

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2 (牛乳)

東 祐衣、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0.01 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ノ酸 (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。その特徴から防火剤や食品包装材、非粘着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、環境における残留性があります。

昨今の研究から、PFASが混入した飼料や水を乳牛が取り込むことでPFASが乳製品へ移行することが明らかになっています¹⁾。人がPFASを含む乳製品を摂取することによる健康被害が懸念されており、乳製品中のPFAS含有量を定量的に把握することは重要であると考えられます。乳製品中のPFASの濃度をモニターするためには、高精度かつ高感度な定量方法が重要です。

このアプリケーションニュースでは、牛乳中に含まれるPFASをLC-MS/MSにて分析した例を紹介します。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PFAS²⁾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0.01 µg/kgから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。サンプルには市販の牛乳を使用しました。

抽出・精製の操作は、FDAにより発行されたメソッド³⁾を参考に、分散固相抽出であるQuEChERS法で行いました。フローを図1、2に示します。牛乳 10 gを量りとり、内部標準物質 10 µLとアセトニトリル 10 mL、ぎ酸 150 µLを加えて10秒間激しく手で振とうしました。抽出用塩パック (Supel QuE, Sigma-Aldrich, P/N: 55295-U) を加え、すぐに手で10秒間激しく振とうしました。その後、振とう機を用いて5分間振とうしました。4,000 rpm、室温で5分間遠心し、アセトニトリル層 8 mLを新しいチューブへ回収しました。これにdSPE吸着材 (Supel QuE PSA/ENVI-Carb Tube 3, Sigma-Aldrich, P/N: 55479-U) を加え、すぐに手で10秒間激しく振とうしました。その後、振とう機を用いて5分間振とうしました。4,000 rpm、室温で5分間遠心し、上清 6 mLを新しいチューブへ回収しました。

窒素ガス吹付濃縮装置TurboVap LV (Biotage) を用いて1 mL以下まで濃縮後、90%メタノール水溶液で1 mLに定容しました。サンプル溶液を完全に乾固させるとPFOSAやNMeFO5A、NEtFO5A、NMeFO5E、NEtFO5Eは著しく回収

率が悪化することを事前検証で確認したため、窒素ガス吹付による濃縮はサンプル溶液が0.5 mL以下にならないように注意しました。

10秒間ボルテックスで攪拌後、溶液を1.5 mLチューブへ移し、15,000 rpm、4°Cで10分間遠心しました。上清をバイアルへ移し、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。分析条件を表1に示します。PFASは溶媒やガラス器具など、前処理環境や分析システム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) ^{*1}
Delay column	: Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm x 2.1 mm I.D., 3 µm) ^{*2}
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 (Co-injection of 10µL of water before and after injection.)

