

大鼠脑组织中全氟壬酸的LC-MS/MS分析方法的建立与验证

张宸祎 罗传梦 张蓉 陆宇婷*

中国药科大学药学院, 中国·江苏 南京 210009

摘要: 本研究通过系统优化色谱条件、质谱参数及样品前处理步骤, 建立了适用于脑组织中全氟壬酸 (PFNA) 的 LC-MS/MS 检测方法。样品前处理采用 0.2% 甲酸酸化 - 乙腈蛋白沉淀法, 并以 $^{13}\text{C}_9$ -PFNA 作为同位素内标。色谱分离使用 Hypersil™ BDS C18 色谱柱 (100 mm × 4.6 mm, 2.4 μm), 流动相为 2 mM 乙酸铵水溶液 - 甲醇, 进行梯度洗脱, 流速为 0.7 mL · min⁻¹。对该方法的专属性、线性范围、精密度、准确度、基质效应及稳定性进行了全面验证, 均符合生物样本分析要求, 并成功应用于大鼠脑组织样本检测。

关键词: 全氟壬酸; 脑组织; LC-MS/MS

Development and Validation of a LC-MS/MS Method for the Determination of Perfluorononanoic Acid in Rat Brain Tissue

Zhang Chenyi, Luo Chuanmeng, Zhang Rong, Lu Yuting*

School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, China Jiangsu Nanjing 210009

Abstract: This research established an LC-MS/MS method for detecting PFNA in brain tissue through systematic optimization of chromatographic conditions, mass spectrometry parameters, and sample pretreatment procedures. Sample preparation employed acidification with 0.2% formic acid followed by acetonitrile protein precipitation, and $^{13}\text{C}_9$ -PFNA was used as the isotopically labeled internal standard. Chromatographic separation was performed on a Hypersil™ BDS C18 column (100 mm × 4.6 mm, 2.4 μm) with gradient elution using 2 mM ammonium acetate solution and methanol as the mobile phase, at a flow rate of 0.7 mL · min⁻¹. The specificity, linearity, precision, accuracy, matrix effects, and stability of this method were comprehensively validated, all meeting the requirements for biological sample analysis. It was successfully applied to the detection of rat brain tissue samples.

Keywords: Perfluorononanoic acid; Brain tissue; LC-MS/MS

0 引言

全氟及多氟烷基化合物 (Per- and polyfluoroalkyl substances, PFAS) 凭借其优异的疏水疏油性、热稳定性及化学惰性, 在医疗器械、不粘涂层、食品包装材料和化妆品等工业领域及日常消费品中得到广泛应用^[1]。由于 PFAS 分子中的碳 - 氟键高度稳定, 在环境中难以降解, 容易在环境和生物体内蓄积^[2], 已成为全球关注的新型持久性有机污染物。近年来, PFAS 污染问题在我国日益凸显, 尤其在华东和西南等地区^[3,4]。值得注意的是, 这些地区是多种道地药材的重要产区, 如浙贝母、苏芩实、川芎和滇黄精等。因此, 中药材在种植过程中极易接触并富集 PFAS。目前, 已在地龙、昆布等中药材中检出多种 PFAS 残留^[5,6], 表明中药材正成为人体暴露于 PFAS 的一条不容忽视的非

传统途径。

其中, 全氟壬酸 (Perfluorononanoic acid, PFNA) 作为一种典型的长链全氟羧酸, 因其在各类环境介质和人类血液、组织等样本中普遍检出且生物半衰期较长, 备受关注^[7-9]。动物实验表明, PFNA 可在体内长期蓄积, 并具有肝肾毒性及内分泌干扰作用^[10,11]。近年研究进一步表明, PFNA 暴露会影响斑马鱼的行为模式, 并与学龄儿童注意缺陷与多动障碍 (ADHD) 存在关联^[12,13], 提示其具有神经发育毒性。因此, 本研究旨在建立一种基于液相色谱 - 串联质谱技术 (LC-MS/MS) 的生物样本中 PFNA 分析方法, 通过优化前处理步骤、色谱条件与质谱参数, 实现脑组织中 PFNA 的准确定量, 以期揭示其暴露途径、毒代动力学特征及健康风险评

估提供方法支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Vanquish 超高效液相色谱仪（美国赛默飞世尔公司），TSQ Quantis 三重四级杆质谱仪（美国赛默飞世尔公司），BSA124S-CW 万分之一天平（德国赛多利斯公司），TGL-16K 高速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司），冷冻研磨仪（上海净信实业发展有限公司），多管涡旋混匀仪（上海拓赫机电科技有限公司）。

