

水および土壌マトリックス中の PFOS および PFOA の LC/MS/MS 測定

Agilent 1290 Infinity II LC と Ultivo トリプル四重極 LC/MS

著者

Wenlong Yang, Jing Guo,
Liang Dong, and Yeru Huang
National Center for
Environmental Analysis and
Measurement

Wei Du, Hua Wu, and
Meiling Lu
Agilent Technologies (China),
Beijing

概要

このアプリケーションノートでは、先行の研究報告¹に基づき、水および土壌マトリックス中のペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) とペルフルオロオクタノ酸 (PFOA) の分析における Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS と Agilent 1290 Infinity II LC の性能について解説します。はじめに、環境水サンプルはろ過し、土壌サンプルはメタノールを用いて抽出しました。これらのサンプルは、弱アニオン交換カートリッジを用いてクリーンアップし、ターゲット化合物を濃縮して、干渉物を取り除きました。ターゲット化合物を高 pH で溶出した後、さらに窒素下で蒸発させ、Ultivo LC/MS/MS 分析用にメタノールで再溶解しました。定量には内部同位体希釈メソッドを使用しました。溶媒溶液中の PFOA と PFOS の両方が 0.5 ~ 200 µg/L の範囲で優れた直線性を示し、直線回帰係数は 0.997 でした。PFOA と PFOS の検出下限 (LOD) は、水中でサブ ng/L レベル、土壌中で ng/kg のレベルでした。純水、河川水、廃水における 2.5、40、200 ng/L での平均スパイク回収率の範囲は、PFOA が 88.4 ~ 98.8 %、PFOS が 88.0 ~ 97.3 % で、すべての RSD 値 (n = 6) は 0.60 ~ 14 % 内でした。スパイクしたブランク土壌、野外土壌、堆積物のマトリックスにおける 0.50、5.0、20 µg/kg でのスパイクの回収率の範囲は、PFOA が 98.6 ~ 113 %、PFOS が 96.8 ~ 111 % 内で、両方の化合物の RSD は 0.4 ~ 6.6 % 内でした。これらの結果は、Ultivo LC/MS/MS を使用して開発するメソッドが非常に正確で信頼できることを示しています。このメソッドは、さまざまな環境水および土壌のマトリックスに含まれる微量レベルの PFOA と PFOS のルーチンモニタリングの基準にも適合します。

はじめに

ペルフルオロアルキル化された 2 つの主要な物質、PFOA と PFOS は、水、土壌、堆積物、沈泥、生物学的マトリックスを含む、環境条件中に存在しています^{2, 3}。実験動物や免疫学的暴露に関する研究で、PFOS と PFOA が肝毒性、発達毒性、あるいは生殖毒性、潜在的な発がん性を含む、人の健康に有害な影響を持つ可能性が示されています⁴。欧州食品安全機関 (EFSA) は、2008 年に PFOA と PFOS の耐容一日摂取量 (TDI) を発行し⁴、米国環境保護庁 (EPA) は 2016 年に飲料水中の PFOA と PFOS の総量について健康勧告値を発表しました⁵。中国は、ペルフルオロアルキル化された物質を製造、利用している主要な国です。また、中国のさまざまな環境条件や食品中で報告される PFOA、PFOS、および関連化合物が、過去 10 年で増加しています^{6~8}。しかし、中国では、食品と飲料水のどちらについても PFOA と PFOS を規制する最大許容レベルがありません。最近、中国は植物由来の食品中の PFOA と PFOS を測定するための標準メソッドを発表しました⁹。環境中の残留物質の状況を高い信頼性でモニタリングするには、さまざまな環境マトリックス中の PFOA と PFOS を測定できる堅牢なメソッドの確立が不可欠です。このモニタリングは、将来の環境規制に対応する上でも有益です。

マトリックス中の PFOA、PFOS、およびその他のペルフルオロアルキル化された物質の濃度測定には、固相抽出 (SPE) クリーンアップ後に液体クロマトグラフィートリプル四重極タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) による分析を行う方法が広く適用されています^{2~3, 6~8}。ペルフルオロアルキル化された物質用に使用される SPE クリーンアップカートリッジは主に、逆相クロマトグラフィーおよび弱アニオン交換 (WAX) の仕組みを基にし

