

## トリプル四重極質量分析計を用いた 食品中のPFAS分析 その1 (魚の切身)

前島 希

### ユーザーベネフィット

- ◆ 最適化された前処理手法およびLC-MS/MS分析メソッドを用いることで、AOACが指針値を出す30種類のPFASについて0.1 µg/kgから精度よく定量可能です。
- ◆ 本メソッドおよび前処理手法を用いることで、食品中PFASの分析を始めることが可能です。

### ■はじめに

ペルフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物 (Per- and Polyfluoroalkyl Substances, PFAS) は、4,000以上の有機フッ素化合物の総称です。代表的な化合物としてはペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) やペルフルオロオクタン酸 (PFOA) が挙げられます。これらの化合物は優れた撥水性や撥油性、耐熱性、耐薬品性を持ち、化学的に非常に安定です。これらの特徴から防火剤や食品包装材、非粘性コーティング剤など幅広い用途に使用されています。PFASは構造的に非常に安定であるため自然界で分解されにくく、環境中における残留性があります。PFASが混入したえさや水を取り込んだ魚介類を人間が摂取することによる健康被害が懸念されています。そのため、魚介類中のPFAS含有量を定量的に把握する必要があります。

このアプリケーションニュースでは、マグロの切身中に含まれるPFASをLC-MS/MSにて分析した例を紹介いたします。食品検査法の標準化や分析手法の検証などを行う北米の組織であるAOAC INTERNATIONALがターゲットとした30種類のPFASについて定量を行いました。前処理方法から検討し、添加回収試験において妥当性を検証しました。前処理におけるロスを低減し、LC-MS分析条件を最適化することにより、すべての化合物で良好な回収率を得ました。

### ■サンプルと前処理

標準物質および内部標準物質 (ISTD) は、Wellington Laboratoriesから購入した L-PFUDS、L-PFTRDS、L-PFDO5、10:2 FTSと混合液であるPFAC30PARおよびMPFAC-HIF-ESを使用しました。食料品店で購入したマグロの切り身をサンプルとし、凍結粉砕機FST-4000 (株式会社アイスティサイエンス) を用いてドライアイスとともに凍結粉砕しました。一晩冷凍庫で保存し、ドライアイスが揮発した粉砕物を用いて前処理を行いました。

抽出操作はQuEChERS法を参考に行いました。フローを図2に示します。凍結粉砕したサンプル 10 gを量りとり、アセトニトリル 10 mLを加えて1分間激しく振とうしました。QuEChERS抽出塩パック (Restek, P/N: 25849) を1パケット加え、すぐに手で1分間激しく振とうしました。4,000 rpm、室温で5分間遠心し、アセトニトリル層を回収しました。このアセトニトリル層を水で5倍希釈し、抽出液としました。

固相精製にはEVOLUTE PFAS (Biotage, P/N: 614-0015-CP、150 mg/6 mL) を用いました。フローを図3に示します。マニホールドには加圧式のPRESSURE+ (Biotage) を使用しました。28%アンモニア水/メタノール (1:100, v/v) 5 mLとぎ酸/メタノール (1:1000, v/v) 5 mLでコンディショニング後、抽

出液 40 mL (魚サンプル 8 g相当) を負荷しました。水 5 mL および、ぎ酸/メタノール/水 (1:400:600, v/v/v) 5 mLで洗浄後、28%アンモニア水/メタノール/水 (1:90:10, v/v/v) 5 mLで溶出しました。溶出した溶液を500 µL取り、2 µLのぎ酸を加え混合後、LC-MS/MS分析しました。

