	7.5%
MS/MS 质量数	5.0 mDa，7.5 ppm
保留时间	0.115 min
峰过滤器，绝对峰高 ≥	600
评分 (Tgt) ≥	50
化合物必须符合选中的按离子过滤器查找标准	至少一个样品组中 50% 的文件

在 Profinder 中对文件进行递归峰识别后，将结果导出为 CSV 特征表。将新列中的 *m/z* 值（中性质量数）转换为 FluoroMatch Modular 所需的 $[M-H]^-$ *m/z* 值列（因为 FluoroMatch Modular 需要加合物 *m/z* 值，而不是中性 *m/z* 值）。使用 Microsoft Excel 公式减去 1.00783（H 质量）并加上 0.00055（电子质量）。同时添加了列标题行 ID，并使用 Excel 向下填充操作，从 Excel 表的第一行到最后一行以简单的数字顺序（1、2、3）分配特征编号。使用文件名末尾的“_Neg.csv”保存结果表。使用五次迭代进样运行 msconvert（ProteoWizard 工具），并使用安捷伦 .d 文件的手册中的参数将其转换为 .ms2 格式。唯一的例外是将阈值峰过滤器（绝对）设置为 30 次。将所有 .ms2 文件和特征表 (.csv) 均放入桌面上的输入文件夹中。

随后在文本编辑器中打开 FluoroMatch 下载中的 FluoroMatch Modular 脚本 (FluoroMatch-2.6\FluoroMatch_Modular\FluoroMatch_Modular_2o6.r)，并将其复制和粘贴到 FluoroMatch distribution 中所包含的 R（3.3.3 版）中 (FluoroMatch-2.6\Background_Files_FluoroMatch_Flow\FluoroMatch_Flow\R-3.3.3\bin\x64\Rgui.exe)。表 5 显示了 FluoroMatch Modular 使用的参数。

表 5. Innovative Omics FluoroMatch Modular 参数

FluoroMatch Modular 参数	值
m/z ppm 窗口（MS/MS 确认标准）	30 (± 15 ppm)
RT 窗口（用于将 MS/MS 扫描与特征对齐）	0.1 min
分离窗口（用于将 MS/MS 扫描与特征对齐）	0.4 Da
最低扫描次数（用于 MS/MS 标注）	1
最低强度（用于 MS/MS 标注）	30

运行两种工作流程（带 Profinder 的 FluoroMatch Modular，以及 FluoroMatch Flow）后，将所得文件导入 FluoroMatch Visualizer 中：NegIDed_FIN.csv（按同系物和标注置信度组织的最终标注的特征表）和 Neg_rawMSMS.csv（带标注的 MS/MS 谱图）。请注意，Power BI FluoroMatch Visualizer 文件可在 FluoroMatch Suite distribution 中找到 (FluoroMatch-2.6\FluoroMatch_Visualizer\ 2022_05_01_Visualizer_v9_FIN.pbix)。Microsoft Power BI Desktop 可免费下载和安装，并在使用前必须单独安装。在 Power BI FluoroMatch Visualizer 文件中，将数据导入 Power Query 编辑器主页选项卡的 Data Source Settings（数据源设置）下。

请注意，分析数据的用户 (JPK) 对于样品中添加无标记标准品的事实不知情。因此，可以计算软件的真实假阴性率和假阳性率，并使用 FluoroMatch Visualizer 进行人工审查。

结果与讨论

使用迭代 MS/MS、先进的 Q-TOF LC/MS 技术和 FluoroMatch Suite 发现血清中的新型或很少筛查的 PFAS

在使用和不使用 Profinder 运行软件（见“方法”）并使用 FluoroMatch Visualizer 进行手动验证后，为五个同系列的 29 种 PFAS 分配了高置信度（表 4）。在 29 个高置信度标注中，21 个是加标标准品，4 个是来自标准品溶液的污染物，4 个可能是内源性化合物。使用 Profinder 后所得 FluoroMatch Visualizer 结果如图 1 所示。这些系列被鉴定为氟调聚物全氟烷基磺酸 (FTS)、全氟烷基羧酸 (PFCA)、全氟烷基醚羧酸 (PFECA)、全氟烷基磺酸 (PFSA) 和全氟烷基醚磺酸。其中，PFAS 的一种 C4 异构体和三种 PFECA 均为内源性化合物（表 4）。使用 6546 LC/Q-TOF 和 FluoroMatch Suite，首次在人血清中发现了其中一些新型化学物质，包括之前已经介绍的干血斑的潜在局限性和优势。在三种 PFECA 中，有的物质很少观察到，有的物质之前在血清中未观察到。使用迭代 MS/MS 时，MS/MS 包含的特征与仅使用单一数据依赖型分析相比增加 14%（MS/MS 包含 523 个特征中的 73 个）。这 73 个特征中的 39 个具有某些 PFAS 相关 MS/MS 证据（潜在含氟碎片）。

