

在进行PFAS分析时，降低对系统污染的影响

使用ExionLC™ 2.0系统

Reducing the effects of system contamination in PFAS analysis

Simon Roberts,¹ Adrian M. Taylor²

¹ SCIEX, USA; ² SCIEX, Canada

全氟化合物（PFAS）是一类人造化学物质，主要用于抗润滑油、油、水和热。有了这些特点，PFAS被广泛用于消耗品和工业产品中，包括燃料、防水纤维、地毯、清洁产品、涂料、以及防火泡沫。目前某些PFAS被FDA限制使用于厨具、食品包装和食品处理设备。

PFAS的C-F键强度使自然降解及其困难。随过去到现在时间积累，PFAS广泛的使用和它们的保持难降解的能力已引起严重的环境污染。这具有警示意义的积累速度导致PFAS对环境和健康的潜在影响的研究数量逐渐增加。这类化合物的不易降解，也使它们成为分析工作的一个挑战，因为它们也是分析仪器的一个普遍存在的污染物。随着要求PFAS浓度持续降低限度的指南，控制所使用分析仪器的背景水平具有越来越高的需求。这将使PFAS在环境样本中的含量精确检测成为可能。

这里研究了配备可选的清洗系统的ExionLC™ 2.0系统的灵活性，当分析包含PFAS的样本时使LC-MS/MS分析背景污染的PFAS降

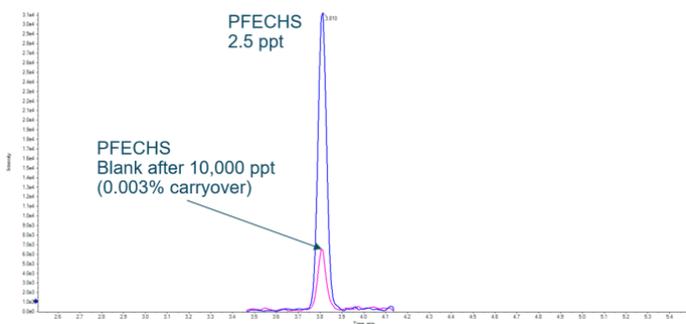


图1 残留分析。PFECHS的空白提取离子色谱图显示了进样10,000 pg/mL最高浓度校正标准样本后,立即进样空白样本进样后极低的污染（粉标），残留浓度为2.5 pg/mL的最低定量限（蓝标）。



到可接受的水平。一个连接ExionLC 2.0系统的SCIEX Triple Quad™ 7500系统被选择为高灵敏性测试平台，来观测1ppb标准品和空白污染<2.5ppt的52个PFAS化合物进样后满足<0.05%的残留效能。

ExionLC™ 2.0系统的关键特点

- 洗脱溶剂选择以及流速选择的灵活性，延长的洗针能力可以使残留降到可忽略不计，这也能降低假阳性率和重复提取和再次检测的需要
- 用户自定义能力和所有自动进样器溶剂清洗的优化，使系统污染很小，可实现PFAS的精确检测，即使在很低的浓度
- 准确和精确的定量结果，检测线性系数（ r^2 ）>0.99，精确度<10%的变异系数，以及对称因子在0.8和1.5之间

- 灵敏的限低至2.5 pg/mL，校准范围在2.5-10,000 pg/mL之间（4个数量级的动态范围）。

方法

材料：所有实验采用 U.S. EPA 537 和 533 方法，分析物初始稀释标准溶液/混合物 (Wellington Laboratories Cat.#)。带Verex 聚四氟乙烯/硅瓶盖的Verex玻璃管和聚丙烯自动进样管，从飞诺美采购。