### ■分析条件

分析はトリプル四重極質量分析計LCMS-8060NXと超高速液体クロマトグラフNexera™ X3 UHPLCシステムを組み合わせで行いました (図1)。分析条件を表1に示します。PFASは溶媒やガラス器具、LCシステムの脱気装置など、前処理環境や分析装置から混入することがあります。分析装置由来のPFASについてはディレイカラムを使用することにより分析結果への影響を抑えることが可能です。本分析ではSUS配管 (300 mm x 0.3 mm I.D., P/N: 228-69955-41) を用いてミキサとオートサンプラの間にディレイカラムを設置しました。ディレイカラムによりLCシステム由来のPFASの溶出時間が遅くなるため、サンプル中のPFASと分離することができ、サンプル中のPFAS濃度を正確に算出することができます。また、バイアルはPFASが検出されないことを確認したPPバイアル (島津ジーエルシー、P/N: GLC-IVS-100) を使用しました。

表1 LC-MS/MS分析条件

#### [HPLC conditions] Nexera X3

Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 (100 mm x 2.1 mm I.D., 3 µm) <sup>*1</sup>
Delay column	: Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm x 2.1 mm I.D., 3 µm) <sup>*2</sup>
Mobile phase A	: 2 mmol/L Ammonium Acetate in Acetonitrile/Water (5:95, v/v)
Mobile phase B	: Acetonitrile
Flow rate	: 0.3 mL/min (0.6 mL/min only between 10.01-12 min)
Gradient program	: B conc. 20% (0 min) → 100% (10-12 min) → 20% (12.01-15 min) The flow was introduced into the mass spectrometer between 1 to 9.6 min using a flow switching valve.
Column temp.	: 40°C
Injection volume	: 5 µL

#### [MS conditions] LCMS-8060NX

Ionization	: ESI, Negative mode
Nebulizing gas	: 2 L/min
Heating gas	: 10 L/min
Drying gas	: 10 L/min
DL temp.	: 200°C
Interface temp.	: 250°C
Heat block temp.	: 400°C
Probe position	: +2 mm

