

双固相萃取柱净化-超快速液相色谱-串联质谱法同时测定贝类组织中全氟羧酸及其前体物质

国 佼^{1,2}, 郭萌萌^{2,3}, 吴海燕^{2,3}, 翟毓秀^{2,3}, 牟海津¹, 卢立娜^{2,3}, 谭志军^{2,3,*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘 要: 建立同时测定贝类中13种全氟羧酸类化合物、6种氟调聚饱和酸和3种氟调聚不饱和酸的超快速液相色谱-串联质谱分析方法。样品经90%乙腈溶液超声提取, Oasis WAX和Envi-Carb双固相萃取柱净化, Kinetex XB-C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm)分离, 多反应监测负离子模式扫描, 同位素内标法定量。22种目标物在各自相应质量浓度范围内线性良好, 相关系数不低于0.995, 定量限为0.03~1.67 ng/g。基质加标回收率在63.05%~127.18%之间, 相对标准偏差为4.70%~17.1%。本方法实现了复杂贝类基质(肌肉、肝脏、外套膜、鳃、性腺等)中PFCAs及其前体物质的同时测定, 采用双柱净化方式, 大大降低了杂质成分的干扰, 部分化合物的灵敏度优于现有方法, 适用于贝类样品中PFCAs及其前体物质的监控分析, 为研究PFCAs前体物质的生物转化提供了新技术手段。

关键词: 全氟羧酸及其前体物质; 贝类; 固相萃取; 超快速液相色谱-串联质谱

Simultaneous Determination of Perfluorinated Acids and Their Precursors in Bivalve Shellfish by Double SPE Columns Purification and Ultra Fast Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

GUO Jiao^{1,2}, GUO Mengmeng^{2,3}, WU Haiyan^{2,3}, ZHAI Yuxiu^{2,3}, MOU Haijin¹, LU Lina^{2,3}, TAN Zhijun^{2,3,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China)

Abstract: A method for the simultaneous identification and quantification of thirteen perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs), six fluorotelomer saturated carboxylic acids (FTCAs) and three fluorotelomer unsaturated carboxylic acids (FTUCAs) in bivalve shellfish tissues was developed using ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UFLC-MS/MS). Samples were extracted with acetonitrile-water (90:10, V/V), and the extract was cleaned up by solid-phase extraction (SPE) using Oasis WAX SPE coupled in-line to ENVI-Carb. Then, the separation was performed on a Kinetex XB-C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm) with gradient elution using a mixture of 95% methanol solution containing 5 mmol/L ammonium acetate and 5% methanol solution containing 5 mmol/L ammonium acetate as the mobile phase. Mass spectrometry was carried out under the multiple reaction monitoring (MRM) mode with negative electrospray ionization and the internal standard method was employed for quantification. The calibration curves for 22 analytes were linear well with correlation coefficient over 0.995. The limits of quantification ranged from 0.03 to 1.67 ng/g. The average spiked recoveries for 22 analytes were between 63.05% and 127.18%, with relative standard deviations (RSDs) from 4.70% to 17.1%. This method was successfully applied for the simultaneous determination of 13 PFCAs and 9 potential precursors in bivalve shellfish tissue samples.

Key words: perfluorinated acids and their precursors; bivalve shellfish; solid-phase extraction (SPE); ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UFLC-MS/MS)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720036

中图分类号: O652.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 20-0248-08

收稿日期: 2016-11-03

基金项目: 国家科技基础性工作专项 (2014FY230100)

作者简介: 国佼 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为有机污染物安全检测与评价。E-mail: guoam630@outlook.com

*通信作者: 谭志军 (1978—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为水产品质量安全。E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn

引文格式:

国佼, 郭萌萌, 吴海燕, 等. 双固相萃取柱净化-超快速液相色谱-串联质谱法同时测定贝类组织中全氟羧酸及其前体物质[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 248-255. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720036. <http://www.spkx.net.cn>

GUO Jiao, GUO Mengmeng, WU Haiyan, et al. Simultaneous determination of perfluorinated acids and their precursors in bivalve shellfish by double SPE columns purification and ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2017, 38(20): 248-255. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720036. <http://www.spkx.net.cn>

全氟羧酸类化合物(perfluoroalkyl carboxylic acids, PFCAs)为环境介质中广泛存在、极具代表性的一类全氟化合物,具有多脏器毒性和潜在致癌性^[1-3]。与其他全氟化合物相比,PFCAs分布更广且是多种前体物质在环境和生物体中的最终转化产物,其造成的环境和健康问题,已引起国际社会的高度关注^[4-5]。而除PFCAs自身外,PFCAs前体物质为生物体内PFCAs污染的间接来源,其中氟调聚物是PFCAs间接来源的重要组成部分^[6]。研究发现,PFCAs毒性阈值主要取决于氟化碳链长度、种类和 α - β 碳键的不饱和程度^[7-8],其毒性随着其碳链长度增加而增强^[9]。而且,PFCAs的前体物质,如氟调聚物和酸(fluorotelomer saturated carboxylic acids, FTCAs)和氟调聚不饱和酸(fluorotelomer unsaturated carboxylic acids, FTUCAs)的毒性甚至远大于PFCAs(毒性大小顺序为:FTCAs>FTUCAs>PFCAs)^[7,10]。由于PFCAs及其前体物质可能同时存在于同一生物体内,这种复合污染所带来的联合毒性已引起了研究者的密切关注^[11-12]。而双壳贝类作为海洋POPs污染指示物,对PFCAs表现出高选择性的蓄积作用^[13],相关检出率达72%以上^[14]。因此,建立一个涵盖多组分PFCAs及其前体物质的准确、灵敏的高效检测方法,对于双壳贝类中PFCAs及其前体物质的生物转化和联合毒性等相关研究具有重要意义。