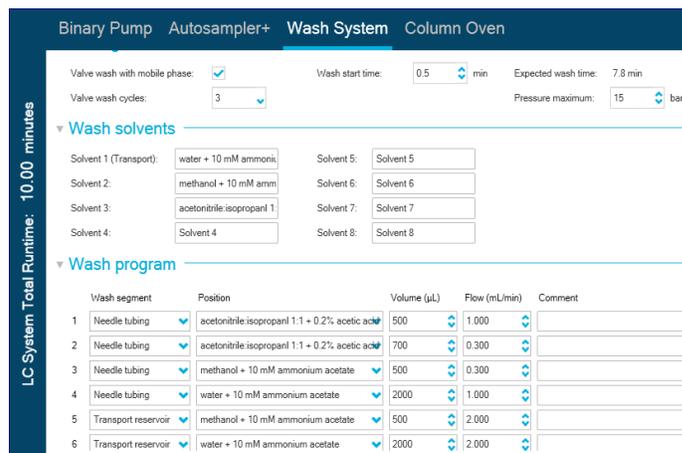
样本制备：标准品储备液配置成2.5-10,000 pg/mL的校准浓度。

色谱条件：使用SCIEX ExionLC 2.0系统和飞诺美 Gemini C18色谱柱 (3 μm, 3.0 x 50 mm, P/N 00B-4439-Y0)进行液相分离。飞诺美 Gemini C18 5 μm, 4.6 x 30 mm柱安装在50 μL混合器之后，作为延时柱从分析物峰中分离二相泵溶剂PFAS污染峰¹。采用一个9.5 min的洗脱梯度，流动相是含10mM乙酸铵缓冲液的水和的甲醇，流速是0.6mL/min，柱温为40度。

SCIEX ExionLC™ 2.0系统自动进样器模块包含250 μL的注射器，250 μL缓冲液管路，100 μL 定量环和15 μL的针管。为了优化样本消耗和进样循环时间，用的注射模式是微升 pick-up plus模式，进样量设为10.0 μL，应用两个35 μL的传输部分（含10mM乙酸铵的水）。注射器速度设为low，速度因子设0.8。所有多聚合物管路均替换为PEEK，包括溶剂瓶和溶剂选择器阀门之间的管路（使用1/8” 外径, 或 O.D. 和一个0.08” 内径, 或 I.D.），溶剂选择阀门到脱气机的管路（1/8” O.D. x 0.08” I.D.），脱气机到泵头的管路（1/8” O.D. x 0.08” I.D.）以及自动进样器中的缓冲液管（1/16” O.D. x 0.03” I.D.）。

自动进样器清洗系统：使用清洗系统运输各种体积的多种不同组成的溶剂，在不同流速下提供灵活性和控制残留的能力。使用的清洗程序的溶剂、流速、以及体积见图2。所有管路均使用PEEK替换（1/16 in x 0.03 in）。使用一根Phenomenex Gemini C18 5 μm, 4.6 x 30 mm柱(P/N 00A- 4435-E0)作为延迟柱从分析物峰区分自动进样期清洗液和运载溶剂PFAS污染峰。

质谱条件：使用SCIEX 7500 系统进行质谱分析，采取负模式电喷雾离子化（ESI）。监测各个分析物的一个MRM离子对。当预期的保留时间窗口使循环时间和处理时间最大化时，使用 Scheduled MRM算法检测化合物。本方法所有的色谱峰扫描点多于12。



Binary Pump Autosampler+ Wash System Column Oven

Valve wash with mobile phase: Wash start time: 0.5 min Expected wash time: 7.8 min
 Valve wash cycles: 3 Pressure maximum: 15 bar

LC System Total Runtime: 10.00 minutes

▼ Wash solvents

Solvent 1 (Transport): water + 10 mM ammonium acetate Solvent 5: Solvent 5
 Solvent 2: methanol + 10 mM ammonium acetate Solvent 6: Solvent 6
 Solvent 3: acetonitrile:isopropanol 1:1 Solvent 7: Solvent 7
 Solvent 4: Solvent 4 Solvent 8: Solvent 8

▼ Wash program

Wash segment	Position	Volume (μL)	Flow (mL/min)	Comment
1	Needle tubing	500	1.000	
2	Needle tubing	700	0.300	
3	Needle tubing	500	0.300	
4	Needle tubing	2000	1.000	
5	Transport reservoir	500	2.000	
6	Transport reservoir	2000	2.000	

图2. 灵活的自动进样器清洗系统组成。多于8个不同的溶剂可以用于最有效的清洗程序。这里，用三个不同的溶剂采用在不同步骤：乙腈/异丙醇(1:1, v/v) 含 0.1% 乙酸，甲醇使用 10mM 乙酸铵清洗，以及水使用 10mM 乙酸铵清洗。

