STANOVENIE PERFLUOROALKYLOVÝCH ZLÚČENÍN V ĽUDSKOM SÉRE A V MATERSKOM MLIEKU VYUŽITÍM KOMBINÁCIE KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNEJ SPEKTROMETRIE

DETERMINATION OF PERFLUOROALKYL COMPOUNDS IN HUMAN SERUM AND MOTHER MILK BY COMBINATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

MIŠĽANOVÁ Csilla[1], VOJS STAŇOVÁ Andrea[1], MURÍNOVÁ Ľubica[2]

[1] *Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava*
[2] *Slovenská zdravotnícka univerzita, Oddelenie environmentálnej medicíny, Bratislava*

ABSTRAKT:
Polyfluoroalkyl a perfluoroalkylové zlúčeniny predstavujú veľkú skupinu syntetických organických zlúčenín, ktoré boli aplikované v rôznych priemyselných a komerčných produktoch vzhľadom k ich jedinečným fyzikálno-chemickým vlastnostiam. Hlavnými reprezentantmi sú perfluoroktánová kyselina (PFOA) a perfluoroktán sulfonát (PFOS). Na Slovensku narastá environmentálna expozícia obyvateľstva týmto zdraviu škodlivým chemickým látkam, čo vyvoláva stále narastajúce obavy, nakoľko sa jedná o látky perzistentné v životnom prostredí a schopné bioakumulácie u ľudí aj zvierat. Dôležitá je úloha týchto látok v prenatálnom období, kedy sa očakáva prenos týchto látok z matky na plod a/alebo pre novorodencov. Je potrebné zdôrazniť, že simultánna analýza týchto látok v pupočníkovej krvi, materskom mlieku a ľudskom sére je dôležitá, nakoľko umožňuje posúdiť prenosy uvažovaných látok z matky na plod (cez placentu) a z matky na dieťa (prostredníctvom dojčenia). Vzhľadom na potrebu analyzovať vybrané chemické látky na nízkych koncentračných úrovniach v komplexných biologických matriciach, vystupuje do popredia nevyhnutnosť použiť vysoko selektívnu, citlivú a presnú analytickú metódu. Cieľom práce bolo vyvinúť, optimalizovať a validovať metódu na stanovenie PFOA a PFOS vo vzorkách ľudského séra a materského mlieka využitím vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou.

Kľúčové slová: Perfluoroalkylové zlúčeniny. Materské mlieko. Ľudské sérum. LC-MS/MS

ABSTRACT
Polyfluoroalkyl and perfluoroalkyl substances represent a large group of synthetic organic compounds that have been manufactured and applied in numerous industrial and commercial products due to their unique physicochemical properties. The main representants are perfluorooctane acid (PFOA) and perfluorooctanesulphonate (PFOS). In Slovakia, the environmental exposure of the population to these health-damaging chemicals is increasing, which raises ever-increasing concerns as they are substances that are persistent in the environment and capable of bio-accumulation in both humans and animals. The role of these substances in the prenatal period is important, when it is expected the transfer of these substances from the mother to the fetus and/or for newborns. It should be emphasized that simultaneous analysis of these substances in cord blood, breast milk and human serum is important as it makes it possible to assess transmissions of the substances considered from the mother to the fetus (through placenta) and from the mother to the child (by breastfeedeing). Due to the need to analyze selected chemical compounds at low concentration levels in complex biological matrices, it is necessary to use a highly selective, sensitive and accurate analytical method. The aim of this work was to develop, optimize and validate the method for determination of PFOA and PFOS in human serum and breast milk samples using high-performance liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry.

Key words: Perfluoroalkyl compounds. Breast milk. Human serum. LC-MS/MS

ÚVOD

Perfluoroalkylové zlúčeniny obsahujú alkylové reťazce rôznej dĺžky (od C4 do 16) a hydrofilné koncové funkčné skupiny, ktoré definujú typ zlúčeniny. Majú široké použitie v priemysle kvôli svojej schopnosti odpudzovať vodu aj olej. Aplikujú sa najmä pri impregnácii kobercov, textílií a kože, povlakov na papier, lepeniek, materiálu na balenie potravín alebo sa používajú v penových hasiacich prístrojoch, pri výrobe napr. polytetrafluoretylénu (PTFE), v menšej miere aj ako antistatická prísada a v leteckom a elektronickom priemysle atď. [1,2]. Vyznačujú sa chemickou a tepelnou stabilitou a povrchovo-aktívnymi vlastnosťami. Hlavnými reprezentantmi sú perfluoroktánová kyselina (PFOA) a perfluoroktán sulfonát (PFOS) [3,4].

