

· 论 著 ·

超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉全氟羧酸化合物

刘少颖, 金铨, 任韧, 黄希汇

杭州市疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310021

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中9种全氟羧酸化合物(PFCAs)。**方法** 鱼肉样品经甲基叔丁基醚萃取, WAX固相萃取柱净化, 使用甲醇和25 mmol/L乙酸铵溶液依次淋洗, 0.5%氨水甲醇洗脱, 氮吹至近干后, 50%甲醇水溶液复溶, 选择1 mmol/L乙酸铵水溶液-甲醇作为流动相, 采用超高效液相色谱-串联质谱法检测分析。**结果** 9种PFCAs在UPLC BEH-C18色谱柱上能较好分离, 在1.0~200.0 ng/mL范围线性关系良好, 相关系数>0.99, 检出限为0.06~0.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为0.19~0.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在5.0、25.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平的回收率为70.08%~117.24%, 相对标准偏差为2.31%~19.68%。**结论** 通过优化预处理条件, 液相色谱流动相和质谱检测条件建立的超高效液相色谱-串联质谱法适用于鱼肉中全氟羧酸化合物测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 鱼肉; 全氟羧酸化合物

中图分类号: R123.1 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2020) 12-1204-04

Determination of perfluorocarboxylic acids in fish by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

LIU Shaoying, JIN Quan, REN Ren, HUANG Xihui

Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310021, China

Abstract: Objective To develop the ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the determination of perfluorocarboxylic acids (PFCAs) in fish. **Methods** The fish samples were extracted with tert-butyl methyl ether and purified by WAX columns. The WAX cartridges were rinsed with methanol and 25 mmol/L ammonium acetate, and the target compound residues were eluted with 0.5% ammonia methanol and then redissolved with 50% methanol aqueous solution after nitrogen blowing to nearly dry. Nine kinds of PFCAs were simultaneously quantified by UPLC-MS/MS with 1 mmol/L ammonium acetate-methanol solution as the mobile phase. **Results** The extraction was separated well in UPLC BEH C18 column. There were good linear correlations of nine kinds of PFCAs in the range of 1.0-200.0 ng/mL, with the coefficients all more than 0.99. The limits of detection and quantification were 0.06-0.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.19-0.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The recovery rates were 70.08%-117.24% at different spiked levels (5.0, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and the relative standard deviations were 2.31%-19.68%. **Conclusion** Through optimizing the pretreatment conditions, the mobile phase of liquid chromatography and the detection conditions of mass spectrometry, the UPLC-MS/MS could meet the monitoring requirements of PFCAs in fish.

Keywords: ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; fish; perfluorocarboxylic acids

全氟羧酸化合物(perfluorocarboxylic acids, PFCAs)是分子中与碳原子连接的氢被氟取代的一类

羧酸类有机化合物,具有良好的化学稳定性、热稳定性和疏水疏油性,被广泛用于化工、机械、纺织、电子、消防和家庭用品^[1]。PFCAs在多种环境介质和生物体内被检出^[2],具有致癌性^[3]、肝毒性^[4]、神经毒性^[5]、生殖毒性^[6]和甲状腺毒性^[7]等。由于其结构中包含C-F化学键,难以被水解、光解和微生

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2020.12.004

基金项目: 浙江省分析测试科技计划项目(2018C37031)

