

魚油、粉末コーヒー、プロテインパウダーの PFAS 30 種の測定

Agilent Captiva EMR PFAS Food II
パススルークリーンアップと LC/MS/MS 検出を使用

著者

Limian Zhao and Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、魚油、粉末コーヒー、およびプロテインパウダーに含まれる 30 種類の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 (PFAS) 残留物を分析する多成分残留分析メソッドの開発とバリデーションについて取り上げます。このメソッドでは、QuEChERS 抽出に続いて Agilent Captiva EMR PFAS Food II カートリッジによる EMR ミックスモードパススルークリーンアップを行った後、液体クロマトグラフィー / トリプル四重極質量分析 (LC/TQ) で検出します。シンプルかつ効率的なサンプル前処理、Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラによる直接注入、高感度な Agilent 6495D LC/TQ による検出、適切な標準検量線にもとづく信頼性の高い定量を主な特長としています。AOAC が定める標準メソッド性能要件 (SMPR) 2023.003 ガイドラインに従ってこのメソッドのバリデーションを実施し、その適合性、感度、真度、および精度を評価しました。その結果、3 種類の全食品マトリックス中の PFAS 30 種すべてについて、要求される定量下限 (LOQ)、回収率、および再現性 (RSD) を満たしていることが確認されました。

はじめに

近年、食品中の PFAS 残留物の測定がますます重要視されるようになってきました。2023 年 4 月に、欧州委員会は 4 種類の PFAS 化合物 (PFOS、PFOA、PFNA、PFHxS) に関する規制を施行しました。これらの規制は、卵、魚、魚介類、肉、内臓など、さまざまな食品カテゴリーを対象としています¹。2023 年 11 月には、AOAC が SMPR 2023.003 を公表し、農産物、コーヒー、牛乳、粉乳および植物性プロテインパウダー、卵、魚介類、魚肉および陸生動物の肉、陸生動物の食用内臓、魚油、乳児および幼児用食品、ペットフードおよび飼料の 11 カテゴリーの食品にわたる 30 種類の PFAS 化合物の分析に関する性能要件を定めました²。

QuEChERS 抽出に続き、Captiva EMR PFAS Food I および II カートリッジによる EMR ミックスモードのパススルークリーンアップを行う手法は、シンプルかつ効率的で信頼性の高いサンプル前処理プロトコルであることが実証されています。このプロトコルでは、8 カテゴリーの食品マトリックスにわたり、EU および AOAC SMPR の要件を満たす優れた定量性能が実現されます^{3~8}。本研究では、このメソッドの適用性を残り 3 カテゴリーの食品 (魚油、コーヒー、植物性プロテインパウダー) まで拡張し、この PFAS 分析ワークフローが、AOAC SMPR 2023.003 で規定される全食品カテゴリーに有効であることを実証しました。

また、本研究では、Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラの feed 注入モードを利用し、EMR パススルークリーンアップ後にサンプル溶出液を直接注入できるように機器メソッドを改良しました。その結果、3 種類の食品マトリックスの分析に乾燥および再溶解ステップが不要になりました。この改良版プロトコルにより、ワークフローが簡略化されただけでなく、サンプル前処理時間が最大 50 % 短縮されました。このアプローチは、肉、魚、卵、飼料、食用内臓など中〜高レベルの定量下限 (LOQ) が求められるその他の食品カテゴリーにも拡張できます。

実験

材料および試薬

非標識 PFAS および同位体標識された内部標準 (ISTD) 溶液は、Wellington Laboratories 社 (米国カリフォルニア州オントリオ) から購入しました。メタノール (MeOH)、アセトニトリル (ACN)、イソプロピルアルコール (IPA) は、VWR 社 (米国ペンシルベニア州ラドナー) から購入しました。酢酸 (AAS) および酢酸アンモニウムは、MilliporeSigma 社 (米国マサチューセッツ州バーリントン) から購入しました。