1.2 试剂

PFNA（批号：MKCW3054，纯度：97%，Sigma-Aldrich 公司）；¹³C₉-PFNA（批号：J3022706，北京曼哈格生物科技有限公司），甲醇（色谱级，安徽天地高纯溶剂有限公司），乙腈（色谱级，安徽天地高纯溶剂有限公司），乙酸铵（纯度 ≥ 98%，国药集团化学试剂有限公司），纯水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

1.3 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠，体重 200 ± 20 g，许可证号：SCXK（沪）2021-0002。

2 方法和结果

2.1 溶液配制

2.1.1 工作液

取 PFNA 1 mg，精密称定，置 1 mL 棕色量瓶中，加入甲醇溶解并定容至刻度，配制成浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的 PFNA 储备液。以甲醇为溶剂对储备液进行逐级稀释，制备浓度为 1250、2500、6250、12500、25000、50000 ng · mL⁻¹ 的标准曲线工作液，以及浓度为 2500、12500、37500 ng · mL⁻¹ 的质控工作液。

2.1.2 内标液

精密移取 1 mL ¹³C₉-PFNA 溶液至 5 mL 量瓶中，加入甲醇稀释至刻度，摇匀，配制成浓度为 1000 ng · mL⁻¹ 的内标工作液。

2.1.3 校正标样及质控样本

称取适量大鼠空白脑组织，以 1 : 10 (W/V) 比例加入纯水，进行冷冻研磨匀浆。分别取 PFNA 标准曲线工作液及质控工作液各 2 μL，加入 50 μL 空白脑组织匀浆液中，充分涡旋混匀，制成含 PFNA 浓度分别为 50、100、250、500、1000、2000 ng · mL⁻¹ 的系列校正标样，以及低（100 ng · mL⁻¹）、中（500 ng · mL⁻¹）、高（1500 ng · mL⁻¹）三个浓度水平的质控样本。

2.2 样本前处理与 LC-MS/MS 检测

2.2.1 色谱条件优化

比较了 2.4 μm 和 3 μm 填料粒径的 Hypersil™ BDS C18 色谱柱（100 mm × 4.6 mm）对 PFNA 保留行为和峰形表现的影响。结果表明，3 μm 粒径色谱柱出现明显峰拖尾，而 2.4 μm 粒径色谱柱可获得更对称、尖锐的色谱峰见图 1A。同时，本研究对比了两种色谱条件：（1）70% 水 - 30% 乙腈等度洗脱，（2）2 mM 乙酸铵水溶液 - 甲醇梯度洗脱^[14-16]。结果显示，在等度洗脱条件下，PFNA 保留较弱，保留时间为 0.84 min，不利于与基质中的潜在干扰物分离；而梯度洗脱显著改善了 PFNA 的保留行为与峰形见图 1B，故采用 2 mM 乙酸铵水溶液 - 甲醇流动相体系。进一步对进样体积（2、5、10、20 μL）及流速（0.4 ~ 1.0 mL · min⁻¹）进行优化，综合考虑峰形、保留时间及灵敏度等。结果表明，进样体积为 5 μL 时，可在保证响应信号的同时避免峰展宽或柱超载见图 1C；流速设为 0.7 mL · min⁻¹ 时可兼顾分离效率与系统压力稳定性。综上，最终确定色谱条件为：Hypersil™ BDS C18 色谱柱（100 mm × 4.6 mm，2.4 μm），流动相为 2 mM 乙酸铵水溶液（A）和甲醇（B），梯度洗脱程序：0 ~ 2 min，5%B；2 ~ 3 min，5% ~ 95%B；3 ~ 6 min，95%B；6 ~ 7 min，95% ~ 5%B；7 ~ 9 min，5%B，进样量 5 μL，柱温 40 °C，流速 0.7 mL · min⁻¹。

