

定量分析供人类食用的鸡蛋中的全氟和多氟烷基化合物 (PFAS)

使用 Agilent Bond Elut Carbon S 固相萃取小柱和 Agilent 6475 三重四极杆液质联用系统

作者

Carola Damen 和 Peter Kornas
安捷伦科技有限公司

René van der Molen
Triskelion, The Netherlands

摘要

欧盟委员会关于食品中某些污染物最高含量的法规规定了各种食品基质（如肉类和鱼类产品以及蛋类）中四种全氟和多氟烷基化合物 (PFAS) 的最高允许含量。此外，欧盟委员会还建议监测其他 PFAS 成分。世界上其他地区也在制定类似的法规。本应用简报介绍了用于分析鸡蛋中 21 种 PFAS 化合物的多组分分析方法的开发和验证。该方法先使用 QuEChERS 净化进行样品萃取，然后使用 Agilent Bond Elut Carbon S 小柱进行固相萃取。使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱与 Agilent 6475A 三重四极杆液质联用系统进行定量分析。根据 SANTE 指南 11312/2021 进行方法验证，监测了分析物萃取回收率、线性、灵敏度（方法检测限）和重现性。

前言

PFAS 包含 8000 多种合成有机氟化合物，最早开发于 20 世纪 40 年代。PFAS 具有耐高温、防水、防油、防油脂、防污等化学特性，因此作为表面活性剂和涂层广泛用于各种商业应用中。PFAS 的商业应用包括化妆品、食品包装、不粘炊具、消防泡沫、电子设备、飞机、车辆和各种纺织品（如地毯、皮革制品、家具、服装、手术服等）。PFAS 分子的化学结构中包含强氟碳键，难以被环境降解。因此，这些化合物往往分布广泛，且具有持久性和环境稳定性。人类接触 PFAS 的主要途径包括遭污染的水和食品。

2023 年 4 月，欧盟委员会发布了关于食品中某些污染物最高含量的法规 (2023/915)^[1]。该法规规定了鱼类、肉类和蛋类产品中四种 PFAS 成分的最高含量。PFOS、PFOA、PFNA 和 PFHxS 的最高允许含量分别为 1.0、0.30、0.70 和 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。此外，鸡蛋中上述四种成分的总含量最高为 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。除该法规外，欧盟委员会还颁布了关于食品中 PFAS 物质监测的建议 (2022/1431)^[2]。该建议提到，成员国应尽可能监测是否存在与 PFOS、PFOA、PFNA 和 PFHxS 类似的化合物，并就此提出了 18 种不同的成分。此外，还应考虑其他 PFAS 成分的测定。鸡蛋中 PFOS、PFOA、PFNA 和 PFHxS 的定量限应不高于 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。对于其他 PFAS 成分，未提及要求的定量限。

由于鸡蛋中存在胆固醇、脂质、胆汁酸和蛋白质等基质干扰物质，因此分析具有挑战性。本应用简报介绍了使用 QuEChERS 与 Agilent Bond Elut Carbon S 固相萃取小柱进行高效样品净化，然后进行 LC/MS/MS 分析的方法。

实验部分

样品采集

此方法中使用的所有鸡蛋均为供人类食用的鸡蛋。

化学品与试剂

本研究中使用的 LC/MS 级乙腈和甲醇购自 Actu-All Chemicals BV。使用的水为超纯水 (Milli-Q)。乙酸铵、甲酸和乙二醇购自 Sigma-Aldrich。氨水购自 Thermo Scientific。