Rôzne potraviny, ako sú morské plody a mliečne výrobky, sú hlavnými zdrojmi expozície pre celú populáciu. Nezanedbateľnými zdrojmi expozície sú aj vnútorné prostredie a prach, čo je dôležité najmä u novorodencov a detí. Tieto látky môžu byť zodpovedné za reprodukčné poruchy u ľudí. Na Slovensku narastá environmentálna expozícia obyvateľstva zdraviu škodlivým perzistentným organickým chemickým látkam. Napriek tomu, že simultánna analýza týchto látok v pupočníkovej krvi, v materskom mlieku a v ľudskom sére by mala umožniť posúdiť prenos uvažovaných chemických látok z matky na plod a prenos medzi matkou a dieťaťom,

nevenuje sa dostatočná vedecká pozornosť pôsobeniu týchto látok [5-7].

Keďže sa predpokladá, že obsah týchto látok v životnom prostredí je veľmi nízky, kladú sa vysoké požiadavky na citlivú, selektívnu a presnú analytickú metódu [8-11]. Využitie techniky vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (MS/MS) sa javí ako vhodné riešenie pre stanovenie perfluoroalkylových zlúčenín v komplexných biologických vzorkách. HPLC-MS/MS spojenie je veľmi citlivá analytická technika určená k získaniu molekulovej hmotnosti, identifikácii separovaných látok a kvantifikácii [12-14]. Vďaka kvapalinovej chromatografii dochádza k odstráneniu nežiadúcich intereferencií pochádzajúcich napr. z matrice, a tým dochádza k zlepšeniu signálu. Jedným z hlavných dôvodov častého využitia tohto spojenia je možnosť získať komplexné dáta. To znamená, že najprv sú látky rozdelené na základe retenčného času v kvapalinovej chromatografii, následne sú ich ióny rozdelené v pomere *m/z* v hmotnostnom analyzátore a v poslednom kroku hmotnostný detektor určí množstvo každého zo sledovaných iónov. Vzhľadom k tomu, že sa jedná o stopovú analýzu látok v komplexných matriciach, veľká pozornosť musí byť venovaná úprave vzoriek pred samotnou analýzou, aby došlo k zníženiu interferencií matrice, ktoré by zabránili správnym a presným výsledkom [15-17].

CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo vyvinúť, optimalizovať a validovať metódu vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (MS/MS) na stanovenie vybraných analytov PFOS a PFOA a aplikovať metódu na analýzu reálnych vzoriek ľudského séra a materského mlieka.

SÚBOR

Súbor bol tvorený z reálnych vzoriek ľudského séra (n=70) a materského mlieka (n=22). Vzorky boli po odbere uskladnené na -80 ºC.

EXPERIMENTÁLNE PODMIENKY

Chemikálie a štandardy

Metanol, kyselina mravčia, hydroxid amónny, voda, octan amónny, tetrahydrofurán (všetky HPLC čistoty) boli získané od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Všetky chemikálie LC-MS čistoty (metanol, kyselina mravčia, mravčan amónny, octan amónny a voda) boli získané od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemecko). Deutérované štandardy THPFOS, PFOA $^{13}C2$ boli získané od firmy Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada).

Úprava biologického materiálu

Vzorky materského mlieka boli po rozmrazení zohriate na teplotu 37-40 °C a homogenizované. K 500 µL mlieka bolo pridaných 500 µL 0,1 mol/L kyseliny mravčej a 30 µL interného štandardu. Vzorka bola premiešaná v ultrazvuku cca 1 h a ďalej upravovaná extrakciou tuhou fázou.

K 500 µL séra sa pridalo 500 µL metanolu s interným štandardom, vzorka sa centrifugovala 5 min pri 14 000xg a k 500 µL supernatantu sa pridalo 500 µL 0,1 mol/L kyseliny mravčej. Vzorka sa ďalej upravovala extrakciou tuhou fázou (SPE).