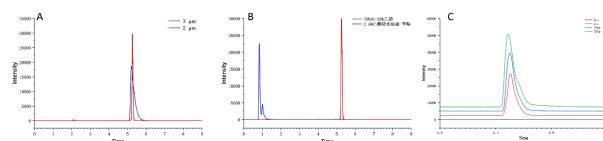


图1 不同色谱条件对PFNA色谱行为的影响

A. 色谱柱粒径；B. 洗脱方式；C. 进样量

2.2.2 质谱条件

质谱分析采用电喷雾离子源（ESI），负离子模式（ESI⁻），扫描方式为多反应检测（MRM）。主要参数设置如下：毛细管电压 4000 V，离子传输管温度 350 °C，雾化气温度 400 °C，鞘气流速 35 Arb，辅助气流速 5 Arb。PFNA 的定量离子对为 m/z 463.2 → 418.9，碰撞能量为 10 V，¹³C₉-PFNA 的定量离子对为 m/z 472.0 → 427.0，碰撞能量为 10 V。

2.2.3 前处理条件优化

在 PFAS 生物样品分析中，酸化结合有机溶剂沉淀蛋白是常用的前处理策略^[15,17,18]，本研究采用甲酸酸化 - 乙腈沉淀蛋白法，考察了不同甲酸浓度（0.2%，0.5%，1%）对 PFNA 检测响应及方法定量性能的影响。结果表明，

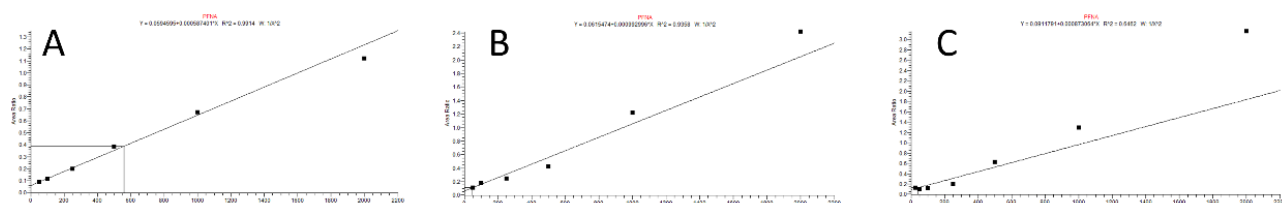


图2 不同甲酸浓度对PFNA线性的影响

A. 0.2%甲酸; B. 0.5%甲酸; C. 1%甲酸

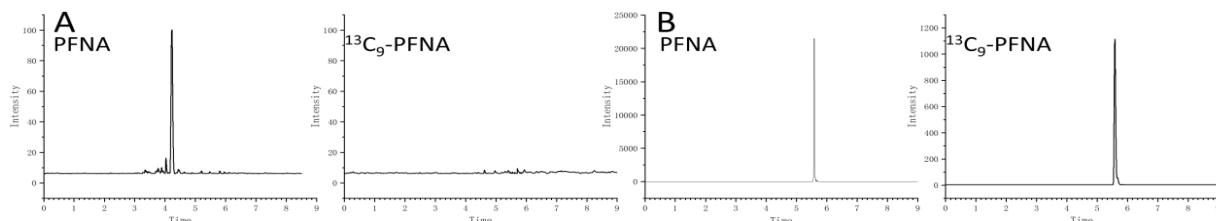


图3 专属性考察色谱图

A. 空白脑组织样本; B. 质控样本

0.2% 甲酸处理后, 线性关系最佳, 信号稳定性好见图 2。因此, 确定前处理条件如下: 称取 10 mg 大鼠脑组织, 加入 100 μ L 纯水进行冷冻研磨制备匀浆。取 20 μ L 脑组织匀浆液, 加入 5 μ L 内标工作液, 涡旋混匀后加入 100 μ L 0.2% 甲酸溶液, 涡旋 1 min, 再加入 500 μ L 乙腈, 涡旋 3 min。将混合液于 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 条件下离心 5 min, 取上清液用于 LC-MS/MS 分析。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性

分别取空白样本和质控样本, 按“2.2.3”进行前处理后进样分析, 记录色谱图。结果表明, 在所建立的 LC-MS/MS 条件下, 空白基质中未发现与待测物及内标物保留时间相近的内源性干扰峰见图 3。PFNA 和 $^{13}\text{C}_9$ -PFNA 的保留时间分别为 5.57 min 和 5.61 min, 峰形良好, 表明所建立的 LC-MS/MS 方法具有良好的专属性。

2.3.2 线性与范围

取 PFNA 系列校正标样, 按“2.2.3”前处理后进样分析, 记录色谱图。以 PFNA 与 $^{13}\text{C}_9$ -PFNA 的响应比 (y) 对脑组织中 PFNA 浓度 (x) 进行权重回归 ($1/x^2$)。典型标准曲线的回归方程为 $y=0.0594+0.0005874x$, 相关系数 $r^2=0.9914$ 。结果表明, PFNA 浓度在 50 ~ 2000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内具有良好的线性关系, 满足定量分析要求。