\*1 227-31014-05

\*2 227-31014-03



図1 Nexera™ X3とLCMS™-8060NX

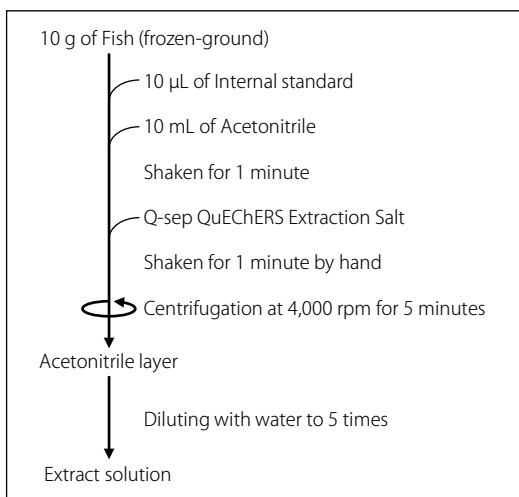


図2 抽出操作

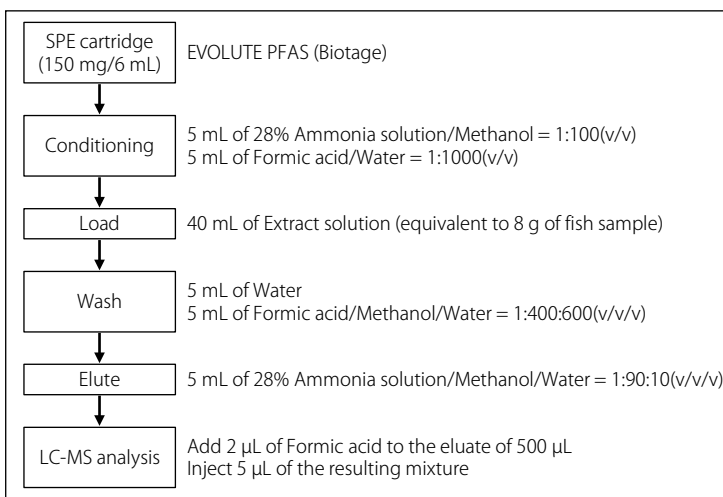


図3 精製操作

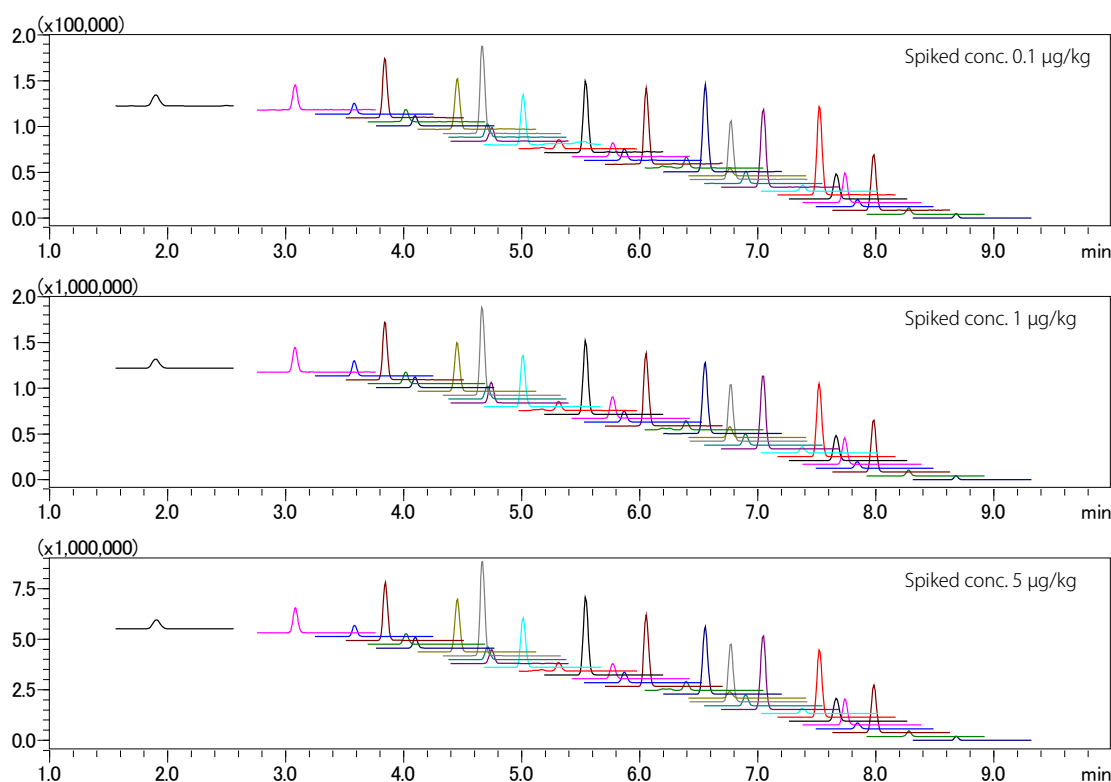


図4 PFAS標準品を添加したサンプルのマスククロマトグラム

### ■ マスククロマトグラムと検量線

30化合物のPFASを一斉分析したマスククロマトグラムを図4に示します。すべての化合物が8分以内に溶出しており、良好な分離を示しています。図には示しません、PFOSのMRMトランジションへの影響が懸念されるタウロデオキシコール酸 (TDCA) やタウロケノデオキシコール酸 (TCDCA)、タウロウルソデオキシコール酸 (TUDCA) は、PFOSと十分に分離していることを確認しています。

代表的な化合物の検量線を図5に示します。標準品および内部標準を添加してから前処理したものを検量線用サンプルとして分析しています。すべての化合物で添加濃度0.05から5 μg/kgで検量線を作成しており、決定係数R<sup>2</sup>が10:2 FTSでは0.98、それ以外の化合物では0.99以上と良好な直線性となっています。バイアル中の濃度は0.07から7 ng/mLとなります。