标样和溶液

PFAS 标准品购自 Wellington Laboratories。本研究中使用的 PFAS 成分及其内标列于表 1。

样品萃取

如图 1 所示，对鸡蛋样品进行手动均质化处理，然后取 5 g 样品转移至聚丙烯试管中。向每个样品、校准标样或 QC 样品中加入内标。向每个样品中加入 10 mL 5% 甲酸的乙腈溶液，然后将试管振摇一分钟。向每个样品管中加入一袋 Agilent Bond Elut QuEChERS 萃取试剂盒，AOAC 方法（部件号 5982-5755），振摇一分钟。随后在 4 °C 下以 3600 rpm 的转速将试管离心 15 分钟。然后，取 4 mL 上清液转移至 Agilent Bond Elut QuEChERS 含脂肪和蜡质的水果和蔬菜分散式 SPE 试剂盒（部件号 5982-5156）中。将试管密封，用手剧烈振摇一分钟。在 4 °C 下以 3600 rpm 的转速将样品离心 10 分钟。然后取 1000 μL 样品转移至 17 \times 100 mm 聚丙烯试管中。向试管中加入 200 μL 10% 乙二醇的甲醇溶液。然后将样品置于 45 °C 下氮吹 10 分钟。用 6 mL 1% 氨水的甲醇溶液重新溶解萃取物，然后加入 100 μL 25% 浓氨水。将试管涡旋，准备使用 Agilent Bond Elut Carbon S SPE 250 mg/6 cc 小柱（部件号 5610-2082）进行净化。首先用 5 mL 甲醇对 Carbon S SPE 色谱柱进行活化。将全部萃取物上样至小柱，然后用 1.5 mL 1% 氨水的甲醇溶液在重力作用下冲洗小柱。在 45 °C 下将萃取物氮吹至干。通过涡旋混合的方式将干燥后的萃取物重新溶解于 500 μL 1 mmol/L 乙酸铵的甲醇溶液中。将萃取物转移至 2 mL 不含 PFC 的带盖 HPLC 样品瓶（部件号 5191-8150 和 5191-8151）中，以备 LC/MS/MS 分析。



图 1. 样品前处理工作流程示意图

校准标样、萃取物加标标准品和 QC 样品

在制备校准标样、基质空白和 QC 样品时，将 5 g 空白鸡蛋基质转移至塑料管中。对于校准标样和 QC 样品，在样品前处理前加入两种 PFAS 标准品作为内标。然后对标样和 QC 样品进行与样品相同的前处理步骤。对于验证过程中用于基质效应测定的萃取物加标样品，对空白鸡蛋基质进行样品前处理。在 Carbon S SPE 步骤之后加入 PFAS 标准品和内标。

为了测试萃取和 LC/MS 分析过程中的 PFAS 背景，我们制备了一个方法空白样品。取一支没有鸡蛋样品的试管，执行萃取部分所述的所有步骤，即可制得该样品。

每个样品中的内标浓度为 1 μg/kg。校准曲线包含 6 个浓度，对于某些 PFAS 成分，每种 PFAS 成分的浓度范围为 0.13–1.8 μg/kg，其他 PFAS 成分的浓度范围高达 0.3–4 μg/kg。低浓度（0.3 或 0.6 μg/kg，取决于 PFAS 成分）和高浓度（1.3–3 μg/kg，取决于 PFAS 成分）QC 样品均重复分析 4 次。萃取物校准范围如表 1 所示。

