



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103487515 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201210190624. 5

(22) 申请日 2012. 06. 11

(71) 申请人 上海市环境科学研究院

地址 200233 上海市钦州路 508 号固土所

(72) 发明人 朱江 郭小品 卢聪 罗启仕
杨洁 孟梁 朱杰 郭琳 李忠元
张长波 李青青 王旌 高洁
朱悦

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006. 01)

G01N 30/06 (2006. 01)

G01N 30/08 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种乳制品中全氟化合物的免疫亲和色谱-超高效液相色谱-质谱联用快速检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫亲和色谱-超高效液相色谱-质谱联用快速检测方法,尤其涉及乳制品以及水体中全氟化合物检测方法的新技术。步骤为:第一步,人工抗原的合成。第二步,多克隆抗体的筛选与鉴定。第三步,免疫亲和柱的研制。第四步,超高效液相色谱串联质谱检测方法的建立和优化。该技术提供一种快速检测环境中全氟化合物残留的方法,更好地提高了检测灵敏度,保证了对样品检测的准确性。适应当前对全氟化合物残留检测的需要,便于开展对环境中实际样品中全氟化合物的残留检测。

1. 一种乳制品中全氟化合物的免疫亲和色谱-超高效液相色谱-质谱连用快速检测方法,其特征在于,制备免疫亲和色谱的抗体,实现色谱前处理中 PFCs 及其衍生物全氟辛烷磺酸盐和全氟辛基磺酰氟的富集浓缩;运用液相色谱-质谱连用对乳制品 PFCs 进行定性定量分析并建立典型 PFCs 及其衍生物全氟辛烷磺酸盐和全氟辛基磺酰氟的标准曲线,提供最佳分离鉴定效果。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫亲和色谱-超高效液相色谱-质谱连用快速检测方法,其特征在于,制备了适用于 PFCs 及其衍生物的免疫亲和色谱柱。

3. 根据权利要求 2 所述的 PFCs 及其衍生物的免疫亲和色谱柱,其特征在于,色谱柱制备的具体步骤包括:人工抗原的合成、多克隆抗体的筛选与鉴定以及 IAC 柱的研制。

4. 根据权利要求 3 所述的人工抗原的合成,具体包括:a、PFOS/PFOA 等 PFCs 及其结构类似物二羧基或二磺酸基 PFCs,通过混合酸酐法与载体蛋白牛血清蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)偶联成人工抗原;b、人工抗原的纯化及鉴定:采用透析的方式进行纯化;通过 HPLC、MS、SDS-PAGE 凝胶电泳、IR 等鉴定手段对所合成的人工抗原进行鉴定,判定偶联效果,计算结合比。

5. 根据权利要求 3 所述的多克隆抗体的筛选,具体为:将合成的 PFCs-BSA 人工抗原注入大白兔,约间隔 7-10 天注射一次,30 天后,取血清进行抗体的特性鉴定。抗体特性及效价采用包被 PFCs-OVA 的间接竞争 ELISA 方法,利用酶标羊抗兔抗体进行测定。对于阳性高效价的抗体血清进行收集,并经聚丙烯酰胺电泳或琼脂双扩进行抗体纯化。纯化后抗体效价、特异性测定采用 ELISA 进行测定。

6. 根据权利要求 3 所述的 IAC 柱的研制,具体为:将抗体与活化的 SepharoseCL-4B 偶联,乙醇胺封闭未偶联的活性位点,获得特异性免疫吸附剂。将免疫吸附剂装柱,平衡,然后进行柱容量、选择性、富集效率、稳定性测试,洗脱条件的建立,回收率、重复性测定等。

7. 根据权利要求 1 所述的运用液相色谱-质谱连用对乳制品 PFCs 进行定性定量分析,其特征在于,乳制品的前处理方式为:将样品过滤纸取 200mL,利用固相萃取仪进行净化分离萃取,收集洗脱液,将洗脱液氮吹至干,7:3 甲醇水定容 1mL,涡旋振荡后用高速冷冻离心机离心,供上机测定。