现有方法中,多采用有机溶剂提取,弱阴离子交换(weak anion exchange, WAX)固相萃取或分散石墨化炭黑净化^[15-17],结合液相色谱-串联质谱^[18-19]分析生物样品中的痕量全氟化合物。但是针对环境和生物样品中PFCAs及其前体物质的同时分析方法相对较少,而且已有方法多存在分析物种类不全、灵敏度和回收率低等缺陷。如Taniyasu等^[20]采用KOH消解提取结合WAX固相萃取柱净化的方法对水、血液和肝脏样品中PFCAs及其前体物质进行分析,由于净化方法无法有效消除基质效应导致部分前体物质回收率偏低。而双柱串联的净化方式可有效解决这一问题,已用于复杂基质中全氟化合物的分析^[14,21-22]。Zabaleta等^[18]在全氟化合物分析方法的基础上,将双柱净化方式用于鱼的肝脏、肌肉中PFCAs及其前体物质的痕量分析,但不足之处是采用了两种洗脱梯度进行洗脱分析,未实现真正意义上的同时测定,且部分目标物的检出限仍处于较高水平,无法满足痕量水平上PFCAs及其前体物质转化研究的需要。

本研究选取双壳贝类的不同组织(肌肉、肝脏、外套膜、鳃、性腺)和全贝为生物基质,采用超声提取结合WAX和Envi-carb双柱串联固相萃取净化的前处理方法,并优化PFCAs及其前体物质同时测定的仪器条件,实现了13种PFCAs及其9种前体物质(6种FTCAs和3种FTUCAs)的同步提取和同时测定。该方法灵敏度、准确度高,适用于贝类组织复杂基质样品中PFCAs及其前体物质的痕量分析,为全氟化合物及其前体物质的生物转化特征、安全评价等相关研究提供了新技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

贝类样品:2016年1—4月,随机在黄海青岛海域和大连海域共采集45个双壳贝类样品,种类为扇贝和牡蛎,分解为肌肉、肝脏、外套膜、鳃、性腺等不同组织,所有组织和样品经冷冻干燥后于-20℃保存,用于实际样品的测试和方法验证。

甲醇、乙腈(LC-MS级) 美国Merck公司;乙酸铵(HPLC级)、Supelclean ENVI-Carb固相萃取柱、氨水(ACS级) 美国Sigma Aldrich公司;甲酸、超纯水(LC-MS级) 美国赛默飞世尔公司;Oasis WAX固相萃取柱(150 mg, 6 mL) 美国Waters公司;丙酮(HPLC级) 美国J.T.Baker公司;其他未作特殊说明的试剂均为分析纯。

22种标准物质及6种内标物质(纯度均大于99%)均购自于加拿大Wellington Laboratories公司:1) PFCAs:全氟丁酸(perfluorobutanoic acid, PFBA)、全氟戊酸(perfluoropentanoic acid, PFPeA)、全氟己酸(perfluorohexanoic acid, PFHxA)、全氟庚酸(perfluoroheptanoic acid, PFHpA)、全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)、全氟壬酸(perfluorononanoic acid, PFNA)、全氟癸酸(perfluorodecanoic acid, PFDA)、全氟十一烷酸(perfluoroundecanoic acid, PFUdA)、全氟十二烷酸(perfluorododecanoic acid, PFDoA)、全氟十三烷酸(perfluorotridecanoic acid, PFTrDA)、全氟十四烷酸(perfluorotetradecanoic acid, PFTeDA)、全氟十六烷酸(perfluorohexadecanoic acid, PFHxDA)、全氟十八

烷酸(perfluorooctadecanoic acid, PFODA); 2) PFCAs前体物质: 6:2氟调聚酸(6:2 fluorotelomer carboxylic acid, 6:2 FTCA)、8:2氟调聚酸(8:2 FTCA)、10:2氟调聚酸(10:2 FTCA)、3:3氟调聚酸(3:3 FTCA)、5:3氟调聚酸(5:3 FTCA)、7:3氟调聚酸(7:3 FTCA)、6:2氟调聚不饱和酸(6:2 Fluorotelomer unsaturated carboxylic acid, 6:2 FTUCA)、8:2氟调聚不饱和酸(8:2 FTUCA)、10:2氟调聚不饱和酸(10:2 FTUCA); 3) 内标物质: [¹³C₄]-全氟辛酸(MPFOA)、[¹³C₂]-6:2氟调聚酸(M6:2 FTCA)、[¹³C₂]-8:2氟调聚酸(M8:2 FTCA)、[¹³C₂]-10:2氟调聚酸(M10:2 FTCA)、[¹³C₂]-6:2氟调聚不饱和酸(M6:2 FTUCA)、[¹³C₂]-8:2氟调聚不饱和酸(M8:2 FTUCA)。

1.2 仪器与设备

Prominence UFLC液相色谱 日本Shimadzu公司; 5500 QTRAP四极杆-线性离子阱复合质谱 美国AB Sciex公司; Elmasonic E300超声清洗机 德国艾尔玛公司; T18 basic型均质机 德国IKA公司; 真空冷冻干燥机 丹麦Scanlaf公司; XW-80A旋涡混合器 上海医大仪器有限公司; Himac CR 22G II高速离心机 日本Hitachi公司; N-EVAP 112氮吹仪 美国Organomation公司; Milli-Q超纯水仪 美国Millipore公司; 57250-U固相萃取装置 美国Supelco公司。

1.3 方法

1.3.1 样品预处理

1.3.1.1 提取

称取0.50 g匀质后的冻干样品, 于15 mL聚丙烯(polypropylene, PP)离心管中, 加入内标物(1 ng)和5 mL 90%乙腈溶液, 涡旋混匀, 在30 °C超声萃取15 min, 频率50 kHz, 6 000 r/min离心5 min, 将上清液转移至15 mL PP离心管中, 重复提取一次, 合并两次提取液, 40 °C氮吹至约1 mL, 待净化。

1.3.1.2 净化

WAX固相萃取柱使用前依次用5 mL甲醇和5 mL水活化, Envi-carb小柱预先用5 mL甲醇活化。将提取液用6 mL水稀释后, 以1 滴/s的流速通过WAX小柱, 用1 mL 2%甲酸溶液和1 mL 5%甲醇溶液淋洗, 再将Envi-carb小柱串联至WAX固相萃取柱下方, 向WAX柱中加入4 mL 2.5%的氨水-丙酮溶液洗脱目标物, 洗脱液在40 °C氮吹至干, 最后用50%甲醇溶液定容至0.25 mL, 12 000 r/min离心5 min, 过0.22 μm滤膜后进超快速液相色谱-串联质谱分析。