溶液および標準液

非標識 PFAS および ISTD のスパイク溶液は、それぞれの原液を MeOH で希釈して調製しました。非標識 PFAS スパイク溶液の濃度は、PFBA、9Cl-PF3ONS、11Cl-PF3OUdS、HFPO-DA、DONA、4:2 FTS、6:2 FTS、および 8:2 FTS については 100 ng/mL、PFPeA は 50 ng/mL、その他の化合物 21 種は 25 ng/mL に調製しました。ISTD スパイク溶液は、同位体標識された 18 種類すべての ISTD 化合物の濃度が 100 ng/mL で一定になるように調製しました。

これらのスパイク溶液を、1 % の酢酸を含む ACN で希釈して、検量線用標準液を調製しました。その濃度を表 1 に示します。

調製後、すべての検量線用標準液を 10 % の水で希釈して完全に混合し、LC/TQ への注入に使用しました。この希釈ステップは、EMR カートリッジによるサンプルクリーンアップ時の 10 % の追加希釈に合わせて、検量線用標準液とサンプル抽出液の一貫性を確保することを目的としています。

すべての標準液は 4 °C で保管し、2 週間以内に使用しました。検量線用標準液のルーチンテストでは、一定量の検量線用標準液をポリプロピレン (PP) 製インサート付きの別のバイアルセットに移し、機器への注入に使用しました。標準液は、使用前に完全に室温になるまで温める必要があります。このプロセスを促進させるために、超音波処理を使用することもできます。このステップは、バイアル内の長鎖 PFAS 成分の損失を防ぐうえで重要になります。また、LC/TQ 分析時の注入誤差につながる可能性のある気泡を除去するために、インサート内のサンプルを十分に攪拌することが重要です。

表 1. 検量線作成用標準液

非標識 PFAS または ISTD	検量線用標準液 (ng/mL)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PFBA、9Cl-PF3ONS、11Cl-PF3OUdS、HPFO-DA、DONA、4:2 FTS、6:2 FTS、8:2 FTS	NA	0.008	0.02	0.04	0.2	0.4	2.0	4.0	8.0	20.0
PFPeA	NA	0.004	0.01	0.02	0.1	0.2	1.0	2.0	4.0	10.0
PFHxA、PFBS、PFHpA、PFPeS、PFHxS、PFOA、PFNA、PFHpS、PFDA、PFUnDA、PFDoDA、PFTrDA、PFTDA、PFOS、PFNS、PFDS、PFUnDS、PFDoS、PFTrDS、PFOSA、10:2 FTS	NA	0.002	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0
ISTD	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

1%の酢酸を含むACN抽出溶媒は、10 mLの氷酢酸を990 mLのACNに加えて調製し、室温で保管しました。LC移動相Aとして5 mM NH₄OAc水溶液、移動相Bとして95:5 ACN/水を使用しました。また、ニードル洗浄溶媒としてIPA、水、ACNを使用しました。

実験装置および器具

本研究には、Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ (G7120A)、Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプリング (G7167C)、およびAgilent 1290 Infinity II サーモスタットカラムコンパートメント (G7116B) で構成されるAgilent 1290 Infinity II LCシステムを使用しました。このLCシステムを、Agilent Jet Stream iFunnel エレクトロスプレーイオン源を搭載したAgilent トリプル四重極 LC/MS システム (G6495D) に接続しました。データの取り込みと解析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

サンプル前処理に使用したその他の機器は以下のとおりです。

- Centra CL3R 遠心管 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)
- ジェノグラインダー (メアチエン、ニュージャージー州、米国)
- Multi Reax 試験管シェーカー (Heidolph 社、シュヴァーバハ、ドイツ)
- ピペットおよびリピーター (Eppendorf 社、ニューヨーク州、米国)
- Agilent 加圧式マニホールド SPE カートリッジ 48 本用 (PPM-48、部品番号 5191-4101)
- 超音波洗浄器 (VWR 社、米国ペンシルベニア州)