ています。これらの SPE クリーンアップカートリッジは、大半のサンプルマトリックスを効率的に除去し^{6, 8}、その後の LC/MS/MS による正確で堅牢な測定にとって有益なものとなっています。このアプリケーションノートでは、WAX カートリッジクリーンアップと Ultivo LC/MS により、さまざまな環境マトリックス中の PFOA と PFOS を優れた感度と信頼性で正確に測定できることを実証します。

実験方法

材料と試薬

PFOA、PFOS、¹³C₄-PFOA、¹³C₄-PFOS の標準原液は、メタノール中における濃度がそれぞれ 50.00 µg/mL のものをカナダの Wellington Laboratories 社から購入しました。メタノール、アセトニトリル、酢酸、酢酸アンモニウム、水酸化アンモニウム (W% = 20%) は、HPLC グレードのものを Fisher Scientific 社 (フェアローン、ニュージャージー州) から購入しました。Milli-Q 水を純水 (抵抗率 18 MΩ) として実験を通して使用しました。他のすべての試薬は、分析グレードのものを SinoChem 社 (北京、中国) から入手しました。WAX カートリッジ (150 mg/6 mL) は、アジレント・テクノロジー (リトルフォールズ、デラウェア州) から入手しました。

標準混合物キャリブレーション溶液の調製

最初に、各内部標準を 10 ng/mL で含む標準混合物キャリブレーション溶液 (200 ng/mL) を原液から調製します。その後、10 ng/mL の内部標準混合物メタノール溶液を原液から希釈溶媒として調整しました。調整した 10 ng/mL の各内部標準を含む希釈溶媒を使用し、最も高い濃度の標準混合物キャリブレーション溶液を順次希釈して、他の標準混合物キャリブレーション溶液 (0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50、100 ng/mL) を作製しました。各キャリブレーション溶液中の内部標準の最終濃度は 10 ng/mL でした。

水および土壌サンプルの収集、輸送、保管

表流水も廃水も、中国国内の河川および工業廃水排出口から収集しました。土壌サンプリングのための土壌サンプルの収集、輸送、保管は、GB17378.3 および HJ/T 166 ガイドラインに従って実施しました。すべての収集サンプルは、ポリプロピレン容器に入れて暗所に 4 °C で保管し、2 週間以内にクリーンアップにして、1 か月以内に分析しました。

サンプルのクリーンアップと濃縮

水サンプル (500 mL) は石英膜でろ過しました。その後、10 ng の ¹³C₄-PFOA と ¹³C₄-PFOS をろ液に加え、30 秒間ボルテックスした後、室温で 30 分間放置しました。WAX クリーンアッププロトコルは、参考文献 1 に記載された手順に従って実施しました。または、各ステップで使用する溶媒の量を減らしてより環境に優しいメソッドを作成しました。この手順の詳細は次のとおりです。

1. 0.5 % アンモニアメタノール溶液 (4 mL)、メタノール (4 mL)、水 (4 mL) を連続的に使用して、WAX カートリッジをあらかじめ活性化させました。
2. その後、水サンプルを WAX カートリッジに流量 3 ~ 5 mL/min でロードしました。
3. すべての水サンプルがカートリッジを通過した後、水 (5 mL) および酢酸バッファ (5 mL、pH 4.0) を使用してカートリッジを連続的に洗浄しました。
4. その後、カートリッジを真空中で 1 時間乾燥させました。
5. 乾燥後、3 mL のメタノールでカートリッジを洗浄し、フロースルーした溶液を廃棄しました。
6. その後、0.5 % のアンモニアメタノール溶液 (4 mL) を用いてターゲット化合物をカートリッジから溶出しました。溶出物を 10 mL ポリプロピレンテストチューブに収集して、窒素下で 40 °C にして乾燥させ、大半の水分を除去しました。

- 次に、残留物を 1 mL のメタノール中で十分にボルテックスして溶解しました。
- この溶液を、0.22 μm 膜を用いてさらにろ過し、2 mL ポリプロピレンバイアルに移して LC/MS/MS で分析しました。