数据获取由SCIEX OS软件 2.1.6和ExionLC™ 2.0 系统组件来实现。

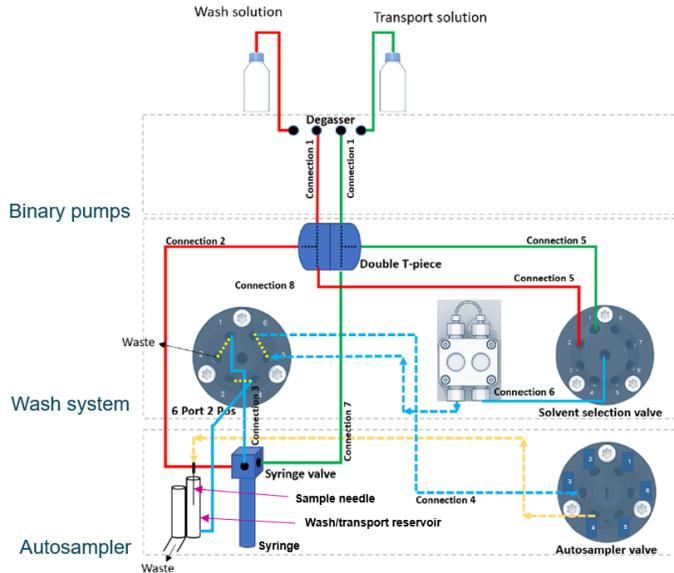
数据处理：质谱数据的处理使用 SCIEX OS 软件 2.1.6操作，其中对校准曲线、精密度和准确度进行评价。

使用自动进样器清洗系统管理PFAS残留

ExionLC™ 2.0 系统的清洗系统具有自动进样器管路内部清洗的灵活性，以及实现一个强大的进样针外部清洗能力，使用多至8种不同流速的溶剂（图3）。也可以选择自动进样器阀门清洗，使用多至3个自动进样器注射器阀门切换，并在使用清洗系统溶剂实施清洗程序前使用梯度泵溶剂清洗。清洗步骤可以按程序在注射后的任意时间点开始，因此阀门清洗可以在梯度的高有机溶剂比例时进行。阀门的清洗不在清洗程序进行，因此不存在梯度中引入不同溶剂成分的风险，从而影响色谱分离。为了优化样品消耗以及将注射循环时间最小化，使用微升增强进样注射模式。运载溶剂部分使用于该注射模式，保证所有样本运输到色谱柱上。出于ExionLC™ 2.0系统对PFAS分析的需求，清洗系统的使用允许在自动进样阀之前引入额外的延迟柱，从样本和标准品中的PFAS分析物中分离存于自动进样器溶剂中的任何PFAS污染。

Step 1

Wash system pump delivers wash solvent (solvent selection valve allows use of eight different solvents in wash program) through inside of autosampler tubing and sample needle at high flow rate (follow dotted line)



Step 2

6 port; 2 position valve switches and wash system pump delivers solvent to the wash port (dotted line) and overflows into waste and rinses outside of sample needle

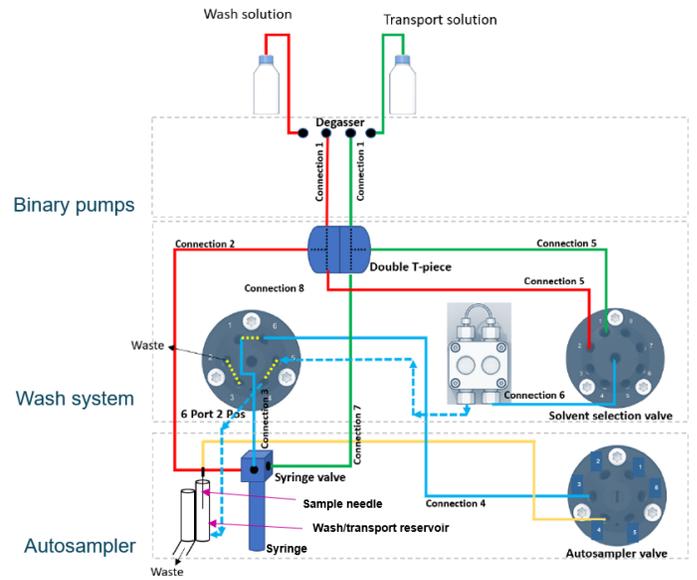


图3. 两步序列清洗系统。首先描述了进样针的内部清洗。其次描述了进样针的外部清洗。在清洗程序中多至8中溶剂可以在不同的流速选择和使用，提供了更大程度的灵活性和高效率。