1290 Infinity II LC システムを改良するため、InfinityLab PFC ディレイカラム、4.6 × 30 mm (部品番号 5062-8100) を装着したAgilent InfinityLab PFC フリー HPLC 変換キット (部品番号 5004-0006) を使用しました。クロマトグラフィー分離には、Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、95 Å、2.1 × 100 mm、1.8 μm (部品番号 959758-902)、ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 mm、1.8 μm、圧力上限 1200 bar、およびAgilent UHPLC ガードカラム (部品番号 821725-901) を使用しました。

サンプル前処理およびその他の消耗品として以下の製品を使用しました。

- Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キット、EN 15662 メソッド、バッファ塩、セラミックホモジナイザ (部品番号 5982-5650CH)
- Agilent Captiva EMR PFAS Food II カートリッジ、6 mL カートリッジ、750 mg (部品番号 5610-2232)
- PP 製スナップキャップおよびバイアル、1 mL (部品番号 5182-0567 および 5182-0542)

- PP スクリューキャップ型バイアルおよびキャップ、2 mL (部品番号 5191-8121 および 5191-8151)
- チューブおよびキャップ、50 mL、50 個 (部品番号 5610-2049)
- チューブおよびキャップ、15 mL、100 個 (部品番号 5610-2039)

本研究で使用した消耗品はすべて、PFAS の許容清浄度を満たしていることがテストにより確認されています。

LC/TQ 機器条件

表 2 に、LC ポンプ条件を示します。

表 2. LC/TQ の LC ポンプ条件

パラメータ	設定値			
移動相 A	5 mM NH ₄ OAc 水溶液			
移動相 B	95:5 ACN:水			
グラジエント	時間 (分)	A%	B%	流量 (mL/min)
	0.00	90	10	0.400
	0.50	90	10	0.400
	2.00	70	30	0.400
	8.50	55	45	0.400
	11.50	25	75	0.400
13.25	0	100	0.460	
ストップタイム	15.50 分			
ポストタイム	2.5 分			

表 3 に、LC マルチサンプリング条件を示します。

表 3. LC/TQ の LC マルチサンプリングプログラム

パラメータ	設定値			
Feed 注入	モード: フィード注入			
	サンプル吸引: 10.00 μL			
	フィード速度: ポンプ流量の 10 %			
	フラッシュアウトモード: 自動			
	10.00 μL の空気と 5 回混合			
	注入			
注入路のクリーニング	ステップ	作業	溶媒	時間/容量
	サンプル吸引			
	1	外側洗浄	1:1 IPA:ACN	10 秒
	2	外側洗浄	ACN	10 秒
	注入			
	1	内側洗浄	2 mM 酢酸アンモニウム	150 μL
	2	内側洗浄	2 mM 酢酸アンモニウム	150 μL
	3	シート洗浄	1:1 IPA:ACN	150 μL
	4	シート洗浄	ACN	150 μL
	5	再コンディショニング	2 mM 酢酸アンモニウム	

LC カラムコンパートメント: 40 ± 0.8 °C で等温に保持

表 4 に、MS エレクトロスプレーイオン (ESI) 源の設定を示します。

表 4. 質量分析計の ESI ソースの設定

パラメータ	設定値
乾燥ガス	150 °C、18 L/min
シースガス	390 °C、12 L/min
ネブライザガス	15 psi
キャピラリ電圧	2,500 V (負)
ノズル電圧	0 V (負)
イオンモード	ネガティブイオンモード、フラグメンタ電圧を 166 V で一定に設定
iFunnel モード	HFPO-DA を除くすべての化合物に標準モードを使用

PFAS 対象化合物および ISTD の MS 取得条件は、PFAS MRM データベース (G1736AA) から取得しました。

サンプル前処理手順

魚油、粉末コーヒー、およびプロテインパウダーの各サンプルは現地の食料品店で購入し、そのまま抽出に使用しました。1 g のプロテインパウダーまたは粉末コーヒー、2 g の魚油を 50 mL PP 製チューブに計量しました。すべてのプレスパイク品質管理 (QC) サンプルに PFAS 標準液および ISTD を適宜スパイクし、マトリックスブランク (MB) には ISTD のみを加えました。また、操作ブランク (PB) には、ISTD をスパイクした 1 mL または 2 mL の水を使用しました。

