

Agilent Captiva EMR-Lipid および LC/MS/MS による魚の可食組織中の ペル/ポリフルオロアルキル化合物の分析

著者

Erin Pulster, PhD
University of South Florida
College of Marine Science
St. Petersburg, FL, USA

Matthew Giardina, PhD
Agilent Technologies, Inc
Wilmington, DE, USA

概要

このアプリケーションノートでは、魚の筋肉組織中の 25 種類のペル/ポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) を分析するための多成分分析メソッドの開発と評価について説明します。このメソッドでは、溶媒抽出の後に、Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) および LC/MS/MS による定量分析を使用したパススルー脂質除去ステップを実施します。25 種類の魚種に対する 140 回の抽出の平均サロゲート回収率は 105 % で、平均相対標準偏差 (RSD) は 14 % でした。

はじめに

PFAS は、5,000 を超える合成有機フッ素化合物のグループで、1940 年代に初めて開発されました。¹幅広い商業用途で界面活性剤やコーティングに広く使用されており、化学的な特徴として、熱、水、油、グリース、汚れに対する耐性が挙げられます。PFAS の商業用途には、化粧品、食品包装、焦げ付き防止加工の調理器具、消火剤の泡、電子機器、航空機、車両、およびさまざまな織物（カーペット、皮革製品、家具、衣類、手術衣など）があります。PFAS 分子の化学構造には、炭素-フッ素結合の強力な鎖が含まれているため環境劣化に耐性があります。したがってこれらの化学物質には浸透性・持続性があり、環境的に安定しているという特性があります。汚染された水と食品（魚介類など）が、人の PFAS への主な暴露経路と考えられています。

脂肪や脂質などのマトリックス干渉が存在するため、魚組織抽出物の分析は困難な場合があります。Captive EMR-Lipid パススルークリーンアップ手法は、分析成分を失うことなく主要な脂質クラスを効率的に除去します。脂質干渉の除去によって、マトリックスのイオン化効果が確実に最小限に抑えられ、メソッドの信頼性と耐久性が向上します。

本検討の目的は、大都市を流れる河川の河口から採取された魚の可食組織の PFAS 抽出物に対して Captiva EMR-Lipid クリーンアップを使用することと、それに続き LC/MS/MS 分析を実際に行うことです。

実験方法

サンプル収集

魚は、2020 年と 2021 年に米国フロリダ州タンパベイにある都会の大きな河口湾内および隣接した 24 か所から釣り糸、餌付きトラップ、網を使用して収集されたものです。魚はそれぞれポリプロピレンバッグ（ULINE、プレザントブレイリー、ウィスコンシン州、米国）に入れられ、バッグ入りの氷の上でクーラーに保管され実験室に持ち込まれました。25 種合計 140 匹の魚（ $n = 140$ ）を対象に、25 種類のターゲット PFAS について分析しました。

材料および試薬

溶媒と試薬（アセトニトリル（ACN）、酢酸、酢酸アンモニウム、ギ酸、およびメタノール）はすべて、LC/MS または ACS グレードで Fisher Scientific（ウォルサム、マサチューセッツ州、米国）から購入しました。ミリポア精製水（ $18\ \mu\Omega$ 、ベッドフォード、マサチューセッツ州、米国）を $0.22\ \mu\text{m}$ メンブレンフィルタでろ過しました。個々のネイティブ化合物（化学的純度 $> 98\%$ ）、および質量標識された内部標準およびサロゲート標準（化学的純度 $> 98\%$ および同位体純度 $\geq 99\%$ ）は、Wellington Laboratories（グエルフ、オンタリオ州、カナダ）から購入しました。