1.3.1.3 肝脏样品

经上述提取和净化处理后, 用50%甲醇溶液定容至1 mL, 12 000 r/min离心5 min, 过0.22 μm滤膜后进液相色谱-串联质谱分析。

为避免引入高背景值, 实验全过程避免使用聚四氟乙烯材质的色谱管路和器皿, 且实验器皿使用前用甲醇

充分清洗; 同时, 采用杂质延迟法^[23], 在混合器和进样器之间安装延迟色谱柱, 使液相系统的背景干扰组分与目标组分分离。

1.3.2 色谱条件

Kinetex XB-C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm); 延迟柱: C₁₈色谱柱(2.1 mm×50 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 流动相: A: 5%的甲醇溶液(含5 mmol/L乙酸铵), B: 95%的甲醇溶液(含5 mmol/L乙酸铵); 洗脱梯度: 0~1.5 min, 10% B; 1.6~2.0 min, 10%~40% B; 2.1~5.0 min, 40%~60% B; 5.1~14 min, 60%~98% B; 14.1~16.0 min, 98% B; 16.1~18.0 min, 10% B。

1.3.3 质谱条件

表1 22种目标物的质谱参数
Table 1 Mass spectral parameters for 22 target compounds

| 化合物 | 分子式 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | 解簇 电压/V | 碰撞 能量/eV |
|------------|--|--------------|--------------|------------|-------------|
| PFBA | CF ₃ (CF ₂) ₂ COOH | 213 | 169* | -40 | -12 |
| PFPcA | CF ₃ (CF ₂) ₃ COOH | 263 | 219* 69 | -40 | -11 -56 |
| PFHxA | CF ₃ (CF ₂) ₄ COOH | 313 | 269* 119 | -45 | -13 -27 |
| PFHpA | CF ₃ (CF ₂) ₅ COOH | 363 | 319* 169 | -40 | -14 -24 |
| PFOA | CF ₃ (CF ₂) ₆ COOH | 413 | 369* 169 | -40 | -14 -24 |
| PFNA | CF ₃ (CF ₂) ₇ COOH | 463 | 419* 219 | -35 | -16 -24 |
| PFDA | CF(CF ₂) ₈ COOH | 513 | 469* 219 | -40 | -18 -26 |
| PFUdA | CF(CF ₂) ₉ COOH | 563 | 519* 269 | -70 | -16 -28 |
| PFDoA | CF(CF ₂) ₁₀ COOH | 613 | 569* 169 | -70 | -18 -36 |
| PFTriDA | CF(CF ₂) ₁₁ COOH | 663 | 619* 169 | -65 | -20 -38 |
| PFTeDA | CF ₃ (CF ₂) ₁₂ COOH | 713 | 669* 169 | -85 | -20 -40 |
| PFHxDA | CF ₃ (CF ₂) ₁₄ COOH | 813 | 769* 169 | -90 | -18 -40 |
| PFODA | CF ₃ (CF ₂) ₁₆ COOH | 913 | 869* 169 | -40 | -25 -45 |
| 3:3 FTCA | CF ₃ (CF ₂) ₂ (CH ₂) ₂ COOH | 241 | 137 117* | -67 | -20 -44 |
| 5:3 FTCA | CF ₃ (CF ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COOH | 341 | 237* 217 | -75 | -10 |
| 7:3 FTCA | CF ₃ (CF ₂) ₆ (CH ₂) ₂ COOH | 441 | 337* 317 | -75 | -12 |
| 6:2 FTCA | CF ₃ (CF ₂) ₅ CH ₂ COOH | 377 | 293* | -40 | -24 |
| 8:2 FTCA | CF ₃ (CF ₂) ₇ CH ₂ COOH | 477 | 393* | -50 | -18 |
| 10:2 FTCA | CF ₃ (CF ₂) ₉ CH ₂ COOH | 577 | 493* | -58 | -22 |
| 6:2 FTUCA | CF ₃ (CF ₂) ₄ CF=CHCOOH | 357 | 293* 243 | -72 -40 | -40 -48 |
| 8:2 FTUCA | CF ₃ (CF ₂) ₆ CF=CHCOOH | 457 | 393* 343 | -75 -65 | -21 -21 |
| 10:2 FTUCA | CF ₃ (CF ₂) ₈ CF=CHCOOH | 557 | 493* 443 | -75 -70 | -21 -21 |

注: *.定量离子。

表2 内标物的质谱参数及其校正的目标化合物
Table 2 Mass spectral parameters for internal standards with corresponding calibrated target analytes

| 内标物 | 校正化合物 | 母离子 (<i>m/z</i>) | 子离子 (<i>m/z</i>) | 解簇 电压/V | 碰撞 能量/eV |
|------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------|-------------|
| MPFOA | PFCAs | 417 | 372 | -40 | -14 |
| M6:2 FTCA | 6:2 FTCA, 3:3 FTCA, 5:3 FTCA | 379 | 294 | -40 | -24 |
| M8:2 FTCA | 8:2 FTCA, 7:3 FTCA | 479 | 394 | -50 | -18 |
| M10:2 FTCA | 10:2 FTCA | 579 | 494 | -58 | -22 |
| M6:2 FTUCA | 6:2 FTUCA | 359 | 294 | -72 | -40 |
| | | | 244 | -64 | -40 |
| M8:2 FTUCA | 8:2 FTUCA, 10:2 FTUCA | 459 | 394 | -75 | -12 |
| | | | 344 | -70 | -12 |

电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 负离子模式; 喷雾电压: -4.5 kV; 气帘气压力: 0.24 MPa; 碰撞气压力: 0.02 MPa; 温度 500 °C; 碰撞室入口电压: -10 V; 碰撞室出口电压: -12 V; 驻留时间: 20 ms; 离子源雾化气 (Gas1): 0.34 MPa, 辅助加热气 (Gas2): 0.34 MPa。其他参数见表1和表2。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