表 5 に、プレスパイク QC サンプルに使用したスパイクの詳細をまとめます。サンプル前処理プロトコルに従い、プロテインパウダーおよび粉末コーヒーには 10 倍希釈、魚油には 5 倍希釈を行いました。したがって、QC サンプルのスパイク濃度は、マトリックスごとの希釈倍率と要求される LOQ の両方を考慮して計算しました。あらかじめ作成した検量線を用いて正確な定量を行うためには、検量線用標準液中の ISTD 濃度に合わせて、最終的な ACN 抽出液中の ISTD の理論濃度を 0.2 ng/mL に保つことが不可欠です。EMR によるクリーンアップ前にサンプルの ACN 抽出液を 10 % の水で希釈するという条件を検量線用標準液でも再現することで (「溶液および標準液」を参照)、最終的なサンプル濃度の計算に影響を与えないようにしました。

表 5. コーヒー、プロテインパウダー、および魚油のバリデーションパッチ用に調製されたマトリックス適合 QC サンプルとマトリックスゼロサンプル

サンプル (g)	プロテインパウダー				粉末コーヒー				魚油			
	サンプルマトリックスへのスパイク濃度 (µg/kg)											
希釈係数	10				10				5			
マトリックススパイク済みサンプル	PFAS 21 種	PFAS 8 種	PFPeA	ISTD	PFAS 21 種	PFAS 8 種	PFPeA	ISTD	PFAS 21 種	PFAS 8 種	PFPeA	ISTD
ゼロ	--	--	--	2.0	--	--	--	2.0	--	--	--	1.0
QC 1	0.05	0.2	0.1	2.0	0.02	0.08	0.04	2.0	0.025	0.1	0.05	1.0
QC 2	0.08	0.4	0.2	2.0	0.05	0.2	0.1	2.0	0.05	0.2	0.1	1.0
QC 3	0.5	2.0	1.0	2.0	0.5	2.0	1.0	2.0	0.25	1.0	0.5	1.0
QC 4	2.0	8.0	4.0	2.0	2.0	8.0	4.0	2.0	1.0	4.0	2.0	1.0
QC 5	10.0	40.0	20.0	2.0	10.0	40.0	20.0	2.0	2.0	8.0	4.0	1.0

PFAS 化合物 8 種には PFBA、HFPO-DA、DONA、4:2 FTS、6:2 FTS、8:2 FTS、9Cl-PF3ONS、11Cl-PF3OUdS が含まれます。