8. 根据权利要求 1 所述的运用液相色谱-质谱连用对乳制品 PFCs 进行定性定量分析,其特征在于,高效液相色谱分析方法具体为:

色谱柱:Eclipse Plus C18 2.1*50mm

流动相:①A:5mmol/L 乙酸铵 5% 甲醇水溶液;②流动相 B:100% 甲醇

梯度洗脱程序:

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	0.40	70.0	30.0
0.3	0.40	70.0	30.0
4.6	0.40	10.0	90.0
4.9	0.40	0	100
5.3	0.40	0	100
6.8	0.55	0	100
8.6	0.40	70.0	30.0
11.7	0.00	70.0	30.0

柱温 :45℃

进样量 :10 μ L

串联质谱条件具体为 :

离子源 :ESI, 离子化方式 ES(-)。

毛细管电压 :2.5kV。

离子源温度 :120℃。

脱气溶剂温度 :350℃。

碰撞气流速 :0.35mL/min。

扫描模式 :多反应 (MRM)。

碰撞能量、锥孔电压 :

参数	母离子 m/z	子离子 m/z	参考值		
			驻留时间 sec	锥孔电压 v	碰撞能量 ev
运行时间			12 分钟		
通道	298.41	79.71	0.02	60.00	30.00
	313.02	269.02	0.02	16.00	7.00
	363.01	319.01	0.02	15.00	7.00
	398.43	79.72	0.02	60.00	38.00
	412.32	368.40	0.02	20.00	10.00
	463.03	419.02	0.02	20.00	8.00
	498.22	79.71	0.02	70.00	45.00
	513.01	469.01	0.02	22.00	8.00
	563.00	519.01	0.02	22.00	8.00
	613.03	569.02	0.02	22.00	8.00

9. 根据权利要求1所述的超高效液相色谱串联质谱仪分析方法,其特征在于,固相萃取法的加标量为0.4~12.0ng时,平均加标回收率范围为81.0%~133.5%之间,相对标准偏差在1.4%~7.9%之间。

10. 根据权利要求1所述的超高效液相色谱串联质谱仪分析方法,其特征在于,所测定的十种全氟化合物最低检出限为0.014~0.076pg/ml。

一种乳制品中全氟化合物的免疫亲和色谱 - 超高效液相色谱 - 质谱连用快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫亲和色谱 - 超高效液相色谱 - 质谱连用快速检测方法, 尤其涉及乳制品以及水体中全氟化合物检测方法的新技术。

背景技术

[0002] 全氟化合物 (Perfluorinated compounds, PFCs) 以其优良的热稳定性、化学稳定性、高表面活性及疏水疏油性能, 被大量应用于聚合物添加剂、润滑剂等诸多工业生产和生活用品中。全氟辛烷磺酸 (Perfluorooctane Sulphonate, PFOS) 和全氟辛酸 (Perfluorooctanoic Acid, PFOA) 是代表性的 PFCs。

[0003] 2009 年 5 月联合国环境规划署及《关于持久性有机污染物 (POPs) 的斯德哥尔摩公约》第四次缔约方大会就减少并最终禁止使用 9 种严重危害人类健康与自然环境的有毒化学物质达成共识。这 9 种新的 POPs 就包括 PFOS 及其衍生物全氟辛烷磺酸盐和全氟辛基磺酰氟。由于 PFCs 的 C-F 键能极大, 在正常环境条件下很难降解, 不能被传统的污水处理方法有效去除。Alexander G. P. 估算 1970-2002 年间全球全氟辛基磺酰化合物的产量为 9.6-12.25 万吨, 其中海洋表层中存在量估计为 235-1770 吨。所以 PFCs 所造成的全球性环境污染已成事实。