土壌/堆積物サンプルの抽出、クリーンアップ、濃縮

5.0 (±0.1) g の乾燥したサンプルを 100 mL ポリプロピレンチューブに移しました。その後、10 ng の各内部標準 (¹³C₄-PFOA と ¹³C₄-PFOS) をサンプルに加えて、ボルテックスした後、室温で 30 分間放置しました。

その後、メタノールを使用してサンプルを抽出しました。抽出プロトコルは、参考文献 1 に記載された手順に従いました。あるいは、次のように抽出条件をわずかに変更して、抽出時間を短縮することができます。10 mL のメタノールをサンプルチューブに添加し、ボルテックスして均質に混合します。その後、シェーカーを用いてサンプルチューブを 37 °C で 20 分間振とうしてから、6,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。この結果として得られた上澄み溶液を 500 mL ポリプロピレンビーカーに移しました。抽出手順を 2 回繰り返して、抽出物を同じビーカーに収集しました。次に、サンプル溶液中のメタノールの濃度を 10 % 未満にするために、300 mL の純水をビーカーに移しました。希釈したサンプル抽出物はその後、水サンプルと同様の手順で、WAX カートリッジによってさらにクリーンアップし、濃縮しました。

添加回収試験

ブランク水、河川水、廃水のマトリックスを使用して、水マトリックスの回収率を評価しました。ブランク土壌、農業土壌、川の堆積物を用いて、土壌マトリックスの回収を試験しました。各マトリックスについて、1 ~ 3 のレベルの PFOA と PFOS をマトリックスにスパイクして、6 回繰り返し分析しました。表 1 に、各マ

トリックスにスパイクした PFOA と PFOS の濃度を示します。さらに、10 ng の内部標準をマトリックスに添加しました。スパイク済みサンプルを室温で 30 分間ボルテックスしてから、水または土壌マトリックス用にそれぞれサンプル前処理しました。

LC および MS 条件

1290 Infinity II LC と Ultivo トリプル四重極 LC/MS を組み合わせて使用し、LC/MS/MS 分析をしました。表 2 は LC と MS/MS の条件を示しています。

表 1. 各マトリックスにスパイクした PFOA と PFOS の濃度

水のマトリックス	L1 (ng/L)	L2 (ng/L)	L3 (ng/L)
ブランク水	2.5	40	200
表流水	2.5	40	-
工業廃水	-	-	200
土壌マトリックス	L1 (μg/kg)	L2 (μg/kg)	L3 (μg/kg)
ブランク土壌	0.5	5	20
土壌	-	5	20
堆積物	-	5	20

表 2. LC/MS/MS の分析条件

LC 条件	
機器	Agilent 1290 Infinity II LC、デガッサ組み込み済み
オートサンブラ	Agilent 1290 Infinity II オートサンブラ、温度制御機能付き
カラム温度	1290 Infinity II サーモスタットカラムコンパートメント
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm
カラム温度	35 °C
移動相	2.0 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B) アセトニトリル
流量	0.30 mL/min
注入量	5.0 μL
ポストタイム	3 分
グラジエント溶出プロファイル	0 ~ 3 分：30 ~ 65 % B、 3 ~ 4 分：65 % B、 4 ~ 5 分：65 ~ 100 % 5 ~ 8 分：100 %
MS/MS 条件	
機器	Ultivo LC/TQ
イオン化モード	ネガティブ
ドライガス温度	325 °C
ドライガス流量	6 L/min
ネプライザガス圧力	30 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧	2,500 V
ノズル電圧	0 V
CAV	9 V

結果と考察

LC および MS/MS 条件の最適化

最初に、2つの化合物を検出する上で適切なプリカーサイオンを見つけるために、PFOAとPFOSの標準溶液をネガティブイオン化モードでQ1 MS スキャンしました。次に、選択したプリカーサイオンをプロダクトイオンスキャンしました。プリカーサイオンのトランスミッションとフラグメンテーションのパラメータを最適化することで、PFOAとPFOSの定量用にそれぞれ、413/369および499/99のトランスミッションを選択しました。その他のイオントランスミッション(413/169、499/80)は、定性の確認用に選択しました。同様に、表3に示すように同位体標準のトランスミッションも確立されました。