スパイク後、すべてのサンプルをボルテックスで2～3分間攪拌して平衡化しました。その後、サンプルは、開発した手順（図1を参照）で抽出できる状態になります。

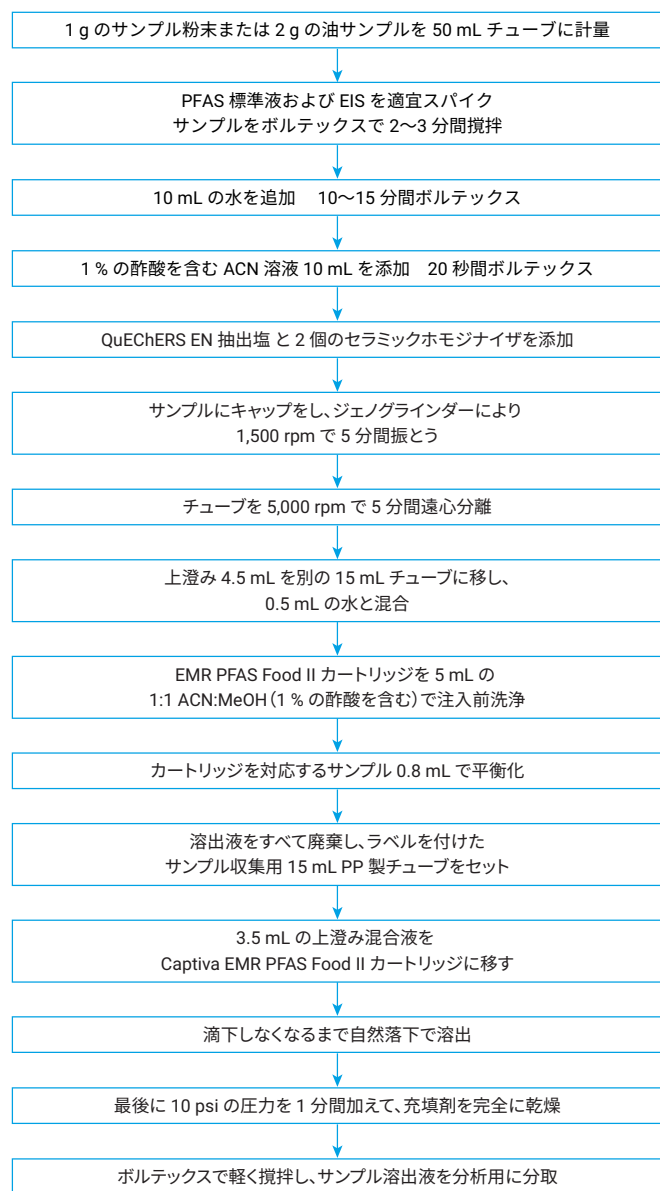


図 1. サンプル前処理手順：QuEChERS 抽出に続いて Agilent Captiva EMR PFAS Food II カートリッジによる EMR ミックスモードパススルークリーンアップを実行

結果と考察

LC/TQ 機器メソッド

本研究で用いた MS 検出条件は既報のメソッドに基づくものですが^{3, 5}、リテンションタイムウィンドウは変更しました。このほか、LC メソッド側にも改良を加えています。具体的には、LC メソッドで使用した LC カラムは既報のメソッドと同じですが、移動相 B、グラジエント条件、注入プログラムは異なります。改良版 LC メソッドでは、非標識ターゲットおよび ISTD 化合物について、取り込みウィンドウ内でより良好なクロマトグラムが得られました。また、一部のターゲットはクロマトグラフィーによりその同位体とより明確に分離され、PFOS と食品由来のコール酸干渉物質がベースライン分離されました。図 2 に、部分的に同定された全ターゲットと ISTD のピークのクロマトグラム (A)、および PFOS 同位体とコール酸干渉物質のクロマトグラム (B) を示します。リテンションタイムウィンドウにわたってピーク分布が改善され、重要なターゲットが、干渉する可能性のあるマトリクス成分からベースライン分離されていることがわかります。さらに、高割合の ACN で抽出されたサンプルを Feed 注入モードで 10 μ L 注入することで、わずかに広いピークを示した PFBA を除くすべての成分について優れたピーク形状が得られました。ただし、ピーク形状とレスポンスは一貫して維持されたため、信頼性の高い積分が可能でした。