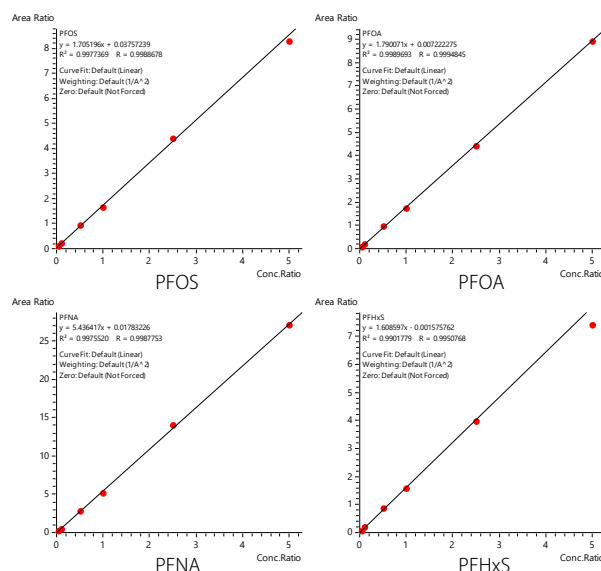


図5. 0.05から5 μg/kg (添加濃度) における検量線

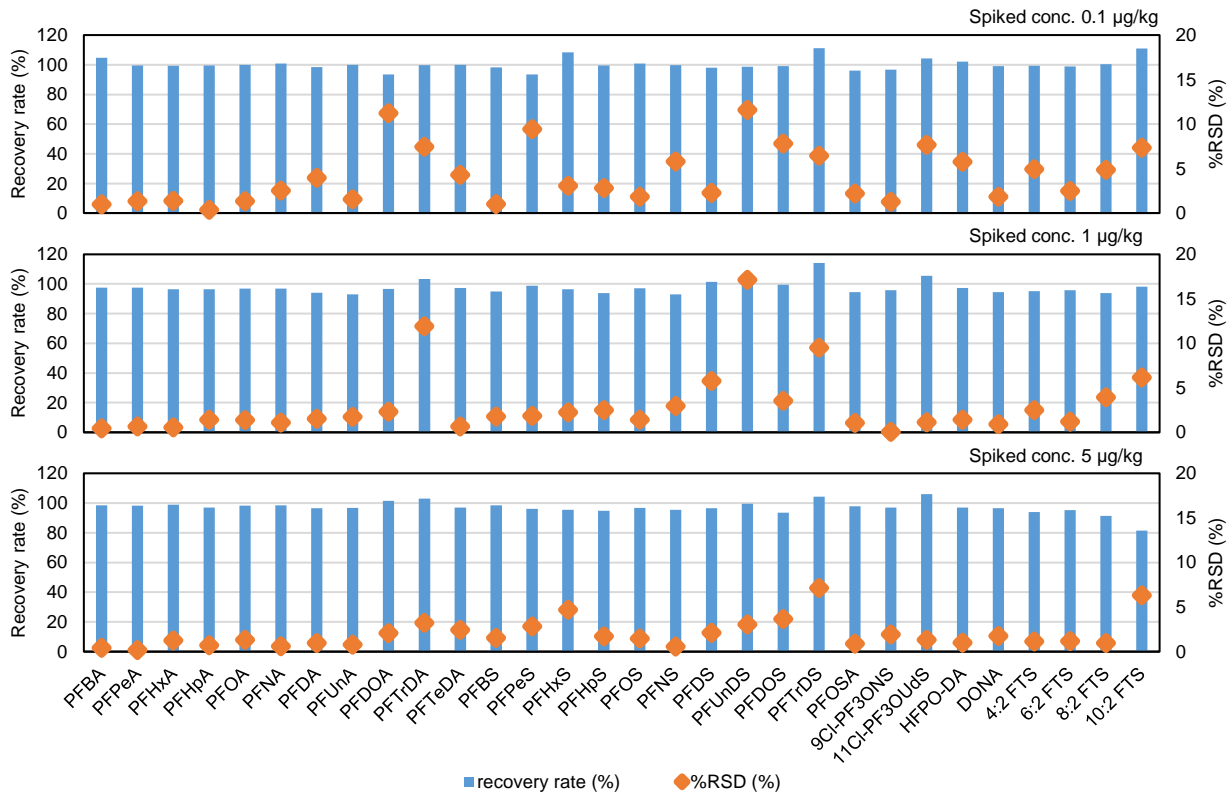


図6 回収率と再現性 (n = 3)

## ■ 添加回収試験

0.1、1、5 µg/kgで添加回収試験を行い、回収率と繰り返し再現性を検証しました。結果を図6に示します。n=3で前処理を行い、マトリックス検量線で定量しました。表2に示す組み合わせで面積値の補正を行いました。AOAC SMPRの要求基準では、PFOS、PFOA、PFNA、PFHxSはLOQが0.1 µg/kg、回収率が80-120%、再現性が20%以下となるよう指定されています。その他のPFASはLOQが1.0 µg/kg、回収率が65-135%、再現性が25%となっています (表3)。いずれの化合物でも、添加濃度0.1、1、5 µg/kgで回収率は80-120%以内、再現性は20%以下となり、良好な結果となりました。

表2 補正に使用した内部標準物質

Compound	ISTD	Compound	ISTD
PFBA	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFBA	PFOS	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOS
PFPeA	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFPeA	PFNS	<sup>13</sup> C <sub>7</sub> -PFUnA
PFHxA	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -PFHxA	PFDS	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFDoA
PFHpA	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFHpA	PFUnDS	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOSA
PFOA	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOA	PFDOS	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFTeDA
PFNA	<sup>13</sup> C <sub>9</sub> -PFNA	PFTrDS	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFTeDA
PFDA	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFDA	PFOSA	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOSA
PFUnA	<sup>13</sup> C <sub>7</sub> -PFUnA	9Cl-PF3ONS	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOS
PFDOA	<sup>13</sup> C <sub>7</sub> -PFUnA	11Cl-PF3OUds	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -HFPO-DA