Profinder 和 FluoroMatch Flow (MZMine) 结果的比较

空白过滤后，在 Profinder 中检测到 1921 个特征；使用 FluoroMatch Flow（在背景中部署 MZmine 和递归峰识别）检测到 17301 个特征。特征数量的差异巨大，但可能归因于各软件对特征的分组方式。Profinder 使用化合物组，而 MZmine 则报告单个特征。将 Profinder 特征组与 Fluoromatch Modular 配合使用，与 FluoroMatch Flow 相比，所得假阴性率（遗漏标准品标注）更低。将 FluoroMatch 与 Profinder 结合时，100% 的加标标准品得到标注，表明具有已知结构的 PFAS 的假阴性率为 0%。对于 FluoroMatch Flow，C14 PFCA 未得到峰识别，因此计算出的假阴性率为 5% (20/21)。两种软件工作流程的未加标标准品覆盖范围也相似。在使用 FluoroMatch Flow 发现的 29 种经手动验证的 PFAS 中，仅有两种未使用 Profinder 得到峰识别，这两种均为痕量（未完全形成的）峰。它们是 C6 PFSA 异构体（来自标准品的污染物）和 C4 PFECA 异构体（可能是内源性的，见表 6）。

关于假阳性（未进行手动验证时），Profinder（与 FluoroMatch Modular 结合使用）优于 FluoroMatch Flow。使用 Profinder 工作流程获得一个假阳性结果，将该假阳性结果鉴定为不符合正确保留时间和 *m/z* 模式的带标注的 C4 PFCA 异构体（图 2；表 4）。因此，获得的假阳性率约为 4% (1/28)。相比之下，在不经手动验证的情况下，FluoroMatch Flow 标注三种不符合正确保留时间和 *m/z* 趋势的化合物，并标注出九种作为源内碎片的化合物 (PFCs)。因此，FluoroMatch Flow 的假阳性率为 30%。值得注意的是，当使用 FluoroMatch Visualizer 手动验证软件标注时，两种工作流程的假阳性率均为 0%。另外值得注意的是，对于自动分配 2 级 Schymanski 评分（FluoroMatch 中的评分 A）的化合物，两种工作流程的假阳性率均为 0%；假阳性仅发生在考虑标注置信度较低系列的成员时。

表 6. 由 Agilent MassHunter Profinder 软件（用 Innovative Omics FluoroMatch Modular (FM) 列出）得到的带有经手动验证的标注的特征与 FluoroMatch Flow 结果的比较