サンプル抽出

図 1 および 2 に示すように、個々の魚の筋肉組織（2 g）を 50 mL ポリプロピレンテストチューブに入れました。100 pg/g のサロゲート標準（SS）を組織に加え、室温で 15 分間静置しました。次に、セラミックホモジナイザ（5/16 × 5/8 インチ）と 1%（v/v）ギ酸を含む 2 mL の精製水を加え、1,500 rpm で 2 分間ホモジナイズした後、2%（v/v）ギ酸を含む冷 ACN 8 mL を添加し、さらに 5 分間（1,500 rpm）ホモジナイズした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。次に、抽出上澄み 2.4 mL を 3 mL Captiva EMR-Lipid カートリッジ（部品番号 5190-1003）に移し、溶出液の液滴が観察されなくなるまで、15 mL ポリプロピレンテストチューブに重力で溶出させました。ACN/水の 80/20 混合物 600 μL をカートリッジに加え、再び重力で溶出させました。次に、真空（ $-6 \sim -9\ \text{in Hg}$ ）を用いて、残りの溶出液をコレクションチューブに回収しました。抽出物を混合し、きれいな抽出物 500 μL をポリプロピレンオートサンブラパイアルに移しました。内部標準（45 pg/mL）を加え、さらに 300 μL の水を加えて最終抽出量を 800 μL にしました。



図 1. サンプル前処理スキーム

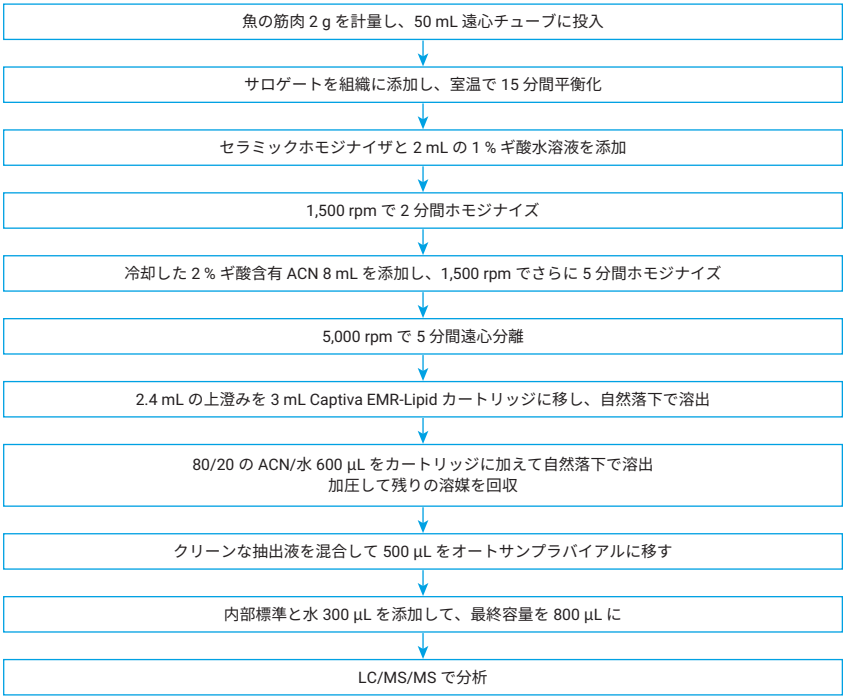


図 2. サンプル前処理のワークフロー図

装置構成

システムのバックグラウンド汚染を低減するために、Agilent 1290 Infinity II LC を分析前に変更しました。配管に関する考慮事項は、Anumol らが推奨するガイドライン²に従いました。溶媒ラインを PEEK チューブに交換し、ポンプシールを PTFE フリーシールに交換し、インラインフィルターとディレイカラムを追加しました。検出には、Agilent Jet Stream ESI ソースが装着された Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS を使用しました。6470B トリプル四重極 LC/MS は、動的マルチプルリアクションモニタリング (dMRM) を備えたネガティブエレクトロスプレーイオン化モードで操作しました。LC および MS のメソッドパラメータを表 1 と表 2 に示します。図 3 は、クレバルジャックの筋肉抽出物に含まれる PFAS の抽出イオンクロマトグラムの一つです。PFOA、PFHxS、PFNA、PFHpS、PFOS、および PFUnDA の濃度は、それぞれ 53.5、280、443、80.4、23,700、および 1,102 pg/g でした。