PFTeDA	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOSA	HFPO-DA	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -HFPO-DA
PFTeDA	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFTeDA	DONA	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFHpA
PFBS	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -PFBS	4:2 FTS	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -4:2 FTS
PFPeS	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFHpA	6:2 FTS	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -6:2 FTS
PFHxS	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -PFHxS	8:2 FTS	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -8:2 FTS
PFHpS	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PFDA	10:2 FTS	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -8:2 FTS

表3 AOAC SMPRの基準

Compound	LOQ (µg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%)
PFOS	≤0.1	80-120	≤20
PFOA	≤0.1	80-120	≤20
PFNA	≤0.1	80-120	≤20
PFHxS	≤0.1	80-120	≤20
Other PFAS	≤1.0	65-135	≤25

## ■ まとめ

本アプリケーションニュースでは魚サンプル中のPFAS分析について紹介しました。分析はトリプル四重極質量分析計LCMS-8060NXと超高速液体クロマトグラフNexera X3 UHPLCシステムを組み合わせで行いました。また、カラムには良好な分離とピーク形状が得られるShim-pack Scepterを使用しました。添加回収試験を行い、添加濃度0.1、1、5 µg/kgにおいてすべての化合物で80-120%以内の回収率および20%以下の再現性を確認しました。特に、PFOS、PFOA、PFNA、PFHxSではすべての添加濃度における回収率が95.5-108.4%以内となりました。最適化された前処理および分析メソッドを用いることで、0.1 µg/kgから正確に定量することが可能です。

<参考文献>

1) [AOAC SMPR®2023.003](https://www.an.shimadzu.co.jp/)

LCMS、Nexera、およびShim-pack Scepterは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。