为获得较好的色谱分离效果和色谱峰形, 实验选择了 Kinetex XB-C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 2.6 μm) 色谱柱作为分析柱, 发现该色谱柱能实现22种目标物的良好分离, 且目标化合物峰形对称。

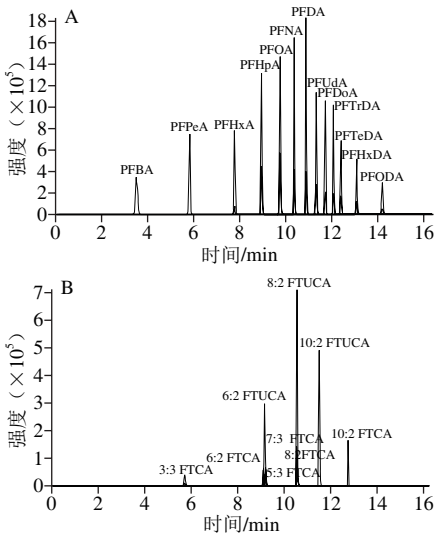


图1 PFCAs (A)、FTCAs和FTUCAs (B) 的提取离子色谱图 (5.0 ng/mL)

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of PFCAs (A), FTCAs and FTUCAs (B) (5.0 ng/mL)

实验考察流动相梯度对于色谱行为的影响。Zabaleta等^[24]指出乙腈的加入会使灵敏度下降, 因此液相系统采

用甲醇体系作为流动相, 而在流动相的水相中加入醋酸铵等挥发性电解质, 可以提高离子化效率, 在保持较好分离度的前提下获得理想色谱峰形^[25]。本实验中流动相组成和比例分别为A: 5%的甲醇溶液 (含5 mmol/L乙酸铵), B: 95%的甲醇溶液 (含5 mmol/L乙酸铵), 以5 ng/mL的PFCAs标准溶液为例, 以文献中前体物质测定的色谱条件^[18]为基础进一步优化洗脱条件。结果表明, 在优化后的洗脱条件下, 目标物分离效果更好。在保证有机溶剂起始浓度以及总洗脱时间相同的条件下, 延长了目标物的出峰时间, 从而降低了分析时间前段带来的基质干扰^[26], 使22种目标物在18 min内实现了PFCAs及其前体物质的良好分离和同时测定 (图1)。

2.2 质谱条件的优化

将PFCAs及其前体物质的混合标准溶液以针泵流动注射方式注入, 优化ESI源负离子模式下的质谱参数。通过四极杆Q1全扫描确定目标母离子, 以MRM模式优化各化合物的子离子和碰撞能。源区参数主要考察脱溶剂气温度、喷雾电压、气帘气流速等质谱参数, 其中, 脱溶剂气温度对PFCAs和前体物质的影响差异较大, *n*:2 FTCAs对其温度最为敏感, 当温度从450 °C升高至650 °C时, *n*:2 FTCA响应值提高了3~8倍; 而随着脱溶剂气温度的升高, PFCAs的响应强度呈现先上升后下降的趋势, 结果与文献^[27]报道类似, 最终确定脱溶剂气温度为500 °C。当喷雾电压分别为-4、-4.5 kV和-5 kV时, 目标物在-4.5 kV时响应值最高, 最终确定喷雾电压为-4.5 kV; 当气帘气流速分别为低、中和高时, 目标化合物在High级响应最高。

在二级质谱扫描中, 对母离子进行相应子离子扫描, 并选取丰度最强的离子作为定量离子, 丰度次强的离子作为定性离子。13种PFCAs含有羧基, 主要发生CO₂丢失, 形成碎片离子峰[M-H-44]⁻; *n*:2 FTUCA和3:3 FTCA主要发生CO₂和HF丢失, 形成碎片离子峰[M-H-64]⁻; *n*:2 FTCA主要发生CO₂和2 HF丢失, 形成碎片离子峰[M-H-84]⁻; 5:3 FTCA和7:3 FTCA主要发生CO₂和3 HF丢失, 形成碎片离子峰[M-H-104]⁻。同时, 优化解簇电压和碰撞能等参数。优化后的质谱条件如表1和表2所示。

2.3 前处理条件的优化

2.3.1 提取剂的选择

水产品基质中PFCAs及其前体物质的检测方法多采用乙腈^[18,28-29]为提取剂, 本实验以扇贝干粉样品为例, 选用2%甲酸-乙腈、乙腈、90%乙腈溶液、80%乙腈溶液分别作为提取剂进行比较, 如图2所示, 以2%甲酸-乙腈为提取剂时, 提取出的干扰物较多, 具有较强的基质增强效应, 多数目标物的回收率在120%以上。采用乙腈、90%乙腈溶液和80%乙腈溶液为提取剂时, 前体物质FTCAs的提取率在69.9%~125%之间, 但乙腈和80%乙腈

溶液对PFDA、PFUDa、PFDoA、PFTrDA、PFTeDA的回收率仅为36.6%~84.3%，而90%乙腈溶液对这5种化合物的回收率在56.5%~86.7%之间；然而这4种提取剂对PFHxDA和PFODA的回收率均在60%左右，可能与基质抑制效应以及缺少相应的内标物定量有关。

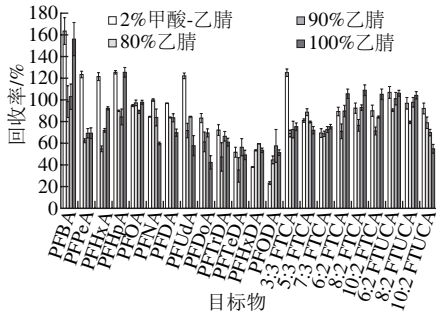
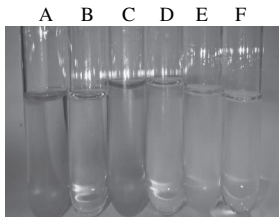


图2 不同提取剂下目标物的回收率 (n=3)

Fig. 2 Recoveries of target compounds with different extraction solvents (n=3)