表 1. LC の分析条件

パラメータ	設定値																																				
LC	Agilent 1290 Infinity II LC																																				
分析カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラム、2.1 × 100 mm、1.8 μm (部品番号 959758-902)、Agilent 1290 Infinity II インラインフィルタ 0.3 μm (部品番号 5067-6189) 付き																																				
ディレイカラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 95 Å C18 カラム、4.6 × 50 mm、3.5 μm (部品番号 959943-902)																																				
カラム温度	50 °C																																				
注入量	20 μL																																				
移動相	A) 95/5 水/ACN 中の 20 mM 酢酸アンモニウム B) 95/5 ACN/水中の 10 mM 酢酸アンモニウム																																				
グラジエント	<table><tr><th>時間 (分)</th><th>% A</th><th>% B</th><th>流量 (mL/min)</th></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0.300</td></tr><tr><td>6</td><td>70</td><td>30</td><td>0.300</td></tr><tr><td>9</td><td>50</td><td>50</td><td>0.300</td></tr><tr><td>16</td><td>15</td><td>85</td><td>0.300</td></tr><tr><td>17</td><td>0</td><td>100</td><td>0.300</td></tr><tr><td>20</td><td>0</td><td>100</td><td>0.300</td></tr><tr><td>21</td><td>100</td><td>0</td><td>0.300</td></tr><tr><td>31</td><td>100</td><td>0</td><td>0.300</td></tr></table>	時間 (分)	% A	% B	流量 (mL/min)	0	100	0	0.300	6	70	30	0.300	9	50	50	0.300	16	15	85	0.300	17	0	100	0.300	20	0	100	0.300	21	100	0	0.300	31	100	0	0.300
時間 (分)	% A	% B	流量 (mL/min)																																		
0	100	0	0.300																																		
6	70	30	0.300																																		
9	50	50	0.300																																		
16	15	85	0.300																																		
17	0	100	0.300																																		
20	0	100	0.300																																		
21	100	0	0.300																																		
31	100	0	0.300																																		

表 2. MS 条件

パラメータ	設定値
MS	Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS (Agilent Jet Stream ESI ソース搭載)
イオン源パラメータ	
極性	ネガティブ
乾燥ガス	230 °C、4 L/min
シースガス	250 °C、12 L/min
ネブライザガス	15 psi
キャピラリー電圧	2,500 V
ノズル電圧	0 V