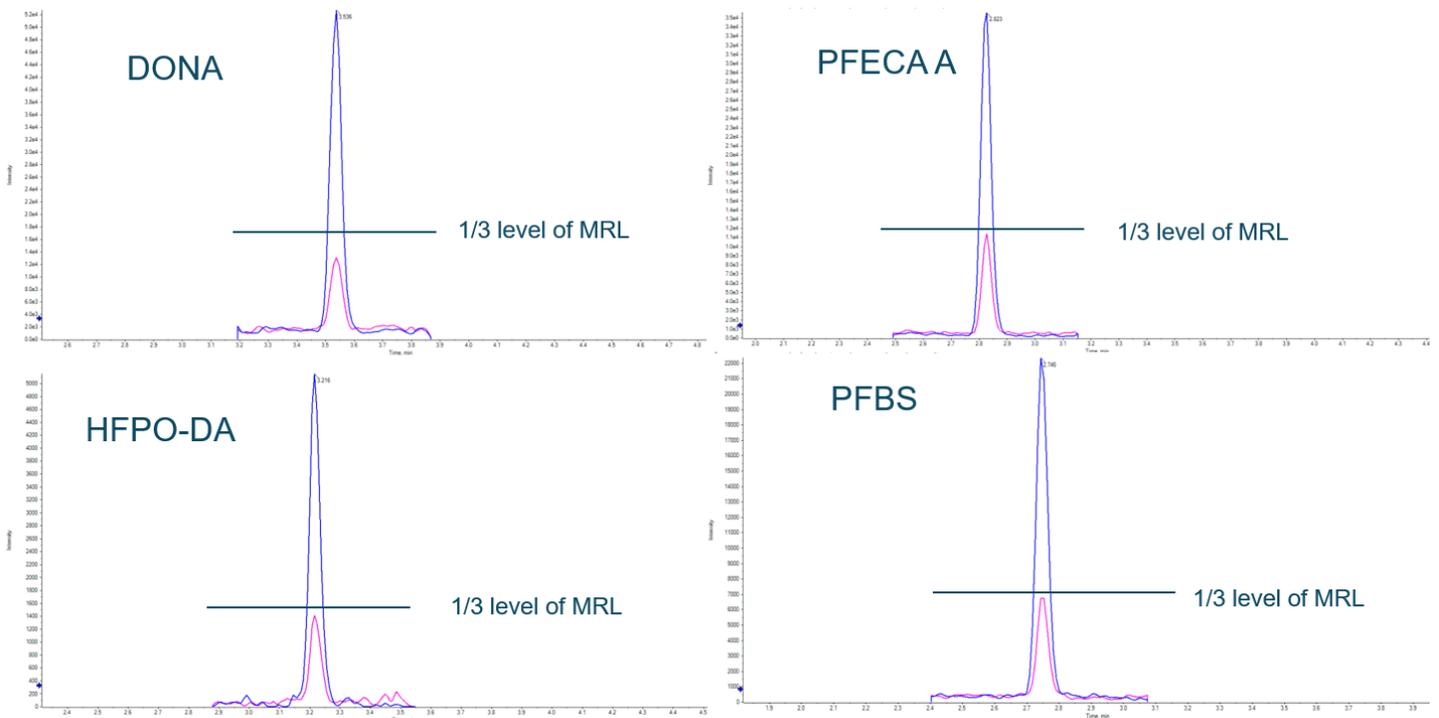


图4. 空白样本。选择PFAS的空白提取离子色谱图显示空表样本（粉标）中极低的污染。这些在进样10,000 pg/mL最高校准浓度标准品后被立即分析，只有2.5 pg/mL（蓝标）LLOQ标准品残留。特别要求空白样本必须低于1/3的最高残留限量(MRL)水平。