作者简介: 刘少颖, 博士, 副主任技师, 主要从事理化分析工作

通信作者: 金铨, E-mail: jinquanjinquan@163.com

物降解,是一类持久性有机污染物 (persistent organic pollutants, POPs) [8]。目前 PFCA_s 的检测主要采用液相色谱质谱法 [9-10] 和气相色谱质谱法 [11],前者适用于中性 PFCA_s [12],后者适用于挥发性弱的 PFCA_s。有研究发现 [13],水源性食品中的 PFCA_s 浓度高于陆源性食品,以鱼类为代表的水产品消费是人群暴露 PFCA_s 的主要来源。鱼肉中含有较高的脂质,容易导致明显的基质效应,采用合适的提取和净化方法能降低基质效应,提高方法的灵敏度和精密度。目前,我国尚未建立有关鱼肉样品的标准检测方法。本研究旨在优化固相萃取柱、色谱和质谱条件,建立超高效液相色谱-串联质谱法检测鱼肉中 9 种 PFCA_s。现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-串联质谱仪 QTRAP® 6500 (美国 AB Sciex 公司)-LC-30AD (日本 Shimadzu 公司);分析天平 (感量 0.1 mg, METrLE TOLEDO MS204S);天平 (感量 0.01 g, 常熟双杰测试仪器厂, JJ300);MS2 Minishaker 振荡器 (德国 IKA 公司);T25 digital ULTRA 均质机 (德国 IKA 公司);Microfuge 20R 台式微量离心机 (美国 Beckman 公司);Sorvall LYNX 4000 高速落地离心机 (美国 Thermo Scientific 公司);N-EVAP 112 氮吹仪 (美国 Organomatuon 公司);超纯水净化系统, Millipore Mili-Q Gradient;OASIS WAX 固相萃取柱 (150 mg/6 cc, 美国 Waters 公司);0.22 μm 滤膜。

全氟丁酸 (PFBA)、全氟戊酸 (PFPeA)、全氟己酸 (PFHxA)、全氟庚酸 (PFHpA)、全氟辛酸 (PFOA)、全氟壬酸 (PFNA)、全氟癸酸 (PFDA)、全氟十一酸 (PFUdA) 和全氟十二酸 (PFDoA) 9 种 PFCA_s 标准物质,以及内标 ¹³C₄-全氟辛酸 (MPFOA) 标准物质均购自 Wellington Laboratories 公司,纯度 >98%;甲醇、乙腈和甲基叔丁基醚购自德国 Merck 公司,色谱级;其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters UPLC BEH C18 柱 (1.7 μm, 2.1 mm×100 mm);柱温: 40 ℃;进样体积: 10 μL;流动相: A 为 1 mmol/L 乙酸铵水溶液, B 为甲醇;流速: 0.3 mL/min;梯度洗脱程序: 0~2 min, 10% B; 2~5 min, 10% B~70% B; 5~10 min, 70% B~95% B; 10 mmol/L 18 min, 95% B; 18~19 min, 95% B~10% B; 19 mmol/L 25 min, 10% B。

1.2.2 质谱条件

毛细管电压: 4.5 kV;脱溶剂气: 氮气;碰撞器: 氮气;脱溶剂温度: 350 ℃;气帘气: 40 psi;离子化模式: ESI⁻;扫描模式: 多反应监测模式。见表 1。

表 1 9 种 PFCA_s 及其内标的多反应监测模式参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
PFBA	213	169 ^a	26	12
PFPeA	263	219 ^a	45	10
PFHxA	313	269 ^a , 119	22, 22	14, 26
PFHpA	363	319 ^a , 169	18, 16	11, 24
PFOA	413	369 ^a , 169	17, 19	14, 25
PFNA	463	419 ^a , 169	37, 37	16, 28
PFDA	513	469 ^a , 269	31, 42	13, 26
PFUdA	563	519 ^a , 319	21, 20	16, 25
PFDoA	613	569 ^a , 319	33, 41	15, 29
MPFOA	417	372 ^a , 169	20, 20	15, 24

注: a 为定量离子。

1.2.3 样品前处理

取 2.0 g 鱼肉置于 50 mL 离心管中,加入 25.0 μg/kg 内标后静置 10 min,加入 2 mL 水, 2 mL 0.5 mol/L 四丁基硫酸氢铵溶液和 4 mL 0.05 mol/L 碳酸钠溶液,经振荡混匀器混匀后加 10 mL 甲基叔丁基醚,匀质提取 3 min, 4 ℃ 21 532×g 离心 5 min,上清液转移至另一干净 50 mL 离心管;沉淀物再加入 10 mL 甲基叔丁基醚,匀质,重复以上步骤,合并上清液,在 40 ℃氮吹至约 0.5 mL,用超纯水定容至 50 mL,待净化。