表 1. 化合物、保留时间和浓度范围

化合物	保留时间 (min)	内标	校准曲线 (µg/kg)	QC 低浓度 (µg/kg)	QC 高浓度 (µg/kg)
PFPeA	4.22	¹³ C ₅ -PFPeA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFBS	4.32	¹³ C ₃ -PFBS	0.13-1.8	0.27	1.33
PFHxA	4.84	¹³ C ₅ -PFHxA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFPeS	4.90	¹³ C ₅ -PFPeA	0.15-2.0	0.3	1.5
HFPO-DA	5.04	¹³ C ₅ -PFHxA	0.3-4.0	0.6	3
PFHpA	5.55	¹³ C ₄ -PFHpA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFHxS	5.59	¹³ C ₃ -PFHxS	0.14-1.9	0.29	1.43
PFOA	6.90	¹³ C ₈ -PFOA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFHpS	6.32	¹³ C ₄ -PFHpA	0.14-1.91	0.29	1.43
PFOS	7.03	¹³ C ₈ -PFOS	0.14-1.92	0.29	1.44
PFNA	7.04	¹³ C ₉ -PFNA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFNS	7.69	¹³ C ₉ -PFNA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFDA	7.71	¹³ C ₆ -PFDA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFOSA	8.25	¹³ C ₂ -PFDoDA	0.3-4.0	0.6	3
PFDS	8.27	¹³ C ₂ -PFDoDA	0.14-1.93	0.29	1.45
PFUnDA	8.31	¹³ C ₇ -PFUnDA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFuDS	8.79	¹³ C ₇ -PFUnDA	0.3-4.0	0.6	3
PFDoDA	8.83	¹³ C ₂ -PFDoDA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFDoS	9.24	¹³ C ₂ -PFTDA	0.3-4.0	0.6	3
PFTTrDA	9.29	¹³ C ₂ -PFTDA	0.15-2.0	0.3	1.5
PFTTrDS	9.64	¹³ C ₂ -PFTDA	0.3-4.0	0.6	3

仪器

使用包括 Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)、配备多重清洗选件的 Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) 和 Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7167B) 的 1290 Infinity II 液相色谱系统进行样品分析。使用 Agilent InfinityLab 无 PFC HPLC 转换工具包 (部件号 5004-0006) 对液相色谱系统进行了改进, 以用于 PFAS 分析。该液相色谱系统与配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6475A 三重四极杆 LC/MS 联用。采用 Agilent MassHunter Workstation 软件 (12.0 版) 进行数据采集和分析。不同 PFAS 成分的优化 MRM 设置取自 PFAS dMRM 数据库 (G1736AA)。

LC 和 MS 方法参数如表 2 和表 3 所示。在每次进样结束时添加测试正离子对, 以防止仅在负离子模式下进行测量而导致仪器充电。

表 2. 液相色谱条件

参数	值																											
LC	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统																											
分析柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse plus C18 色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm (部件号 959758-902) 与 Agilent 1290 ZORBAX Eclipse plus C18 保护柱, 2.1 × 5 mm, 1.8 µm (部件号 821725-901)																											
延迟柱	Agilent InfinityLab PFC 延迟柱, 4.6 × 30 mm (部件号 5062-8100)																											
柱温	50 °C																											
进样量	5 µL																											
进样针清洗	<table border="1"> <thead> <tr> <th>步骤</th> <th>时间 (s)</th> <th>溶剂</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>7</td> <td>乙腈</td> <td>针座反冲和进样针清洗</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>7</td> <td>甲醇</td> <td>针座反冲和进样针清洗</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>7</td> <td>水</td> <td>针座反冲和进样针清洗</td> </tr> </tbody> </table>	步骤	时间 (s)	溶剂		1	7	乙腈	针座反冲和进样针清洗	2	7	甲醇	针座反冲和进样针清洗	3	7	水	针座反冲和进样针清洗											
步骤	时间 (s)	溶剂																										
1	7	乙腈	针座反冲和进样针清洗																									
2	7	甲醇	针座反冲和进样针清洗																									
3	7	水	针座反冲和进样针清洗																									
流速	0.4 mL/min																											
流动相	A) 5 mmol/L 乙酸铵水溶液 B) 5 mmol/L 乙酸铵的甲醇溶液																											
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>2.5</td> <td>45</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>9.5</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>11.5</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>11.6</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%A	%B	0	90	10	0.5	90	10	2.5	45	55	9	10	90	9.5	0	100	11.5	0	100	11.6	90	10	14	90	10
时间 (min)	%A	%B																										
0	90	10																										
0.5	90	10																										
2.5	45	55																										
9	10	90																										
9.5	0	100																										
11.5	0	100																										
11.6	90	10																										
14	90	10																										