確立したMRM取り込みパラメータを用い、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18カラムを選択して、アセトニトリルと、酢酸アンモニアを含む水を移動相として使用し、PFOAとPFOSを分離しました。図1に示すように、5分間のグラジエント溶出によって、PFOAとPFOSの両方をベースライン分離しました。比較的クリーンな水マトリックスでは、分析対象物の分離は5分で十分です。しかし、廃水、土壌、堆積物などの複雑なマトリックスの分析では、クリーンアップ後のサンプル中の残留マトリックスが分析に干渉し、カラム寿命が短くなることがあります。そのため、各分析後にカラムが完全にクリーンアップされるよう、両方

表 3. PFOA および PFOS 検出の MRM 取り込みパラメータ

化合物	プリカーサ (m/z)	フラグメントイオン (m/z)	フラグメント電圧 (V)	コリジョンエネルギー (V)	ドウェルタイム (ms)
PFOA	413	369*	80	1	30
		169	80	12	30
M4-PFOA	417	372*	80	1	30
		169	80	12	30
PFOS	499	99*	200	52	30
		80	200	68	30
M4-PFOS	503	99*	200	52	30
		80	62	68	30

*定量イオン

の分析対象物がカラムから溶出した直後に、グラジエントプロファイルを純粋なアセトニトリルまで3分間上昇させました。また、広く存在するペルフルオロアルキル化された物質のために、LCシステムからのバックグラウンド

レベルが高くなることがあります。この場合には、残留物をトラップして共溶出干渉を除去し、正確な定量を実現するために、溶媒混合物とオートサンプリング間をトラッピングカラムで接続することを推奨します⁷。