SPE extrakciu sme uskutočnili v zariadení Vacuum Manifold (Merck, Darmstadt, Nemecko) vybavenom membránovou vákuovou pumpou. Boli použité kolónky Oasis WAX 30 mg, 1 cc (Waters Corporation, Milford, MA, USA) a aplikoval sa nasledovný postup: 1 mL 0,1% hydroxidu amónneho v metanole, 1 mL metanolu, 2 mL vody (kondicionovanie). Potom sa nadávkoval 1 mL vzorky séra a mlieka a kolónky sa premývali 2 mL octanu amónneho (pH=4), 0,5 mL 25% tetrahydrofuránu v metanole, 0,5 mL vody. Na elúciu analytov pri pomalej rýchlosti elúcie bolo použitých 400 µL 0,1% NH_4OH v metanole. Eluát sa odparil do sucha pod dusíkom, odparok sa rozpustil v 25 µL metanolu, pridalo sa 25 µL 0,1 mol/L kyseliny mravčej a aliquotná časť výslednej vzorky bola použitá na LC-MS/MS analýzu.

Inštrumentálne zariadenie

HPLC analýzy boli uskutočnené na kvapalinovom chromatografe HP 1260 s binárnou pumpou, termostatovaným dávkovačom a termostatovaním kolón (Agilent Technologies, USA). Na detekciu bol použitý tandemový hmotnostný spektrometer s trojitým kvadrupólom 6460 TripleQuad (Agilent Technologies) s ionizáciou elektrosprejom (ESI) v pozitívnom móde. Na vyhodnotenie údajov bol aplikovaný softvér MassHunter Optimizer (Agilent Technologies).

Chromatografické podmienky

Na HPLC analýzu bola použitá analytická kolóna XSelect HSS PFP (2,1x100 mm, 2,5 µm)

s predkolónou XSelect HSS PFP (2,1x5 mm, 2,5 μm) termostatované na 40 °C s využitím gradientovej elúcie (5 mmol/L octan amónny-metanol) s prietokom mobilnej fázy 0,3 mL/min (0 min – 60% metanolu; 0,5–9 min – 80% metanolu; 9,5-12 min – 60% metanolu). Dávkovaný objem vzorky bol 15 μL.

Pracovné podmienky pre hmotnostný spektrometer boli nasledovné: teplota nosného plynu-dusíka - 320 °C, prietok plynu - 5 L/min; rozprašovač plynu - 50 psi; ionizačné napätie - 3500 V. MRM prechody analytov boli nasledovné: PFOS 498,8 → 80, THPFOS 427 → 407, PFOA 412,9 → 368,9, PFOA ^{13}C2 414,8 → 370.

VÝSLEDKY

Prvá časť našej práce spočívala v optimalizácii zloženia mobilnej fázy pre chromatografickú separáciu, ako aj parametrov hmotnostnej spektrometrie (teplota, prietok nosného plynu, rozprašovač plynu a ionizačné napätie). Boli testované rôzne prídavky kyseliny mravčej, mravčanu amónneho a octanu amónneho do vodnej zložky mobilnej fázy v kombinácii s organickou zložkou mobilnej fázy (acetonitril, metanol). Ako optimálna mobilná fáza vzhľadom na ionizáciu analytov bola vybraná kombinácia octanu amónneho a metanolu. Gradientová elúcia mobilnej fázy ako aj pracovné podmienky pre hmotnostný detektor sú popísané v Experimentálnej časti. Zavedená metóda bola aplikovaná pre reálne vzorky ľudského séra (n=70) a materského mlieka (n=22). Metóda bola validovaná vzhľadom na linearitu, presnosť, správnosť a výťažnosť. Validačné parametre sú uvedené v Tab. 1.

Stanovené koncentrácie analytov v ľudskom sére a v materskom mlieku sú uvedené v Tab. 2 a 3. Priemerné koncentrácie boli nasledovné: 1,39±0,29 ng/mL a 0,04±0,03 ng/mL pre PFOA v ľudskom sére a v mlieku, respektíve; 0,60±0,17 ng/mL a 0,03±0,02 ng/mL pre PFOS v ľudskom sére a v mlieku, respektíve.

