

# 采用 EPA 1633 方法指南测定罗非鱼组织中的 40 种 PFAS

使用 Agilent Captiva EMR PFAS Food II 通过式净化和 LC/MS/MS 检测

## 作者

Limian Zhao, Emily Parry  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本应用简报介绍了罗非鱼组织中 40 种残留全氟和多氟烷基化合物 (PFAS) 多组分分析方法的开发与验证。该方法首先进行 QuEChERS 萃取，随后使用 Agilent Captiva EMR PFAS Food II 小柱进行增强型基质去除 (EMR) 混合模式通过式净化，最后进行 LC/MS/MS 检测。该方法的样品前处理过程简单、高效，LC/MS/MS 检测灵敏度高，且使用纯标准品校准曲线实现了可靠定量。按照美国国家环境保护局 (EPA) 1633 方法指南对该方法进行了验证，各项结果均满足方法质量控制要求。与 EPA 1633 中的传统弱阴离子交换 (WAX) 固相萃取 (SPE) 方法和改进的碳/WAX SPE 方法相比，该方法显著提升了定量准确度与精度，同时节省了 80% 以上的样品前处理时间和成本。

## 前言

测定组织中（尤其是鱼类）的 PFAS 残留是监测和管理环境中 PFAS 残留的重要途径。2021 年，EPA 发布了方法 1633，采用 LC/MS/MS<sup>[1]</sup> 对水基质、固体、生物固体和组织样品中的 40 种 PFAS 目标物进行定量分析。PFAS 化合物含有酸性基团，在负离子模式下能够轻松且高效地实现电离，可显著提升方法灵敏度和选择性。该方法使用稳定同位素标记内标 (ISTD) 进行定量，利用纯标准品建立的校准曲线即可实现可靠的定量分析。方法中采用了两组内标：萃取内标 (EIS) 和非萃取内标 (NIS)。EIS 化合物包括 24 种同位素标记 PFAS 化合物，用于 PFAS 目标物定量。在萃取之前，将 EIS 加标溶液直接加入到样品基质中，以便通过 EIS 标准品全程追踪 PFAS 目标物在样品前处理过程中的回收情况。NIS 化合物包括七种不同的同位素标记 PFAS 化合物，用于计算 EIS 回收率。NIS 溶液直接加入到最终样品提取物中，仅用于评估基质效应。

基于 WAX 聚合物吸附剂的 SPE 方法已广泛应用于多种 EPA 方法，以进行水、土壤和其他环境介质的 PFAS 分析；这些方法包括 2009 年和 2019 年发布的 EPA 533 方法<sup>[2,3]</sup>（用于测定饮用水中 PFAS 目标物）、EPA 2021 年发布的多行业全氟和多氟烷基物质 (PFAS) 研究初步报告<sup>[4]</sup>，以及 2021 年发布的 EPA 1633 方法<sup>[1]</sup>（用于水、固体、生物固体及组织样品中的 PFAS 分析）。WAX SPE 方法为水样 PFAS 分析的样品前处理提供了一种稳健、可靠的解决方案，但在处理复杂的固体组织样品时仍面临挑战。组织样本需要首先使用有机溶剂（例如甲醇 (MeOH) 或乙腈 (ACN)）进行萃取，接着需要对粗提物进行溶剂切换，将基质由高含量有机相转换为高含量水相，但这一过程通常涉及干燥和复溶步骤或需要用大量水进行稀释。完成上述操作后，才能继续进行典型的 SPE 流程，即活化-平衡-上样-清洗-洗脱。无论是溶剂切换还是 SPE 流程，都会使整个方法变得既耗时又繁琐。

已有文献报道了使用 QuEChERS 萃取进行食品样品 PFAS 分析<sup>[5,6]</sup>。与 EPA 方

法 1633 中的碱性甲醇消解和萃取流程相比，QuEChERS 萃取法将萃取时间从约 20 小时缩短至约 1 小时，所用有机溶剂减少了约 80%，且萃取效率更高。Captiva EMR PFAS Food II 小柱专门针对动物源性食品基质中的 PFAS 分析而开发和优化。将 QuEChERS 萃取得到的粗提物按 10% 比例加水稀释后，通过 Captiva EMR PFAS Food II 小柱进行通过式净化。粗提物中的各种化合物与吸附剂发生混合模式相互作用，其中 PFAS 目标物可顺利通过小柱，而不需要的基质共萃取物则被保留在小柱上。该方法已经过验证，可用于动物源性食品基质中 PFAS 的分析<sup>[7,8]</sup>。

本研究的目的是将该方法应用于鱼组织中 40 种 PFAS 的分析，并根据 EPA 1633 方法指南进行验证，确保满足验收标准。考虑到环境组织分析方法定量限 (LOQs) 的要求有所不同，本研究对此前食品分析中的样品前处理方法<sup>[7]</sup>进行了相应调整，省略了干燥步骤，从而节省了时间。采用 Agilent 6495D 三重四极杆液质联用系统进行 LC/MS/MS 检测和定量，并根据样品的差异对仪器条件进行了调整。

## 实验部分

### 化学品与试剂

EPA 1633 天然 PFAS、EIS 和 NIS 储备液均购自 Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)。储备液中化合物的浓度各不相同，具体见附录表 1。甲醇、乙腈和异丙醇 (IPA) 购自 VWR (Radnor, PA, USA)。乙酸、乙酸钠、氢氧化铵和氢氧化钾均购自 MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)。

### 溶液与标准品

用甲醇稀释相应的储备液来制备天然 PFAS、EIS 和 NIS 加标溶液。加标溶液中天然 PFAS 目标物的浓度  $\geq 25$  ng/mL (以甲醇为溶剂)。EIS 加标溶液 I 和 II 中 EIS 化合物的浓度分别为  $\geq 5$  ng/mL (以甲醇为溶剂) 和  $\geq 25$  ng/mL (以甲醇为溶剂)。NIS 加标溶液中 NIS 化合物浓度为  $\geq 5$  ng/mL (以甲醇为溶剂)。加标溶液的标示浓度对应于储备液中最低浓度的化合物。混合溶液中其他化合物的浓度根据其于在储备液中的相应浓度 (详见附录表 1) 成比例增加。

使用天然 PFAS 加标溶液、EIS 加标溶液 I 和 NIS 加标溶液制备校准曲线纯标准溶液，其中天然 PFAS 目标物的浓度为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5、5.0 和 10.0 ng/mL，EIS 的浓度为 0.1 ng/mL，NIS 的浓度为 0.1 ng/mL，基质为含有 1% 乙酸的乙腈萃取溶剂。同样，上述浓度对应于储备液中最低浓度的化合物。混合物中其他化合物的浓度则根据其于在储备液中的相应浓度成比例

增加。所有校准标样溶液制备完成后，按 10% 比例加水稀释，充分混匀后进行 LC/MS/MS 检测。此步骤对应于样品在 EMR 小柱净化过程中额外引入的 10% 比例稀释。

所有标准溶液均储存于 4 °C，使用时间不超过两周。使用前，溶液需充分恢复至室温。可适当超声处理以加速标准溶液回温。在进行常规校准曲线标准溶液分析时，将一份校准溶液转移到另一组带有聚丙烯 (PP) 内插管的样品瓶中，随后进行仪器进样。

在 990 mL 乙腈中加入 10 mL 冰乙酸，制备含 1% 乙酸的乙腈萃取溶剂，并于室温下储存。液相色谱流动相 A 为 5 mM NH<sub>4</sub>OAc 水溶液，流动相 B 为 ACN。针头清洗溶剂包括 IPA、水和 ACN。

### 仪器与材料

本研究使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统进行，该液相色谱系统包括 Agilent 1290 Infinity II 二元泵 (G4220A)、Agilent 1290 Infinity II 高性能自动进样器 (G4226A) 和 Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G1316C)。该液相色谱系统与配备安捷伦喷射流 iFunnel 电喷雾离子源 (ESI) 的安捷伦三重四极杆液质联用系统 (G6495D) 联用。采用 Agilent MassHunter 工作站软件进行数据采集和分析。

用于样品前处理的其他仪器包括：

- Centra CL3R 离心机 (Thermo IEC, MA, USA)

- Geno/Grinder (Metuchen, NJ, USA)
- Multi Reax 试管振荡器 (Heidolph, Schwabach, Germany)
- 移液管和重复用移液器 (Eppendorf, NY, USA)
- 安捷伦正压 48 孔处理装置 (PPM-48; 部件号 5191-4101)
- 超声波清洗池 (VWR, PA, USA)