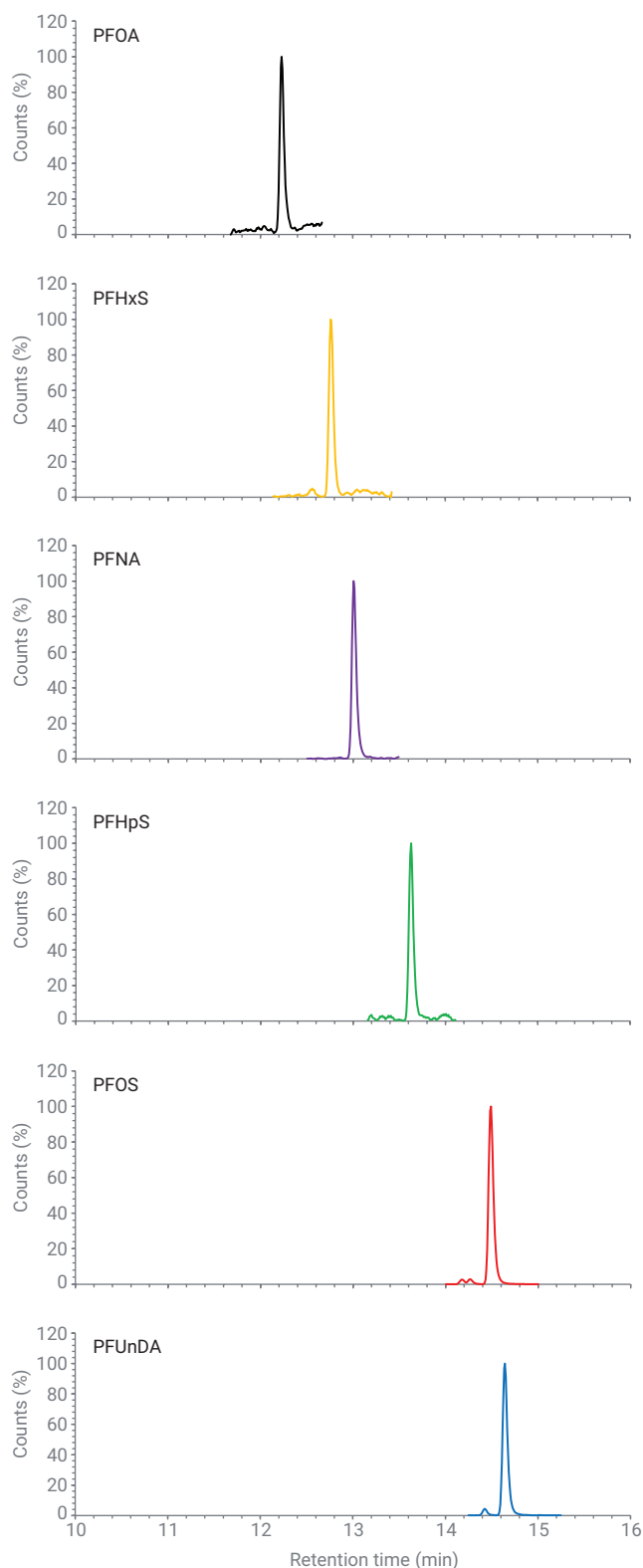


図 3. 野外で捕獲された魚（クレバルジャック）の筋肉で検出された PFAS のクロマトグラム。図中の 5 つの PFAS のこのサンプルにおける濃度は、PFOA の 53.5 pg/g w/w から PFOS の 23.7 ng/g w/w の範囲でした。

定量

本検討では、合計 25 種類の標準 PFAS 化合物を選択しました。また、4 つの同位体標識 PFAS をサロゲートとして選択し、15 種類の PFAS を内部標準として選択しました。標準はすべて、Wellington Laboratories（グエルフ、オンタリオ州、カナダ）から購入しました。付録 A に、化合物およびリテンションタイム、MRM トランジション、最適化された解離電圧を示します。

各 PFAS は、10 倍希釈による 5 点（0.1、1、10、100、1,000 ng/L）の検量線の二次方程式を用いて定量化しました。ターゲット応答は、同じ濃度（45 pg/mL）でサンプルとキャリブントに追加された内部標準の応答に対して正規化しました。本検討を通じて最高のデータ品質を確保するために、品質保証/品質管理プログラムは ASTM および EPA の方法論³⁻⁵に従いました。

結果と考察

マトリックススパイクの精度と正確度

抽出方法のバリデーションを行うために、2 種類の魚組織サンプルに 25 種類の標準 PFAS ターゲットを 100 pg/g の濃度でスパイクし抽出しました。その結果を図 4 に示します。2 つのサンプルについて、各ターゲットの平均回収率は 70 ～ 130 % の範囲で、平均回収率は 102 %、平均範囲は ±15 % でした。

サロゲート回収率の精度と正確度

本検討のデータ品質を確保するために、抽出方法の精度と正確度を評価しました。平均回収率と相対標準偏差（RSD）は、サンプルセット全体の魚可食組織にスパイクされたサロゲートについて計算しました。これは、25 の魚種とメソッドブランク（スパイクされた試薬水）にわたる 140 回の抽出を元にしたものです。精度と正確度の結果は、魚の組織とメソッドブランクについて、それぞれ表 3 と 4 に記載しました。メソッドの性能は目覚ましいもので、サンプルの平均回収率は 101 ～ 114 %、RSD は 12 ～ 16 %、魚組織の全体的な平均回収率は 105 ± 14 % RSD でした（表 3）。メソッドブランクの全体的なサロゲート回収率は 71 ～ 129 % の範囲で、平均回収率は 106 ± 15 % RSD でした（表 4）。これらの結果は、70 ～ 130 % の精度という一般的な許容基準の範囲内にあり、RSD が 30 % 未満であることは、堅牢で信頼性の高い抽出および分析手法であることを示しています。