评价残留

空白样本显示极低的相应并低于要求的1/3的最大残留限 (MRL)。图4显示10000 pg/mL最高浓度校准标准品进样后立即进样一个空白样品(粉标)中所选PFAS化合物的残留峰,只有2.5 pg/mL LLOQ标准品(蓝标)残留。最高浓度样本(10000pg/mL)之后的第一个空白样品的峰面积比所有化合物的最低校准浓度样品的32%还低。例如,10000 pg/mL校准标准品之后分析的第一个空白样品的峰面积为PFECHS的2.5 pg/mL标准品峰面积的19%。所有残留峰面积低于最高标准品(10,000 pg/mL)峰面积的0.01%。”

清洗系统程序允许选择清洗溶剂的体积以及流速。与使用延迟柱清洗自动进样器溶剂的能力相结合,这使ExionLC™2.0系统对残留的控制满足<0.05%残留效应要求。这在10,000 pg/mL标准品进样分析后被一个<2.5ppt的52种PFAS化合物的空白污染所显示出来。选定PFAS化合物的残留效的举例请见表1。

表1. 残留分析

Compound	% Carryover (after 10,000 ppt standard)
PFHxA	0.003
PFOA	0.001
PFBA	0.013
DONA	not detected
PFOS	0.007
PFBS	0.007
HFPO DA	0.005
PFNA	0.006
PFECHS	0.003
PFHxS	not detected
PFDoA	0.003
PFECA A	0.009

残留-10,000 pg/mL校准标准品之后的第一个空白峰面积, 10,000 pg/mL标准品峰面积的%

方法效果

52个PFAS化合物的色谱分离见图5。得到非常好分离,峰宽很窄,峰对称性良好,这对实施定量尤为重要。

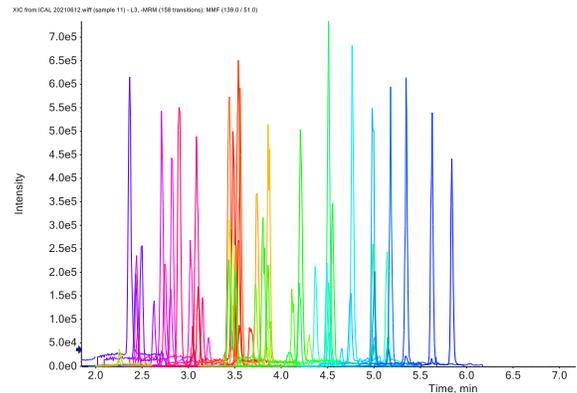


图5. 色谱分离。提取离子色谱图显示25 pg/mL标准品的PFAS洗脱特点。

使用对称因子测量峰对称--从色谱峰中线到峰后沿的距离除以色谱峰中线到峰前沿的距离,该因子在最大峰的10%--普遍在1.0左右,并期望能>0.8和<1.5之间。图6显示选定的化合物在2.5 pg/mL时的提取离子色谱图。图中显示的化合物,平均对称因子为1.01。在2.5到1000 pg/mL浓度范围,PFBS的平均对称因子为1.21,PFECA A为1.03, HFPO DA为1.17, PFHxS为1.05, DONA为0.94, PFECHS为1.02, PFOS为1.14。两个早期洗脱峰的分和对称因子见图7。