2.3.3 精密度与准确度

制备三个浓度水平的质控样本, 每个浓度水平各 6 份, 并于 2 天内完成 3 个独立分析批次, 按“2.2”项下方法进行测定。结果显示, PFNA 的批内和批间精密度 (RSD) 为 5.39% ~ 8.18%, 准确度为 90.15% ~ 112.49%。符

合生物样品分析方法学验证指导原则的相关要求, 表明该方法具有良好精密度和准确度。

2.3.4 基质效应

取空白大鼠脑组织样本, 按“2.2”进行前处理, 吸取所得上清液作为基质溶液, 在其中加入质控工作液, 配制与低、中、高浓度质控样本相同浓度水平的基质加标样品, 记录 PFNA 与 $^{13}\text{C}_9$ -PFNA 的峰面积比值, 记为 B。另以甲醇为溶剂, 配制不含基质的相同浓度质控溶液, 记录其峰面积比值, 记为 A。按基质效应因子 (MF)= $B/A \times 100\%$ 计算 MF。结果表明, PFNA 在大鼠脑组织中的 MF 为 88.6% ~ 94.8%。

2.3.5 稳定性

制备低浓度和高浓度质控样本, 每个浓度水平各 6 份, 分别考察以下三种条件的稳定性: 在 -80°C 储存 30 天、反复冻融 3 次、以及将样本按“2.2”进行前处理后放置于进样盘 24 h 后进样。结果表明, 低浓度质控样本在上述条件下的准确度分别为 94.65%、91.58% 和 96.72%, 高浓度质控样本的准确度分别为 95.56%、96.15% 和 97.88%, 满足生物样品分析方法学验证指导原则的稳定性考察要求。

2.4 不同剂量暴露后大鼠脑组织中 PFNA 的分析

选取 SD 大鼠 18 只, 按体重随机分为空白对照组、PFNA 低剂量组 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 PFNA 高剂量组 ($6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 6 只。空白对照组给予等体积溶剂, 低剂量组和高剂量组分别以 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量每日灌胃给药一次, 连续给药 6 周。末次给药后禁食不禁水 12 h 后, 处死动物并取脑组织, 于 -80°C 保存待测。取待测组织样本按“2.2.3”进行前处理, 采用所建立的 LC-

MS/MS 方法测定脑组织中 PFNA 含量, 结果以 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。结果显示, 空白对照组中可检测到低水平 PFNA, 其含量低于给药组, 应来源于环境暴露; 低剂量组和高剂量组脑组织中 PFNA 均可被检出, 且随给药剂量的增加, 脑组织中 PFNA 浓度呈现升高趋势见图 4。与空白对照组相比, 低剂量组和高剂量组脑组织中 PFNA 含量均显著升高 ($P < 0.05$), 其中低剂量组浓度为 $3299.08 \pm 644.23 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P=0.0006$), 高剂量组为 $7878.06 \pm 4721.13 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P=0.02$)。上述结果表明, 所建立的 LC-MS/MS 方法能够满足大鼠脑组织中 PFNA 的定量分析需求, 可有效区分不同暴露水平下脑组织中 PFNA 的含量差异, 具有良好的实际样本适用性。

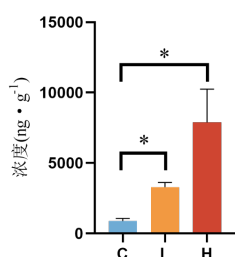


图4 不同给药剂量组大鼠脑组织中PFNA的浓度 ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)
注: 与空白对照组相比, $*P < 0.05$ 。

3 讨论

本文建立了一种基于 LC-MS/MS 的大鼠脑组织中 PFNA 定量分析方法, 采用 Hypersil™ BDS C18 色谱柱 ($100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 2.4 \mu\text{m}$) 进行分离, 同位素标记物作为内标。该方法前处理流程简便, 适用于生物样品中 PFNA 的快速分析。在样品前处理条件优化过程中, 系统考察了不同甲酸浓度对 PFNA 定量性能的影响。结果表明, 较高浓度 (0.5% 和 1%) 甲酸并未改善 PFNA 的质谱响应和线性关系, 反而可能因过度酸化而影响提取效率。相比之下, 0.2% 甲酸条件可有效促进脑组织蛋白变性, 并有助于释放与蛋白结合的 PFNA, 从而降低基质干扰, 获得更优的线性范围和信号稳定性。与采用固相萃取方法相比, 本研究所建立的方法简化了样品处理流程, 减少了样品用量和处理时间, 为脑组织样品中的 PFNA 检测提供快速、稳定的方法, 并为其它羧酸类 PFAS 的方法建立提供参考。

参考文献:

[1] Gaines LGT. Historical and current usage of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A literature review [J]. *Am J Ind Med*, 2023, 66(5): 353-378.