Detekčné limity dosahovali hodnoty 0,01 ng/mL pre PFOA a 0,1 ng/mL pre PFOS vo vzorkách mlieka. Vo vzorkách ľudského séra dosahovali detekčné limity hodnoty 0,15 ng/mL pre PFOA a 0,20 ng/mL pre PFOS.

Reprezentatívny chromatogram stanovenia PFOS a PFOA v reálnej vzorke materského mlieka a ľudského séra je uvedený na Obr. 1.

Tabuľka 1 Validačné parametre HPLC-MS/MS metódy

Parametre	Sérum		Mlieko	
	PFOS 0,1-1,5 ng/mL	**PFOA 0,1-2,5 ng/mL**	**PFOS 0,005-0,15 ng/mL**	**PFOA 0,01-0,20 ng/mL**
Vnútrodňové analýzy[a]				
RE%	2,17-3,56	2,83-4,62	4,56-8,01	5,18-9,71
CV%	4,01-7,16	5,31-7,15	8,02-12,15	5,05-10,32
Medzidňové analýzy[b]				
RE%	2,95-5,67	5,72-10,88	8,14-12,49	8,53-9,58
CV%	4,01-6,11	7,14-12,81	9,64-13,84	9,51-12,21
Opakovateľnosť				
RE% -retenčného času[c] -plochy píku[d]	0,011	0,008	0,008	0,005
C2	2,17	10,54	9,87	6,91
C3	1,95	6,24	7,21	4,15
Linearita y	-0,11	0,03	-0,002	0,009
-smernica	28,06	7,98	3,48	2,46
-korelačný koficient	0,9888	0,9984	0,9876	0,9852
Výťažnosť (%)	89,92	90,01	80,72	81,50

[a]Vnútrodňová presnosť a správnosť metódy bola vyhodnotená opakovanou analýzou (n=4) kalibračného štandardu v sére a v mlieku. [b]Medzidňové parametre boli stanovené analýzou kalibračných štandardov 4 rôzne dni v týždni.

[c]Relatívne chyby (RE) (vyjadrené ako odhad relatívnej štandardnej odchýlky) boli vypočítané z 20 nástrekov vzoriek štandardov, vzoriek blanku séra a mlieka na koncentračnej úrovni C1. [d]RE hodnoty boli vypočítané z 20 nástrekov blankovej vzorky séra a mlieka s prídavkom štandardov na 2 rôznych koncentračných úrovniach C2 a C3.

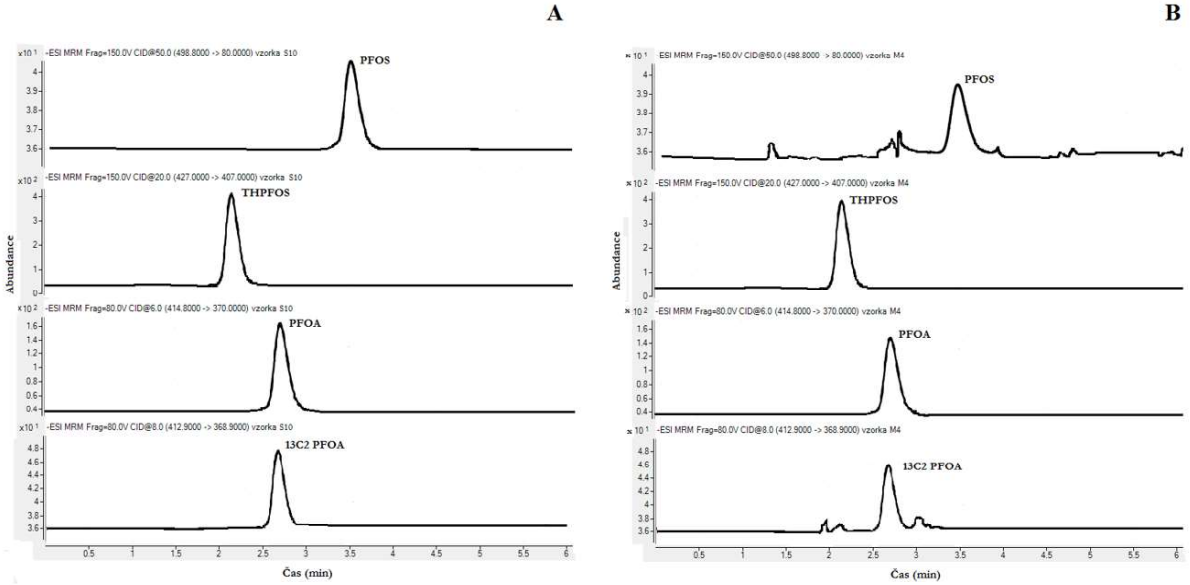
C1 - 0,25 ng/mL a 0,50 ng/mL pre PFOS a PFOA v sére; 0,01 ng/mL a 0,05 ng/mL pre PFOS a PFOA v materskom mlieku. C2 - 0,80 ng/mL a 1,50 ng/mL pre PFOS a PFOA v sére; 0,05 ng/mL a 0,08 ng/mL pre PFOS a PFOA v materskom mlieku. C3 - 1,20 ng/mL a 2,00 ng/mL pre PFOS a PFOA v sére; 0,10 ng/mL a 0,15 ng/mL pre PFOS a PFOA v materskom mlieku