使用 Agilent InfinityLab 无 PFC HPLC 转换工具包 (部件号 5004-0006) 对 1290 Infinity II 液相色谱系统进行了改进，该工具包中包括 InfinityLab PFC 延迟柱 (4.6 × 30 mm, 部件号 5062-8100)。色谱分离采用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱 (95Å, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm, 部件号 959758-902) 和安捷伦 UHPLC 保护柱 (部件号 821725-901)。

所用样品前处理及其他消耗品包括：

- Agilent Bond Elut QuEChERS EN 萃取试剂盒，EN 15662 方法，缓冲盐，陶瓷均质子 (部件号 5982-5650CH)
- Agilent Captiva EMR PFAS Food II 小柱，6 mL，750 mg (部件号 5610-2232)
- PP 卡口盖和样品瓶，1 mL (部件号 5182-0567 和 5182-0542)
- PP 螺口盖型样品瓶和瓶盖，2 mL (部件号 5191-8121 和 5191-8151)
- 试管和管盖，50 mL，50/包 (部件号 5610-2049)
- 试管和管盖，15 mL，100/包 (部件号 5610-2039)

研究中使用的所有消耗品均经过测试和验证，确保 PFAS 残留符合要求。

## LC/MS/MS 仪器条件

表 1. 用于 LC/MS/MS 的液相色谱泵条件

参数	设置			
流动相 A	5 mM NH <sub>4</sub> OAc 水溶液			
流动相 B	ACN			
梯度	时间 (min)	A%	B%	流速 (mL/min)
	0.00	90	10	0.400
	2.00	70	30	0.400
	8.50	55	45	0.400
	11.50	25	75	0.400
	13.25	0	100	0.460
停止时间	15.50 min			
后运行时间	2.0			

表 2. 用于 LC/MS/MS 的 LC Multisampler 程序

参数	设置				
进样程序	- 吸取 15.00 µL 水				
	- 吸取 5.00 µL 样品				
	- 根据方法中的规定清洗针头				
	- 吸取 10.00 µL 水				
	- 吸取 10.00 µL 空气, 混合五次				
	- 进样				
多重清洗	步骤	溶剂	时间 (s)	针座反冲洗	进样针清洗
	1	IPA	10	启用	启用
	2	ACN	10	启用	启用
	3	水	10	启用	启用

**液相色谱柱温箱:** 恒温, 温度为

55 ± 0.8 °C。

**质谱仪 (MS) 采集参数:** 负离子模式, 恒定的碎裂电压 (166 V), iFunnel 标准模式。

**ESI 离子源设置:**

- 干燥气: 200 °C, 18 L/min
- 鞘气: 300 °C, 11 L/min
- 雾化器气体压力: 15 psi
- 毛细管电压: 2500 V (负) 和 3000 V (正)
- 喷嘴电压: 0 V (负) 和 1500 V (正)

PFAS 目标物、EISs、NISs 和胆酸的 MS 采集条件源自用于 LC/TQ 的安捷伦 PFAS MRM 数据库 (部件号 G1736AA)。

## 样品前处理流程

新鲜罗非鱼片购自当地超市。将样品在 -20 °C 下冷冻 1-2 小时后切成小块, 然后采用机械匀浆机将冷冻鱼片碎块制成匀浆。将鱼糜匀浆保存于 -20 °C 备用。

取 5 g 鱼糜匀浆样品, 置于 50 mL PP 离心管中。向所有预加标质量控制样品 (QCs) 中加入适量 PFAS 标准品和 EIS, 基质零空白样 (MBs) 仅添加 EIS。对于程序空白样 (PBs), 仅添加 5 mL 水和 EIS。

表 3 给出了预加标样品的加标详情。由于样品前处理过程中引入了 2 倍稀释倍数, 最终提取物中的目标物浓度为原始样品的 50%。为确保使用之前制备的校准曲线获得准确的定量结果, 必须使理论 EIS 和 NIS 浓度与校准标样溶液中的浓度保持一致, 即最终 ACN 提取物中的 EIS 和 NIS 浓度为 0.1 ng/mL。在 EMR 净化之前, 将样品 ACN 提取物按 10% 的比例加入水, 这一步已通过向校准曲线标准溶液加入 10% 的水进行了匹配 (请参见前文“溶液与标准品”), 因此无需额外考虑其对样品浓度的影响。表 3 所列浓度为储备液中浓度最低的目标物和 EIS 化合物的浓度。其他目标物或 EIS 化合物的浓度根据其在储备液中的原始浓度成比例增加。

样品加标后, 将所有样品涡旋 2 至 3 分钟以达到平衡状态, 随后即可按照图 1 所示流程进行萃取操作。

样品经萃取和净化程序后, 移取 1.111 mL 样品至 2 mL PP 样品瓶中 (相当于 1 mL 样品 ACN 提取物)。然后, 加入 20 µL NIS 加标溶液 (5 ng/mL), 盖紧瓶盖后涡旋混匀 10-20 秒。此操作使样品中的 NIS 浓度与校准曲线标准溶液保持一致。至此, 所有样品均已完成 LC/TQ 分析前的准备工作。

表 3. 预加标样品中加入的天然 PFAS 目标物和 EIS 化合物

样品	天然 PFAS 目标物加标				EIS 化合物加标				重复样 (N)
	加标溶液和浓度 (ng/mL)	加标体积 (μL)	样品中浓度 (μg/kg)	样品提取物中浓度 (ng/mL)	加标溶液和浓度 (ng/mL)	加标体积 (μL)	样品中浓度 (μg/kg)	样品提取物中浓度 (ng/mL)	
PB	NA	NA	NA	NA	EIS 加标溶液 II (25 ng/mL)	40	0.2	0.1	3
MB	NA	NA	NA	NA		40	0.2	0.1	7
QC-LOQ	PFAS 加标溶液 (25 ng/mL)	10	0.05	0.025		40	0.2	0.1	6
QC-低浓度 (4x LOQ)		40	0.2	0.1		40	0.2	0.1	6
QC-中浓度 (40x LOQ)	PFAS 储备液 (250 ng/mL)	40	2	1		40	0.2	0.1	6

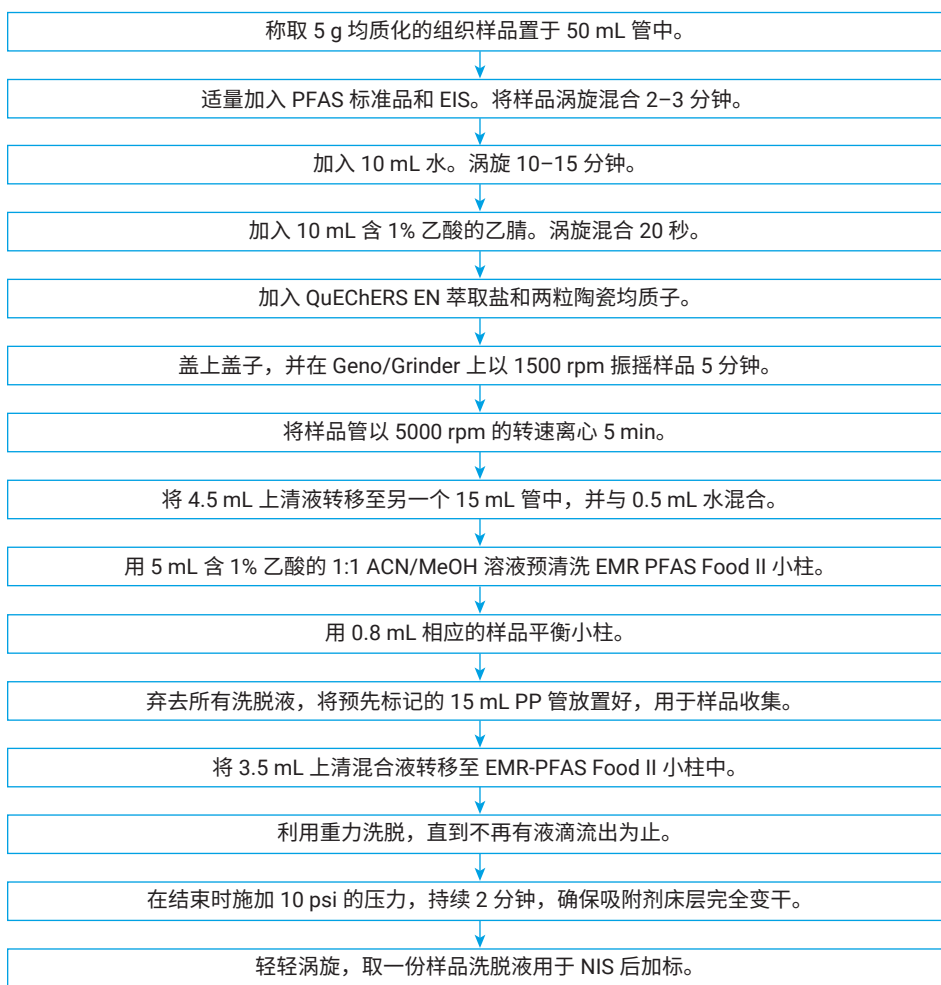


图 1. 采用 QuEChERS 萃取，随后使用 Agilent Captiva EMR PFAS Food II 小柱进行 EMR 混合模式通过式净化的样品前处理流程