[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 P/N: 227-31014-05

*2 P/N: 227-31014-03

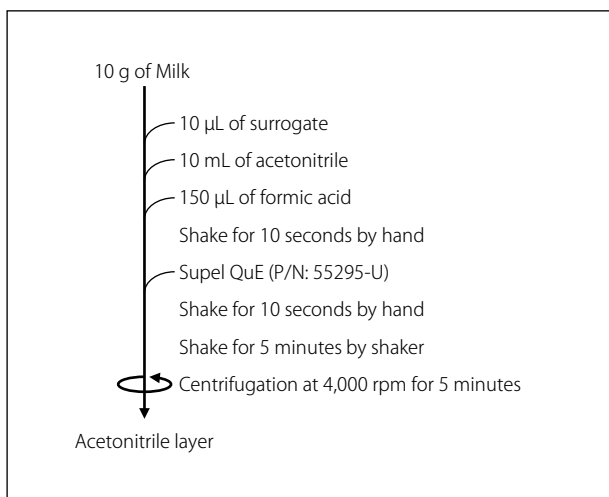


図1 抽出の手順

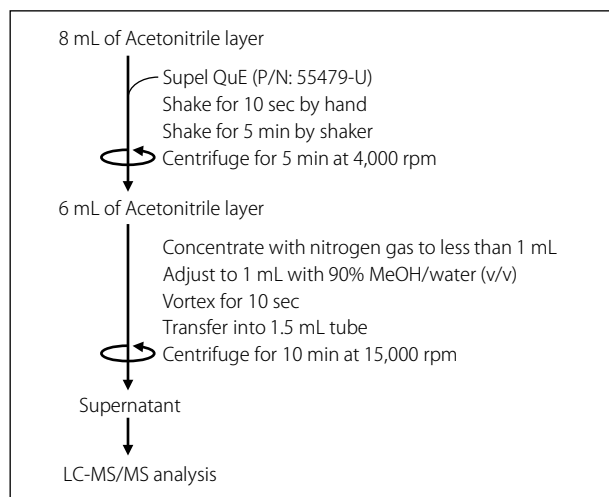


図2 分散固相抽出の手順

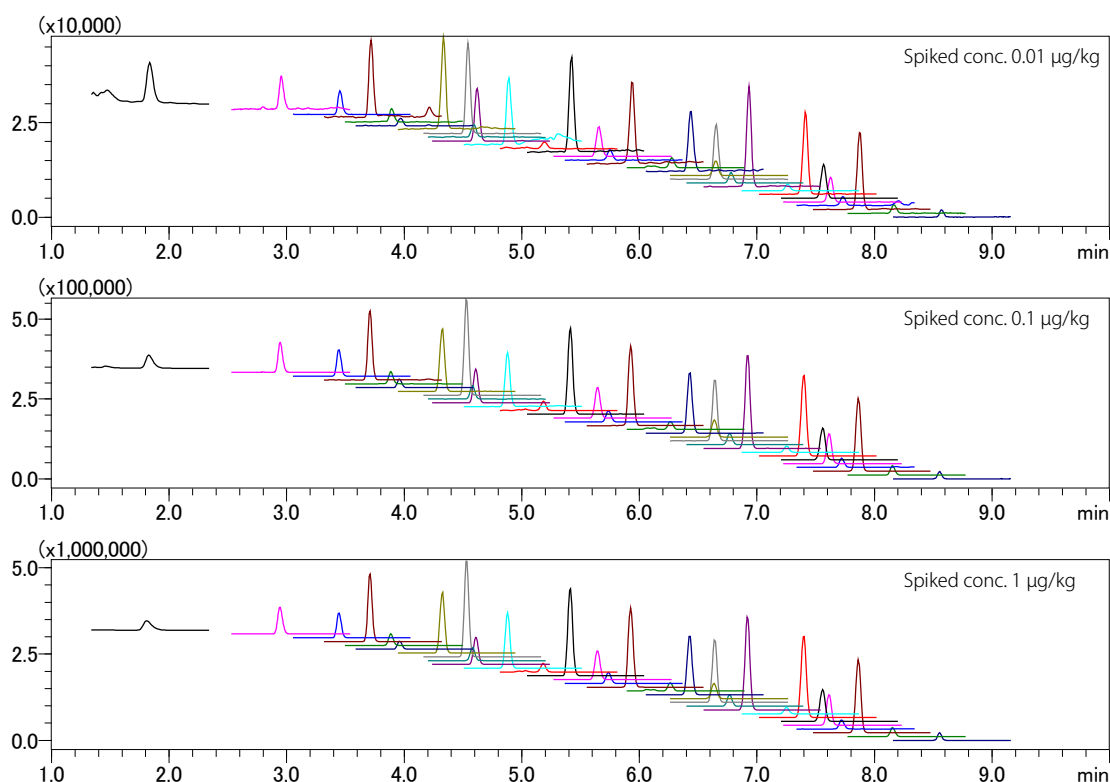


図3 PFAS標準品を添加したQCサンプルのマスクロマトグラム

■ マスクロマトグラムと検量線

30種類のPFASを一斉分析したマスクロマトグラムを図3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4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。表2に示す内部標準を用いて面積値の補正を行いました。すべての化合物で添加濃度0.005から1 µg/kgで検量線を作成しており、決定係数R²は0.99以上と良好な直線性となっています。このとき、バイアル中の各PFASの濃度は0.03から6 ng/mLとなります。