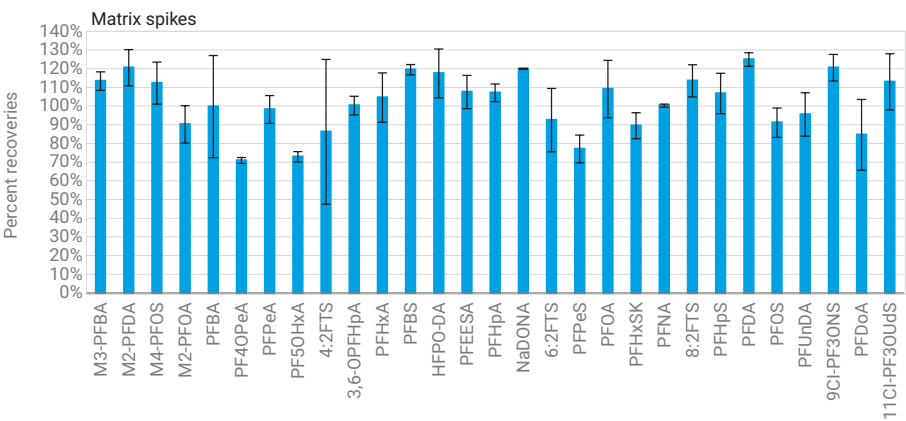


図 4. 抽出前にスパイクされた 2 つの魚の筋肉サンプルに添加された 4 つの同位体標識および 25 種類の標準 PFAS の平均回収率。エラーバーは、2 つの魚の抽出物の回収率の範囲を表します。

表 3. 魚のサンプル（n = 140）のサロゲート精度と正確度

サロゲート	平均精度 (%)	RSD (%)
¹³ C ₃ -PFBA	101	15
¹³ C ₂ -PFDA	114	16
¹³ C ₄ -PFOS	113	13
¹³ C ₂ -PFOA	92	12

表 4. メソッドブランク（n = 13）のサロゲート精度と正確度

サロゲート	平均精度 (%)	RSD (%)
¹³ C ₃ -PFBA	107	16
¹³ C ₂ -PFDA	107	16
¹³ C ₄ -PFOS	111	11
¹³ C ₂ -PFOA	100	17

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent Captiva EMR-Lipid と LC/MS/MS を使用して、25 種の魚種を含む大規模な検討における 25 種類の PFAS を決定するための堅牢な抽出および分析メソッドの開発と実施について説明しました。このメソッドの実施に関する詳細については、Pulster らによる文献⁶を参照してください。

参考文献

1. Research on Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS). <https://www.epa.gov/chemical-research/research-and-polyfluoroalkyl-substances-pfas> (accessed June 14, 2022).
2. Anumol T. *et al.* Recommended Plumbing Configurations for Reduction in Per/Polyfluoroalkyl Substance Background with Agilent 1260/1290 Infinity (II) LC Systems. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-7863EN, **2017**.
3. CWA Methods Team, Engineering, and Analysis Division (4303T), United States Environmental Protection Agency. EPA 821-D-21-001. Draft Method 1633, Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Aqueous, Solid, Biosolids, and Tissue Samples by LC-MS/MS, August **2021**. https://www.epa.gov/system/iles/documents/2021-09/method_1633_draft_aug-2021.pdf.
4. ASTM International. Standard Test Method for Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Water, Sludge, Influent, Effluent, and Wastewater by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS); ASTM D7979-19; **2019**. DOI 10.1520/D7979-20.
5. Shoemaker, J.; Tetttenhorst, D. Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency. Method 537.1: Determination of Selected Per- and Polufluorinated Alkyl Substances in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). February **2018**. Last revised February 2020. https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?dirEntryId=343042&Lab=NERL
6. Pulster E. L. *et al.* Assessing Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Sediments And Fishes From a Large, Urbanized Estuary and the Potential Human Health Implications. *Frontiers in Marine Science* (in review)