在与传统 EPA 1633 样品前处理方法的比较研究中，我们对两种方法进行了测试：原始方法首先进行碱性 MeOH 萃取，然后进行碳分散 SPE (dSPE) 和 WAX SPE 小柱净化处理；改进方法则在相同的样品萃取步骤后，使用双相碳/WAX SPE 小柱进行净化处理。原始方法的前处理流程严格按照 EPA 1633 方法中的步骤进行<sup>[1]</sup>。对于改进的 SPE 方法，前处理流程与原始方法类似，但有两处调整。首先是省略了碳材料分散净化步骤。其次，在 SPE 步骤中使用碳/WAX 双相 SPE 小柱替代了原来的 WAX SPE 小柱。在比较研究中，仅 MB 和 QC-LOQ 制备了四份重复样。由于 SPE 方法引入了 2.5 倍的稀释倍数，且 SPE 步骤后的最终样品溶剂为甲醇，因此另外用甲醇配制了一组校准曲线标准溶液，用于比较样品定量结果。除了将第一个标准溶液调整为 0.02 ng/mL，以匹配 QC-LOQ 样品经 SPE 处理引入的 2.5 倍稀释倍数外，其余所有校准曲线标准溶液的浓度均保持不变。

## 结果与讨论

### LC/TQ 仪器方法

本研究采用的 MS 检测方法参考之前的研究<sup>[7,8]</sup>，但在其基础上增加了来自安捷伦 PFAS MRM 数据库的更多目标物和 ISTD 化合物。液相色谱方法则进行了更多调整。虽然 LC 方法仍使用与前述研究相同的 LC 色谱柱，但流动相 B、梯度和进样程序均进行了调整。经调整优化的 LC 方法使天然目标物、EIS 和 NIS 化合物在采集窗口内的色谱分布更加理想。同时，它

还改善了部分目标物与其异构体之间的色谱分离效果，实现了 PFOS 与胆酸干扰物的基线分离。图 2 分别展示了所有目标物、EIS 和 NIS 峰的色谱图及部分定性结果 (A)，以及 PFOS 异构体和胆酸干扰物的色谱图 (B)，可以看出，在保留时间窗口内峰的分布更加理想，关键目标物与潜在基质干扰物实现了基线分离。

### 样品前处理流程

本方法采用 QuEChERS 萃取，结合 Captiva EMR PFAS Food II 小柱的 EMR

混合模式通过式净化，大幅简化了整个样品前处理流程。采用乙腈溶剂萃取结合盐析的方法，不仅提高了萃取效率，还缩短了萃取时间。传统 EPA 1633 方法使用碱性甲醇进行萃取，萃取时间长达约 18 小时，而 QuEChERS 方法在保证萃取效率的前提下，将相同数量样品的萃取时间显著缩短至约 1 小时。盐析步骤对于极性较强的 PFAS 目标物的萃取起着至关重要的作用，同时也有助于去除基质中的极性较强的 PFAS 目标物的萃取起着至关重要的作用，同时也有助于去除基质中的极性较强的 PFAS 目标物的萃取起着至关重要的作用。

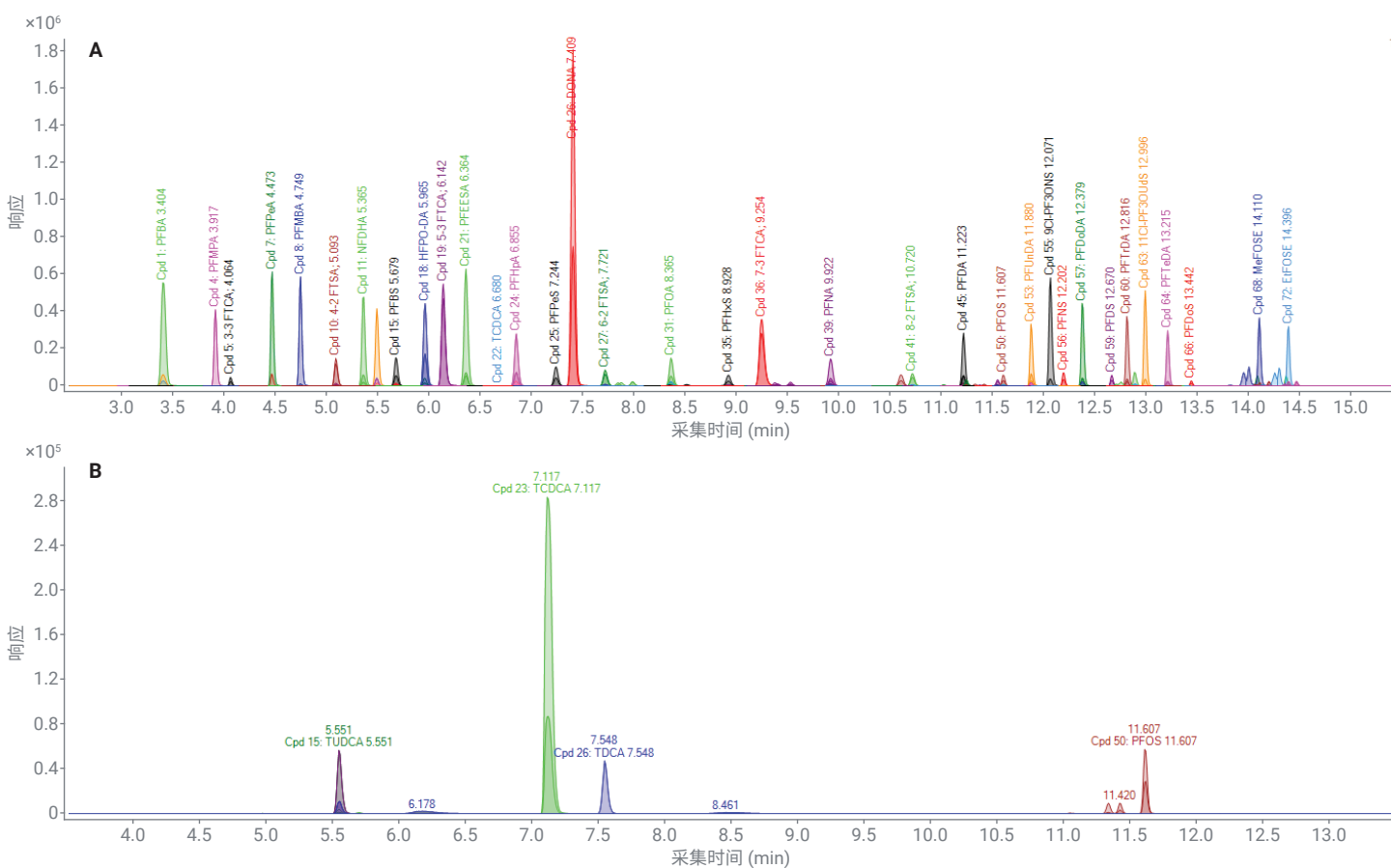


图 2. 所有 PFAS 目标物、EIS 和 NIS 化合物的 MRM 色谱图 (A)，以及 PFOS (RT = 11.607 min) 和胆酸的 MRM 色谱图 (B)，即 TUDCA (RT = 5.551 min)、TCDOCA (RT = 7.117 min) 和 TDCA (RT = 7.548 min)

QuEChERS 萃取后，将 ACN 粗提取物按 10% 的比例加入水进行混合，然后在 Captiva EMR PFAS Food II 小柱上进行通过式净化。洗脱液可直接进样进行 LC/TQ 分析。样品净化过程中不涉及干燥步骤。整个样品净化过程大约需要 1 到 2 个小时，具体取决于处理的样品数量。