[0004] 随着我国乳业的快速发展, 乳制品产量和人均消费量大幅度增加, 人们对乳品的安全问题提出更高的要求。乳品中全氟化合物污染对人体健康的危害, 属于长时期、微剂量、慢性细微毒性效应, 可以导致人体生理生化或者自然免疫功能缺陷、致畸、致癌、致突变等问题。控制乳制品中 PFCs 污染, 确保乳品安全, 正日益受到关注, 其中奶牛饲料原料和饮用水受 PFCs 污染是导致牛乳制品中 PFCs 残留的重要原因。

[0005] 对于 PFOS/PFOA 等 PFCs 造成的环境污染, 尽管目前国内外已经做了许多研究工作, 可是深度和广度仍远远不够, 分析方法尚不够成熟, 复杂环境、生物及食品样品的分析方法需要进一步完善, 经国家标准化委员会网站查询表明, 未见 PFCs 残留检测标准方法。PFCs 检测方法研究中对样品的前处理是一个至关重要的环节。因为 PFCs 具有疏水疏油的双重性, 属于痕量环境污染物, 而且环境基质如生物样品往往都成分复杂, 所以样品前处理较困难, 已成为制约环境监测和深入研究这类物质环境行为的重要因素之一。

[0006] 目前用于 PFOS/PFOA 环境样品前处理的技术主要有液 - 液萃取 (LLE) 和固相萃取 (SPE)。LLE 是传统的萃取方法, 尽管方法成熟, 可是存在如界面易乳化, 耗费溶剂, 操作烦琐, 实验误差大的缺点。SPE 是当前主流的萃取手段, 反相 C18 柱及离子交换 HLB 柱是使用较多的 SPE 柱。这些 SPE 柱尽管萃取效果好于 LLE, 可仍然存在一些缺点: SPE 柱价格较高, 虽然理论上可以重复使用, 但由于环境样品的复杂性, 往往很少重复使用, 使用成本较大; 商品化 SPE 柱的填料易被复杂样品污染堵塞, 柱效下降; PFCs 极性差别大, 反相或离子交换 SPE 填料并不适合所有的 PFCs 萃取, 如反相吸附剂对小分子极性化合物没有足够的保留, 复合弱离子交换吸附剂尽管兼顾离子交换和反相机制, 效果好于反相吸附剂, 可是对于

组织中 C10 以上全氟酸的回收率却低于 50%。近年来,针对 LLE、SPE 萃取技术的不足,科学家们不断地改进,已形成了液-固萃取、加速溶剂萃取、超声萃取、固相微萃取等新技术。

[0007] 免疫亲和色谱 (Immunoaffinity Chromatography, IAC) 是一项颇具发展潜力的样品前处理技术,其原理是利用抗原与抗体之间的高亲和、高特异而且可逆的“锁-钥匙”结合特性和柱层析色谱的差速迁移理论建立的分离富集方法。IAC 具有选择性高、富集能力强、可重复使用的优点,能够满足痕量小分子化合物的检测要求。

[0008] IAC 在农药、兽药残留等领域应用的研究较多,部分 IAC 已经商品化。在环境科学领域,与 IAC 相关的免疫检测技术研究已经取得一定成果,而有关 IAC 用于乳制品样品前处理的研究报道却很少。Weilin L. Shelver 最近报道了用于环境多溴联苯醚 (PBDEs) 检测的酶联免疫吸附方法 (ELISA),检测限与 GC-NCI-MS 相当,可达到 0.1ppb。研究数据表明 ELISA 可用于环境、生物样品的 PBDEs 检测,回收率与仪器方法相当。然而,ELISA 方法存在不能区分相似结构 PBDEs 的缺点,这恰说明抗体的宽识别能力,提示 IAC 技术实际应用的可行性。E. Eljarrat 报道了用于二噁英提取的 IAC 技术。该技术可以选择性提取五种 ppt 级的二噁英,并且与传统的前处理方法相比,IAC 可以使处理速度提高 20 倍,节约 100 倍的有机溶剂。

[0009] 综上所述,有关与 PFCs 相似小分子化合物如长链脂肪酸或环境有机污染物如溴代联苯醚、二噁英等的人工抗原合成、特异性抗体筛选、IAC 柱的制备与应用等技术已经比较成熟,可以为本课题所借鉴。经查新检索,尚未见用于 PFCs 的免疫检测方法及其样品前处理 IAC 的研究报道。