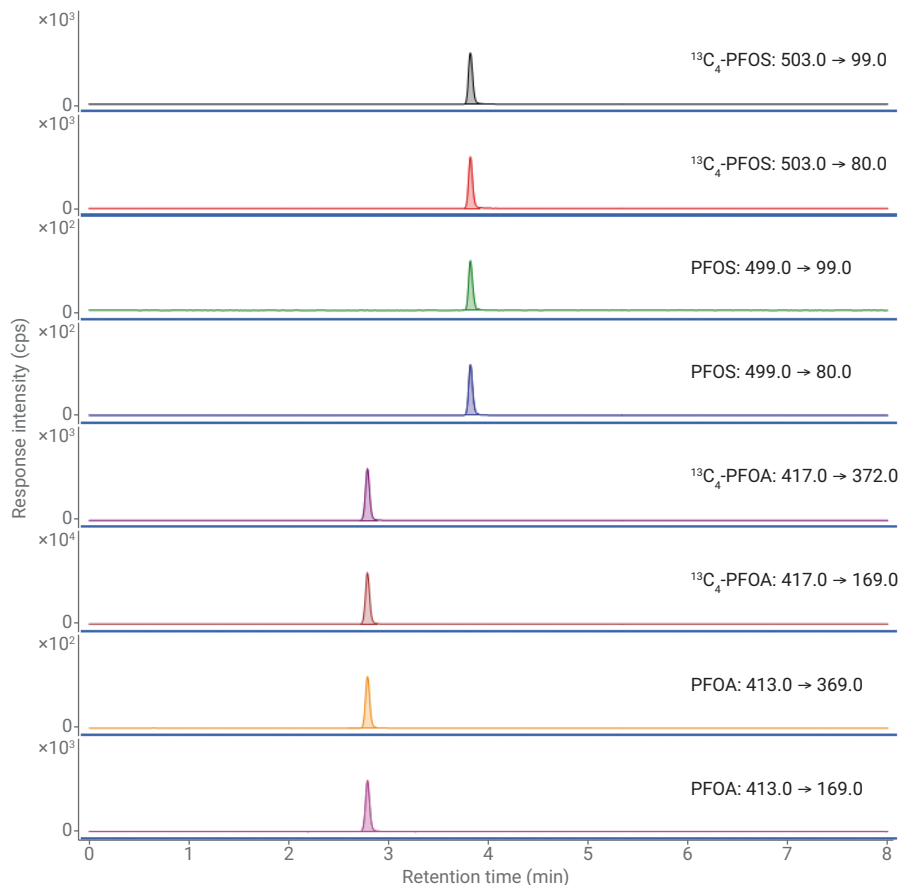


図 1. Ultivo LC/TQ を使用して得られた、PFOA、PFOS、および同位体標識された誘導体の代表的な MRM クロマトグラム

サンプルの抽出とクリーンアップの最適化

クリーンアップ前に水サンプルをろ過しました。しかし、土壌サンプルでは、ターゲット化合物を効率的に抽出するための適切な抽出手順が必要となりました。抽出溶媒、抽出のモード、土壌サンプル中の TOC の割合が、ターゲット化合物の抽出の効率に影響することがあります。PFOA と PFOS を固定濃度 (5 µg/kg) で土壌にスパイクして、抽出溶媒、抽出のモード、土壌マトリックス中の TOC の割合を変えて、回収率を比較しました。振とうまたは超音波処理を用いて抽出モードを変更しても、PFOA と PFOS の回収率に大きな差異は生じませんでした。TOC 試験で TOC の割合を 0.81 ~ 2.4 % の範囲で変えた場合も、PFOA と PFOS の両方について回収率に大きな差異は生じませんでした。しかし、水、メタノール、水とエタノールを組み合わせた中性 (1:1, v/v) および塩基性 pH (0.1 % KOH) などの異なる抽出溶媒を比較することで、PFOA と PFOS の効率的な同時抽出にはメタノールが不可欠であると分かりました。メタノール/水 (1:1, v/v) とメタノールのどちらも PFOA と PFOS を効率的に抽出できます。しかし、メタノールはメタノール/水 (1:1, v/v) と比べて多くの干渉物質を抽出する可能性があり、回収率において偏差がかなり大きくなるのはこのためであると考えられます。

ろ過された水サンプルはクリーンアップ用 WAX カートリッジに直接ロードできます。土壌抽出物を希釈して、カートリッジカラムにロードする前にサンプル溶液中の最終メタノールを 10 % 未満にしました。WAX カートリッジは、PFOA と PFOS を pH 4.0 で強固に保持することができます。このため、サンプルをカートリッジにロードした後、カートリッジを酢酸 (pH 4.0) で洗浄し、さらに純粋なメタノールで洗浄しました。これらの洗浄によってターゲット化合物は溶出しませんが、干渉化合物が土壌抽出物から効率的に溶出します。溶出溶媒をアンモニア/メタノールに変更したところ、ターゲット化合物をカートリッジから効率的に溶出することができました。最終的に最適化された手順を実験セクションに示します。

検量線と感度

キャリブレーション溶液は標準混合物溶液から調製し、PFOA と PFOS の両方の濃度は 0.5 ~ 200 µg/L の範囲とし、それぞれの内部標準の濃度は 10 µg/L としました。ターゲット化合物のピーク面積とその内部標準のピーク面積の比を、溶液中のターゲット化合物とその内部標準の濃度の比に対してプロットしました。図 2 に、ピーク面積の比が PFOA と PFOS の両方の濃度の比と、0.997 という高い回帰係数で直線的に相関することを示します。