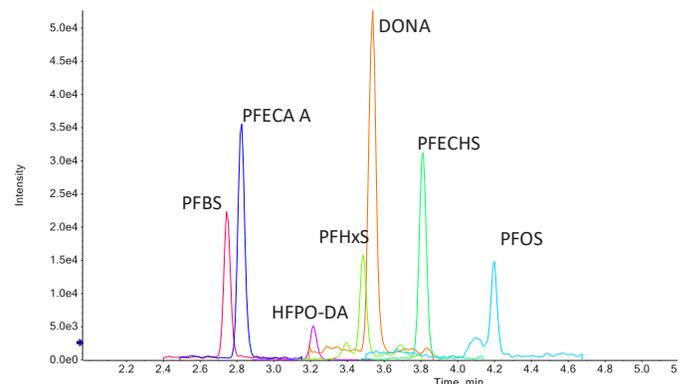


图6. LLOQ信号。2.5 pg/mL标准品中PFAS的提取离子色谱图。观测到非常好的峰对称。

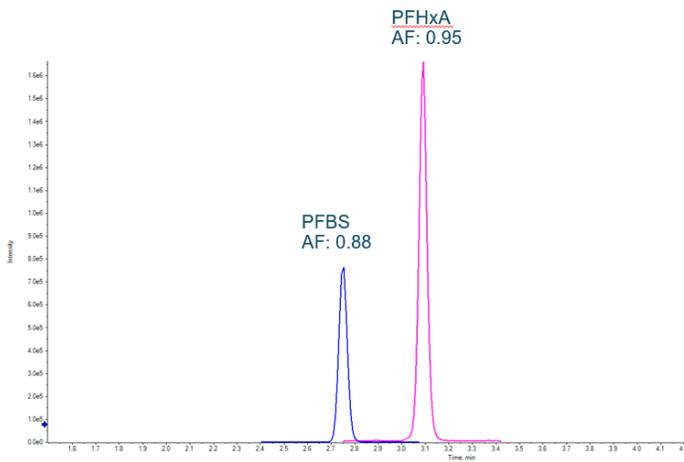


图7. 对称因子 (AF)。AF由先洗脱的峰来计算, PFBS和PFHxA, 在其100 pg/mL的标准品浓度进行。

7点校准曲线显示了良好的准确性, 所有点均在在 $\pm 10\%$ 期望值以内 (表2) 且 R^2 系数 >0.990 , 如图9所示。面积重复性也从7次重复进样2.5 pg/mL标准样品计算, 然后是25 pg/mL的7个标准品重复进样。典型变异结果使用所选化合物显示在表3中。此外, 优异的峰面积重复性如多于30次进样的内参峰面积重复性的metric plot所示 (图8)。计算平均内参标准峰面积, 所有获取的数据点均落在 $\pm 10\%$ 平均回归偏差范围内 (虚线)。 $^{13}\text{C}_4$ -PFBA, $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS, $^{13}\text{C}_8$ -PFOS和 $^{13}\text{C}_2$ -PFHxDA的峰面积%CV分别为3.7, 3.2, 2.7和4.0%。