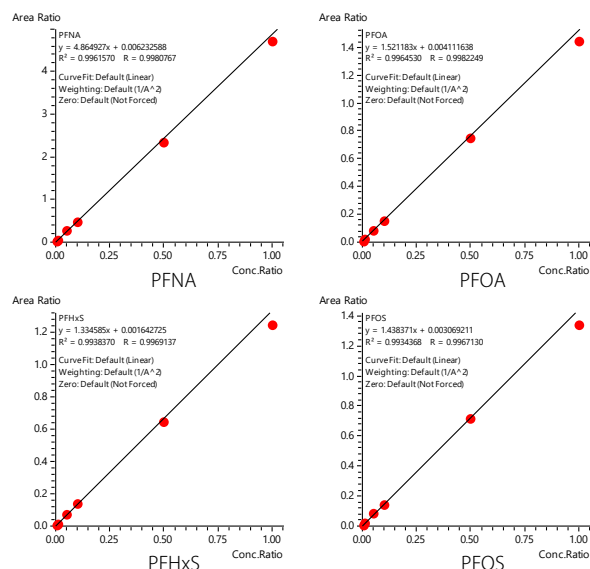


図4 0.005から1 µg/kg (添加濃度) における検量線

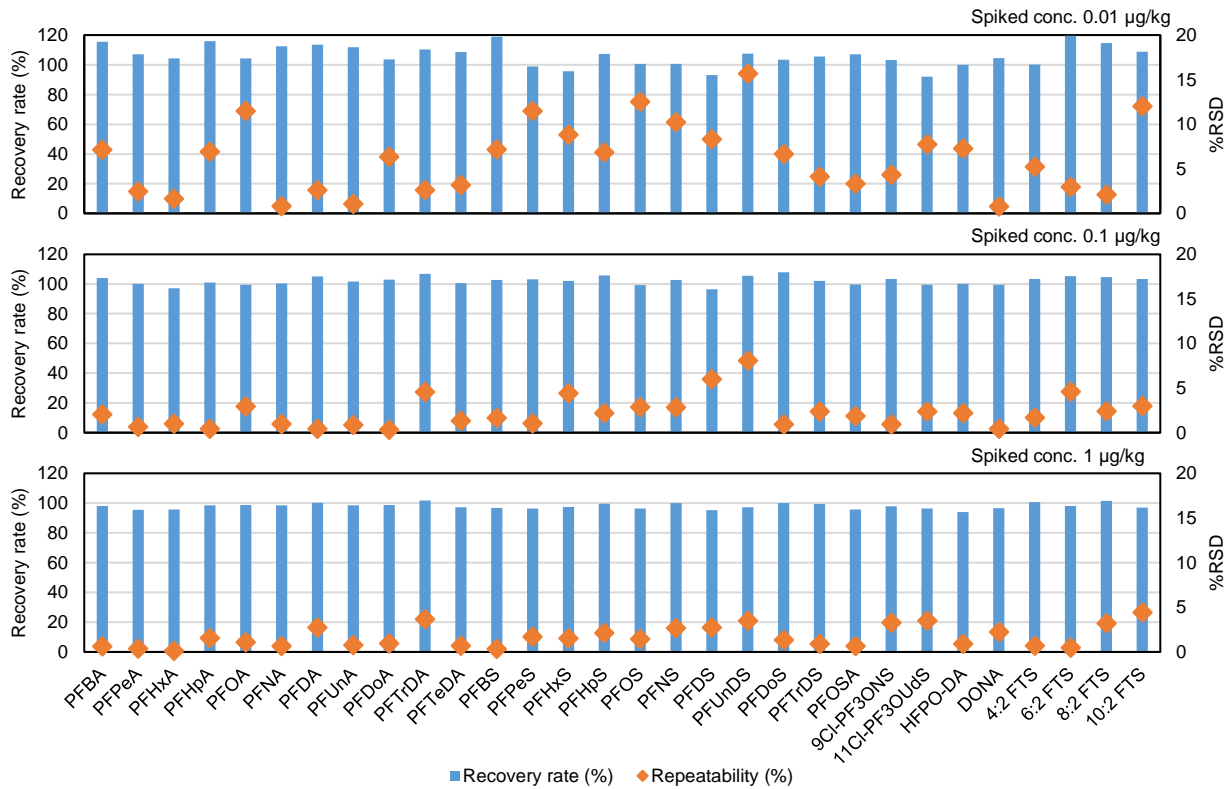


図5 回収率と再現性 (n = 3)

■ 添加回収試験

0.01、0.1、1 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5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。AOAC SMPRの要求基準では、PFOA、PFNA、PFHxS、PFOSはLOQが0.01 µg/kg、回収率が65-135%、再現性が25%以下となるよう指定されています。その他のPFASのLOQは、PFBAおよびPFPeAが1.0 µg/kg、それ以外が0.1 µg/kgとなっています(表3)。今回の検証では、いずれの化合物も添加濃度0.01 µg/kgでは回収率は92.0-119.6%で再現性は15.7%以下、添加濃度0.1 µg/kgでは回収率は96.6%-107.8%以内で再現性は8.1%以下、添加濃度1 µg/kgでは回収率は93.9-101.7%以内で再現性は4.4%以下となりました。

表2 補正に使用した内部標準物質

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

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。

表3 AOAC SMPRの基準

Compound	LOQ (µg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%)
PFOA	≤0.01	65-135	≤25
PFNA	≤0.01	65-135	≤25
PFHxS	≤0.01	65-135	≤25
PFOS	≤0.01	65-135	≤25
PFBA and PFPeA	≤1.0	-	-
Other PFAS	≤0.1	-	-

■ まとめ

本アプリケーションニュースでは牛乳サンプル中の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て行いました。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。添加回収試験を行ったところ、添加濃度0.01、0.1、1 µg/kgにおいてすべての化合物で回収率は92.0-119.6%以内、再現性は15.7%以下であり、良好な結果が得られたことを確認しました。特に、PFOA、PFNA、PFHxS、PFOSではいずれの添加濃度においても回収率は95.7-112.5%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、0.01 µg/kgから正確に定量することが可能です。

<参考文献>

- 1) E.D. Van Asselt, et al. Transfer of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) from contaminated feed to dairy milk, Food Chem. 141 (2013) 1489-1495
- 2) [AOAC SMPR®2023.003](#)
- 3) [Determination of 30 Per and Polyfluoroalkyl Substances \(PFAS\) in Food and Feed using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry \(LC-MS/MS\), FDA, C-010.03](#)

関連製品

一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



> LCMS-8060NX

トリプル四重極質量分析計



> LabSolutions Insight™

GC/MS & LC/MS用 多検体定量支援ソフトウェア LabSolutions Insight



> LCMS-TQ RX シリーズ

トリプル四重極質量分析計

関連分野

> 食品・飲料

> 食品汚染

> 価格お問い合わせ

> 製品お問い合わせ

> 技術お問い合わせ

> その他お問い合わせ