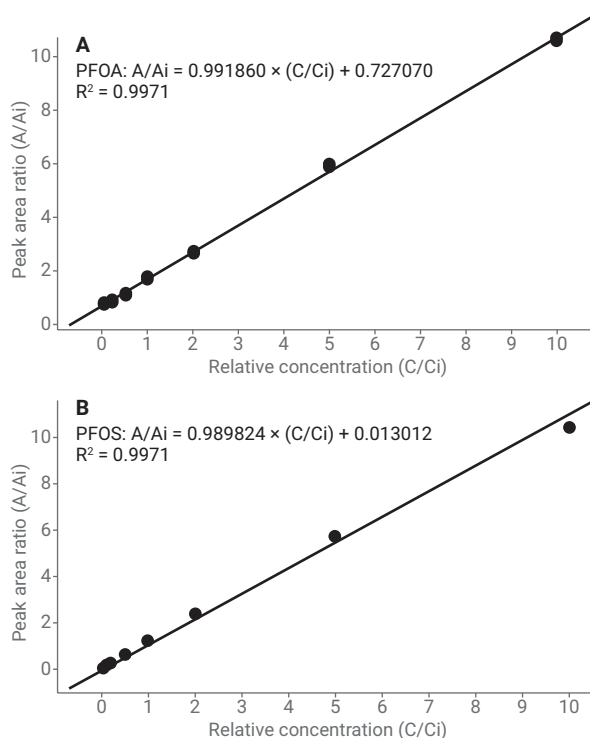


図 2. 試験濃度範囲における PFOA (A) と PFOS (B) の検量線

メソッドの感度が、純水およびブランク土壌の PFOA と PFOS の最低のスパイクレベルで示されました。図 3 に示すように、水中への 2.5 ng/L という低いスパイクレベルで、PFOA と PFOS の S/N 比はそれぞれ 1,193 と 120 でした。これらの S/N 比は、水中の PFOA と PFOS の LOD がサブ ng/L レベル以下になる可能性があることを示しています。ブランク土壌中への 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ スパイクレベルで、PFOA と PFOS の S/N 比はそれぞれ 1,382 と 226 でした。これは、ブランク土壌中の PFOA と PFOS の両方の LOD が ng/kg レベル以下の濃度になる可能性があることを示しています。これらの結果は、開発したメソッドでごく微量の PFOA と PFOS の検出が可能であることを示しています。