付録

付表 A

表 5. 化合物のリテンションタイム、MRM トランジション、および電圧

化合物	リテンション タイム(分)	内部標準	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	フラグメンタ (V)	コリジョン エネルギー (V)	コリジョンセル 加速電圧 (V)
ターゲット化合物							
PFBA	6.169	M4-PFBA	213	169	72	8	2
PF4OPeA	7.691	M5-PFPeA	229	85	50	16	2
PFPeA	9.214	M5-PFPeA	263	219	72	4	2
PF5OHxA	9.748	M2-4:2FTS	279	85	80	8	5
4:2FTS	10.288	M2-4:2FTS	327	307	150	20	2
3,6-OPFHpA	10.562	M5-PFHxA	201	85	120	4	5
PFHxA	10.700	M5-PFHxA	313	269	72	8	2
PFBS	10.962	M3-PFBS	299	80	154	36	2
HFPO-DA	11.089	M3-HFPO-DA	285	169	135	8	4
PFEESA	11.479	M4-PFHpA	315	135	124	28	5
PFHpA	11.621	M4-PFHpA	363	319	72	8	2
NaDONA	11.914	M3-HFPO-DA	377	251	50	8	5
6:2FTS	12.020	M2-6:2FTS	427	407	135	18	4
PFPeS	12.007	M2-6:2FTS	349	80	135	20	4
PFOA	12.391	M8-PFOA	413	369	72	8	2
PFHxS	12.880	M3-PFHxS	399	80	156	56	2
PFNA	13.134	M9-PFNA	463	419	72	8	2
8:2FTS	13.467	M2-8:2FTS	527	507	200	30	4
PFHpS	13.699	M6-PFDA	449	80	148	50	2
PFDA	13.897	M6-PFDA	513	469	72	12	2
PFOS	14.502	M8-PFOS	499	80	135	50	4
PFUnDA	14.638	M7-PFUdA	563	519	100	12	2
9CI-PF3ONS	14.975	M7-PFUdA	531	351	150	28	3
PFDoA	15.239	M7-PFUdA	613	569	100	8	2
11CI-PF3OUdS	16.641	M7-PFUdA	631	451	150	36	2

化合物	リテンション タイム (分)	内部標準	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	フラグメンタ (V)	コリジョン エネルギー (V)	コリジョンセル 加速電圧 (V)
サロゲート標準							
M3-PFBA	6.169	M4-PFBA	216	172	72	8	2
M2-PFOA	12.391	M8-PFOA	415	370	72	8	2
M2-PFDA	13.896	M6-PFDA	515	470	72	8	2
M4-PFOS	14.501	M8-PFOS	503	99	135	54	4
内部標準							
M4-PFBA	6.164		217	172	72	8	2
M5-PFPeA	9.214		268	223	72	4	2
M2-4:2FTS	10.287		329	309	150	24	2
M5-PFHxA	10.699		318	273	72	8	2
M3-PFBS	10.961		302	80	130	44	2
M3-HFPO-DA	11.080		287	169	135	4	5
M4-PFHpA	11.620		367	322	72	8	2
M2-6:2FTS	12.019		429	409	150	28	2
M8-PFOA	12.390		421	376	72	8	2
M3-PFHxS	12.879		402	80	156	48	2
M9-PFNA	13.133		472	427	72	8	2
M2-8:2FTS	13.466		529	509	200	28	4
M6-PFDA	13.896		519	474	72	8	2
M8-PFOS	14.500		507	80	148	54	2
M7-PFUdA	14.637		570	525	73	5	4

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

DE86273469

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, September 13, 2022

5994-5227JAJP