发明内容

[0010] 本发明的目的是制备免疫亲和色谱的抗体,实现色谱前处理中 PFCs 及其衍生物全氟辛烷磺酸盐和全氟辛基磺酰氟的富集浓缩;运用液相色谱-质谱连用对乳制品中 PFCs 进行试验参数探索,定性定量分析并建立典型 PFCs 及其衍生物全氟辛烷磺酸盐和全氟辛基磺酰氟的标准曲线,提供最佳分离鉴定效果。

[0011] 一方面,本发明提供了一种制备 PFCs 及其衍生物免疫亲和色谱柱的方法,该方法的具体步骤为:

[0012] (1) 人工抗原的合成

[0013] a、PFOS/PFOA 等 PFCs 及其结构类似物二羧基或二磺酸基 PFCs,通过混合酸酐法与载体蛋白牛血清蛋白 (BSA)、鸡卵清白蛋白 (OVA) 偶联合成人工抗原。

[0014] b、人工抗原的纯化及鉴定:采用透析的方式进行纯化;通过 HPLC、MS、SDS-PAGE 凝胶电泳、IR 等鉴定手段对所合成的人工抗原进行鉴定,判定偶联效果,计算结合比。

[0015] (2) 多克隆抗体的筛选与鉴定

[0016] 将合成的 PFCs-BSA 人工抗原注入大白兔,约间隔 7-10 天注射一次,30 天后,取血清进行抗体的特性鉴定。抗体特性及效价采用包被 PFCs-OVA 的间接竞争 ELISA 方法,利用酶标羊抗兔抗体进行测定。对于阳性高效价的抗体血清进行收集,并经聚丙烯酰胺电泳或琼脂双扩进行抗体纯化。纯化后抗体效价、特异性测定采用 ELISA 进行测定。

[0017] (3) IAC 柱的研制

[0018] 将抗体与活化的 SepharoseCL-4B 偶联,乙醇胺封闭未偶联的活性位点,获得特异

性免疫吸附剂。将免疫吸附剂装柱,平衡,然后进行柱容量、选择性、富集效率、稳定性测试,洗脱条件的建立,回收率、重复性测定等。

[0019] 在本发明的优选实施过程中,前述的柱容量、选择性、富集效率、稳定性测试,洗脱条件的建立过程如下:

[0020] (1) 柱容量的选择:分别将含 3ng、20ng、100ng、150ng、300ng 的 PFOS 标准品的 50mL 2% 乙腈溶液分别添加到本试验制备的亲合柱上,以 2mL/min 的流速流出,然后用 10mL 水溶液洗涤杂质,用 4mL 乙腈洗脱,自然重力流出,收集洗脱液,30℃ 氮气吹干,用 10% 乙腈水溶液复溶并定容至 1mL,涡动 1min,0.22 μ m 的针孔式滤膜过滤。LC-MS 检测。结果表明,自制免疫亲和柱的回收率受到不同上样量的影响而变化,从具体数据可知,自制柱上样 100ng 的回收率能达到 87.9% 以上,可满足应用要求。

[0021] (2) 上样体积的优化:分别将含 100ng 的 PFOS 标准品 10mL、30mL、50mL、70mL 的 PBS 溶液分别添加到本试验制备的亲合柱上。以 2mL/min 的流速流出,然后用 10mL 10% 甲醇水溶液洗涤杂质,用 1mL 甲醇洗脱,自然重力流出,收集洗脱液,30℃ 氮气吹干。用 10% 乙腈水溶液复溶并定容至 1mL,涡动 1min,0.22 μ m 的针孔滤膜过滤,LC-MS 检测。结果表明,自制亲和柱的上样体积在 50 ~ 70mL 时回收率高、没有显著差异,考虑到尽量缩短操作时间,选择 50mL 为最佳上样体积。

