

人血清中PFAS的提取和分析

Kari L. Organtini, Kenneth J. Rosnack, Mary E. Lame, Lisa J. Calton

Waters Corporation

摘要

全氟和多氟烷基化合物(PFAS)具有生物蓄积性，监测这些化合物在人体液中的含量有助于了解暴露水平和暴露途径。由于PFAS不会快速代谢或从体内清除，因此可以通过研究这些化合物的血清含量来了解其暴露水平。本研究开发出一种优化的固相萃取(SPE)方法，利用Oasis WAX μ Elution 96孔提取板从人血清中提取PFAS。分析采用与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统联用的Xevo TQ-S micro完成，该系统已使用PFAS方法包组件进行改良。ACQUITY HSS T3色谱柱可实现PFAS与血清类固醇硫酸盐干扰物质的关键分离。使用六批不同的混合人血清进行方法验证。此外，使用NIST标准参考物质(SRM 1957)对优化的提取方法进行验证，获得始终准确的结果。证明最终方法准确耐用，适用于从各类不同的常见PFAS化学物质中提取并分析30种PFAS。

优势

- 一种经过优化的方法，适用于研究并了解PFAS化合物在人体中的暴露水平
- 利用PFAS方法包改良液相色谱系统，分离可能的系统和溶剂污染物，从而提高结果可信度
- 使用Xevo TQ-S micro准确分析人血清中PFAS的耐用方法
- 使用Oasis WAX 96孔板和理想色谱柱提取PFAS，实现高效样品净化

简介

数十年来，全氟和多氟烷基化合物(PFAS)广泛应用于工业生产过程、各类消费品和消防泡沫，导致这些污染物持续释放到环境中。人们随后通过使用消费品、摄入受污染的饮用水和食品以及空气污染而持续暴露于PFAS。目前

已知存在数千种PFAS，但有关它们的毒理学知识有限。有关全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS)的研究表明，这些化合物严重危害人体健康，包括对免疫、生殖和发育途径的影响以及肝肾损害^{1,2}。PFOA被视为一种与肾癌和睾丸癌有关的潜在致癌物^{3,4}。PFAS具有较强的碳-氟键，可作为有效的涂层材料，但也非常难以代谢，因此很可能在人体中蓄积。根据大量生物监测研究的结论，大多数人的血液中均含有可检出量的各种PFAS化合物⁵。因此，有必要采用可靠、准确的方法持续监测PFAS在人体内的含量，以用于职业健康监测、环境暴露监测和毒理学研究等目的。

血清是一种复杂基质，要实现高重现性、高准确度的PFAS检测，必须去除基质化合物。当研究范围不断扩展至更多种类的PFAS时，这一点尤为重要，因为研究重点已经从仅研究PFOA和PFOS转向更广泛的化合物。仅采用蛋白沉淀法和/或稀释进行样品前处理难以满足要求。固相萃取(SPE)是一种更实用的样品前处理解决方案。液相色谱与串联四极杆质谱联用系统(LC-MS/MS)大幅提升了分析的灵敏度和选择性。下文将概述一套完整的SPE方法，该方法使用Oasis WAX 96孔 μ Elution提取板从人血清中提取PFAS，然后利用Xevo TQ-S micro进行分析。

实验

样品前处理

使用Oasis WAX 96孔 μ Elution提取板（每孔包含2 mg吸附剂）通过固相萃取法提取人血清样品。提取胎牛血清(FBS)作为校准曲线的基质，它是合适的无PFAS基质替代品。完整的SPE萃取方案见图1。将NIST标准参考物质(SRM) 1957（未加标人血清）与每批样品一起萃取，确保成功完成样品前处理。本研究使用了一组PFAS，共30种化合物，代表各种PFAS类别，例如羧酸类、磺酸类、磺胺类、磺胺乙酸类、氟调聚物磺酸盐和全氟醚。在适用情况下，对每种化合物添加同位素标记的内标。



图1.使用Oasis WAX 96孔µElution板提取人血清中PFAS的SPE方案

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS, 经PFAS方法包改良
稀释板:	96孔样品收集板, 2 mL方孔
收集板:	96孔样品收集板, 700 µL圆孔
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm
柱温:	35 °C
样品温度:	4 °C
进样体积:	5 µL
流速:	变化 (见梯度表)
流动相A:	95:5水:甲醇 + 2 mM醋酸铵

流动相B:

甲醇 + 2 mM醋酸铵

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.3	100	0	6
1	0.3	80	20	6
6	0.3	55	45	6
13	0.3	20	80	6
14	0.4	5	95	6
17	0.4	5	95	6
18	0.3	100	0	6
22	0.3	100	0	6

质谱条件

质谱系统:

Xevo TQ-S micro

电离模式:

ESI-

毛细管电压:

0.5 kV

脱溶剂气温度:

300 °C

脱溶剂气流速:	900 L/h
锥孔气流速:	100 L/h
碰撞能量:	取决于不同化合物 (条件见附录表)
锥孔电压:	取决于不同化合物 (条件见附录表)
导流至废液:	0~3 min和16~22 min

数据管理

色谱软件:	MassLynx 4.2 SCN1001
MS软件:	MassLynx4.2 SCN1001
信息学软件:	TargetLynx XS

结果与讨论

方法优化

使用Oasis弱阴离子交换(WAX)色谱柱进行SPE萃取, 因为这款色谱柱已广泛用于从水体及其他环境样品中萃取PFAS。WAX同时提供阴离子交换和反相保留机理, 能够保留各种PFAS化合物。因此, 将从水中提取PFAS的基本方案经过适当调整后得到适用于血清的类似方法, 主要是针对血清相应地调整了样品预处理和样品板清洗步骤。

已有研究证明, 样品预处理是非常重要的步骤, 还需要进一步优化, 破坏血清样品中的PFAS蛋白结合。本研究比较了直接使用50%甲酸进行稀释与经过蛋白沉淀处理后再用1%甲酸进行稀释的方法。测试的蛋白沉淀比例有1:1乙腈、1:3乙腈和1:1甲醇(血清:溶剂)。进行蛋白沉淀后必须稀释有机相, 使PFAS保留在WAX色谱柱上。为确定所测试的各种预处理方法的效率, 将处理后的样品加载到WAX板, 收集上样废液并分析。上样废液中PFAS的

检测结果表明，PFAS并未在上样过程中保留，其仍然很有可能与血清基质中的蛋白质或其他组分结合。图2显示了使用该方法分析上样废液中的各种PFAS化合物得到的选定色谱图。从图中可以明显看出，经甲酸稀释的血清导致上样过程中发生大量穿透，因此需要进行蛋白沉淀。在测试的三种蛋白沉淀步骤中，1:3血清:乙腈法使PFAS几乎没有在上样时穿透。

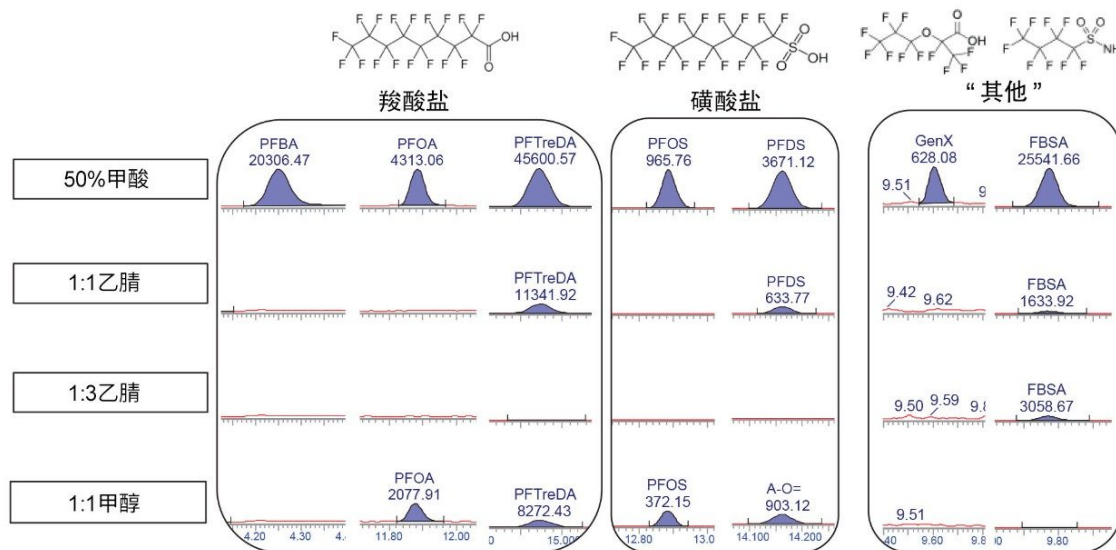


图2.测试各种样品预处理条件后在上样过程中收集的废液

由于存在SPE无法有效去除的血清特异性干扰物，因此还必须对色谱柱进行优化。已知多种类固醇硫酸盐（类固醇前体和降解产物的代谢物）会与PFAS（例如PFOS和PFHxS）共洗脱^{6,7}。起初是利用ACQUITY BEH C₁₈色谱柱进行分析，以便与先前的PFAS应用一致，但这种方法使干扰物发生共洗脱。