表 3. 质谱条件

参数	值
MS	配备安捷伦喷射流 ESI 离子源的 Agilent 6475A 三重四极杆液质联用系统
扫描类型	动态 MRM (dMRM)
分析周期	300 ms
MRM 总数	69 个 MRM 和一个测试正离子对
离子源参数	
极性	负
气体流速	250 °C, 11 L/min
鞘气温度	375 °C, 11 L/min
雾化器气体	25 psi
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	0 V

结果与讨论

校准性能

根据 SANTE 指南 11312/2021 进行方法验证^[3]。所有分析物的保留时间一致，整个运行过程中的 RSD 均小于 0.05%。除 PFHpS 和 PFPeS 采用 1/X 加权外，其余所有分析物的校准曲线（采用线性拟合的六点曲线，无加权，忽略原点） R^2 值均大于 0.993。图 2 所示的 MRM 色谱图表明，目标 PFAS 实现了良好的分离和检测。

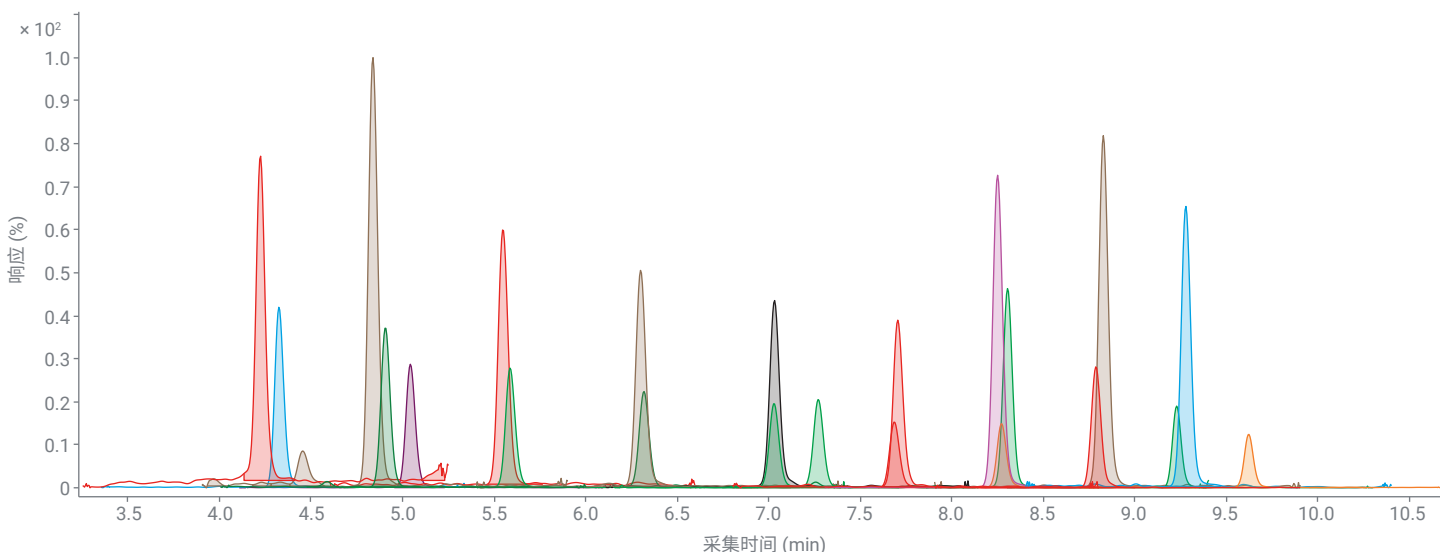


图 2. 加标了浓度为 0.4–1 µg/kg 的 21 种 PFAS 目标分析物的空白鸡蛋样品（校准标样 3）的提取 MRM 色谱图。图中未显示内标

回收率、精密度和基质效应

为了测定回收率和精密度，在 QC 低浓度和 QC 高浓度样品的每种水平下制备五份单独样品，进样到 LC/MS 系统中。此外，为了测定基质效应，将系统适用性样品（流动相中的 PFAS 成分）与相应浓度下的后加标基质空白样品进行了比较。