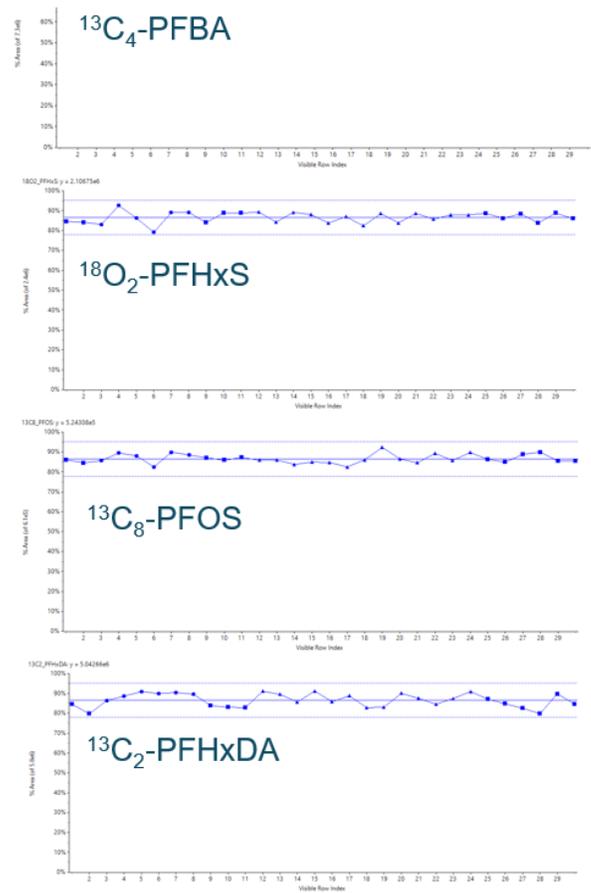


图8 数据重复性。对30次分析的内参峰面积重复性的算法作图。含 $\pm 10\%$ 的平均回归偏差的平均回归 (虚线)。

表2. 校正曲线统计。在受审校准范围内的校准曲线标准品的%准确度。

Concentration (ppt)	PFHxA	PFOA	PFBA	DONA	PFOS	PFBS	HFPO DA	PFNA	PFECHS	PFHxS	PFDoA	PFECA A
2.50	89.8	97.5	99.5	79.4	99.0	104.9	97.1	108.0	107.7	81.2	80.6	99.4
5.00	94.1	88.9	92.9	101.1	97.8	102.2	94.6	88.2	101.7	90.6	99.3	104.5
25.00	108.2	106.0	103.6	114.1	104.2	98.6	98.8	107.7	96.4	104.5	118.7	99.0
100.00	105.6	109.0	101.9	111.4	101.7	98.2	104.3	91.3	92.7	122.6	106.0	100.0
250.00	101.4	97.4	103.4	93.8	99.1	98.3	107.1	99.1	92.3	102.2	94.7	97.1
500.00	103.7	103.0	99.6	100.2	96.6	94.2	100.4	109.6	113.1	103.4	101.0	98.6
1000.00	97.1	98.2	99.1	116.9	101.7	103.5	97.7	96.2	96.2	95.5	99.8	101.4

表3 QC峰面积精确度, 展示了两个浓度样本的%变异系数 (n=7)。

Concentration (ppt)	PFHxA	PFOA	PFBA	DONA	PFOS	PFBS	HFPO DA	PFNA	PFECHS	PFHxS	PFDoA	PFECA A
2.5	5.3	9.0	4.0	4.3	6.7	4.9	6.8	6.2	4.1	7.8	7.8	3.5
25	4.7	1.0	3.6	2.5	1.7	4.8	4.3	2.9	5.6	5.0	3.4	3.3