图3通过比较PFHxS在BEH C₁₈和HSS T3色谱柱上得到的色谱图说明这一问题。使用BEH C₁₈色谱柱时，基质干扰物容易导致某个支化PFHxS异构体被遗漏或误判。此外，如果在正常自动化数据处理程序中对峰进行平滑处理，这种干扰物很可能也被平滑并积分到直链PFHxS峰中。这将导致样品中PFHxS的浓度被高估。使用HSS T3色谱柱成功分离了基质干扰峰，从而提供更准确可靠的结果。因此采用ACQUITY HSS T3色谱柱分析所有血清样品。

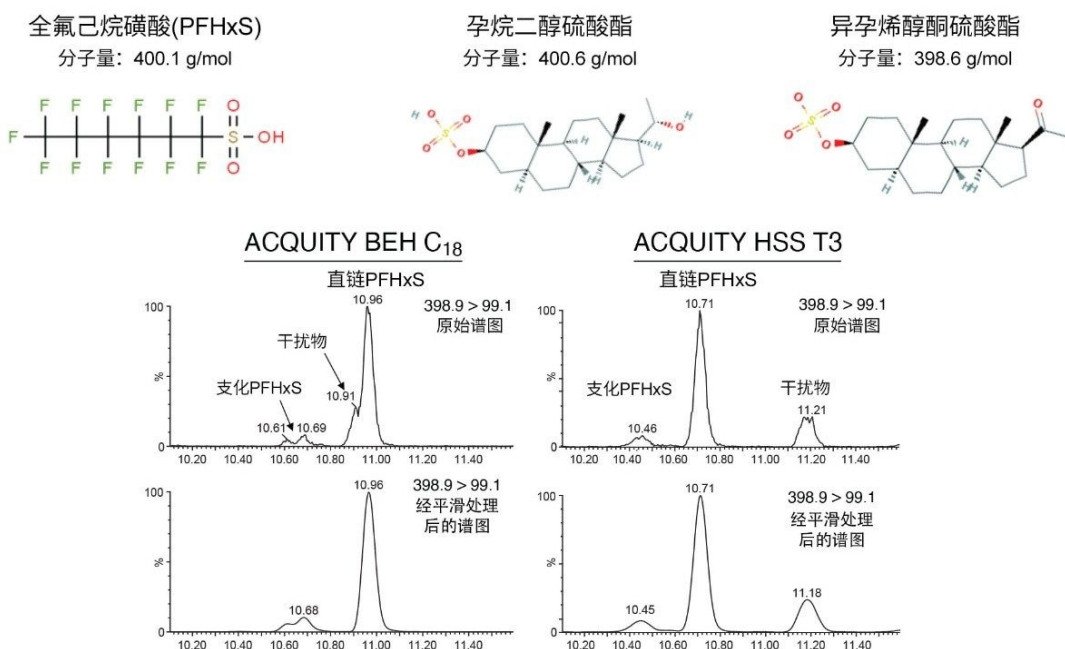


图3. (上图) 全氟己烷磺酸(PFHxS)和两种人血清类固醇硫酸盐化合物(确定为使用LC-MS/MS方法分析时的潜在干扰物)。(下图) PFHxS与人血清特异性干扰化合物在BEH C₁₈和HSS T3色谱柱上的色谱分离结果比较。

方法性能

本研究评估了使用FBS作为基质生成的校准曲线的线性和准确度, 各种PFAS化合物的结果见图4。经证明, FBS是一种理想的无PFAS基质替代品, 非常适用于本研究, 并且在分析物回收率和响应方面的表现与人血清相似。校准曲线在测试的浓度范围0.05~20 ng/mL内呈线性, 所有化合物的R²值均≥0.996。唯一例外是6:2 FTS, 其R²值为0.992。此外, 还评估了校准范围内各种化合物的残差值, 以证明方法的准确度和重现性。残差百分比是衡量标准品计算浓度与理论响应(根据校准数据预测)之间百分比偏差的指标。残差范围越小, 数据准确度和重现性越高。天然PFAS的残差在定量限(LOQ)下≤15%, 在校准曲线的其余部分≤10%。另外, 观察到同位素标记标准品的残差≤10%。样品分析过程中还进行了不同浓度的QC样品, LOQ下QC样品的准确度为20%以内, 所有其他浓度为15%以内。