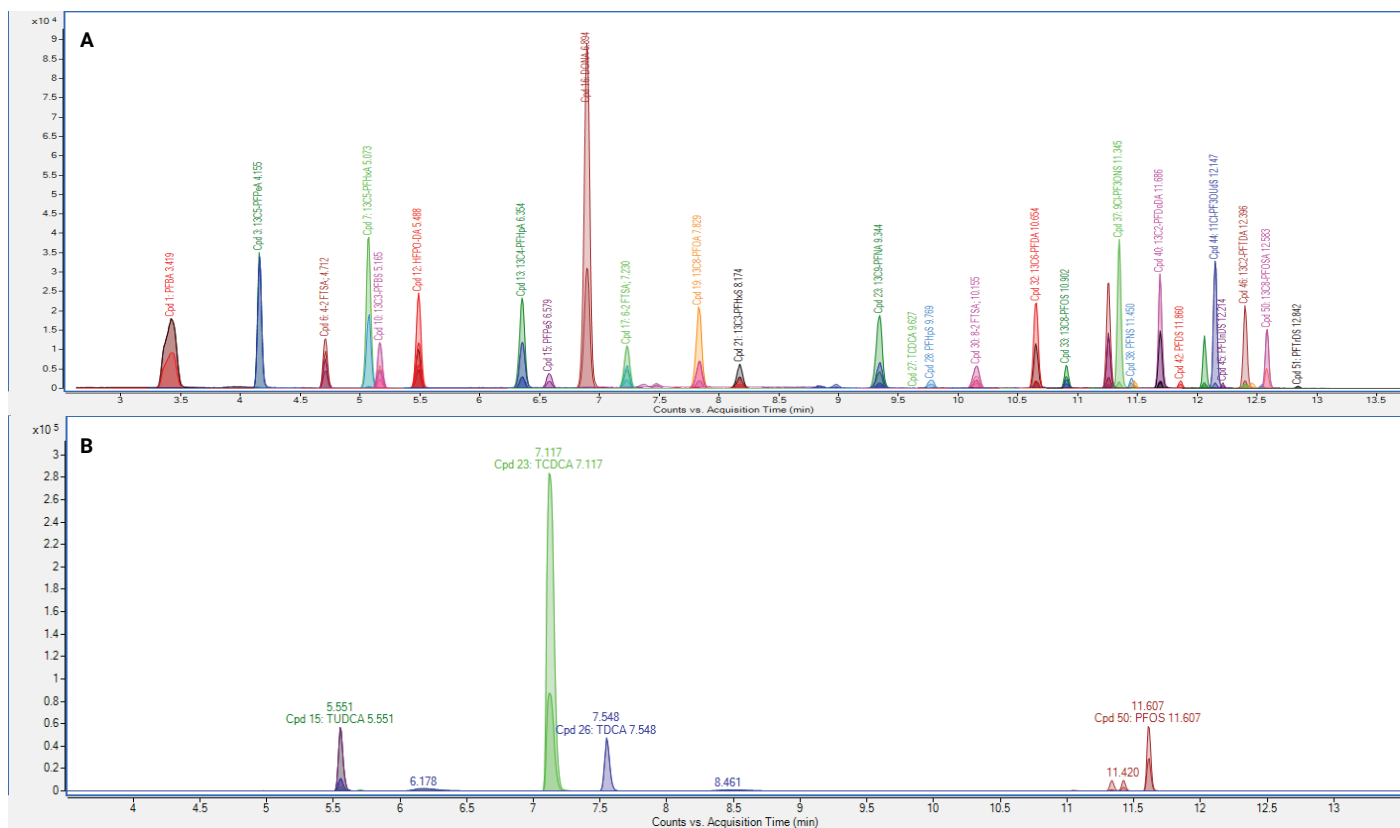


図 2. MRM クロマトグラム：(A) すべての PFAS 成分と ISTD 化合物、(B) PFOS とコール酸 (TUDCA、TCDCA、TDCA)

サンプル前処理手順

サンプル前処理は、全体的には以前確立されたプロトコルに従い、改良をいくつか加えました。第一に、サンプル量を、プロテインパウダーと粉末コーヒーは 1 g に減らし、魚油は 2 g にしました。プロテインパウダーはそれほど複雑ではありませんが、粘性が高く、ACN を吸収しやすい性質があります。サンプル量を増やすと (1 g 超)、塩分配後の ACN 層の大幅な損失につながります。粉末コーヒーは、乾燥していて、色素と脂質/油分を豊富に含む、より複雑な濃縮マトリックスです。魚油は最も困難な油系マトリックスの 1 つと考えられています。EMR パススルークリーニングによって十分にクリーニングされました。そのため、魚油はより多いサンプル量 (2 g) を使用しました。

第二に、QuEChERS 抽出後に得られた未精製の ACN 抽出液を 10 % の水で希釈し、Captiva EMR PFAS Food II カートリッジによるパススルークリーニングを行いました。元のプロトコルではロード量 5 mL を使用していますが、3.5 mL に減らしました。この調整により EMR カートリッジが飽和する可能性が回避され、成分の回収率を損なうことなくクリーニング効率向上しました。大量の溶出液を必要としない直接注入を用いたことも、このようなロード量の低減が可能になった要因です。