如表 4 所示，所有 PFAS 成分均获得了出色的回收率，范围为 93.5%–109.0%，在 70%–120% 的可接受范围内。除 PFOSA 的精密度值高达 17.5% 外，其余化合物的精密度值均低于 10.3%。PFOSA 的 RSD 值较高的原因在于，PFOSA 没有相应的稳定标记内标，因此使用了另一种内标。不过，所有值都在 SANTE 可接受值 ($\leq 20\%$) 的范围内。

基质效应研究表明，几乎不存在任何基质效应。对于所有成分，萃取物加标样品与系统适用性样品的峰响应面积大致相同。

表 4. 平均回收率和精密度结果 (N = 5)

化合物	QC 低浓度		QC 高浓度	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
HFPO-DA	97.0	5.1	99.8	1.6
PFBS	93.5	2.2	102.2	0.5
PFDA	102.1	1.4	96.0	1.0
PFDoDA	98.9	4.8	101.2	1.1
PFDoS	102.9	4.4	100.6	3.9
PFDS	107.4	9.0	101.3	4.1
PFHpA	98.3	4.0	103.7	2.9
PFHpS	95.5	10.3	104.0	2.4
PFHxA	99.8	2.0	100.1	2.2
PFHxS	105.4	4.1	98.1	1.0
PFNA	102.7	4.2	101.1	2.9
PFNS	102.6	7.8	99.8	4.0
PFOA	98.9	4.0	100.0	2.1
PFOS	100.9	5.2	102.4	4.7
PFOSA	109.0	17.5	99.5	16.9
PFPeA	99.4	5.6	103.1	0.8
PFPeS	97.3	5.3	104.5	2.6
PFTTrDA	103.5	5.8	101.0	3.1
PFTTrDS	99.0	6.0	98.9	3.2
PFUdS	96.0	9.7	98.8	1.9
PFUnDA	102.6	5.1	100.9	2.4

方法检测限

为了提高方法的灵敏度，使用了最低浓度校准标样。计算分析浓度与回算浓度的偏差并监测色谱图。在校准样品 1 浓度下，所有 PFAS 成分的分析浓度与回算浓度的偏差（百分比误差）为 15.2% 或更低，未超过 $\leq \pm 20\%$ 的可接受范围。

图 3A 显示了 PFOS、PFOA、PFNA 和 PFHxS（欧盟法规监管的四种 PFAS 成分）以及其他两组化合物 PFNS 和 PFHxA 在最低校准浓度下的色谱图。为了证明该方法的选择性，图 3B 显示了方法空白样的色谱图。从图中可以看出，方法空白样中存在少量的 PFOA，但对于所有其他 PFAS 成分，方法空白样中未检出任何峰。