样品萃取完成后，传统的 EPA 1633 方法会采用 WAX SPE 程序进一步净化样品提取物。对于采用 WAX SPE 小柱的原始方法，首先会用少量碳吸附剂对粗提取物进行进一步净化，然后进行干燥以更换溶剂介质，以备上样净化。对于改进后的方法，省略了分散碳材料净化步骤，但样品粗提取物仍需在上样净化前进行干燥。由于每个样品的总体积为 25 mL，因此干燥过程通常需要 1 到 3 个小时，具体取决于处理

的样品数量。准备好样品进行 SPE 处理后，无论是 WAX 还是碳/WAX 双相 SPE 小柱都采用相同的 SPE 程序，包括小柱预活化、平衡、上样、清洗和最终洗脱。根据处理的样品数量，整个 SPE 过程通常需要 2 到 4 个小时。SPE 程序需要使用大量有机溶剂。

表 4 比较了不同样品前处理方法在处理单个样品时的耗时、有机溶剂用量及所需的其他消耗品。为了简化方法描述，每种方法均采用基于其关键特征的缩写名称。新开发的方法用 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 表示，原始 EPA 1633 前处理方法用 Solvent<sub>ext</sub>-Carbon dSPE-WAX SPE 表示，改进方法用 Solvent<sub>ext</sub>-Carbon/WAX SPE 表示。

如表所示，传统 SPE 方法的前处理过程非常耗时，而 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 方法则大大简化了流程，节省了 80% 以上的时间。在每个样品所消耗的溶剂和化学品方面，新方法同样节省了约 80% 的溶剂和化学品。此外，新方法所节省的消耗品也超过了 50%。对于多个样品的前处理，有机溶剂和消耗品的使用量会随样品数量呈相应倍数增加。多个样品前处理所需的时间则取决于前处理流程的复杂程度，程序越复杂，耗时越长。例如，在比较研究中，分析人员使用 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 样品前处理方法处理 10 到 15 个样品，仅需约 2 至 2.5 小时。而使用传统的基于 SPE 的方法，即使处理的样品更少（8 到 10 个），也需要同一名分析人员花费 2 至 3 天才能完成。

表 4. 三种定量方法在处理单个样品时所需的时间、有机溶剂和消耗品比较

前处理主要阶段	QuEChERS <sub>ext</sub> -EMR 方法				Solvent <sub>ext</sub> -Carbon/WAX SPE 方法				Solvent <sub>ext</sub> -Carbon dSPE-WAX SPE 方法			
	主要步骤	时间 (h)	溶剂用量 (mL)	消耗品	主要步骤	时间 (h)	溶剂用量 (mL)	消耗品	主要步骤	时间 (h)	溶剂用量 (mL)	消耗品
准备工作	配制两种试剂	0.25			配制六种试剂，将玻璃毛装入 SPE 小柱中	1		玻璃毛	配制六种试剂，将玻璃毛装入 SPE 小柱中	1		玻璃毛
样品萃取	一步法 QuEChERS 萃取	0.75	10	50 mL 管 (1), 萃取盐 (1), CHs (2)	三步溶剂萃取和消解	17.5	25	15 mL 管 (1), 50 mL 管 (1)	三步溶剂萃取和消解，碳 dSPE 净化	18	25	15 mL 管 (1), 50 mL 管 (2), 碳材料 (10 mg)
过渡步骤	按 10% 的比例加入水稀释	0.25		5 mL 管 (1)	干燥和复溶，pH 值检查和调整	1.25		pH 试纸 (1-2)	干燥和复溶，pH 值检查和调整	1.25		pH 试纸 (1-2)
样品进一步萃取/净化	EMR 通过式净化	0.25		EMR 小柱 (1), 15 mL 管 (1)	碳/WAX SPE 萃取和净化	2	25	碳/WAX SPE 小柱 (1), 50 mL 上样管 (1), 连接接头 (1), 15 mL 管 (1)	WAX SPE 萃取和净化	1.25	25	WAX SPE 小柱 (1), 50 mL 上样管 (1), 连接接头 (1), 15 mL 管 (1)
样品后处理	NIS 后加标	0.25		2 mL PP 样品瓶 (1)	样品中和，NIS 后加标，样品过滤	0.5		2 mL PP 样品瓶 (1), 5 mL 注射器 (1), 针头过滤器 (1)	样品中和，NIS 后加标，样品过滤	0.5		2 mL PP 样品瓶 (1), 5 mL 注射器 (1), 针头过滤器 (1)
总计 (每个样品)		1.75	10			22.25	50			22	50	

## 定量方法

EPA 1633 定量方法基于同位素标记 EIS 和 NIS 化合物的使用，其中 EIS 化合物用于目标物定量，NIS 化合物用于计算 EIS 回收率。该方法针对每种目标物和 EIS 化合物的定量参比化合物选择提供了具体建议。我们严格按照方法建议建立了定量方法，并应用于基质样品的定量分析。大多数推荐的参比化合物表现良好，但也有一些例外导致定量失败。首先，<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-HFPO-DA (EIS 化合物) 作为内标化合物的表现不稳定，在样品基质中的响应波动较大。虽然方法中指定将该 EIS 用于 HFPO-DA、ADONA、9Cl-PF3ONS 和 11Cl-PF3OUdS 的定量，但最终仅其对应的目标物 HFPO-DA 的定量结果是可接受的，其余三种目标物均因该内标化合物响应波动而定量失败。因此，对于这三种目标物，采用了保留时间更接近、响应更稳定的其他 EIS 化合物，成功解决了这三种目标物的定量问题，获得了理想的定量结果。所有 PFAS 目标物和 EIS 化合物的定量参比化合物详见表 5。

表 5. QuEChERS<sub>emr</sub>-EMR 方法定量结果与发布的 EPA 1633 方法定量结果<sup>[1]</sup> 的比较

目标物	RT (min)	定量参比内标	MDL-EMR (µg/kg)	MDL-EPA (µg/kg)	LOQ-EMR (µg/kg)	LOQ-EPA (µg/kg)
PFHxA	5.56	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFHxA	0.002	0.111	0.05	0.4-0.5
PFHpA	6.94	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFHpA	0.006	0.099	0.05	0.4-0.5
PFOA 异构体	8.5	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFOA	0.005	0.105	0.05	0.4-0.5
PFNA 异构体	10.1	<sup>13</sup> C <sub>9</sub> -PFNA	0.009	0.119	0.05	0.4-0.5
PFDA	11.34	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFDA	0.006	0.149	0.05	0.4-0.5
PFUnA	11.99	<sup>13</sup> C <sub>7</sub> -PFUnA	0.007	0.125	0.05	0.4-1.0
PFDoA	12.51	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFDoA	0.007	0.101	0.05	0.4-0.5
PFTeDA	12.96	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFTeDA	0.009	0.142	0.05	0.4-0.5
PFTeDA	13.36	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFTeDA	0.009	0.159	0.05	0.4-1.0
PFOSA 异构体	12.88	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFOSA	0.005	0.069	0.05	0.4-0.5
N-MeFOSA 异构体	14.19	D <sub>3</sub> -N-MeFOSA	0.011	0.162	0.05	0.4-0.5
N-EtFOSA 异构体	14.45	D <sub>5</sub> -N-EtFOSA	0.008	0.163	0.05	0.4-1.0
N-MeFOSAA 异构体	11.32	D <sub>3</sub> -N-MeFOSAA	0.016	0.145	0.05	0.4-0.5
N-EtFOSAA 异构体	11.63	D <sub>5</sub> -N-EtFOSAA	0.01	0.148	0.05	0.4-0.5
PFBS	5.76	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -PFBS	0.007	0.097	0.05	0.4-0.5
PFPeS	7.36	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFHpA	0.004	0.076	0.05	0.4-0.5
PFHxS 异构体	9.09	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFHxS	0.013	0.081	0.05	0.4-0.5
PFHpS	10.82	<sup>13</sup> C <sub>9</sub> -PFNA	0.004	0.119	0.05	0.4-0.5
PFOS 异构体	11.74	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFOS	0.005	0.145	0.05	0.4-2.0
PFNS	12.32	<sup>13</sup> C <sub>7</sub> -PFUnA	0.009	0.108	0.05	0.4-0.5
PFDS	12.81	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFDoA	0.018	0.114	0.05	0.4-0.5
PFDoS	13.61	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFOS	0.021	0.153	0.05	0.4-0.5
PFPeA	4.5	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFPeA	0.005	0.155	0.1	0.8-1.0
PFEESA	6.47	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFHpA	0.007	0.123	0.1	0.8-1.0
PFMPA	3.95	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFBA	0.007	0.273	0.1	0.8-2.0
PFMBA	4.79	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFPeA	0.005	0.168	0.1	0.8-1.0
NFDHA	5.43	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFHxA	0.01	0.216	0.1	0.8-1.0
PFBA	3.47	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFBA	0.019	0.208	0.2	1.6-4.0
HFPO-DA	6.05	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -HFPO-DA	0.014	0.339	0.2	1.6-2.1
4:2 FTS	5.14	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -4:2 FTS	0.024	0.369	0.2	1.6-2.0
6:2 FTS	7.82	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -6:2 FTS	0.019	0.537	0.2	1.6-2.0
8:2 FTS	10.87	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -8:2 FTS	0.039	0.378	0.2	1.6-2.0
ADONA	7.52	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFOA	0.013	0.274	0.2	1.6-2.0
9Cl-PF3ONS	12.2	<sup>13</sup> C <sub>7</sub> -PFUnA	0.019	0.362	0.2	1.6-2.0
11Cl-PF3OUdS	13.15	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFOS	0.021	0.352	0.2	1.6-2.0
N-MeFOSE 异构体	14.09	D <sub>7</sub> -N-MeFOSE	0.046	0.832	0.5	4.0-5.0
N-EtFOSE 异构体	14.37	D <sub>9</sub> -N-EtFOSE	0.028	1.77	0.5	4.0-5.0
3:3 FTCA	4.07	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFPeA	0.034	0.716	0.25	2.0-4.0
5:3 FTCA	6.17	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFHpA	0.12	2.38	1.25	10-20
7:3 FTCA	9.26	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -PFHxS	0.199	2.02	1.25	10-12.5