Tabuľka 2 Stanovené koncentrácie vybraných analytov v ľudskom sére [ng/mL]

Analyt [ng/ml]	N	<LOD	priemer	SD	25%-til	medián	75%-til	min	max
PFOA	71	0	1,39	0,29	1,13	1,42	1,62	0,89	1,65
PFOS	71	0	0,60	0,17	0,48	0,57	0,71	0,22	1,05

Tabuľka 3 Stanovené koncentrácie vybraných analytov v materskom mlieku [ng/mL]

Analyt [ng/ml]	N	<LOD	priemer	SD	25%-til	medián	75%-til	min	max
PFOA	22	0	0,04	0,03	0,02	0,04	0,06	0,007	0,09
PFOS	22	0	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03	0,01	0,11



Obr. 1 HPLC-MS/MS analýza PFOS a PFOA v ľudskom sére **(**1,42 ng/mL a 0,89 ng/mL) (A) a v materskom mlieku **(**0,089 ng/mL a 0,017 ng/mL**)** (B). Chromatografické podmienky: Analytická kolóna: XSelect HSS PFP (2,1x100 mm, 2,5 µm). Predkolóna: XSelect HSS PFP (2,1x5 mm, 2,5 µm). Teplota kolóny: 40 °C. Dávkovaný objem: 15 µL. Mobilná fáza pozostávala z vodného roztoku 5 mmol/L octanu amónneho a metanolu s prietokom 0,3 mL/min. THPFOS, PFOA ^{13}C2 - deutérované štandardy. Gradient MF a parametre MS detektora sú uvedené v Experimentálnej časti.

ZÁVER

Výsledky našej štúdie ukázali, že optimalizovaná metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie v kombinácii s tandemovou hmotnostnou detekciou je vhodnou metódou pre stopovú analýzu perfluoroalkylových zlúčenín v komplexných biologických matriciach. Navrhnutá a validovaná HPLC-MS/MS metóda je veľkým prínosom vzhľadom k tomu, že na Slovensku narastá environmentálna expozícia obyvateľstva zdraviu škodlivým perzistentným organickým chemickým látkam a doteraz tomu nebola venovaná dostatočná vedecká pozornosť.

Poďakovanie

Predložená práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja projektu (APVV-16-0124) a realizáciou projektu "Centrum excelentnosti environmentálneho zdravia" (ITMS č. 26240120033) na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] MOSCH C., KIRANOGLU M., FROMME H., VÖLKEL W. Simultaneous quantitation of perfluoroalkyl acids in human serum and breast milk using on-line sample preparation by HPLC column switching coupled to ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B.* 2010; 878 (27): 2652-2658.

[2] POOTHONG S., LUNDANES E., THOMSEN C., SMÅSTUEN HAUG L. High throughput on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography- tandem mass

spectrometry method for olyfluoroalkyl phosphate esters, perfluroalkyl phosponates, and other perfluoroalkyl substances in human serum, plasma, and whole blood. *Analytica Chimica Acta.* 2017; 957: 10-19.