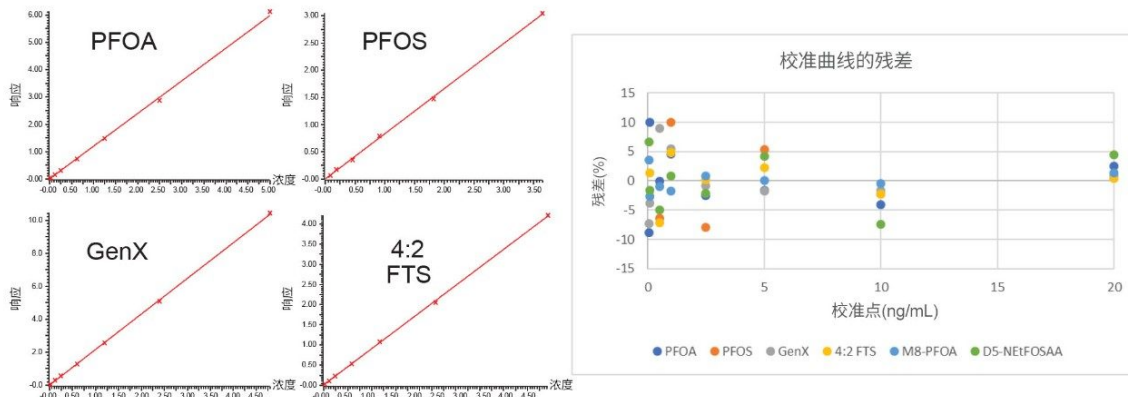


图4.方法中四种PFAS化合物的代表性校准曲线（左图），以及代表性天然化合物和同位素标记标准品的残差百分比（右图）。

使用内标评估人血清基质中30种PFAS的回收率，以校正任何基质效应。图5展示了六个不同批次的混合人血清（加标浓度范围为0.1~10 ng/mL）中各种化合物的回收率。

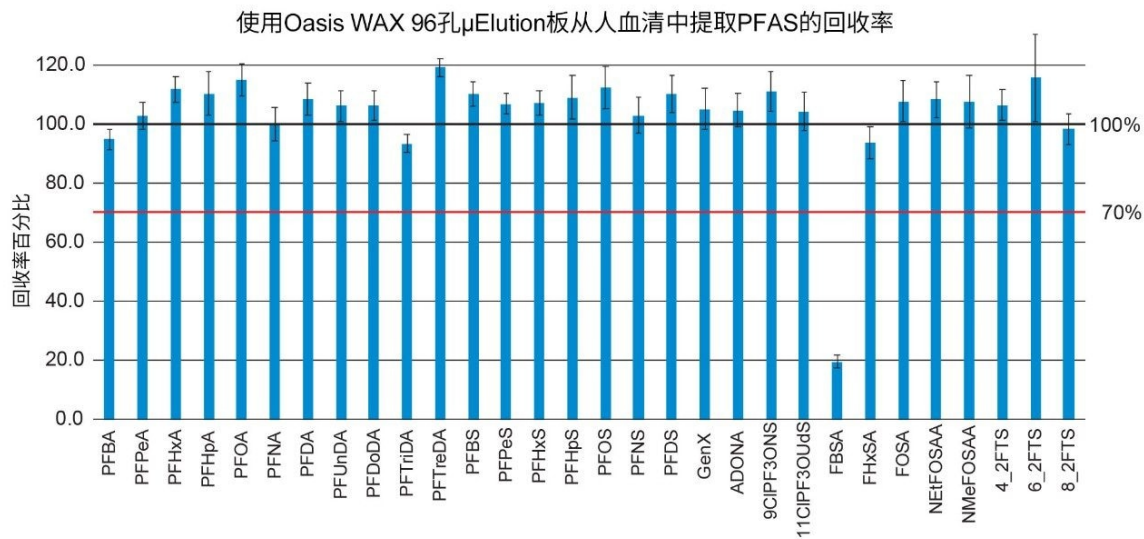


图5.方法中的30种PFAS从六个不同批次的混合人血清（加标浓度范围为0.1~10 ng/mL）中提取的平均回收率。误差棒表示18个数据点中各化合物的RSD百分比。