[0022] (3) 上样流速的优化:分别将含 100ng 的 PFOS 标准品 50mL 的 PBS 溶液加到本试验制备的亲合柱上,以 0.5mL/min、1mL/min、2mL/min、3mL/min、4mL/min、5mL/min、的流速流出,然后用 10mL 10% 甲醇-水溶液洗涤杂质,用 1mL 甲醇洗脱,自然重力流出。收集洗脱液,30℃ 氮气吹干,用 10% 乙腈-水溶液复溶,并定容至 1mL,涡动 1min,0.22 μ m 的针孔滤膜过滤,LC-MS 检测。结果表明,自制亲和柱在上样流速 2 ~ 3mL/min 时回收率较高,故选择该上样流速为最佳上样流速。

[0023] (4) 洗脱溶液的优化

[0024] 将含 100ng 的 PFOS 标准品 50mL 的 PBS 溶液加到本实验制备的 PFOS 亲和柱上,10mL 10% 甲醇-水溶液洗涤杂质。分别用 1mL 80% 甲醇-水溶液、1mL 纯甲醇、4mL 纯甲醇、4mL 纯乙腈进行洗脱。收集洗脱液,30℃ 氮气吹干,用 10% 乙腈-水溶液复溶并定容至 1mL,涡动 1min,0.22 μ m 的针孔滤膜过滤,LC-MS 检测。结果表明,4mL 纯乙腈作为洗脱溶剂的效果最佳。PFOS 的回收率达 91.3% ~ 96.7%。

[0025] 另一方面,本发明提供了一种超高效液相色谱串联质谱法测定乳品中全氟化合物的检测方法。方法的具体条件为:

[0026] (1) 样品前处理方式:将样品过滤纸取 200mL,利用固相萃取仪进行净化分离萃取,收集洗脱液,将洗脱液氮吹至干,7 : 3 甲醇水定容 1mL,涡旋振荡后用高速冷冻离心机离心,过亲和柱后,供上机测定。

[0027] (2) 超高效液相色谱条件为:

[0028] 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 2.1*50mm,或相当色谱柱。

[0029] 流动相:① A :5mmol/L 乙酸铵 5% 甲醇溶液;② 流动相 B :100% 甲醇。梯度洗脱程序如下:

[0030]

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	0.40	70.0	30.0
0.3	0.40	70.0	30.0
4.6	0.40	10.0	90.0
4.9	0.40	0	100
5.3	0.40	0	100
6.8	0.55	0	100
8.6	0.40	70.0	30.0
11.7	0.00	70.0	30.0

- [0031] 柱温 :45℃。
- [0032] 进样量 :10 μ L。
- [0033] (3) 串联质谱条件为 :
- [0034] 离子源 :ESI, 离子化方式 ES(-)。
- [0035] 毛细管电压 :2.5kV。
- [0036] 离子源温度 :120℃。
- [0037] 脱气溶剂温度 :350℃。
- [0038] 碰撞气流速 :0.35mL/min。
- [0039] 扫描模式 :多反应 (MRM)。
- [0040] 碰撞能量、锥孔电压如下 :
- [0041]

参数	参考值				
	母离子 m/z	子离子 m/z	驻留时间 sec	锥孔电压 v	碰撞能量 ev
运行时间			12 分钟		
	298.41	79.71	0.02	60.00	30.00
	313.02	269.02	0.02	16.00	7.00
	363.01	319.01	0.02	15.00	7.00
	398.43	79.72	0.02	60.00	38.00
通道	412.32	368.40	0.02	20.00	10.00
	463.03	419.02	0.02	20.00	8.00
	498.22	79.71	0.02	70.00	45.00
	513.01	469.01	0.02	22.00	8.00
	563.00	519.01	0.02	22.00	8.00
	613.03	569.02	0.02	22.00	8.00

[0042] 使用本发明提供的方法检测乳制品中残留的十种全氟化合物见附图 1。使用该方法进行加标回收实验, 固相萃取法的加标量为 0.4 ~ 12.0ng 时, 平均加标回收率范围为 81.0% ~ 133.5% 之间, 相对标准偏差在 1.4% ~ 7.9% 之间, 如下表所示 :