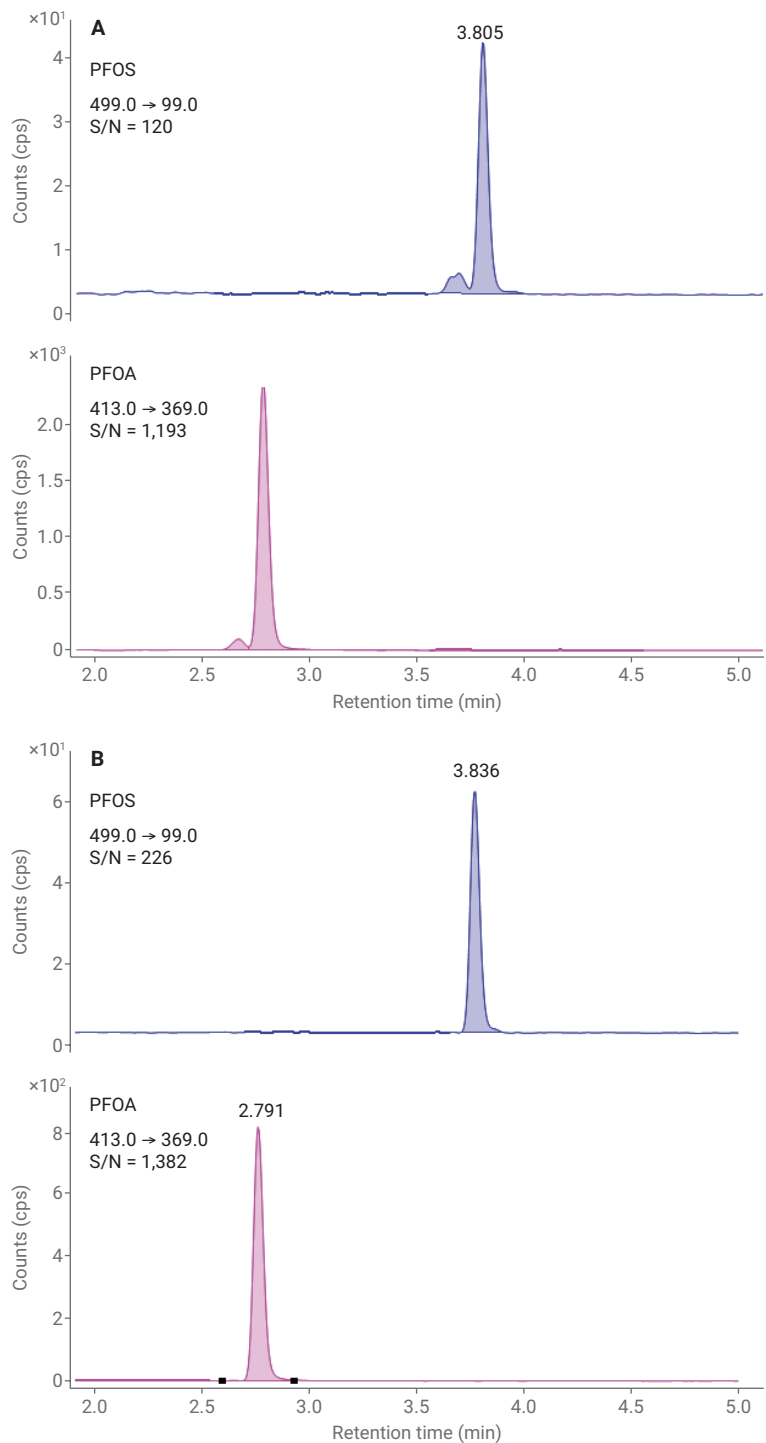


図 3. PFOA と PFOS のクロマトグラム。(A) 水に 2.5 ng/L スパイク、(B) ブランク土壌に 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ スパイク。注：各化合物について定量イオンクロマトグラムのみを示しました。

メソッドの真度と精度

メソッドの真度と精度の評価には、スパイク実験を用いました。純水、河川水、廃水、ブランク土壌（けい砂）、野外土壌、堆積物を試験マトリックスとして選択しました。図 4 は、2.5、40、200 ng/L のスパイクレベルで、PFOA の回収率が 91.1 ~ 94.1 % 内となり、相対標準偏差（RSD、n = 6）が 1.3 ~ 4.8 % 内となることを示しています。PFOS の回収率は 88.0 ~ 93.8 % で、RSD の範囲は 0.8 ~ 5.3 % です。2.5 および 40.0 ng/L でスパイクした河川水と 200 ng/L でスパイクした廃水では、PFOA と PFOS の両方の回収率がそれぞれ 88.4 ~ 98.8 % と 88.0 ~ 97.3 % 内で、RSD は 2.2 ~ 13.8 % と 0.9 ~ 4.1 % 内でした。ブランク土壌、野外土壌、堆積物への 0.5、5.0、20.0 µg/kg でのスパイクの場合、PFOA の回収率は 98.5 ~ 112.8 % 内で、RSD は 0.6 ~ 5.7 % 内でした。また、PFOS

の回収率は 96.8 ~ 111.1 % 内で、RSD は 0.4 ~ 6.6 % 内でした。これらの結果は、さまざまな環境水や土壌マトリックス中の微量の PFOA と PFOS を、本メソッドで高い真度と信頼性で測定できることを示しています。

実際のサンプル分析

本メソッドを使用して、地域で収集した地下水、表流水、周辺の土壌、堆積物に含まれる PFOA と PFOS の濃度をモニタリングしました。その結果、数 ng/L から数十 ng/L までの範囲の非常に低いレベルの PFOA と PFOS で、表流水と地下水が汚染されていることが示されました。周辺の土壌と堆積物については、大半のサンプル中で PFOA も PFOS も検出されませんでした。

結論

1290 Infinity II LC を Ultivo トリプル四重極 LC/MS と組み合わせて、さまざまな環境水および土壌マトリックスに含まれる PFOA と PFOS の検出に適用しました。WAX カートリッジを用いたクリーンアップと濃縮により、ブランク水中の PFOA と PFOS の両方の LOD をサブ ng/L まで低くすることができます。ブランク土壌中の PFOA と PFOS の LOD は ng/kg レベルにできます。同位体希釈キャリブレーション溶液は、試験範囲の 0.5 ~ 200 µg/L で良好な直線性を示し、回帰係数は 0.997 という高い値でした。本メソッドは真度と精度も優れており、回収率はスパイク試験したすべてのマトリックスで 88 ~ 113 % の範囲で、RSD は 0.6 ~ 13.8 % 内にあります。つまり、環境水および土壌マトリックスに含まれる微量の PFOA と PFOS のルーチン測定に高い信頼性で適用できるメソッドであることを示しています。