除C4磺酰胺(FBSA)外，所有其他化合物的回收率均在可接受范围(85~120%)内。FBSA的回收率约20%，这是因为该化合物的分子量低，中性PFAS化合物可能不适合多残留提取方法。该化合物也没有合适的内标可用于校正同位素稀释。FBSA的回收率虽低，但仍然可以检出，因此能够鉴定其是否存在于样品中。如果一定要提高该化合物的回收率，可以稍微修改SPE程序。例如，可以取消使用1:3乙腈:水进行二次SPE板清洗，以回收更多的FBSA。另外，如果仅关注中性PFAS化合物，可以利用Oasis HLB等反相填料代替WAX。但是，这将影响离子型PFAS化合物的性能和回收率。

除回收率以外，研究还使用了NIST标准参考物质(SRM)持续评估方法性能。将未加标人血清NIST SRM 1957的重复样品与每批样品一起萃取，确保获得一致、准确的结果。该参考物质包含混合人血清中天然存在的七种PFAS，浓度认定值范围为0.172~21.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (或0.043~5.27 ng/L)。由于该SRM涵盖万亿分之一(ppb)至十亿分之一(ppb)的浓度范围，因此在方法性能测试方面非常耐用。方法的准确度和耐用性结果如图6所示。柱状图并列比较了8个SRM 1957提取和分析重复样的实验计算浓度与NIST认定值。散点图展示了实验结果与认定范围的百分比差异，所有实测值均在认定值 $\pm 10\%$ 的范围内。只有PFOS的实验结果一直高于认定值，这很可能是因为数据处理过程中支化和直链异构体的处理方式不同。此外，8个重复样品的RSD百分比均低于4%，表明样品萃取和分析非常稳定。