化学类别	Profinder + FM			FluoroMatch Flow		
	分子式	*m/z*	RT	分子式	*m/z*	RT
全氟烷基羧酸 (PFCA)	$C_4HF_7O_2$*	212.9792	2.0	$C_4HF_7O_2$*	212.9791	2.0
	$C_4HF_7O_2$	**212.9792**	**4.6**	**$C_4HF_7O_2$**	**212.9792**	**4.6**
	$C_5HF_9O_2$*	262.9758	4.3	$C_5HF_9O_2$*	262.9759	4.3
	$C_6HF_{11}O_2$*	312.9727	5.3	$C_6HF_{11}O_2$*	312.9727	5.3
	$C_7HF_{13}O_2$*	362.9696	6.1	$C_7HF_{13}O_2$*	362.9696	6.1
	$C_8HF_{15}O_2$*	412.9663	6.8	$C_8HF_{15}O_2$*	412.9662	6.8
	$C_9HF_{17}O_2$*	462.9630	7.5	$C_9HF_{17}O_2$*	462.9630	7.5
	$C_{10}HF_{19}O_2$*	512.9601	8.1	$C_{10}HF_{19}O_2$*	512.9599	8.1
	$C_{11}HF_{21}O_2$*	562.9565	8.8	$C_{11}HF_{21}O_2$*	562.9567	8.8
	$C_{12}HF_{23}O_2$*	612.9533	9.3	$C_{12}HF_{23}O_2$*	612.9532	9.3
	$C_{13}HF_{25}O_2$*	662.9503	9.7	$C_{13}HF_{25}O_2$*	662.9502	9.7
	$C_{14}HF_{27}O_2$*	**712.9470**	**10.0**			
全氟烷基磺酸 (PFSA)	$C_4HF_9O_3S$*	298.9429	5.1	**SO_3HF**	**98.9556**	**5.8**
	$C_4HF_9O_3S$	298.9429	5.4	$C_4HF_9O_3S$*	298.9429	5.1
	$C_5HF_{11}O_3S$*	348.9396	6.3	$C_4HF_9O_3S$	298.9429	5.4
	$C_6HF_{13}O_3S$*	398.9365	7.1	$C_5HF_{11}O_3S$*	348.9397	6.3
	$C_7HF_{15}O_3S$*	448.9332	7.8	$C_6HF_{13}O_3S$*	398.9364	7.1
	$C_8HF_{17}O_3S$§	498.9301	8.2	**$C_6HF_{13}O_3S$§**	**398.9364**	**6.9**
	$C_8HF_{17}O_3S$*	498.9302	8.5	$C_7HF_{15}O_3S$*	448.9333	7.8
	$C_9HF_{19}O_3S$*	548.9270	9.1	$C_8HF_{17}O_3S$§	498.9300	8.2
	$C_{10}HF_{21}O_3S$*	598.9237	9.6	$C_8HF_{17}O_3S$*	498.9301	8.5
				$C_9HF_{19}O_3S$*	548.9268	9.1
				$C_{10}HF_{21}O_3S$*	598.9236	9.5
全氟聚醚羧酸 (PFECA)	$C_4HF_7O_3$	228.9743	3.1	**$C_4HF_7O_3$**	**228.9739**	**3.5**
	$C_5HF_9O_3$	278.9710	4.7	$C_4HF_7O_3$	228.9741	3.1
				$C_5HF_9O_3$	278.9708	4.7
全氟聚醚磺酸 (PFESA)	$C_3HF_7O_4S$§	264.9409	4.6	**CHF_3O_4S**	**164.9507**	**4.3**
	$C_4HF_9O_4S$§	314.9381	5.8	$C_3HF_7O_4S$§	264.9411	4.6
				$C_4HF_9O_4S$§	314.9383	5.8
氟调聚物全氟烷基磺酸 (FTS)	$C_6H_5F_9O_3S$*	326.9741	5.0	$C_6H_5F_9O_3S$*	326.9740	5.0
	$C_8H_5F_{13}O_3S$*	426.9677	6.6	$C_8H_5F_{13}O_3S$*	426.9677	6.6
	$C_{10}H_5F_{17}O_3S$*	526.9614	7.9	$C_{10}H_5F_{17}O_3S$*	526.9613	7.9
全氟化碳 (PFC)				**C_2F_9H**	118.9926	4.6
				C_3F_9H	168.9894	2.0
				C_4F_9H	218.9861	4.3
				C_5F_9H	268.9830	5.3
				C_6F_9H	318.9797	6.1
				C_7F_9H	368.9765	6.8
				C_8F_9H	418.9732	7.5
				C_9F_9H	468.9701	8.1
				$C_{10}F_9H$	518.9667	8.7