2.3.2 净化方法的优化

近年来，因WAX固相萃取柱采用离子交换和反相吸附的共同保留机制使其对于强酸性化合物 ($\lg pK_a < 5$) 有较强的保留作用，而被广泛用于全氟化合物的净化过程^[16,24,30]。Zabaleta等^[24]比较了HLB、WAX和MAX 3种固相萃取柱的净化效果，结果也表明采用WAX柱净化，样品中全氟化合物的回收率在80%~120%之间。石墨化碳黑由微弱的范德华力结合，其表面特殊的六边形结构对于平面分子或者含有平面芳香型的分子具有强烈的吸附作用，而PFCA类物质并不与其结合，从而也可达到净化目的。由于贝类样品的基质颜色较深，仅用WAX柱净化不能去除色素等杂质，本实验拟在WAX柱净化的基础上，增加石墨化碳黑的净化步骤，即在洗脱时，经过WAX和Envi-carb双固相萃取柱的复合净化，以除去芳香族化合物和色素，并比较了有无Envi-carb固相萃取柱对净化效果的影响。实验结果表明，Envi-carb净化后的洗脱液颜色明显变浅（图3），比较经Envi-carb净化前后的贝类肌肉的全扫描总离子流图（图4）可见，以基质成分的强度估算，经Envi-carb净化后的基质成分明显减少，PFUDa、PFDoA和10:2 FTUCA的回收率从58.71%~77.11%提高到92.9%~98.6%。



A、C、E分别为未经净化的扇贝肝脏、鳃和肌肉样品溶液；B、D、F分别为经Envi-carb净化的扇贝肝脏、鳃和肌肉样品溶液。

图3 Envi-carb的净化前后对比

Fig. 3 Purification efficiency of Envi-carb

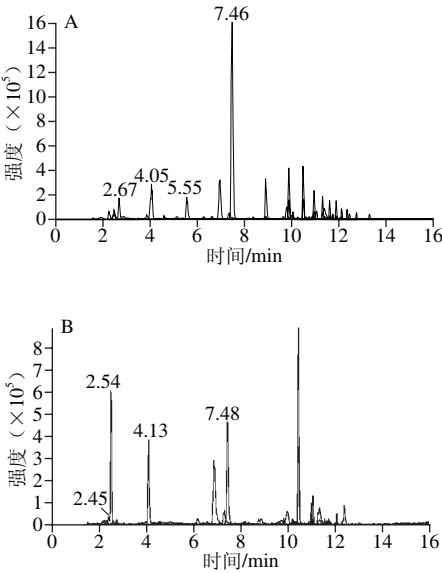


图4 经Envi-carb净化前(A)和净化后(B)扇贝肌肉样品的总离子流图比较

Fig. 4 Total ion current (TIC) chromatograms of scallop muscle extract not purified (A) and purified (B) with Envi-carb

2.3.3 贝类肝脏样品基质效应的评估

本方法在测试贝类不同组织时，发现肝脏样品中前体物质FTCA受基质干扰严重、噪音高、杂质多，抑制目标物的离子化，难以进行准确性和定量。实验采用稀释提取浓缩液的方法以降低基质效应，并以空白样品提取液和50%甲醇溶液配制一系列质量浓度（2~20 ng/mL）的基质标准系列溶液和溶剂标准系列溶液，以8:2 FTCA为例，通过比较8:2 FTCA的溶剂标准曲线和基质标准曲线评估基质效应，由图5可以看出，溶剂标准曲线和基质标准曲线重合较好，结果表明，将定容体积提高到1 mL后能有效降低肝脏样品中的基质效应。在贝类肝脏样品中加入2 ng目标物，按照1.3.1节的前处理步骤，进行提取浓缩后，并定容至1 mL，FTCA的回收率由62.3%~102.5%提高到85.3%~123%。由图6也可以看出，在稀释萃取浓缩液后，肝脏样品中8:2 FTCA的响应强度显著提高。

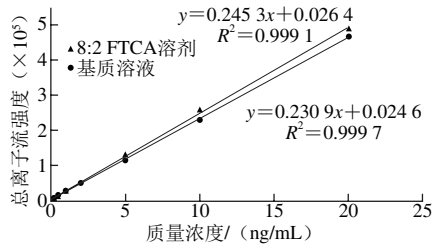
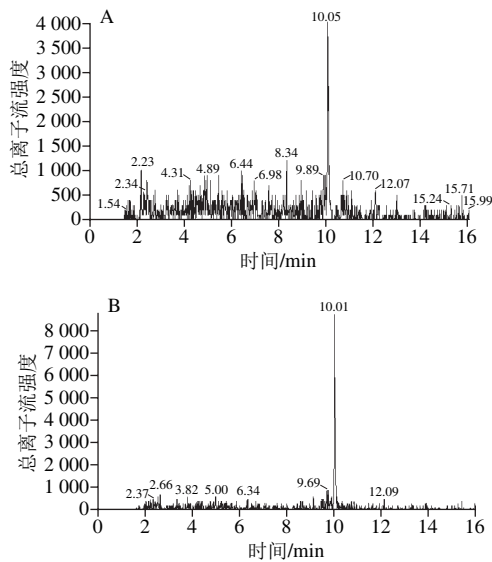


图5 稀释后的8:2 FTCA溶剂标准曲线与基质溶液标准曲线

Fig. 5 Standard curves for standard solutions and calibration curves for matrix-matched solutions of 8:2 FTCA after dilution



A.定容体积0.25 mL; B.定容体积1 mL。

图6 肝脏中不同定容体积下8:2 FTCA的提取离子色谱图对比
Fig. 6 Comparison of MRM chromatograms for 8:2 FTCA in liver (2 ng/mL) with difference volumes of reconstitution