[0043]

PFCs	回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD%)	检出限 (pg/mL)
全氟丁基磺酸钾	83.86	1.37	0.076
全氟己酸	82.75	6.04	0.029
全氟庚酸	81.00	4.32	0.029
全氟己基磺酸钾	89.79	5.03	0.044
全氟辛酸	85.29	2.97	0.016
全氟壬酸	84.13	7.08	0.014
全氟辛烷磺酸	82.97	3.14	0.036
全氟癸酸	83.45	7.92	0.015
全氟十一烷酸	91.07	5.21	0.022
全氟十二烷酸	133.5	4.93	0.024

附图说明

[0044] 附图 1 表示十种全氟化合物标准物质色谱图

具体实施方式

下面结合本发明的实施例作详细说明：本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0045] 实施例 1 PFOS 免疫亲和柱的制备

[0046] 1. 抗体的准备

[0047] 用反应缓冲液 (0.1mol/L, NaHCO₃, 0.5mol/L NaCl, pH8.3) 稀释抗体溶液。准备 10mL 的 2mg/mL 抗体溶液。

[0048] 2. 亲和柱的制备

[0049] 参照溴化氰 (CNBr) 活化的 SepharoseCL 4B 胶产品说明书，具体操作步骤如下：

[0050] (1) 将 2g CNBr 活化的 SepharoseCL4B 干胶悬浮于 20mL 1mol/L HCL 中溶胀，然后用约 200mL 1mmol/L HCL 清洗溶胀后的胶。

[0051] (2) 将上一步已经洗涤的填料用 200mL 的反应缓冲液 (0.1mol/L NaHCO₃, pH 8.1) 清洗充分，将胶加入 10mL 2mg/mL 的 PFOS 抗体反应缓冲液溶液中，室温温和搅拌 2h，静置，收集反应上清，紫外分光光度计测定洗脱液中未偶联蛋白含量，经测定，本次制备 PFOS 抗体与凝胶的偶联率是 97.2%

[0052] (3) 用反应缓冲液洗涤上一步反应后的胶，将胶加入 10mL 0.1mol/L pH8.0 的 Tris-HCL 缓冲液中，室温下温和搅拌反应 2h。

[0053] (4) 用 600mL 0.1mol/L 醋酸缓冲液 (pH4.5) 和 0.1mol/L Tris-HCL (pH 8. 先后交替洗涤处理后的胶。洗涤后的凝胶用 200mL PBS 充分平衡后装柱，装到 1mL 的柱管中，高度为 0.5cm，装柱缓冲液体 PBS (含 0.02% 叠氮钠)，装好的柱子用堵头封住柱底部，贮存于 4°C。

[0054] 实施例 2 使用 PFOS 免疫亲和色谱柱处理牛乳样品并使用 LC-MS 检测分析

[0055] 本发明制备的亲合柱使用条件为：上样体积为 50mL，上样流速为 2 ~ 3mL/min，洗脱溶剂采用 4mL 乙腈。对未检出 PFOS 的牛乳样品，分别添加 0.01、0.4 和 2.0ug/kg 三个水平含量的 PFOS，每个水平作 5 次平均试验，检测回收率及精密度。

[0056] 采用如下样本处理方法：

[0057] 对未检出 PFOS 的牛乳样品，分别添加 0.01、0.4 和 2.0ug/L 三个水平含量的 PFOS，将牛乳放置在 36℃ 回温，于 7000r/min 离心 15min，弃上层乳脂和下层沉淀，移取中间层 50mL 用于上样（相当于 PFOS 总添加量为 0.5ng、20ng、100ng）。用移液管移取 50mL 试样到泵流操作架上的 50mL 注射器中，调节压力泵，控制试样以 2 ~ 3mL/min 稳定的流速。通过本试验制备的亲合柱。排干液体后取下 50mL 的注射器，装上 10mL 注射器。注射器内加入 10mL 10% 甲醇 - 水溶液，以 3 ~ 4mL/min 稳定的流速洗柱，排干液体后，加入 4mL 乙腈，洗脱已特异性结合于柱上的 PFOS，流速调整为 1 ~ 2mL/min，收集洗脱液于玻璃试管中，30℃ 氮气吹干，用 10% 乙腈 - 水溶液复溶并定容至 1mL，涡动 1min，0.22 μm 的针孔滤膜过滤，LC-MS 检测。回收率及变异数据见下表：