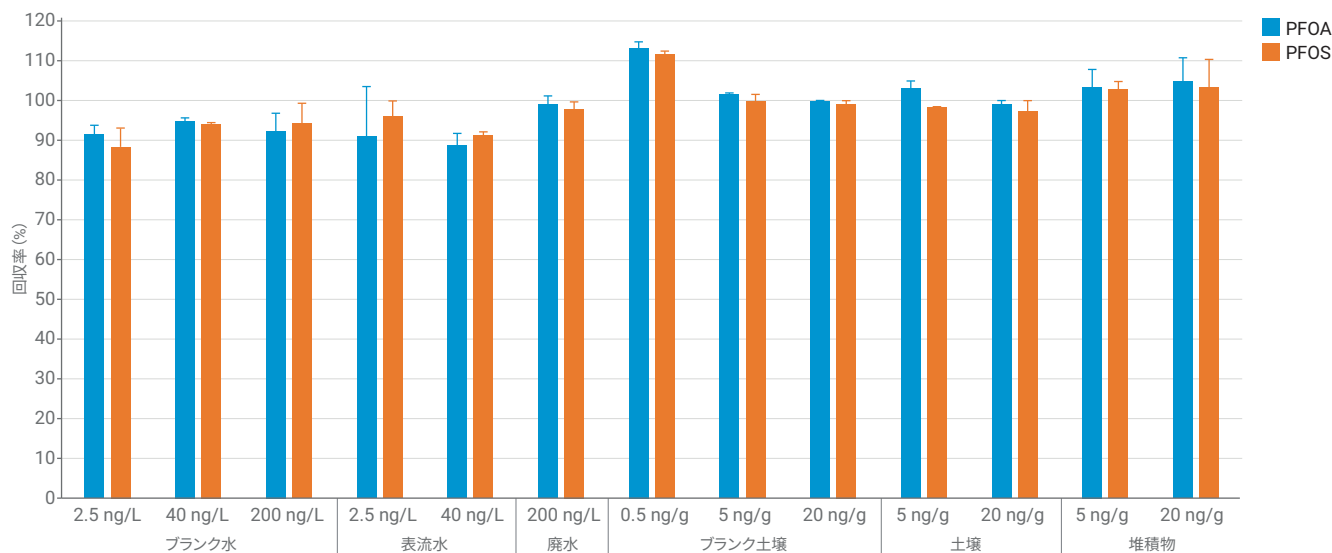


図 4. 試験水および土壌マトリックス中の各スパイク濃度における PFOA と PFOS の回収率

参考文献

1. Yang W. L.; *et al.* Determination of Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctanesulfonates in Various Environmental Water and Soil Matrices Using Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled with State-of-Art Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. *China Journal Environmental Chemistry* (in press).
2. Loos, R.; *et al.* Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds (PFCs) in the River Po watershed in N-Italy. *Chemosphere* **2008**, 71(2), 306–313.
3. Inoue, K.; *et al.* Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Related Perfluorinated Compounds in Human Maternal and Cord Blood Samples: Assessment of PFOS Exposure in a Susceptible Population during Pregnancy. *Environmental Health Perspectives* **2004**, 112(11), 1204–1207.
4. European Food Safety Authority (EFSA). EFSA opinion on two environmental pollutants (PFOS and PFOA) present in food. July 21, **2008**.
5. US Environmental Protection Agency. PFOA & PFOS drinking water health advisories. *Fact Sheet*, EPA 800-F-16-003. **2016**.
6. Pan, Y. Y.; *et al.* Evaluation of perfluorinated compounds in seven wastewater treatment plants in Beijing urban areas. *Science China Chemistry*, **2011**, 54(3), 552–558.
7. Yu, Y.; *et al.* QuEChERS Combined with Online Interference Trapping LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of 20 Polyfluoroalkane Substances in Dietary Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2015**, 63(16), 4087–4095.
8. Wang, Y. X.; *et al.* Dietary sources of human exposure to perfluorooctanoic acid, perfluorooctanesulfonate and their isomers. *China Journal Environmental Chemistry*, **2018**, 37(6), 1197
9. GB5009.253—2016. GB method on determination of PFOS and PFOA in food of animal origin. **2016**. 8.31.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, November 9, 2018
5994-0437JAJP