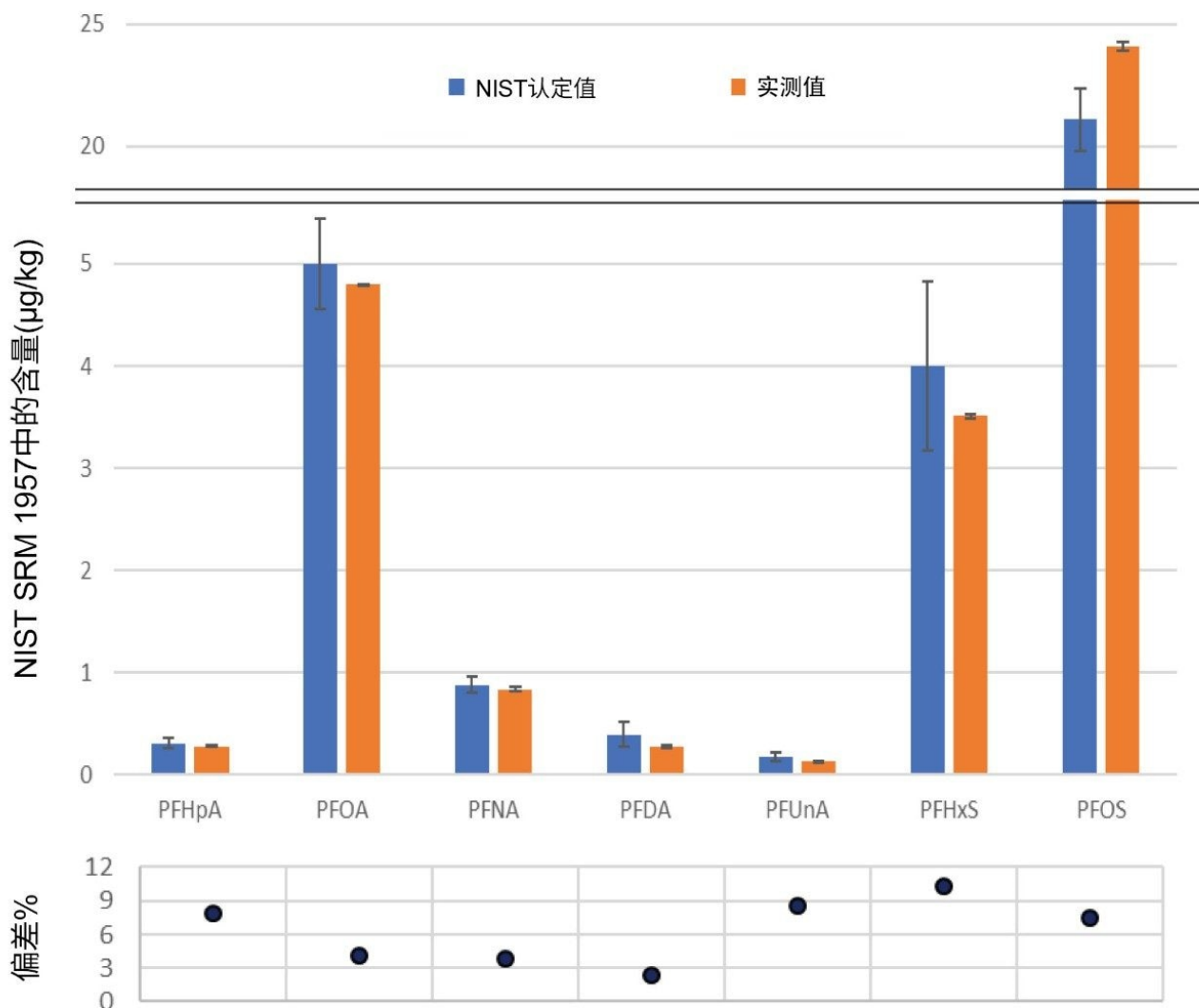


图6. NIST 1957标准参考物质8个重复样的分析结果。（上图）在SRM样品中测得的浓度值。蓝色条柱表示SRM中各种PFAS的认定浓度。橙色条柱表示实测值或实验测定值。（下图）实测值与NIST认定值之间的百分比差异计算结果。

样品分析

利用上文所述方法测定六个不同批次混合人血清中的PFAS浓度，该样品为不同性别、年龄、种族的人血清混合物。所有六个批次中的PFAS浓度均为可鉴定水平。图7所示为6个被测批次里其中3个被测批次中鉴定出的主要PFAS示例，展示了鉴定出的单个PFAS、总PFAS含量以及各PFAS占总PFAS含量的比率。虽然在所有批次的人血清中鉴

定出非常相似的PFAS，但其浓度截然不同。每个批次中各PFAS占总PFAS的比率也有所不同。此外，在人血清样品中检测到的支化异构体与直链异构体比率（图8）与分析标准品中的比率明显不同。支化异构体与直链异构体的比率可以指示PFAS的合成机理。将异构体比率与单个PFAS鉴定结果相结合，创建“PFAS指纹图谱”，可能有助于了解暴露途径或来源。