在两个不同实验室的两套不同的 LC/MS/MS 系统上，对用于 SANTE 验证的样品进行了交叉检查。

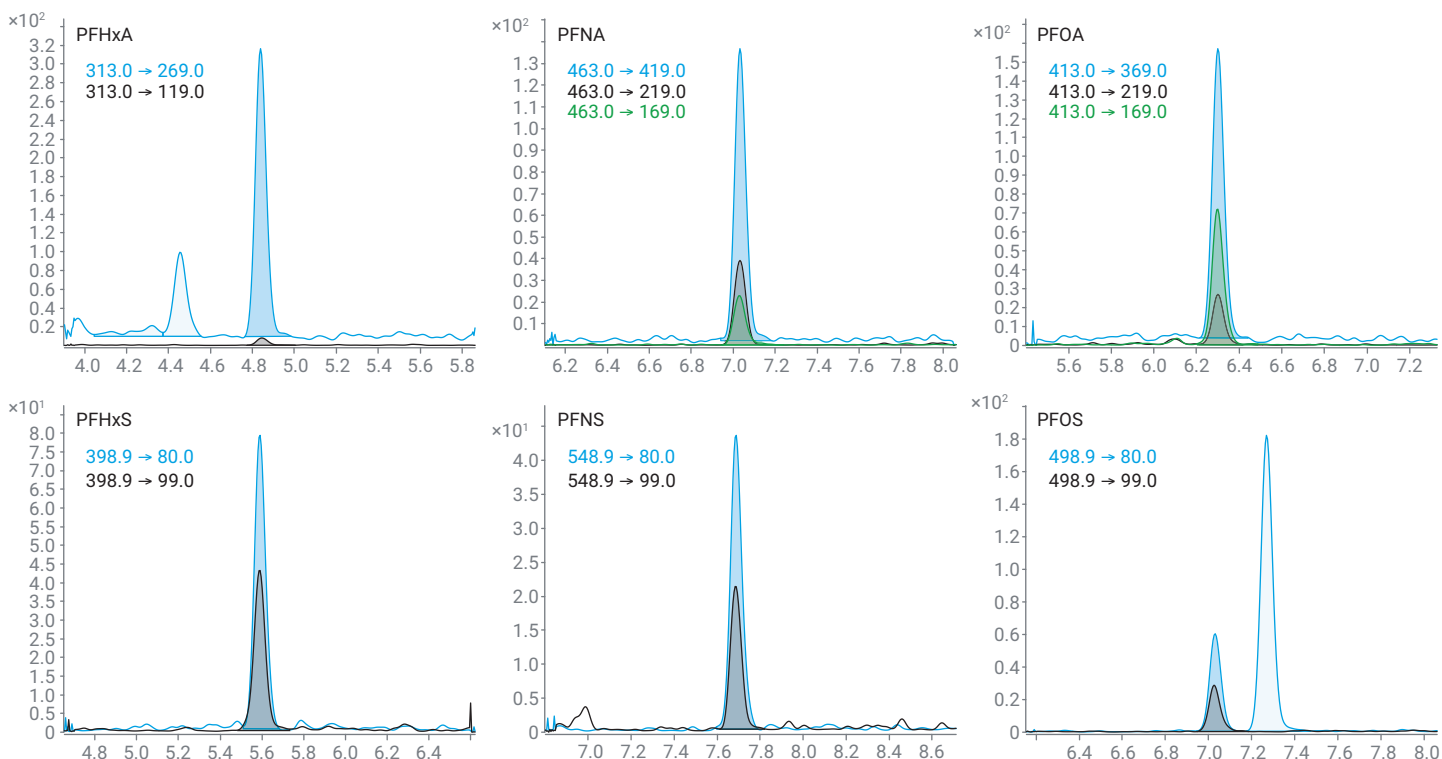


图 3A. 在校准样品 1 浓度 (0.14 或 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 下，PFHxA、PFNA、PFOA、PFHxS、PFNS 和 PFOS 的色谱图。图中显示了定量离子对和定性离子对