粗体黑色文本表示工作流程特有的值。**蓝色**表示假阳性特征（不属于系列或为源内碎片 (PFC)）。

* 将标准品添加至样品中以表示假阴性率和假阳性率

§ 属于来自标准品的污染物的标注化合物

注：如果不带符号，则化合物可能是 DBS 中的内源性化合物

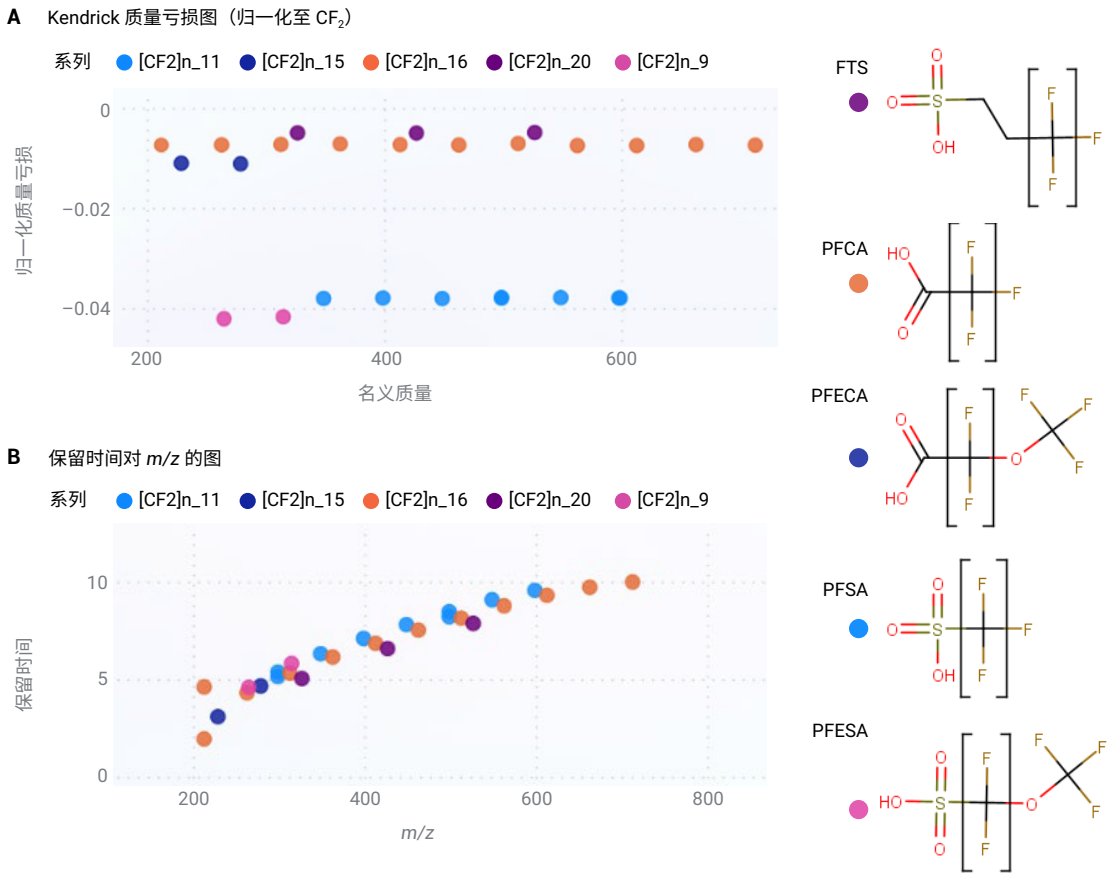


图 2. 对于带有最高置信度标注的系列，由 Innovative Omics FluoroMatch Visualizer 得到的归一化至 CF_2 的质量亏损对名义质量的图（图 2A），以及保留时间对 *m/z* 的图（图 2B）。数据来自 Agilent MassHunter Profinder 软件峰识别与 FluoroMatch Modular 标注/同系物分组

使用 Profinder 的主要假阳性率降低的原因在于 Profinder 结合了二聚体、加合物和其他 ESI 相关伪峰，以确保得到良好的峰和同位素行为并排除重复。Profinder 算法可显著简化所得数据集，无条件实现全面覆盖。例如，在使用 FluoroMatch Flow 进行峰识别之后将系列指定为全氟化碳。确定该系列是由 PFCA 源内碎裂产生的（图 3），而 Profinder 消除了这些伪峰。图 4 显示了按可靠的归属和化学系列过滤后简化的 PFAS 系列可视化结果。虽然在两个工作流程中检测到的可靠系列的数量几乎相同，但 FluoroMatch Flow 显示出更多不成系列的独立特征和其他未标注特征，表明假阳性率更高。