2.4 方法学验证

2.4.1 线性关系和灵敏度

表3 22种目标物的线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限
Table 3 Linear range, regression equation, correlation coefficient, detection limits and quantitation limits for 22 target compounds

| 化合物 | 线性范围/(ng/mL) | 回归方程 | 相关系数 | 检出限/(ng/g) | 定量限/(ng/g) |
|------------|--------------|--------------------------|----------|------------|------------|
| PFBA | 0.1~20 | $Y=0.159\ 79x+0.004\ 21$ | 0.999 78 | 0.02 | 0.07 |
| PFPeA | 0.1~20 | $Y=0.183\ 93x+0.011\ 82$ | 0.999 91 | 0.02 | 0.07 |
| PFHxA | 0.05~20 | $Y=0.259\ 25x+0.003\ 95$ | 0.999 87 | 0.01 | 0.03 |
| PFHpA | 0.03~20 | $Y=0.287\ 37x+0.000\ 97$ | 0.999 98 | 0.01 | 0.03 |
| PFOA | 0.03~20 | $Y=0.274\ 91x+0.035\ 16$ | 0.999 71 | 0.01 | 0.03 |
| PFNA | 0.03~20 | $Y=0.258\ 81x+0.030\ 05$ | 0.999 88 | 0.01 | 0.03 |
| PFDA | 0.03~20 | $Y=0.233\ 63x+0.014\ 62$ | 0.998 57 | 0.01 | 0.03 |
| PFUdA | 0.1~20 | $Y=0.191\ 64x+0.000\ 05$ | 0.999 35 | 0.02 | 0.07 |
| PFDaA | 0.05~20 | $Y=0.197\ 52x+0.000\ 85$ | 0.998 31 | 0.02 | 0.07 |
| PFTTrDA | 0.1~20 | $Y=0.167\ 16x+0.005\ 59$ | 0.999 77 | 0.02 | 0.07 |
| PFTeDA | 0.1~20 | $Y=0.117\ 36x+0.001\ 26$ | 0.998 99 | 0.02 | 0.07 |
| PFHxDA | 0.1~20 | $Y=0.085\ 12x+0.001\ 45$ | 0.999 74 | 0.02 | 0.07 |
| PFODA | 0.1~20 | $Y=0.078\ 09x+0.036\ 25$ | 0.997 08 | 0.02 | 0.07 |
| 3:3 FTCA | 2~20 | $Y=0.169\ 65x+0.017\ 71$ | 0.999 89 | 0.50 | 1.67 |
| 5:3 FTCA | 0.5~20 | $Y=0.218\ 29x+0.029\ 12$ | 0.999 65 | 0.10 | 0.33 |
| 7:3 FTCA | 0.1~20 | $Y=0.561\ 32x+0.018\ 15$ | 0.998 67 | 0.02 | 0.07 |
| 6:2 FTCA | 0.5~20 | $Y=0.224\ 24x+0.005\ 00$ | 0.998 10 | 0.10 | 0.33 |
| 8:2 FTCA | 0.05~20 | $Y=0.249\ 00x+0.002\ 50$ | 0.998 10 | 0.02 | 0.07 |
| 10:2 FTCA | 0.05~20 | $Y=0.256\ 31x+0.003\ 56$ | 0.999 23 | 0.02 | 0.07 |
| 6:2 FTUCA | 0.05~20 | $Y=0.010\ 02x+0.000\ 68$ | 0.998 28 | 0.01 | 0.03 |
| 8:2 FTUCA | 0.05~20 | $Y=0.252\ 50x+0.000\ 67$ | 0.995 50 | 0.01 | 0.03 |
| 10:2 FTUCA | 0.05~20 | $Y=0.204\ 48x+0.002\ 05$ | 0.996 51 | 0.01 | 0.03 |

取适量PFCAs混合标准溶液和内标溶液,配制一系列质量浓度梯度的标准溶液,在1.3.2节和1.3.3节条件下依次测定,以分析物和内标物的峰面积比值为纵坐标,

各组分的质量浓度为横坐标进行线性回归分析。采用杂质延迟法,仪器的背景干扰得到了有效控制。在空白样品中添加低质量浓度的标准溶液,按1.3.1节步骤进行样品前处理后进样测定,以信噪比不小于3确定各组分的检出限,以信噪比不小于10确定各组分定量限,结果见表3。结果表明,22种目标物的线性良好,定量限为0.03~1.67 ng/g,本方法适用于贝类样品中PFCAs及其前体物质的定量分析。

2.4.2 准确度和精密度实验结果

分别选取扇贝和牡蛎的肌肉、肝脏和全贝作为空白基质,分别添加相当于样品基质2、5 ng/g和10 ng/g的混合标准溶液,每组做6个平行,同时做空白实验,扣除本底值后计算加标回收率和相对标准偏差。在扇贝肌肉和全贝中的平均回收率分别为67.76%~123.11%,肝脏中的平均回收率为63.05%~127.18%,相对标准偏差分别为4.70%~15.6%和6.27%~17.1%;在牡蛎肌肉和全贝的平均回收率为68.29%~121.03%,肝脏中的平均回收率为64.68%~119.33%,相对标准偏差分别为5.70%~15.6%和7.35%~16.7%。以上结果说明,该方法的精密度和准确度良好(表4),满足日常水产品中PFCAs及其前体物质的监测要求。

表4 全贝中PFCAs的回收率和精确度(n=6)
Table 4 Recoveries and precision of PFCAs spiked in shellfish (n = 6)