对于存在异构体的 PFAS 目标物，该方法要求对所有异构体峰进行加和积分，然后进行定量。通过采用谱图加和的方式，可以在定义的积分窗口内对所有峰积分，以实现该要求。对于所有存在直链和支链异构体的目标物，包括 PFOA、PFNA、PFOSA、N-MeFOSA、N-EtFOSA、N-MeFOSAA、N-EtFOSAA、N-MeFOSE、N-EtFOSE、PHFxS 和 PFOS，均采用了这一策略。图 3 展示了关键目标物及其异构体通过加和积分进行定量分析的示例。

### 方法验证

使用罗非鱼作为代表性基质，验证了所开发的方法对组织中 40 种 PFAS 目标物的定量性能。我们对多种鱼类进行了 PFAS 本底筛查，发现罗非鱼组织的 PFAS 本底最低，因此最终选择了罗非鱼作为方法验证的代表性鱼类组织样本。使用由萃取溶剂（即含有 1% 乙酸的乙腈）配制的纯校准曲线标准溶液建立方法校准曲线。考虑到样品前处理流程中引入了 2 倍的稀释倍数，实际样品基质中方法校准动态范围应为纯校准曲线标准溶液中范围的 2 倍。由于混合储备液中各目标物的浓度有所不同，校准动态范围亦有所差异。第一组共 22 种目标物（储备液中浓度为 250 ng/mL，详见附录表 1 “天然 PFAS” 列中的 PFHxA 到 PFDoS），

校准动态范围为 0.05–20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。第二组共 5 种目标物（储备液中浓度为 500 ng/mL，包括 PFPeA、PFEESA、PFMPA、PFMBA 和 NFDHA），校准动态范围为 0.1–40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。第三组共 8 种目标物（储备液中浓度为 1000 ng/mL，包括 PFBA、HFPO-DA、4:2 FTS、6:2 FTS、8:2 FTS、ADONA、9Cl-PF3ONS 和 11Cl-PF3OUdS），校准动态范围为 0.2–80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。两种 FOSE 目标物的校准动态范围为 0.5–200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。另外，3:3 FTCA 的校准动态范围为 0.25–100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，5:3 FTCA 和 7:3 FTCA 的校准动态范围为 1.25–500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。所有校准曲线均采用加权 ( $1/x^2$ ) 线性回归， $R^2 > 0.99$ ，相对标准误差 (RSE)  $< 20$ 。

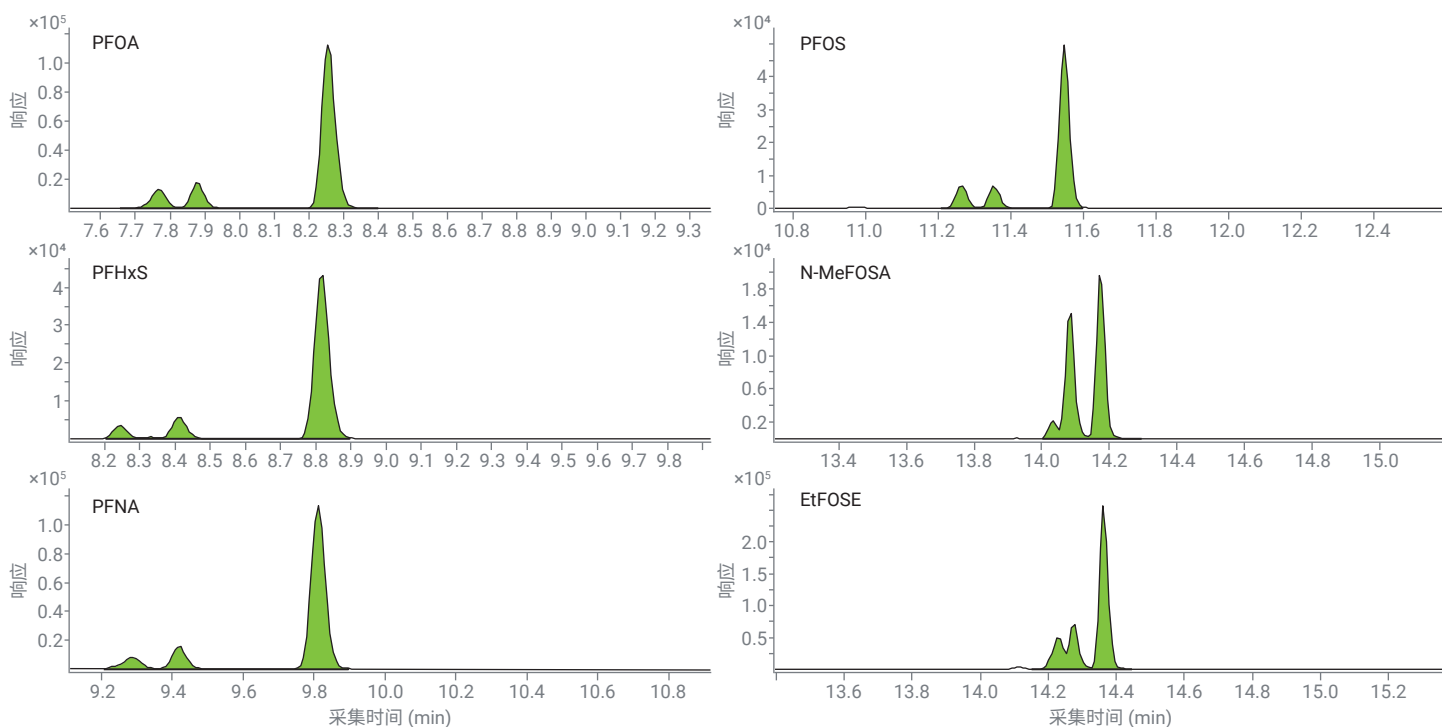


图 3. 关键 PFAS 目标物的加和积分，以纳入所有异构体进行定量

方法的定量准确度和精度通过三个浓度水平的预加标 QC 样品（分别为 LOQ、4x LOQ 和 40x LOQ）进行了验证。每个浓度水平均制备了六份重复样，用于方法精度验证。方法验证的 LOQ 是基于具有可接受准确度和精度的最低预加标浓度确定的。方法检出限 (MDL) 则按照美国国家环境保护局公布的相关程序<sup>[10]</sup> 计算得到，具体公式如下，数据来自六个重复样，99% 置信度。

$$MDL = SD_{LOQ \text{ 加标}} \times 3.365 \quad (\text{公式 1})$$

其中  $SD_{LOQ \text{ 加标}}$  是基于预加标的经验证方法 LOQ 样品的标准偏差。

表 5 列出了使用 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 方法得到的方法 MDL 和 LOQ 结果，并将其与已发布的 EPA 1633 传统方法<sup>[1]</sup> 结果进行了比较。结果表明，该方法获得的 MDL 和 LOQ 均低于 EPA 1633 传统方法的官方汇总研究结果。