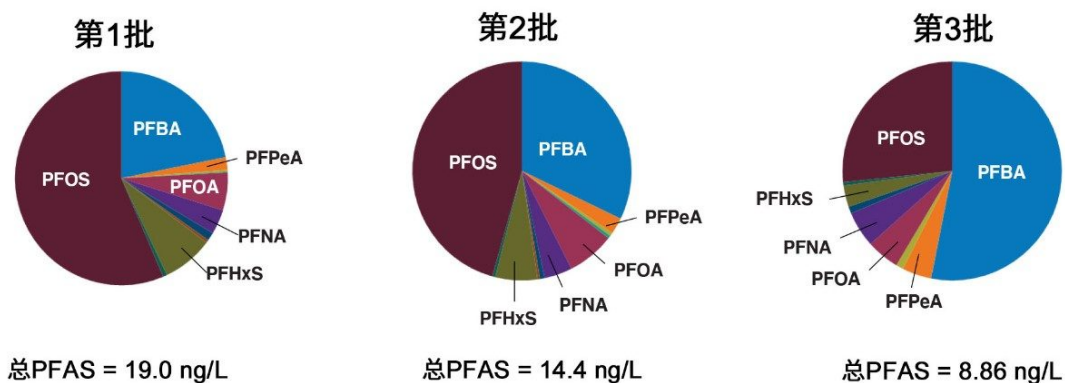


图7.3批混合人血清中PFAS的鉴定结果，展示了不同样品中总体PFAS浓度的差异以及单个PFAS比率的差异

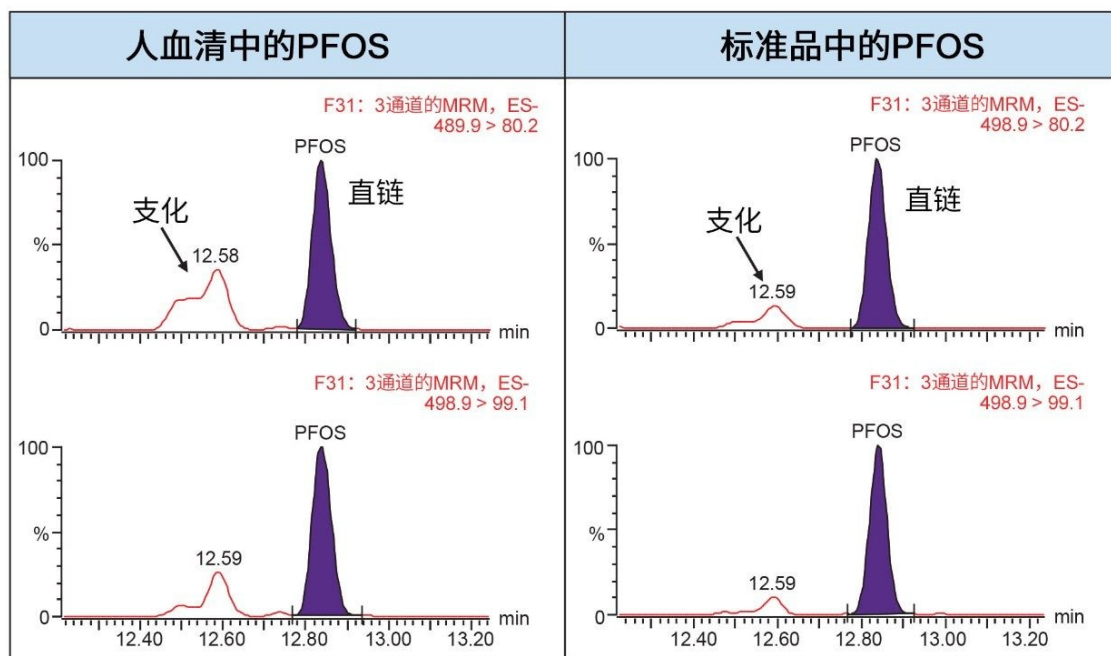


图8.人血清（左图）和分析标准品（右图）中支化与直链PFOS异构体的比率比较。异构体比率可以指示PFAS合成方案的类型，从而可能说明PFAS暴露的来源。

结论

使用Oasis WAX μ Elution 96孔SPE板优化了一种从人血清中提取PFAS的耐用方法。该方法针对30种与人体暴露有关的一系列PFAS进行了优化，这些化合物涵盖各种PFAS类别。分析采用与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统联用的Xevo TQ-S micro完成，该系统已使用PFAS方法包组件进行改良，旨在获得准确可靠的结果。对血清等复杂基质进行样品前处理，不仅可以更轻松地检测目标PFAS分析物，还可以减少仪器维护，延长仪器正常运行时间。使用NIST标准参考物质1957评估了方法性能，并证实了方法准确度。该方法可以应用于各类实验室，以了解血清样品中PFAS的浓度和趋势，用于职业健康监测、了解人体暴露水平、来源指纹图谱分析、暴露途径以及基于地区/或流行病学差异了解对人类的影响等目的。

参考资料

1. Post GB, Cohn PD, Cooper KR. Perfluorooctanoic Acid (PFOA), An Emerging Drinking Water Contaminant: A Critical Review of Recent Literature. *Environ Res.* 2012 Jul;116:93–117. doi: 10.1016/j.envres.2012.03.007.
2. Zeng Z, Song B, Xiao R, Zeng G, Gong J, Chen M, Xu P, Zhang P, Shen M, Yi H. Assessing the Human Health Risks of Perfluorooctane Sulfonate by *In Vivo* and *In Vitro* Studies. *Environment International.* 2019 126:598-610. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.002>.
3. United States Environmental Protection Agency. Health Effects Support Document for Perfluorooctane Sulfonate (PFOS). USEPA 2016; EPA 822-R-16-002.
4. States Environmental Protection Agency. Health Effects Support Document for Perfluorooctanoic Acid (PFOA). USEPA 2016; EPA 822-R-16-003.
5. Sunderland EM, Hu XC, Dassuncao C, Tokranov AK, Wagner CC, Allen JG. A Review of the Pathways of Human Exposure to Poly- and Perfluoroalkyl Substances (PFAS) and Present Understanding of Health Effects. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2019;29(2):131–147. doi:10.1038/s41370-018-0094-1.
6. Huber S, Brox J. An Automated High-Throughput SPE Micro-Elution Method for Perfluoroalkyl Substances in Human Serum. *Anal Bioanal Chem.* 2015 May;407(13):3751–61. doi: 10.1007/s00216-015-8601-x. Epub 2015 Mar 21. PMID: 25795026.
7. Chan E, Sandhu M, Benskin JP, Ralitsch M, Thibault N, Birkholz D, Martin JW. Endogenous high-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Interferences and the Case of Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) in Human Serum; Are We Overestimating Exposure? *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009 May;23(10):1405-10. doi: 10.1002/rcm.4012.