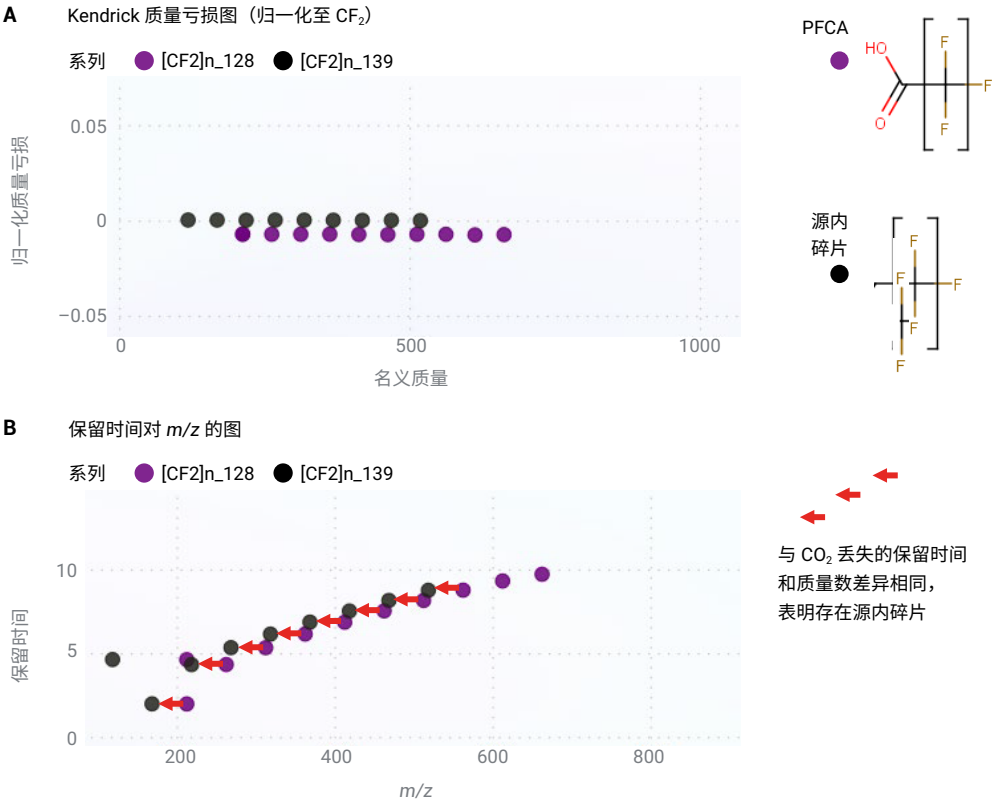


图 3. Agilent MassHunter Profinder 软件可去除源内伪峰（加合物、二聚体、源内碎片等），从而降低假阳性（包括误标注的作为 PFCA 的源内碎片的 PFC）的可能性。这些图是 Innovative Omics FluoroMatch Visualizer 输出结果（手动添加红色箭头）。在 Profinder（图 2）中，去除伪峰后未保留 PFC 特征

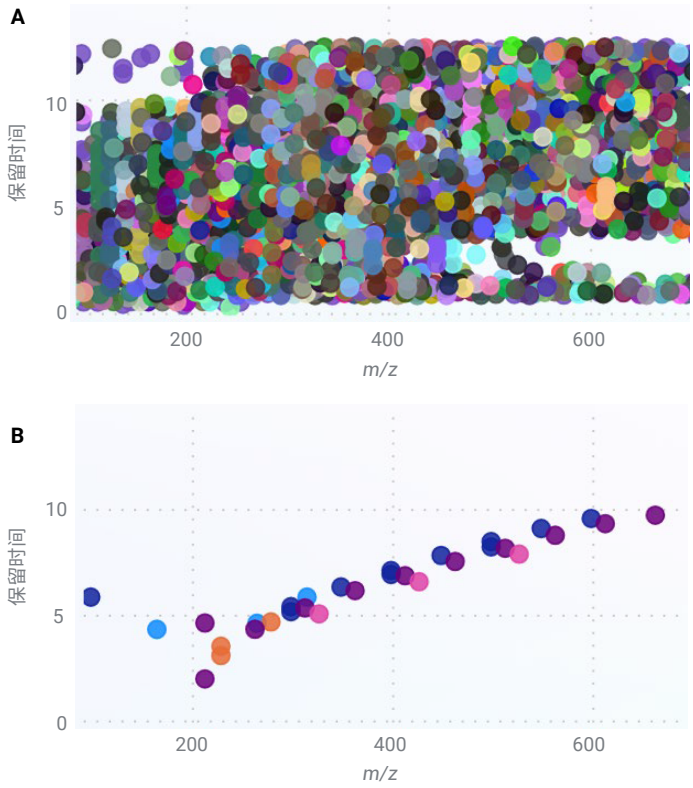


图 4. 保留时间对 *m/z* 空间的所有特征的图 (A)；以及保留时间对仅富含 PFAS 的质量亏损区域的特征（形成使用 Agilent MassHunter Profinder 软件进行峰识别，通过 FluoroMatch Modular 分配得到的可靠的系列）的图 (B)