EIS 和 NIS 化合物的回收率通过验证批次中的所有基质样品进行了评估，这些样品包括 7 个基质空白样，以及每个浓度水平下的 6 个预加标 QC 样品，总计使用了 25 个样品来计算平均回收率结果。图 4 展示了使用 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 方法测定罗非鱼基质获得的 EIS 和 NIS 平均回收率。红色虚线表示 EPA 1633 针对组织 PFAS 分析规定的可接受范围上限和下限。蓝线则为验证批次中 EIS (X 轴左侧的 24 种化合物) 和 NIS (X 轴右侧的 7 种化合物) 的回收率，均在可接受范围内。

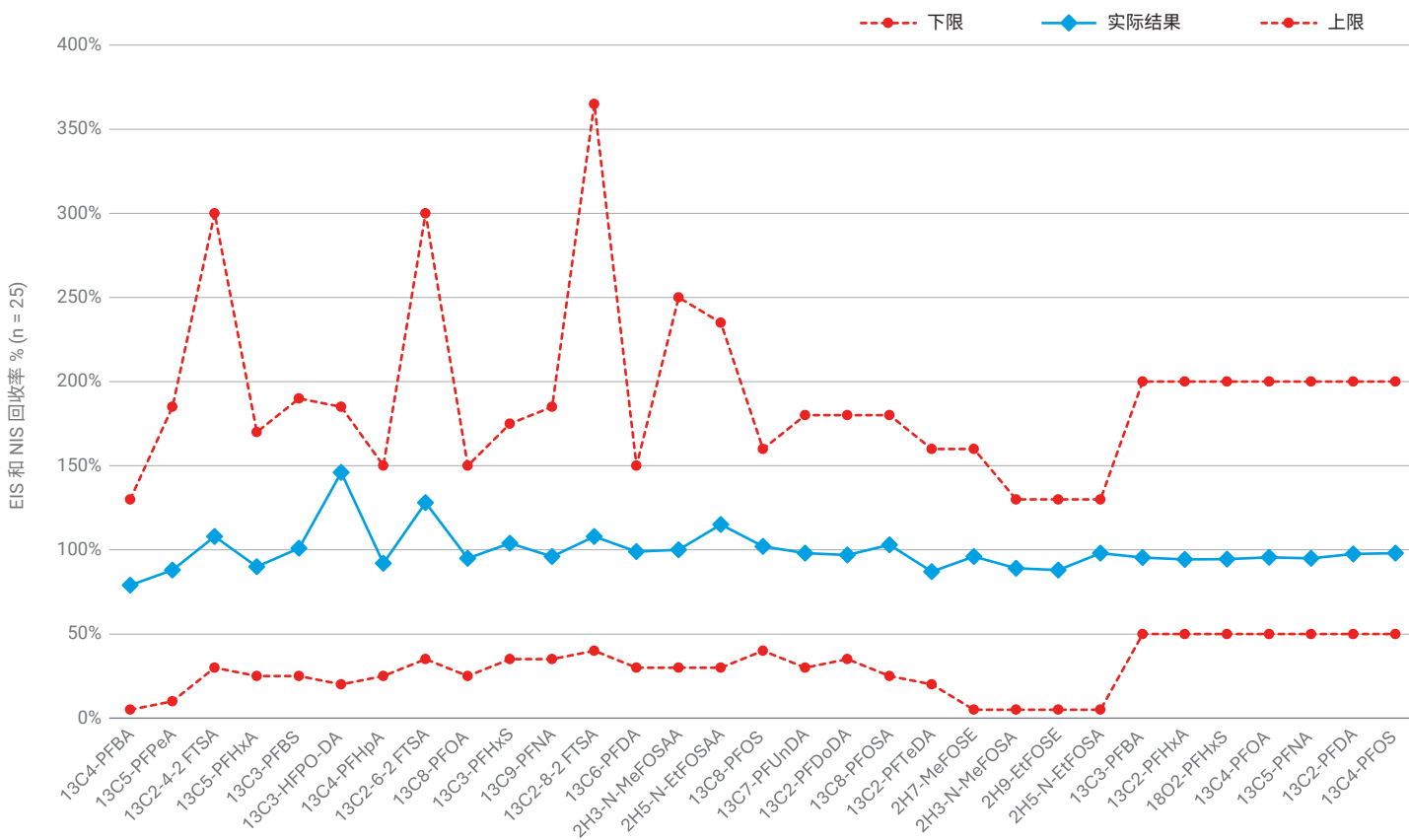


图 4. QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 方法在罗非鱼中获得的 EIS 和 NIS 化合物的平均回收率

图 5 和图 6 为使用所开发的 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 样品前处理方法，对罗非鱼中 40 种 PFAS 目标物的定量准确度和精度结果。所有目标物在三种不同浓度的预加标 QC 样品中均获得了优异的定

量准确度和精度。3:3 FTCA 和 5:3 FTCA 的定量准确度（回收率 %）相对偏高，但仍可在接受范围内。对于 3:3 FTCA，在 LOQ 预加标水平下，其准确度（回收率 %）略高于可接受范围上限。这是因为用于定量

的同位素 EIS 类似物未能完全校正实际目标物所受的基质效应。预计如果使用相应的同位素 ISTD 可以解决该问题，并获得更准确的定量结果。

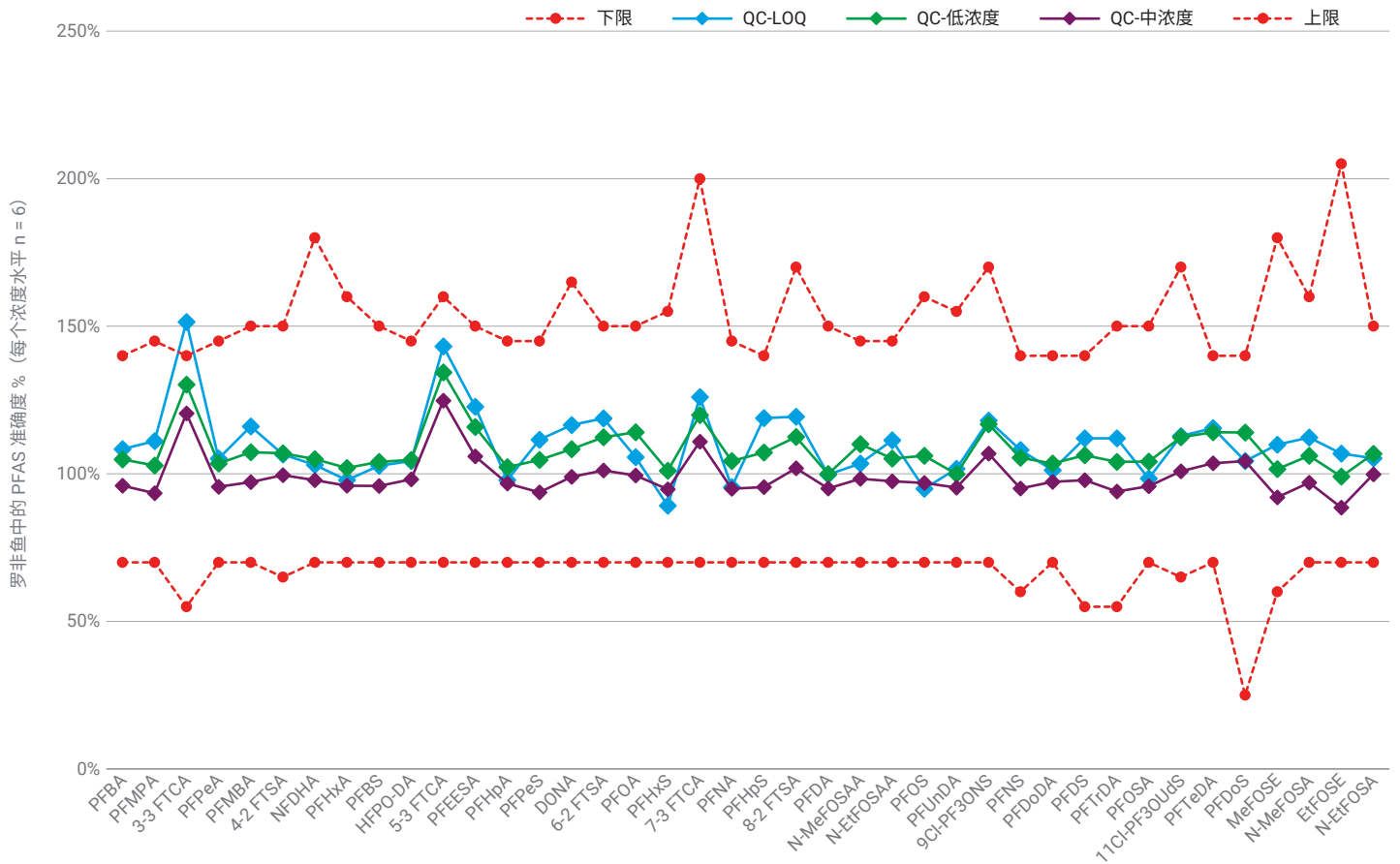


图 5. 使用 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 方法，在三种加标水平下，罗非鱼中 40 种 PFAS 目标物的定量准确度（回收率 %）结果