第三に、EMR によるクリーニング後の溶出液を LC/TQ 分析のため直接注入しました。この結果、乾燥や水による再溶解または追加希釈は不要でした。後処理ステップ、特に乾燥ステップを排除することで、ワークフローがさらに効率化され、全体的なサンプル前処理時間が最大 50 % 短縮されました。

メソッドバリデーション

PFAS バックグラウンドに対するメソッドの選択性：操作ブランク (PB) は一定量の MilliQ 水を使用して調製し、サンプル前処理プロトコルの全プロセスを適用しました。1 つまたは 2 つの操作ブランクを各マトリックスバリデーションバッチに含めました。AOAC SMPR 2023.003 では、要求される最小 LOQ が主要な PFAS ターゲット 4 種については 0.01 µg/kg、PFBA および PFPeA については 1 µg/kg、その他の PFAS については 0.1 µg/kg とされています。これに対し、EU リファレンスガイドで主要なターゲット 4 種に対して規定されている LOQ はさらに低く、同じマトリックスで 0.001 ~ 0.004 µg/kg です。

第一に、検出された主要なターゲット 4 種 (PFHxS、PFOA、PFOS、PFNA) はどの PB でもすべて 0.001 µg/kg のレベルを下回っていました。第二に、その他すべての PFAS ターゲットについて、PB 中のバックグラウンドレベルが十分に低く、要求されるメソッド LOQ を満たすことが確認されました。第三に、PFBA は 0.005 µg/kg 未満の濃度で検出されました。これは、要求される最小 LOQ である 1 µg/kg にもとづく許容しきい値 0.3 µg/kg を大きく下回っています。

PFAS バックグラウンドに対するメソッドの選択性：主な課題の 1 つは食品マトリックスブランクの適合性でした。これは、マトリックスブランクサンプル中の PFAS 残留物の検出に共通する課題です。テストした 3 種類の食品マトリックスのうち、PFAS バックグラウンドコンタミネーションがまったくないものは皆無でした。これは主に、分析メソッドのきわめて低い検出下限と、食品マトリックス中に PFAS が幅広く存在することによるものです。さまざまな食品にわたり、マトリックスブランクで共通して観察された PFAS コンタミネーションには 4:2 FTS、6:2 FTS、PFOA、PFNA、PFOS などがありませんでした。PFAS が検出された頻度はプロテインパウダーが最も高く、次いで魚油でした。粉末コーヒーは最も低いバックグラウンドコンタミネーションを示しました。特に、プロテインパウダーおよび魚油では非常に高濃度の 6:2 FTS が検出され、これが実験の LOQ サンプルに対する LOQ の決定と定量結果に影響をおよぼしました。

メソッド LOQ：メソッド LOQ を、リテンションタイム、クオリファイア成分の S/N 比、定量成分とクオリファイア成分の比率、ターゲット回収率、再現性などのターゲット同定パラメータを含む許容基準をすべて満たした、実験的に設定された最小の QC スパイクレベルとして定義しました。前述のとおり、特にテスト対象のすべての食品マトリックスで共通して PFAS 化合物が検出される場合には、メソッド LOQ の測定は MB の適合性に密接に関係します。そこで、MB で検出された成分の濃度が LOQ 実験値の 30 % 未満の場合にマトリックスの適合性が許容可能と定義し、そのようなマトリックスでは LOQ 実験値をメソッド LOQ として報告しました。MB での検出が許容しきい値を超えた場合は、LOQ 実験値を、定量性能不足のため無効とみなしました。これらのマトリックスのメソッド LOQ は、テスト対象の MB の 7 回の繰り返し分析にもとづいて式 1² により計算しました。

式 1.

$$LOQ_{cal} = SD_{MBs} \times 10$$

ここで、 LOQ_{cal} は、マトリックスブランクでの PFAS の検出にもとづいて計算された LOQ です。 SD_{MBs} は、MB サンプルの 7 回の繰り返し分析で検出された PFAS 濃度の標準偏差 (SD) です。

表 6 に、すべてのマトリックスブランクのテスト結果、報告された PFAS ターゲットの LOQ、それが実験値か計算値か、および AOAC SMPR で要求される LOQ をまとめます。マトリックスブランクで観察された PFAS の検出は、リテンションタイムとクオリファイア成分の比率基準にもとづいて確認しました。