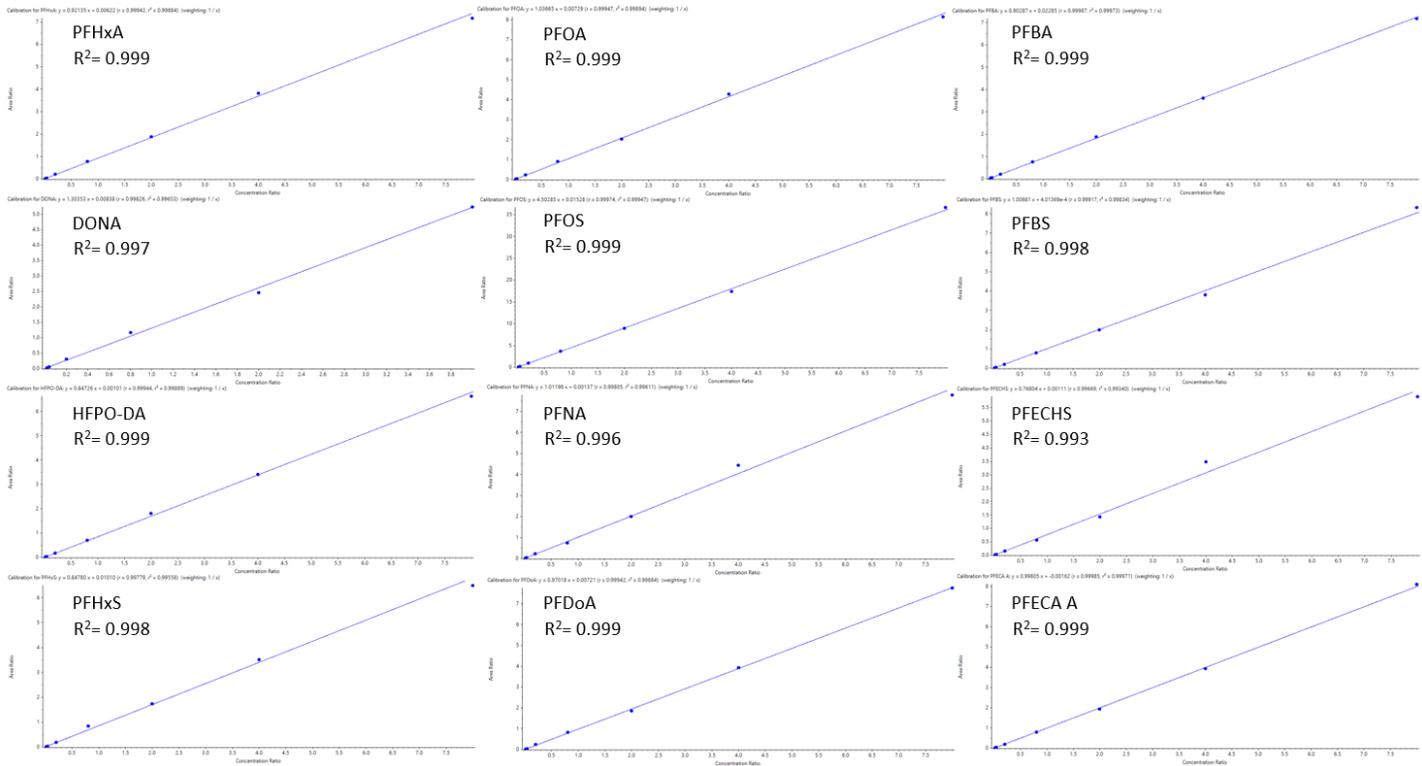


图9. PFAS化合物的校准曲线。浓度线从PDFAS混合物产生，浓度范围从2.5 pg/mL到1000 pg/mL。获得良好的线性， r^2 高于0.99。

保留时间重复性

与scheduled MRM数据采集相结合时，保留时间稳定性在使用窄保留时间窗口时至关重要，为了保证色谱峰能够保留在检测时间窗口内。为了在分析多批次样本时满足不变的保留时间，确保液相色谱系统随时间的稳定性也很重要。这能够减少再调整方法的时间花费，以适应保留时间的漂移，这样可以避免由色谱峰漂移到目标时间窗之外引起的数据丢失。

如图10所示，在保留时间范围内，各个分析物的保留时间精确度均小于0.1%CV，52个化合物的平均0.05%CV。对于大多数检测化合物而言，20次进样的最大保留时间差异<1秒。

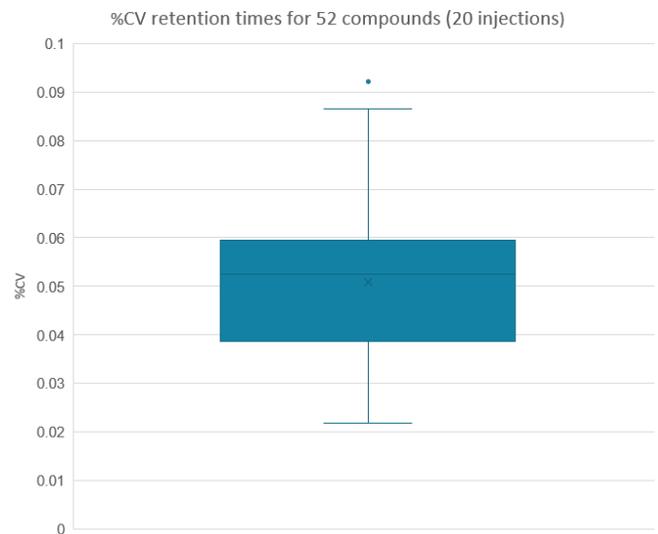


图10. 保留时间精确度。Box和whisker曲线图显示20次进样的保留时间%CV值。

结论

在SCIEX Triple Quad™ 7500系统进行单次LC-MS/MS 10分钟梯度分析，就可获得PFAS浓度的可靠可重复的结果和线性，以及定量准确度和精密度。这使应用ExionLC™ 2.0系统获得高质量分离得到实现，正如保留时间精密度和尖峰质量所显示的那样。

环境样本中PFAS的定量检测的一个重要方面是控制LC/MS/MS的析仪器的背景水平。

这可以在SCIEX ExionLC™ 2.0系统中，通过使用可选配的清洗系统和额外的延迟柱轻易地实现，使残留降的很低，降低假阳性率以及重复提取和再检测。

- 在液相泵后安装延迟柱，其目的是分离溶剂中的PFAS污染；自动进样器延迟柱的安装，目的是用于分离自动进样器溶剂中的PFAS污染
- 清洗溶剂选择和流速选择的灵活性，增强了针清洗能力
- 在整个系统中安装PEEK管路取替FEP管路，以及安装延迟柱，结合清洗系统的使用，可以使背景污染降到很低，为本工作研究的整套52个化合物获得很好的检出限(MDLs)。

参考文献

1. Quantitation of PFASs in water samples using LC-MS/MS large-volume direct injection and solid phase extraction. SCIEX technical note, RUO-MKT-02-4707-A.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13564-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China