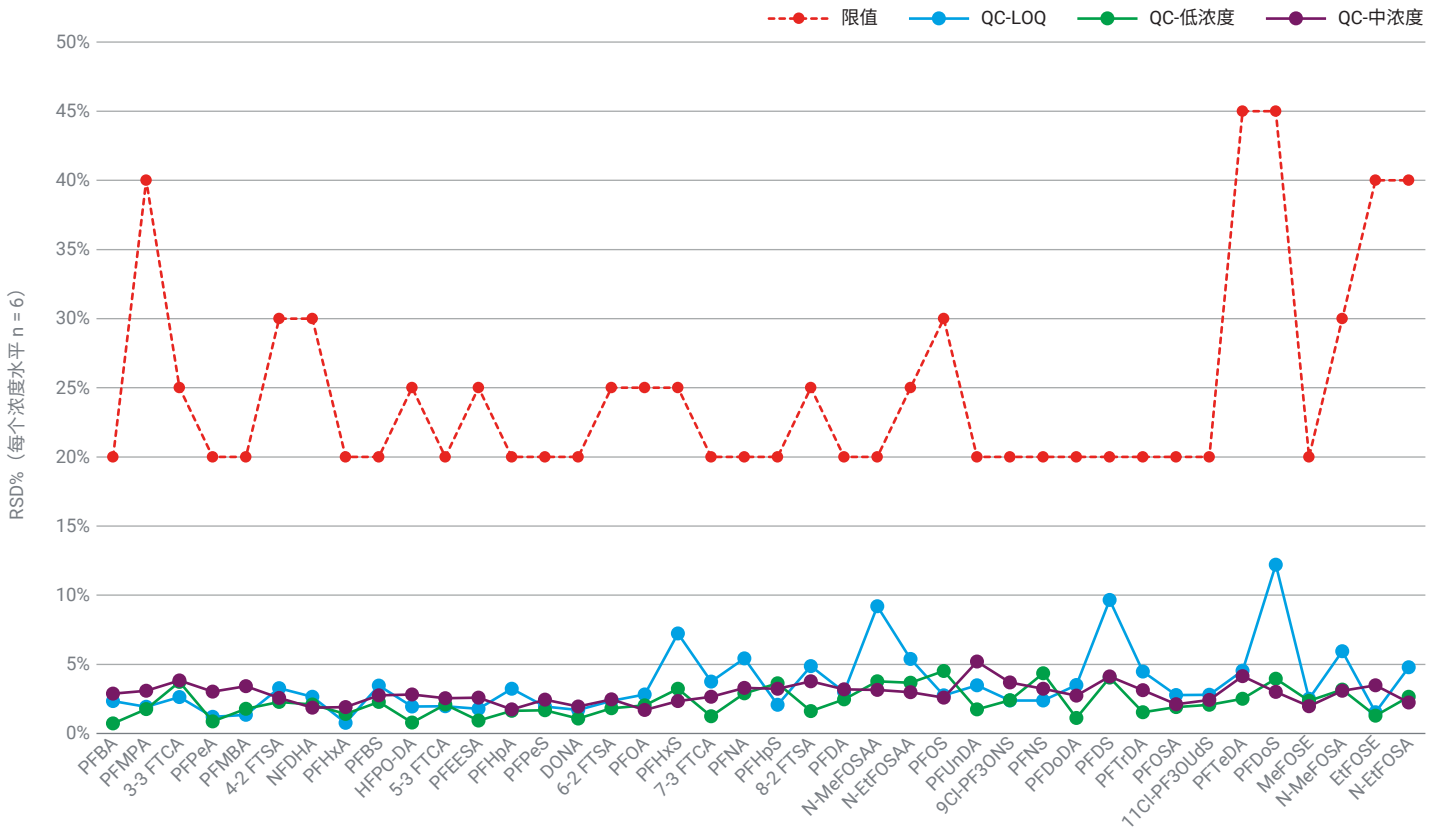


图 6. 使用 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 方法，在三种加标水平下，罗非鱼中 40 种 PFAS 目标物的定量精度 (RSD%) 结果

## 方法性能比较

除了前文讨论的 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 方法与传统 SPE 方法的样品前处理流程比较之外,本研究还对方法性能进行了比较。鉴于天然 PFAS 目标物的分析结果比较起来较为复杂,因此性能比较主要聚焦于 EIS 结果。此外,本研究共涉及七种 NIS 化合物,在三种样品前处理方法下均实现了优异的回收率,介于 92% 至 101% 之间。因此,未将 NIS 结果用于方法性能比较。

图 7 比较了不同的样品前处理方法对罗非鱼中 EIS 化合物的回收率。EIS 化合物回收率是评估样品前处理方法性能的一个关键指标。首先,这些化合物进行了同位素标记,其回收率不会受到样品基质中存在的任何 PFAS 的影响。其次,EPA 1633 方法共涉及九大类 PFAS 目标物,这 24 种 EIS 化合物覆盖了其中七类目标物的标记类似物,能够有效代表这些目标分析物。第三,七种 NIS 化合物仅涵盖两类 PFAS,在校正基质效应方面存在局限性。因此,EIS 回收率能够反映整体方法性能。

图中所示的结果基于预加标 LOQ QC 样品的四次或六次重复测定。蓝色柱状图表示 QuEChERS<sub>ext</sub>-EMR 方法的结果,橙色柱状图表示传统 Solvent<sub>ext</sub>-Carbon/WAX SPE 方法的结果,绿色柱状图表示传统 Solvent<sub>ext</sub>-Carbon dSPE-WAX SPE 方法的结果。总体而言,本研究所开发方法的回收率为 79%–128%,而传统 Solvent<sub>ext</sub>-Carbon/WAX SPE 方法的回收率为 18%–169%,Solvent<sub>ext</sub>-Carbon dSPE-WAX SPE 方法的回收率为 5%–90%。本方法的性能明显优于两种传统方法。