将上述样液转移至已活化的 WAX 固相萃取柱。WAX 固相萃取柱使用前依次用 4 mL 0.5% 氨水甲醇、4 mL 甲醇和 4 mL 水进行活化。样品过柱后,用 4 mL 甲醇和 4 mL 25 mmol/L 乙酸铵 (pH=4) 溶液淋洗柱子后,抽干,用 4 mL 0.5% 氨水甲醇洗脱 2 次,将洗脱液在 40 ℃氮吹至近干,用 50% 甲醇水溶液定容至 1 mL, 4 ℃ 21 532×g 离心 5 min,将上清液转移至进样瓶,供超高效液相色谱-串联质谱仪检测分析。

1.2.4 标准溶液的配制

准确称取 10.0 mg 及 MPFOA 标准品置于 10 mL 容量瓶,用甲醇定容至刻度,配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。用移液器分别吸取 9 种 PECA_s 标准储备液 (1.0 mg/mL) 各 10 μL 置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配置成浓度为 1.0 mg/L 的混合标准储备液。用移液

器吸取适量的混合标准储备液和 MPFOA 标准溶液, 用 50% 甲醇水溶液配制成浓度为 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 ng/mL 的标准系列浓度, 每份溶液含 50 ng/mL MPFOA, 经超高效液相色谱串联质谱仪分析, 采用内标法定量。

1.2.5 回收率和精密度试验 将 5.0、25.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平的 PFCAs 添加到空白鱼肉样品中, 按 1.2.3 步骤进行样品前处理后, 采用超高效液相色谱串联质谱仪测定, 每个水平进行平行试验 6 次, 检测回收率和精密度。

2 结果

2.1 色谱条件的优化 1 mmol/L 乙酸铵-甲醇作为流动相时, PFCAs 信号响应值比水-甲醇作为流动相时高 1.1~3.9 倍, 水相中加入乙酸铵提高 PFCAs 离子化效率。采用 UPLC BEH C18 分离时, 峰形更好, 分离度更高。因此本研究选择 UPLC BEH C18 在 1 mmol/L 乙酸铵-甲醇流动相下梯度洗脱。

2.2 样品前处理的优化 采用甲基叔丁基醚提取鱼肉样品的 PFCAs, 提取效率为 81%~96%, 符合要求。相较于 HLB 固相萃取柱, WAX 固相萃取柱对 9 种 PFCAs 具有更好的萃取效率, 尤其是对 PFBA 和 PFPeA。分别观察甲醇、乙腈、5% 氨水甲醇、5% 氨水乙腈对 WAX 固相萃取柱吸附 PFCAs 的洗脱效果, 发现当洗脱溶液呈碱性时 (5% 氨水甲醇和 5% 氨水乙腈) 能洗脱 WAX 固相萃取柱吸附的 PFCAs, 并且 5% 氨水甲醇比 5% 氨水乙腈洗脱效率更高。

2.3 线性关系和检出限 将 PFCAs 标准溶液按质量浓度从低到高的顺序依次测定, 以内标法定量。分别以 9 种 PFCAs 与 MPFOA 的峰面积比值作为纵坐标, 浓度比值作为横坐标, 进行线性回归分析, 在 1.0~200.0 ng/mL 范围内目标化合物线性关系良好, 相关系数均 >0.99 。取阴性鱼肉样品, 按 1.2.3 的方法处理, 得到空白基质, 加入不同浓度的标准溶液, 按 10 倍和 3 倍信噪比分别计算不同 PFCAs 的检出限和定量限, 目标化合物的检出限为 0.06~0.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 0.19~0.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。见表 2。

2.4 回收率和精密度试验 选取空白样品, 配制 5.0、25.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 种浓度的加标样品, 按 1.2.3 的方法处理, 分别进行 6 次平行加标回收率实验, 以标准曲线定量, PFCAs 的回收率为 70.08%~117.24%, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.31%~19.68%。见表 3。

表 2 9 种 PFCAs 的标准曲线、检出限和定量限

化合物	回归方程	相关系数	检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
PFBA	$y=3.278 3x+0.050 1$	0.991 1	0.08	0.26
PFPeA	$y=1.839 7x+0.022 9$	0.995 5	0.06	0.19
PFHxA	$y=1.483 6x+0.008 8$	0.993 1	0.08	0.28
PFHpA	$y=0.928 9x+0.004 9$	0.993 8	0.16	0.52
PFOA	$y=0.897 0x+0.009 3$	0.991 8	0.09	0.30
PFNA	$y=0.960 4x-0.002 3$	0.998 9	0.19	0.62
PFDA	$y=0.886 5x+0.002 8$	0.999 7	0.07	0.24
PFUdA	$y=1.430 4x+0.000 1$	0.998 8	0.06	0.19
PFDoA	$y=1.029 2x+0.015 9$	0.996 2	0.14	0.47