| 化合物 | 2 ng/g | | 5 ng/g | | 10 ng/g | |
|------------|--------|----------|--------|----------|---------|----------|
| | 回收率/% | 相对标准偏差/% | 回收率/% | 相对标准偏差/% | 回收率/% | 相对标准偏差/% |
| PFBA | 116.78 | 7.95 | 111.61 | 14.5 | 113.33 | 11.3 |
| PFPeA | 92.57 | 11.2 | 78.95 | 12.8 | 88.38 | 9.65 |
| PFHxA | 113.43 | 5.25 | 93.54 | 7.66 | 98.65 | 7.50 |
| PFHpA | 114.97 | 6.93 | 110.92 | 7.22 | 95.15 | 8.46 |
| PFOA | 105.66 | 5.64 | 98.90 | 6.62 | 96.86 | 5.93 |
| PFNA | 88.89 | 8.68 | 87.53 | 7.73 | 89.84 | 6.10 |
| PFDA | 78.91 | 9.56 | 74.64 | 8.38 | 86.07 | 5.63 |
| PFUdA | 77.51 | 10.3 | 77.62 | 9.04 | 75.38 | 12.3 |
| PFDaA | 74.26 | 9.54 | 79.52 | 13.3 | 74.56 | 9.87 |
| PFTTrDA | 69.65 | 8.25 | 69.54 | 11.7 | 73.19 | 11.6 |
| PFTeDA | 70.36 | 14.1 | 71.56 | 6.52 | 68.74 | 8.65 |
| PFHxDA | 68.53 | 12.6 | 67.76 | 9.01 | 67.84 | 13.3 |
| PFODA | 67.97 | 13.5 | 71.66 | 7.11 | 69.21 | 6.39 |
| 3:3 FTCA | 76.21 | 9.34 | 67.91 | 9.45 | 78.63 | 7.32 |
| 5:3 FTCA | 77.27 | 6.54 | 75.69 | 11.6 | 78.33 | 7.27 |
| 7:3 FTCA | 85.77 | 4.98 | 75.17 | 8.16 | 87.50 | 9.36 |
| 6:2 FTCA | 100.65 | 9.44 | 95.41 | 5.64 | 97.23 | 6.87 |
| 8:2 FTCA | 94.29 | 7.56 | 97.26 | 6.32 | 96.30 | 7.52 |
| 10:2 FTCA | 89.59 | 9.68 | 98.71 | 7.98 | 105.45 | 6.03 |
| 6:2 FTUCA | 118.91 | 10.6 | 110.46 | 9.37 | 106.79 | 9.33 |
| 8:2 FTUCA | 116.82 | 11.7 | 116.76 | 10.6 | 112.38 | 11.7 |
| 10:2 FTUCA | 118.46 | 6.95 | 122.76 | 9.94 | 104.12 | 10.3 |

2.5 贝类样品中PFCAs及其前体物质污染情况

应用本方法分析了采自于黄海青岛和大连海域45个双壳贝类样品的PFCAs及其前体物质的污染情况,结果

发现, PFCAs在双壳贝类中的污染呈现出一种普遍性趋势, 其中PFOA检出率高达90%以上, 且平均含量最高, 达5.34 ng/g; PFNA、PFTrDA、PFUDa和PFTeDA等PFCAs类的检出率也超过80%, 但均处于痕量水平。前体物质方面; 同时, 多种前体物质均有检出, 其中7:3 FTCA的平均含量最高(2.33 ng/g)。贝类肝脏样品中的PFOA和7:3 FTCA的色谱图如图7所示。不同贝类组织间(肌肉、性腺、外套膜、内脏、鳃)表现出相似的趋势, 如PFOA平均含量由高到低依次为肝脏>性腺>鳃>外套膜>肌肉。结果证明, 本方法在保证灵敏度和准确度的同时, 实现了PFCAs及其前体物质的同时定量分析, 方法涉及的检测指标丰富, 且采用多步净化方式, 极大程度降低了芳香族化合物和色素等杂质成分的干扰, 适用于复杂基质中多种PFCAs及其前体物质的同时定性、定量分析。

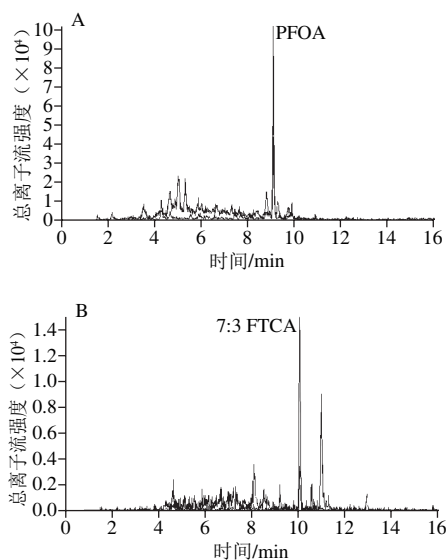


图7 贝类样品中PFOA (A) 和7:3 FTCA (B) 的MRM色谱图

Fig. 7 MRM chromatograms of PFOA and 7:3 FTCA detected in bivalve shellfish

3 结论

本实验利用双固相萃取柱串联净化策略, 即在洗脱时增加Envi-carb小柱净化步骤, 极大程度降低杂质成分干扰, 明显改善基质抑制效应, 且部分化合物回收率有所提升, 在不损失目标成分的前提下, 实现了22种PFCAs及其前体物质的同时测定, 同时采用稀释提取浓缩液的方式, 提高了肝脏等复杂基质样品中目标物的定性和定量能力, 准确度和灵敏度均满足日常水产品监测要求。该方法的建立为研究复杂基质中PFCAs及其前体物质的复合污染特征提供了新的技术手段。

参考文献:

- [1] LAU C, ANITOLE K, HODES C, et al. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings[J]. Toxicological Sciences An Official Journal of the Society of Toxicology, 2007, 99(2): 366-394. DOI:10.1093/toxsci/kfm128.
- [2] FENG M, HE Q, MENG L, et al. Evaluation of single and joint toxicity of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoic acid, and copper to *Carassius auratus* using oxidative stress biomarkers[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 161: 108-116. DOI:10.1016/j.aquatox.2015.01.025.
- [3] BJORK J A, WALLACE K B. Structure-activity relationships and human relevance for perfluoroalkyl acid-induced transcriptional activation of peroxisome proliferation in liver cell cultures[J]. Toxicological Sciences, 2009, 111(1): 89-99. DOI:10.1093/toxsci/kfp093.
- [4] EPA. U.S. 2010/2015 PFOA Stewardship Program, U.S. EPA, Office of Pollution Prevention and Toxics[EB/OL]. (2016-07-11) [2016-10-30]. <https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca>.
- [5] RAND A A, ROONEY J P, BUTT C M, et al. Cellular toxicity associated with exposure to perfluorinated carboxylates (PFCAs) and their metabolic precursors[J]. Chemical Research in Toxicology, 2014, 27(1): 42-50. DOI:10.1021/tx400317p.
- [6] D'EON J C, MABURY S A. Is indirect exposure a significant contributor to the burden of perfluorinated acids observed in humans?[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(19): 7974-7984. DOI:10.1021/es200171y.
- [7] PHILLIPS M D, DINGLASAN-PANLILIO M J A, MABURY S A, et al. Fluorotelomer acids are more toxic than perfluorinated acids[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(20): 7159-7163. DOI:10.1021/es070734c.
- [8] 杨琳, 李敬光. 全氟化合物前体物质生物转化与毒性研究进展[J]. 环境化学, 2015(4): 649-655. DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2015.04.2014091803.
- [9] GOECKEFLORA C M, REO N V. Influence of carbon chain length on the hepatic effects of perfluorinated fatty acids. A ¹⁹F- and ³¹P-NMR investigation[J]. Chemical Research in Toxicology, 1996, 9(4): 689-695. DOI:10.1021/tx950217k.
- [10] PHILLIPS M M, DINGLASAN PANLILIO M J A, MABURY S A, et al. Chronic toxicity of fluorotelomer acids to *Daphnia magna* and *Chironomus dilutus*[J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010, 29(5): 1123-1131. DOI:10.1002/etc.141.
- [11] FASANO W J, CARPENTER S C, GANNON S A, et al. Absorption, distribution, metabolism, and elimination of 8-2 fluorotelomer alcohol in the rat[J]. Toxicological Sciences, 2006, 91(2): 341-355. DOI:10.1093/toxsci/kfj160.
- [12] NING W, BOGDAN S, BUCK R C, et al. 8-2 Fluorotelomer alcohol aerobic soil biodegradation: pathways, metabolites, and metabolite yields[J]. Chemosphere, 2009, 75(8): 1089-1096. DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.01.033.
- [13] VASSILIADOU I, COSTOPOULOU D, KALOGEROPOULOS N, et al. Levels of perfluorinated compounds in raw and cooked Mediterranean finfish and shellfish[J]. Chemosphere, 2015, 127: 117-126. DOI:10.1016/j.chemosphere.2014.12.081.
- [14] PAN Y Y, SHI Y, WANG Y N, et al. Investigation of perfluorinated compounds (PFCs) in mollusks from coastal waters in the Bohai Sea of China[J]. Journal of Environmental Monitoring, 2010, 12(2): 508-513. DOI:10.1039/b909302h.
- [15] GURUGE K S, YEUNG L W Y, LI P, et al. Fluorinated alkyl compounds including long chain carboxylic acids in wild bird livers from Japan[J]. Chemosphere, 2010, 83(3): 379-384. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.12.010.

- [16] KÄRRMAN A, DOMINGO J L, LLEBARIA X, et al. Biomonitoring perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: concentrations and trends in human liver and milk samples[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2010, 17(3): 750-758. DOI:10.1007/s11356-009-0178-5.
- [17] MEYER J, JASPERS V L B, EENS M, et al. The relationship between perfluorinated chemical levels in the feathers and livers of birds from different trophic levels[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(22): 5894-5900. DOI:10.1016/j.scitotenv.2009.07.032.
- [18] ZABALETA I, BIZKARGUENAGA E, PRIETO A, et al. Simultaneous determination of perfluorinated compounds and their potential precursors in mussel tissue and fish muscle tissue and liver samples by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1387: 13-23. DOI:10.1016/j.chroma.2015.01.089.
- [19] ZHANG H N, WEN B, HU X Y, et al. Determination of fluorotelomer alcohols and their degradation products in biosolids-amended soils and plants using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1404: 72-80. DOI:10.1016/j.chroma.2015.05.063.
- [20] TANIYASU S, KANNAN K, SO M K, et al. Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1093(1/2): 89-97. DOI:10.1016/j.chroma.2005.07.053.
- [21] ULLAH S, HUBER S, BIGNERT A, et al. Temporal trends of perfluoroalkane sulfonic acids and their sulfonamide-based precursors in herring from the Swedish west coast 1991-2011 including isomer-specific considerations[J]. *Environment International*, 2014, 65: 63-72. DOI:10.1016/j.envint.2014.01.005.
- [22] LIU R, RUAN T, WANG T, et al. Trace analysis of mono-, di-, tri-substituted polyfluoroalkyl phosphates and perfluorinated phosphonic acids in sewage sludge by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2013, 111(13): 170-177. DOI:10.1016/j.talanta.2013.02.063.
- [23] 郭萌萌, 吴海燕, 卢立娜, 等. 杂质延迟-液相色谱-四极杆/离子阱复合质谱测定水产加工食品中23种全氟烷基化合物[J]. *分析化学*, 2015, 43(8): 1105-1112. DOI:10.11895/j.issn.0253-3820.150120.
- [24] ZABALETA I, BIZKARGUENAGA E, IPARRAGIRRE A, et al. Focused ultrasound solid-liquid extraction for the determination of perfluorinated compounds in fish, vegetables and amended soil[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1331: 27-37. DOI:10.1016/j.chroma.2014.01.025.
- [25] 高立红, 史亚利, 刘杰民, 等. 污水中氟喹诺酮类抗生素的分析方法[J]. *环境化学*, 2010, 29(5): 948-953.
- [26] 苏萌, 艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014(2): 511-515.
- [27] 王雨昕, 李敬光, 赵云峰, 等. 生物基质中全氟辛酸与全氟辛烷磺酸及其前体化合物的超高效液相色谱-串联质谱法研究[J]. *分析化学*, 2011, 39(8): 1134-1140. DOI:10.3724/SP.J.1096.2011.01134.
- [28] BRANDSMA S H, SMITHWICK M, SOLOMON K, et al. Dietary exposure of rainbow trout to 8:2 and 10:2 fluorotelomer alcohols and perfluorooctanesulfonamide: uptake, transformation and elimination[J]. *Chemosphere*, 2011, 82(2): 253-258. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.09.050.
- [29] POWLEY C R, GEORGE S W, RYAN T W, et al. Matrix effect-free analytical methods for determination of perfluorinated carboxylic acids in environmental matrixes[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(19): 6353-6358. DOI:10.1021/ac0508090.
- [30] GURUGE K S, YEUNG L W Y, LI P, et al. Fluorinated alkyl compounds including long chain carboxylic acids in wild bird livers from Japan[J]. *Chemosphere*, 2010, 83(3): 379-384. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.12.010.