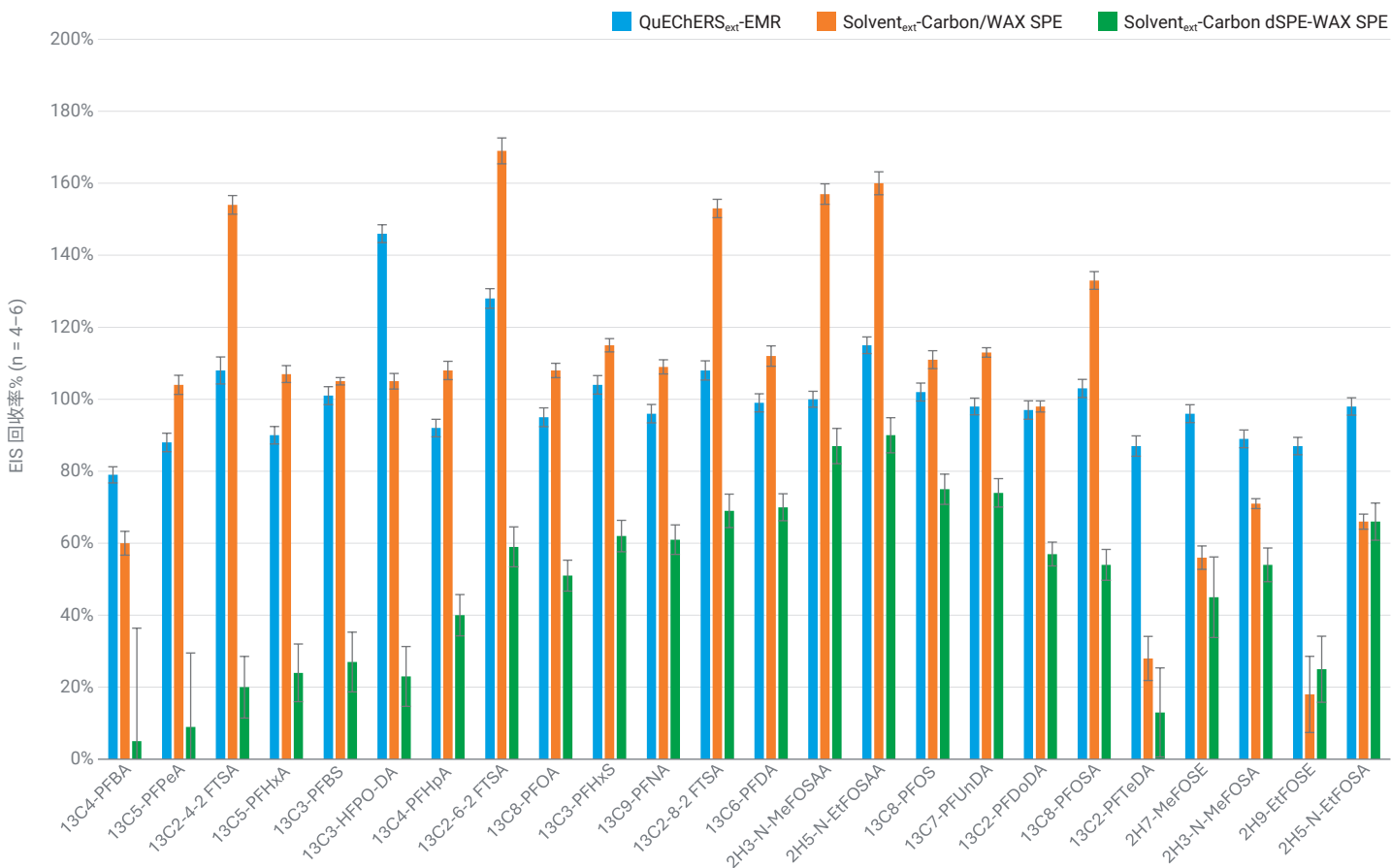


图 7. 不同样品前处理方法下,罗非鱼中 EIS 化合物的回收率比较

## 结论

本研究开发了一种简化、快速且可靠的方法，采用 QuEChERS 萃取结合 Agilent Captiva EMR PFAS Food II 通过式净化进行样品前处理，并根据 EPA 1633 指南，采用 LC/MS/MS 对鱼组织（罗非鱼）中 40 种 PFAS 目标物进行分析，对方法进行了验证。与传统的 EPA 1633 SPE 样品前处理方法相比，新开发的方法节省了 80% 以上的时间，所需的溶剂和化学品也减少了约 80%，且使用的消耗品更少。按照 EPA 1633 指南对方法进行了验证，EIS 和 NIS 化合物的回收率，以及天然 PFAS 的定量准确度和精度均达到可接受标准。所有目标物的方法 MDL 和 LOQ 水平均低于 EPA 1633 方法报告的相应值。研究表明，针对组织样品的 PFAS 分析，所开发的方法相较于传统的 EPA 1633 样品前处理方法，性能更出色、效率更高、成本更低，可作为传统方法的替代方案。

## 参考文献

1. U.S. Environmental Protection Agency. Method 1633, Revision A: Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Aqueous, Solid, Biosolids, and Tissue Samples by LC-MS/MS. *EPA 820-R-24-007*, December **2024**. <https://www.epa.gov/system/files/documents/2024-12/method-1633a-december-5-2024-508-compliant.pdf> (2025-02-20 访问)
2. U.S. Environmental Protection Agency. Method 537: Determination of Selected Perfluorinated Alkyl Acids in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). *EPA/600/R-08/092*, September **2009**. [https://cfpub.epa.gov/si/si\\_public\\_record\\_report.cfm?Lab=NERL&direntryid=198984](https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NERL&direntryid=198984) (2025-02-20 访问)
3. U.S. Environmental Protection Agency. Method 533: Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Drinking Water by Isotope Dilution Anion Exchange Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *EPA 815-B-19-020*, November **2019**. <https://www.epa.gov/dwanalyticalmethods/method-533-determination-and-polyfluoroalkyl-substances-drinking-water-isotope> (2025-02-20 访问)
4. U.S. Environmental Protection Agency. Multi-Industry Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) Study – 2021 Preliminary Report. *EPA-821-R-21-004*, September **2021**. [https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-09/multi-industry-pfas-study\\_preliminary-2021-report\\_508\\_2021.09.08.pdf](https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-09/multi-industry-pfas-study_preliminary-2021-report_508_2021.09.08.pdf) (2025-02-20 访问)
5. Genualdi, S.; Young, W.; Peprah, E., Srigley, C.; Fisher, C.; Ng, B.; deJager, L. Analyte and Matrix Method Extension of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Food and Feed. *Anal. Bioanal. Chem.* **2024**, 416, 627–633. DOI: 10.1007/s00216-023-04833-1
6. Hwang, S. H.; Ryu S. Y.; Seo, D.; Kim, S. Y.; Lee, J. H.; Cho, Y. S. Development of a Method Using QuEChERS and LC/MS/MS for Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Rice Matrix. *Food Chem.* **2024**, 445, 138687. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.138687
7. Zhao, L.; Giardina, M.; Parry, E. 测定牛肉、金枪鱼和虾中的 30 种全氟烷基和多氟烷基化合物, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-7368ZHCN, **2024**
8. Zhao, L.; Giardina, M.; Parry, E. 牛肾脏中 30 种全氟和多氟烷基化合物的测定, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-7370ZHCN, **2024**
9. AOAC. AOAC SMPR 2023.003: Standard Method Performance Requirements (SMPRs) for Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Produce, Beverages, Dairy Products, Eggs, Seafood, Meat Products, and Feed. [https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2023/11/SMPR-2023\\_003-1.pdf](https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2023/11/SMPR-2023_003-1.pdf) (2025-02-20 访问)
10. U.S. Environmental Protection Agency. Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit, Revision 2. *EPA 821-R-16-006*, December **2016**. [https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure\\_rev2\\_12-13-2016.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure_rev2_12-13-2016.pdf) (2025-02-20 访问)

附表 1. 混合储备液中天然 PFAS、EIS 和 NIS 化合物的浓度

天然 PFAS 化合物	浓度 (ng/mL)	EIS 化合物	浓度 (ng/mL)
PFHxA	250	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFBA	2000
PFHpA	250	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFPeA	1000
PFOA 异构体	250	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFHxA	500
PFNA 异构体	250	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFHpA	500
PFDA	250	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFOA	500
PFUnA	250	<sup>13</sup> C <sub>9</sub> -PFNA	250
PFDoA	250	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFDA	250
PFTrDA	250	<sup>13</sup> C <sub>7</sub> -PFUdA	250
PFTeDA	250	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFDoA	250
PFOSA 异构体	250	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFTeDA	250
N-MeFOSA 异构体	250	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOSA	500
N-EtFOSA 异构体	250	D <sub>3</sub> -N-MeFOSA	500
N-MeFOSAA 异构体	250	D <sub>5</sub> -N-EtFOSA	500
N-EtFOSAA 异构体	250	D <sub>3</sub> -N-MeFOSAA	1000
PFBS	250	D <sub>5</sub> -N-EtFOSAA	1000
PFPeS	250	D <sub>7</sub> -N-MeFOSE	5000
PFHxS 异构体	250	D <sub>9</sub> -N-EtFOSE	5000
PFHpS	250	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -HFPO-DA	2000
PFOS 异构体	250	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -PFBS	500
PFNS	250	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -PFHxS	500
PFDS	250	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOS	500
PFDoS	250	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -4:2 FTS	1000
PFPeA	500	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -6:2 FTS	1000
PFEESA	500	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -8:2 FTS	1000
PFMPA	500	<b>NIS 化合物</b>	<b>浓度 (ng/mL)</b>
PFMBA	500	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -PFBA	1000
NFDHA	500	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFHxA	500
PFBA	1000	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOA	500
HFPO-DA	1000	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFNA	250
4:2 FTS	1000	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFDA	250
6:2 FTS	1000	<sup>18</sup> O <sub>2</sub> -PFHxS	500
8:2 FTS	1000	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOS	500
ADONA	1000		
9Cl-PF3ONS	1000		
11Cl-PF3OUdS	1000		
N-MeFOSE 异构体	2500		
N-EtFOSE 异构体	2500		
3:3 FTCA	1250		
5:3 FTCA	6250		
7:3 FTCA	6250		

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)

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

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

DE-004802

联系我们：

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

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

在线询价：

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

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2025  
2025 年 4 月 14 日, 中国出版,  
5994-8232ZHCN