[0058]

PFOS 添加量 (ng)	平均回收量 (ng)	回收率 (%)	变异系数 (%)
0.5	0.472	94.4	6.7
20	18.561	92.8	5.3
100	88.792	88.8	2.9

[0059] 实际样本的加标测定试验结果表明，使用本发明制备的免疫亲和柱，PFOS 的三个添加量的回收率在 88.8% ~ 94.4%，变异系数为 2.9% ~ 6.7%。

[0060] 实施例 3 超高效液相色谱串联质谱法测定全氟化合物的标准物质

[0061] 准确吸取 1mL 的标准溶液于 100mL 容量瓶中，用 7 : 3 甲醇水定容，充分摇匀，得到 0.1mg/L 的标准工作溶液。用 7 : 3 甲醇水逐级稀释得到 0.05mg/L、0.005mg/L、0.001mg/L、0.0005mg/L、0.0002mg/L、0.00005mg/L 的标准工作溶液，按质量浓度由稀至浓顺序依次检测。

[0062] 使用本发明提供的超高效液相色谱条件为：

[0063] 色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 2.1*50mm，或相当色谱柱。

[0064] 流动相：① A : 5mmol/L 乙酸铵 5% 甲醇水溶液；② 流动相 B : 100% 甲醇。梯度洗脱程序如下：

[0065]

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	0.40	70.0	30.0
0.3	0.40	70.0	30.0
4.6	0.40	10.0	90.0
4.9	0.40	0	100
5.3	0.40	0	100
6.8	0.55	0	100
8.6	0.40	70.0	30.0
11.7	0.00	70.0	30.0

[0066] 柱温 :45℃。

[0067] 进样量 :10 μ L。

[0068] 使用的串联质谱条件为 :