附录

化合物	母离子	碎片离子	CV	CE	化合物	母离子	碎片离子	CV	CE
PFBA	213.0	169.0	10	10	8:2 FTS	526.9	506.8	15	25
PFPeA	262.9	219.0	10	5			527.3	15	40
		269.0	5	10	ADONA	376.9	251.0	10	10
PFHxA	312.9	119.0	5	20			377.3	10	25
		319.0	15	10	9Cl-PF3ONS	531.0	350.9	15	25
PFHpA	362.9	169.0	15	15			83.0	15	25
		369.0	10	10	11Cl-PF3OUdS	631.0	450.8	30	30
PFOA	412.9	169.0	10	15			631.2	30	30
		418.9	10	10	GenX	285.0	169.0	5	7
PFNA	462.9	219.0	10	15			GenX	5	35
		468.9	15	10	¹³ C-PFBA	217	172.0	10	10
PFDA	512.9	219.0	15	15	¹³ C ₅ -PFPeA	268	223.0	10	5
		518.9	25	10	¹³ C ₅ -PFHxA	318	272.9	10	5
PFUnDA	562.9	269.0	25	20			119.9	10	20
		568.9	30	10	¹³ C ₄ -PFHpA	367	321.9	15	10
PFDoDA	612.9	169.0	30	25			172.0	15	15
		618.9	5	10	¹³ C ₈ -PFOA	421	375.9	5	10
PFTriDA	662.9	169.0	5	30			172.0	5	15
		668.9	10	15	¹³ C ₉ -PFNA	472	426.9	10	10
PFTreDA	712.9	169.0	10	25			223.0	10	15
		80.1	15	30	¹³ C ₆ -PFDA	519	473.9	5	10
PFBS	298.9	99.1	15	30			223.0	5	15
		80.1	10	30	¹³ C ₇ -PFUnDA	569.9	524.9	5	10
PFPeS	348.9	99.1	10	30			274.0	5	15
		80.1	10	35	¹³ C-PFDoDA	615	569.9	10	10
PFHxS	398.9	99.1	10	30			169.0	10	25
		80.2	15	35	¹³ C ₂ -PFTreDA	715	669.9	25	10
PFHpS	448.9	99.1	15	35			169.0	25	35
		80.2	15	40	¹³ C ₃ -PFBS	301.9	80.0	10	30
PFOS	498.9	99.1	15	40			99.0	10	25
		80.2	20	40	¹³ C ₃ -PFHxS	402	80.1	10	40
PFNS	548.9	99.2	20	40			99.1	10	35
		80.2	25	40	¹³ C ₈ -PFOS	507	80.1	15	40
PFDS	598.9	99.1	25	40			99.1	15	40
		78.0	25	25	¹³ C ₈ -FOSA	506	78.1	35	25
FBSA	297.9	118.9	25	15	D ₃ -N-MeFOSAA	573	418.9	35	20
		78.1	30	25			482.7	35	15
FHxSA	398.0	169.0	30	25	D ₅ -N-EtFOSAA	589	418.9	30	20
		77.9	40	30	¹³ C ₂ -4:2 FTS	329	308.9	40	15
FOSA	498.0	418.9	35	20			81.0	40	25
		219.1	35	25	¹³ C ₂ -6:2 FTS	429	367.0	10	10
N-MeFOSAA	569.9	418.8	15	20			408.8	10	20
		525.9	15	20	¹³ C ₂ -8:2 FTS	529	508.9	10	20
N-EtFOSAA	584.0	307.0	15	15			81.0	10	35
		327.3	15	35	¹³ C ₃ -GenX	287	169	5	12
4:2 FTS	326.9	407.0	15	20			119	5	12
		427.3	15	35					

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007114ZH, 2021年1月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)