表 3 9 种 PFCAs 的回收率和精密度试验结果 ($n=6$)

化合物	加标水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 ($\bar{x}\pm s, \%$)	RSD (%)
PFBA	5	74.94 \pm 12.44	16.60
	25	70.08 \pm 4.59	6.55
	50	73.72 \pm 3.73	5.06
PFPeA	5	91.83 \pm 8.99	9.79
	25	88.31 \pm 2.04	2.31
	50	92.00 \pm 7.48	8.13
PFHxA	5	93.92 \pm 16.67	17.75
	25	95.14 \pm 8.81	9.26
	50	80.14 \pm 6.74	8.41
PFHpA	5	103.51 \pm 14.73	14.23
	25	86.87 \pm 4.81	5.55
	50	93.49 \pm 5.60	5.99
PFOA	5	93.38 \pm 17.35	18.58
	25	117.24 \pm 16.32	13.92
	50	106.54 \pm 12.05	11.31
PFNA	5	77.51 \pm 6.86	8.85
	25	83.62 \pm 11.23	13.43
	50	85.24 \pm 10.68	12.53
PFDA	5	85.96 \pm 5.88	6.84
	25	89.49 \pm 11.83	13.22
	50	90.73 \pm 15.27	16.83
PFUdA	5	99.79 \pm 9.62	9.64
	25	96.90 \pm 14.99	15.47
	50	88.52 \pm 17.42	19.68
PFDoA	5	73.42 \pm 10.00	13.62
	25	86.27 \pm 5.72	6.63
	50	73.24 \pm 4.27	5.83

3 讨论

本研究通过优化样品提取和固相萃取柱净化等预处理条件、液相色谱流动相及质谱检测条件,建立了测定鱼肉样品中多种 PFCA_s 的超高效液相色谱-串联质谱法。选择使用聚丙烯材料的器皿,色谱管路为 PEEK 塑料管路或不锈钢管路^[14],降低了检出限,避免引入污染。通过优化液相色谱与质谱的采集参数,得到最佳的仪器检测条件。PFCA_s 化学结构中具有羧基,在负离子反应模式监测条件下灵敏度较高,加入乙酸铵在一定程度上提高 PFCA_s 的离子化效率,增强目标离子的响应信号,使 PFCA_s 与色谱柱上非极性固定相之间的相互作用发生改变,并且能够防止色谱柱固定相硅醇活性基团与极性组分相互作用所导致的信号掩蔽^[15]。

采用甲基叔丁基醚提取鱼肉样品的 PFCA_s,满足提取目标化合物同时降低共溶物杂质提取率要求,提高方法的灵敏度和精密性^[16-17]。WAX 固相萃取柱填料为混合型弱阴离子交换反相吸附剂,能有效净化复杂基质中含羧酸基团的被测物^[18],对 PFCA_s 具有较高的选择性。HLB 固相萃取柱填料为反相吸附剂,保留大部分 PFCA_s,但出峰时间较早的短链 PFCA_s (C4-C5) PFBA 和 PFPeA 在 HLB 固相萃取柱上却没有保留^[19]。对固相萃取柱的洗脱溶液和淋洗溶液进行优化,选择 5% 氨水甲醇作为洗脱溶液,甲醇作为淋洗溶液,保留目标化合物,减少基质效应。

研究结果显示,1.0~200.0 ng/mL 范围内 9 种 PFCA_s 线性关系良好,检出限为 0.06~0.19 μg/kg,方法的灵敏度、回收率较高,重现性较好,能满足实际检测需要。超高效液相色谱-串联质谱法简便、灵敏、准确和稳定,适用于鱼肉样品中 PFCA_s 的测定。

参考文献

[1] FAIR P A, WOLF B, WHITE N D, et al. Perfluoroalkyl substances (PFASs) in edible fish species from Charleston Harbor and tributaries, South Carolina, United States: exposure and risk assessment [J]. *Environ Res*, 2019, 171: 266-277.