[2] Xing Y, Zhou Y, Zhang X, et al. The sources and bioaccumulation of per- and polyfluoroalkyl substances in

animal-derived foods and the potential risk of dietary intake [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 905: 167313.

[3] Wang L, Chen L, Wang J, et al. Spatial distribution, compositional characteristics, and source apportionment of legacy and novel per- and polyfluoroalkyl substances in farmland soil: A nationwide study in mainland China [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 470: 134238.

[4] Liu L, Qu Y, Huang J, et al. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in Chinese drinking water: risk assessment and geographical distribution [J]. *Environ Sci Eur*, 2021, 33(1): 6.

[5] 孙晶, 唐丹瑞, 强慧敏等. UPLC-Q Orbitrap MS 法同时测定中药材地龙中 43 个全 / 多氟烷基类化合物[J]. *药物分析杂志*, 2024, 44(10): 1756-1771.

[6] 唐丹瑞, 孙晶, 曹玲等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定中药材昆布中 71 种全 / 多氟化合物残留 [J]. *分析化学*, 2025, 53(7): 1177-1185, 中插 1179-中插 1125.

[7] Chiu WA, Lynch MT, Lay CR, et al. Bayesian estimation of human population toxicokinetics of PFOA, PFOS, PFHxS, and PFNA from studies of contaminated drinking water [J]. *Environ Health Perspect*, 2022, 130(12): 127001.

[8] Xu B, Liu S, Zhou JL, et al. PFAS and their substitutes in groundwater: Occurrence, transformation and remediation [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 412: 125159.

[9] Li J, Duan W, An Z, et al. Legacy and alternative per- and polyfluoroalkyl substances spatiotemporal distribution in China: Human exposure, environmental media, and risk assessment [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 480: 135795.

[10] Fang XM, Gao GZ, Xue HY, et al. In vitro and in vivo studies of the toxic effects of perfluorononanoic acid on rat hepatocytes and Kupffer cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012, 34(2): 484-494.

[11] Kim JI, Kim BN, Lee YA, et al. Association between early-childhood exposure to perfluoroalkyl substances and ADHD symptoms: A prospective cohort study [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 879: 163081.

[12] Vuong AM, Webster GM, Yolton K, et al. Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and neurobehavior in US children through 8 years of age: The HOME study [J]. *Environ Res*, 2021, 195: 110825.

[13] Jantzen CE, Annunziato KM, Cooper KR. Behavioral, morphometric, and gene expression effects in adult zebrafish (*Danio rerio*) embryonically exposed to PFOA, PFOS, and PFNA [J]. *Aquat Toxicol*, 2016, 180: 123-130.

[14] Di GA, La MN, Taoussi O, et al. Analysis of perfluoroalkyl substances (PFAS) in conventional and unconventional matrices: Clinical outcomes [J]. *J Pharm Biomed Anal Open*, 2023, 1: 100002.

[15] Das KP, Grey BE, Rosen MB, et al. Developmental toxicity of perfluorononanoic acid in mice [J]. *Reprod Toxicol*, 2015, 51: 133-144.

[16] GB/T 5750.8-2023. 生活饮用水标准检验方法第 8 部分: 有机物指标: [S]. 2023: 146-152.

[17] O'shaughnessy KL, Bell KS, Sasser AL, et al. The pollutant perfluorohexane sulfonate (PFHxS) reduces serum thyroxine but does not alter thyroid action in the postnatal rat brain [J]. *Environ Int*, 2024, 190: 108838.

[18] Marchese MJ, Zhu TY, Hawkey AB, et al. Prenatal and perinatal exposure to Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)-contaminated drinking water impacts offspring neurobehavior and development [J]. *Sci Total Environ*, 2024, 917: 170459.

作者简介: 张宸祎 (2001.09-), 女, 云南省曲靖市, 汉族, 硕士研究生, 研究方向: 主要从事环境污染物研究, 中国药科大学。

* 通讯作者: 陆宇婷。