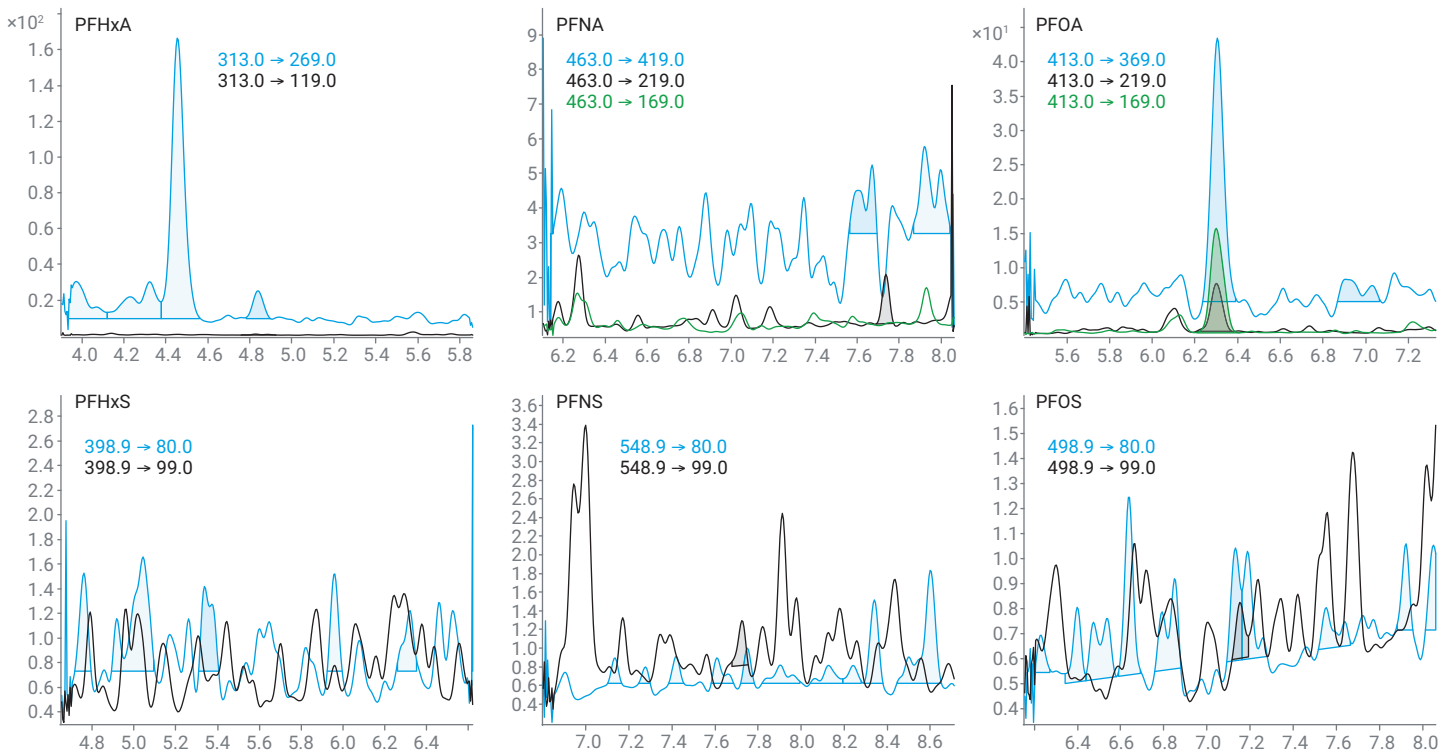


图 3B. 方法空白样中 PFHxA、PFNA、PFOA、PFHxS、PFNS 和 PFOS 的色谱图。图中显示了定量离子对和定性离子对

供人类食用的鸡蛋的分析结果

该方法目前用于对各种来源的鸡蛋进行常规定量分析。在方法验证后的第一次运行中，检测了 30 个不同的鸡蛋批次。只有一个批次的 PFOS 检测结果呈阳性，浓度为 0.147 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，略高于该成分的最低校准点 0.144 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。这远低于欧盟委员会法规^[1]规定的允许限值 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

结论

本研究证明该方法能够有效地定量分析鸡蛋中的 PFAS。将 QuEChERS 样品前处理与 Agilent Bond Elut Carbon S 固相萃取小柱相结合，可获得出色的回收率和重现性。此外，即使在鸡蛋这样具有挑战性的基质中，中端的 Agilent 6475A 三重四极杆液质联用系统也足以满足欧盟委员会的规定和建议。根据 SANTE 指南，使用所选的 21 种 PFAS 成分完成了验证。该方法目前常用于测定鸡蛋中的 PFAS。

参考文献

1. Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels of certain contaminants in food repealing Regulation (EC) No 1881/2006
2. Commission Recommendation (EU) 2022/1431 of 24 August 2022 on the monitoring of perfluoroalkyl substances in food
3. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed; SANTE 11312/2021

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

DE82869096

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4月11日，中国出版
5994-7358ZHCN