[0069] 离子源 :ESI, 离子化方式 ES(-)。

[0070] 毛细管电压 :2.5kV。

[0071] 离子源温度 :120℃。

[0072] 脱气溶剂温度 :350℃。

[0073] 碰撞气流速 :0.35mL/min。

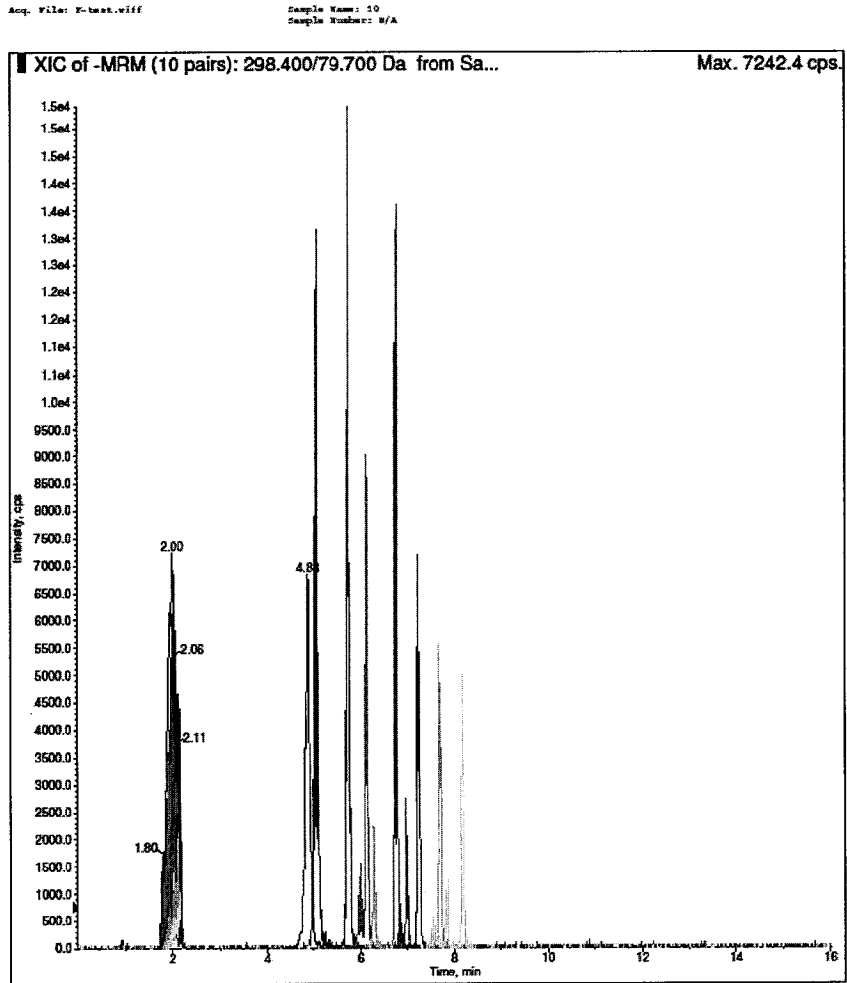
[0074] 扫描模式 :多反应 (MRM)。

[0075] 碰撞能量、锥孔电压如下 :

[0076]

参数			参考值		
	母离子 m/z	子离子 m/z	驻留时间 sec	锥孔电压 v	碰撞能量 ev
运行时间			12 分钟		
	298.41	79.71	0.02	60.00	30.00
	313.02	269.02	0.02	16.00	7.00
	363.01	319.01	0.02	15.00	7.00
	398.43	79.72	0.02	60.00	38.00
通道	412.32	368.40	0.02	20.00	10.00
	463.03	419.02	0.02	20.00	8.00
	498.22	79.71	0.02	70.00	45.00
	513.01	469.01	0.02	22.00	8.00
	563.00	519.01	0.02	22.00	8.00
	613.03	569.02	0.02	22.00	8.00

[0077] 以定量离子峰面积对质量浓度作图供超高效液相色谱串联质谱测定,十种标准物质的图谱见附图 1。



附图 1

专利名称(译)	一种乳制品中全氟化合物的免疫亲和色谱-超高效液相色谱-质谱连用快速检测方法		
公开(公告)号	CN103487515A	公开(公告)日	2014-01-01
申请号	CN201210190624.5	申请日	2012-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	上海市环境科学研究院		
申请(专利权)人(译)	上海市环境科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	上海市环境科学研究院		
[标]发明人	朱江 郭小品 卢聪 罗启仕 杨洁 孟梁 朱杰 郭琳 李忠元 张长波 李青青 王旌 高洁 朱悦		
发明人	朱江 郭小品 卢聪 罗启仕 杨洁 孟梁 朱杰 郭琳 李忠元 张长波 李青青 王旌 高洁 朱悦		
IPC分类号	G01N30/02 G01N30/06 G01N30/08 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫亲和色谱-超高效液相色谱-质谱连用快速检测方法，尤其涉及乳制品以及水体中全氟化合物检测方法的新技术。步骤为：第一步，人工抗原的合成。第二步，多克隆抗体的筛选与鉴定。第三步，免疫亲和柱的研制。第四步，超高效液相色谱串联质谱检测方法的建立和优化。该技术提供一种快速检测环境中全氟化合物残留的方法，更好地提高了检测灵敏度，保证了对样品检测的准确性。适应当前对全氟化合物残留检测的需要，便于开展对环境中实际样品中全氟化合物的残留检测。

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	0.40	70.0	30.0
0.3	0.40	70.0	30.0
4.6	0.40	10.0	90.0
4.9	0.40	0	100
5.3	0.40	0	100
6.8	0.55	0	100
8.6	0.40	70.0	30.0
11.7	0.00	70.0	30.0