[3] VÖLKEL W., GENZEL-BOROVICZÉNY O., DEMMELMAIR H., GEBAUER C., KOLETZKO B., TWARDELLA D., RAAB U., FROMME H. Perfluorooctane suphonate (PFOS) and perfluorooctanic acid (PFOA) in human breast milk: Results of a pilot study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2008; 211 (3-4): 440-446.

[4] SALTO MAMSEN L., JÖNSSON BO A.G., LINDH CH.H., ANDERSEN C.Y., OLESEN R.H., LARSEN A., ERNST E., KELSEY T.W. Concentration of perfluorinated compounds and cotinine in human foetal organs, placenta, and maternal plasma. *Science of The Total Environment.* 2017; 596-597: 97-105.

[5] CARIOU R., VEYRAND B., YAMADA A., BERREBI A., ZALKO D., DURAND S., POLLONO CH., MARCHAND P., LEBLANC J.-CH., ANTIGNAC J.-P., LE BIZEC B. Perfluoroalkyl acid (PFAA) levels and profiles in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns. *Environment International*. 2015; 84: 71-81.

[6] Von EHRENSTEIN O.S., FENTON S.E., KATO K., KUKLENYIK Z.S., HINES E.P. *Polyfluoroalkyl* chemicals in the serum and milk of breastfeeding women. *Reproductive Toxicology.* 2009; 27 (3-4): 239-245.

[7] MONROY R., MORRISON K., TEO K., ATKINSON S., KUBWABO C., STEWART B., FOSTER W.G. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. *Environmental Research.* 2008; 108 (1): 56-62.

[8] KÄRRMAN A., LINDSTRÖM G. Trends, analytical methods and precision in the determination of perfluoroalkyl acids in human milk. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013; 46: 118-128.

[9] SALIHOVIC S., NILSON H., HAGBERG J., LINDSTRÖM G. Trends in the analysis of persistent organic pollutants (POPs) in human blood. *Trends in Analytical Chemistry.* 2013; 46: 129-138.

[10] SMÅSTUEN HAUG L., THOMSEN C., BECHER G. A sensitive method for determination of a broad range of perfluorinated compounds in serum suitable for large-scale human biomonitoring. *Journal of Chromatography A.* 2009; 1216 (3): 385-393.

[11] FERNANDEZ-RAMOS C., ŠATÍNSKY D., ŠMÍDOVÁ B., SOLICH P. Analysis of trace organic compounds in environmnental, food and biological matrices using large- volume sample injection in column-switching liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry.* 2014; 62: 69-85.

[12] LANKOVA D., LACINA O., PULKRABOVA J., HAJSLOVA J. The determination of perfluoroalkyl substances, brominated flame retardants and their metabolites in human breast milk and infant formula. *Talanta.* 2013; 117: 318-325.

[13] ROGATSKY E., O'HEHIR C., DALY J., TEDESCO A., ALDOUS K. Development of high throughput LC/MS/MS method for analysis of perfluorooctanic acid from serum, suitable for large-scale human biomonitoring. *Journal of Chromatography B.* 2017; 1049-1050: 24-29.

[14] LIEN G.W., WEN T.W., HSIEH W.S., WU K.Y., CHEN CH.Y., CHEN P.CH. Analysis of perfluorinated chemicals in umbilical cord blood by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 2011; 879 (9-10): 641-646.

[15] MARTÍN J., RODRÍGUEZ-GÓMEZ R., ZAFRA-GÓMEZ A., ALONSO E., VÍLCHEZ J.L., NAVALÓN A. Validated method for the determination of perfluorinated compounds in placental tissue samples based on a simple extraction procedure followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Talanta.* 2016; 150: 169-176.

[16] HO YU, CH., PATEL B., PALENCIA M., FAN Z. A sensitive and accurate of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in human serum using a method for the high performance liquid chromatography-online solid phase extraction-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2017; 1480: 1-10.

[17] LUQUE N., BALLESTEROS-GÓMEZ A., VAN LEEUWEN S., RUBIO S. A simple and rapid extraction method for sensitive determination of perfluoroalkyl substances n blood serum suitable for exposure evaluation. *Journal of Chromatography A*. 2012; 1235: 84-91.