结论

Innovative Omics FluoroMatch Suite 涵盖了 PFAS 数据处理工作流程的所有步骤。将其工具应用于 Agilent 6546 LC/Q-TOF 采集过程时，开发出一种全面而准确的工作流程，用于在干血斑样品卡中发现新型 PFAS 以及之前筛查的 PFAS。用户可通过将其安捷伦 .d 文件拖动到用户界面上并单击 **Start**（开始），将 FluoroMatch Flow 用作一体化解决方案。或者，用户可使用带有优化参数或本应用简报中所述参数的 Agilent MassHunter Profinder 软件进行峰识别，并使用 FluoroMatch Modular 和 FluoroMatch Visualizer 进行 PFAS 的同系物检测、标注和可视化。两种工作流程的性能相似，但 Profinder 算法显著减少了伪峰和假阳性的数量，提高了探索数据的便利性。

数据集和软件可用性

FluoroMatch Suite 可通过以下网址下载：
innovativeomics.com/software

交互式数据集可通过以下网址访问：
innovativeomics.com/datasets 和
https://medicine.yale.edu/lab/pollitt/projects/pfas/

原始 6546 (.d) 谱图文件可通过以下网址访问：

ftp://massive.ucsd.edu/MSV000091786/

（使用 FileZilla 或其他 FTP 客户端）

参考文献

1. Aro, R.; Carlsson, P.; Vogelsang, C.; Kaerrman, A.; Yeung, L. W. Fluorine Mass Balance Analysis of Selected Environmental Samples from Norway. *Chemosphere* **2021**, *283*, 131200
2. Interstate Technology Regulatory Council Web Page. 7 Human and Ecological Health Effects of select PFAS – PFAS — Per- and Polyfluoroalkyl Substances (itrcweb.org)
3. Miaz, L. T.; Plassmann, M. M.; Gyllenhammar, I.; Bignert, A.; Sandblom, O.; Lignell, S.; Glynn, A.; Benskin, J. P. Temporal Trends of Suspect-and Target-Per/Polyfluoroalkyl Substances (PFAS), Extractable Organic Fluorine (EOF) and Total Fluorine (TF) in Pooled Serum from First-Time Mothers in Uppsala, Sweden, 1996–2017. *Environ. Sci. Process Impacts* **2020**, *22(4)*, 1071–1083
4. Koelmel, J. P.; Stelben, P.; McDonough, C. A.; Dukes, D. A.; Aristizabal-Henao, J. J.; Nason, S. L.; Li, Y.; Sternberg, S.; Lin, E.; Beckmann, M.; et al. FluoroMatch 2.0—Making Automated and Comprehensive Non-Targeted PFAS Annotation a Reality. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *414(3)*, 1201–1215
5. Koelmel, J. P.; Paige, M. K.; Aristizabal-Henao, J. J.; Robey, N. M.; Nason, S. L.; Stelben, P. J.; Li, Y.; Kroeger, N.M.; Napolitano, M.P.; Savvaides, T.; et al. Toward Comprehensive Per-and Polyfluoroalkyl Substances Annotation using Fluoromatch Software and Intelligent High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Acquisition. *Anal. Chem.* **2020**, *92(16)*, 11186–11194
6. Koelmel, J. P.; Stelben, P.; Godri, D.; Qi, J.; McDonough, C. A.; Dukes, D. A.; Aristizabal-Henao, J. J.; Bowden, J.A.; Sternberg, S.; Rennie, E.E.; et al. Interactive Software for Visualization of Nontargeted Mass Spectrometry Data—FluoroMatch Visualizer. *Exposome* **2022**, *2(1)*, osac006
7. Koelmel, J. P.; Lin, E. Z.; Parry, E.; Stelben, P.; Rennie, E. E.; Pollitt, K. J. G. Novel Perfluoroalkyl Substances (PFAS) Discovered in Whole Blood using Automated Non-Targeted Analysis of Dried Blood Spots. *Sci. Total Environ.* **2023**, *883*, 163579

查找当地的安捷伦客户中心：
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

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA45348.6518518518

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024

2024 年 3 月 11 日，中国出版
5994-7023ZHCN

Agilent
Trusted Answers