[2] 李磊, 周贻兵, 刘利亚, 等. QuEChERS 净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定母乳中 9 种全氟化合物 [J]. *现代预防医学*, 2018, 45 (11): 2028-2033.

[3] HURLEY S, GOLDBERG D, WANG M, et al. Breast cancer risk and serum levels of per- and poly-fluoroalkyl substances: a case-control study nested in the California Teachers Stud [J]. *Environ Health*, 2018, 17: 266-277.

[4] KONG B, WANG X, HE B, et al. 8 : 2 fluorotelomer alcohol inhibited proliferation and disturbed the expression of pro-inflamma-

tory cytokines and antigen-presenting genes in murine macrophages [J]. *Chemosphere*, 2019, 219: 1052-1060.

- [5] NIU J, LIANG H, TIAN Y, et al. Prenatal plasma concentrations of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and neuropsychological development in children at four years of age [J]. *Environ Health*, 2019, 18 (1): 53-66.
- [6] LIEW Z, GOUDARZI H, OULHOTE Y. Developmental exposures to perfluoroalkyl substances (PFASs): an update of associated health outcomes [J]. *Curr Environ Health Rep*, 2018, 5 (1): 1-19.
- [7] 常思思, 姚谦, 田英, 等. 全氟化合物暴露对婴幼儿甲状腺激素水平影响的研究进展 [J]. *上海预防医学*, 2019, 31 (9): 773-777.
- [8] DOMINGO J L. Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds [J]. *Environ Int*, 2012, 40 (1): 187-195.
- [9] 谢琳娜, 张海婧, 侯沙沙, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法分析土壤中 15 种全氟化合物 [J]. *分析化学*, 2019, 47 (12): 1967-1972.
- [10] 孙敏, 鲍俊信, 徐蓓, 等. 饮用水厂排泥水及污泥中全氟化合物分布特征 [J]. *浙江大学学报 (工学版)*, 2019, 53 (9): 1835-1842.
- [11] 张子豪, 肖前, 钟怀宁, 等. 液-液萃取/气相色谱-串联质谱测定纸质食品接触材料中 9 种挥发性全氟化合物前体物的迁移量 [J]. *分析测试学报*, 2018, 37 (9): 1002-1007.
- [12] MOTAS GUZMAN M, CLEMENTINI C, DOLORES PEREZ-CARCELES M, et al. Perfluorinated carboxylic acids in human breast milk from Spain and estimation of infant's daily intake [J]. *Sci Total Environ*, 2016, 544: 595-600.
- [13] HAUG L S, SALIHOVIC S, JOGSTEN I E, et al. Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway [J]. *Chemosphere*, 2010, 80 (10): 1137-1143.
- [14] ZHOU Y, LIAN Y, SUN X, et al. Determination of 20 perfluoroalkyl substances in greenhouse vegetables with a modified one-step pretreatment approach coupled with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) [J]. *Chemosphere*, 2019, 227: 470-479.
- [15] MULABAGAL V, LIU L, QI J, et al. A rapid UHPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of 23 perfluoroalkyl substances (PFAS) in estuarine water [J]. *Talanta*, 2018, 190: 95-102.
- [16] 叶洪丽, 余玮玥, 史永富, 等. 东海沿岸省市鱼类水产品中全氟烷基化合物含量调查研究 [J]. *中国渔业质量与标准*, 2019, 9 (4): 13-21.
- [17] MENG J, LIU S, ZHOU Y, et al. Are perfluoroalkyl substances in water and fish from drinking water source the major pathways towards human health risk? [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 181: 194-201.
- [18] CAO X, WANG C, LU Y, et al. Occurrence, sources and health risk of polyfluoroalkyl substances (PFASs) in soil, water and sediment from a drinking water source area [J]. *Ecotoxicology Environ Saf*, 2019, 174: 208-217.
- [19] GAO Y, LI X M, LI X Q, et al. Simultaneous determination of 21 trace perfluoroalkyl substances in fish by isotope dilution ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1084: 45-52.

收稿日期: 2020-09-01 修回日期: 2020-10-21 本文编辑: 田田