前述のとおり、粉末コーヒーのマトリックスブランクは最も低い PFAS バックグラウンドを示しました。約 0.05 µg/kg で検出されたのは PFOA と 6:2 FTS のみでした。6:2 FTS について報告された LOQ は、より高い値だった QC スパイクレベルの実験値にもとづいています。PFOA については、必要なしきい値を下回った LOQ の計算値が使用されています。一方、魚油のマトリックスブランクはわずかに高い PFAS バックグラウンドレベルを示しました。

表 6. 粉末コーヒー、プロテインパウダー、および魚油に含まれる PFAS 成分 30 種のマトリックスブランクでの検出、報告された LOQ、要求される LOQ

ターゲット	マトリックスブランクでの検出と食品マトリックスにおけるメソッド LOQ (µg/kg)								
	粉末コーヒー			プロテインパウダー			魚油		
	MB	報告された LOQ	要求される LOQ	MB	報告された LOQ	要求される LOQ	MB	報告された LOQ	要求される LOQ
PFBA	ND	2.0	≤ 3	0.068	0.32	≤ 1	0.032	0.2	≤ 5
PFPeA	ND	1.0	≤ 3	0.011	0.16	≤ 1	0.005	0.005	≤ 5
PFBS	ND	0.05	≤ 3	ND	0.08	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
4:2 FTS	0.002	2.0	≤ 3	0.014	2	≤ 0.8	0.006	0.1	≤ 5
PFHxA	0.001	0.5	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
PFPeS	ND	0.02	≤ 3	0.037	0.5	≤ 0.8	0.014	0.25	≤ 5
HFPO-DA	ND	0.2	≤ 3	ND	0.2	≤ 0.8	ND	0.1	≤ 5
PFHpA	ND	0.5	≤ 3	0.011	0.5	≤ 0.8	0.004	0.025	≤ 5
PFHxS	ND	0.02	≤ 0.3	0.021	0.05*	≤ 0.08	0.002	0.025	≤ 0.5
DONA	0.002	0.08	≤ 3	0.010	0.2	≤ 0.8	0.005	0.1	≤ 5
6:2 FTS	0.053	2.0	≤ 3	0.808	1.87*	≤ 0.8	0.563	0.13*	≤ 5
PFOA	0.048	0.07*	≤ 0.3	0.028	0.05*	≤ 0.08	0.012	0.01*	≤ 0.5
PFHpS	ND	0.05	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
PFNA	ND	0.05	≤ 0.3	0.020	0.02*	≤ 0.08	ND	0.025	≤ 0.5
PFOS	ND	0.02	≤ 0.3	0.065	0.04*	≤ 0.08	ND	0.025	≤ 0.5
9Cl-PF3ONS	ND	0.08	≤ 3	ND	0.2	≤ 0.8	ND	0.1	≤ 5
8:2 FTS	ND	0.08	≤ 3	ND	0.2	≤ 0.8	ND	0.1	≤ 5
PFDA	ND	0.02	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
PFNS	ND	0.02	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
PFDS	ND	0.05	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
PFUnDA	ND	0.02	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
PFOSA	ND	0.05	≤ 3	ND	0.08	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
11Cl-PF3OUdS	ND	0.08	≤ 3	ND	0.2	≤ 0.8	ND	0.1	≤ 5
PFUnDS	ND	0.02	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.05	≤ 5
PFDoDA	0.001	0.05	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
10:2 FTS	ND	0.05	≤ 3	ND	0.08	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
PFDoS	ND	0.05	≤ 3	ND	0.05	≤ 0.8	ND	0.025	≤ 5
PFTrDA	0.001	0.05	≤ 3	ND	0.08	≤ 0.8	ND	0.05	≤ 5
PFTrDS	ND	0.05	≤ 3	ND	0.08	≤ 0.8	ND	0.05	≤ 5
PFTeDA	ND	0.5	≤ 3	ND	0.08	≤ 0.8	0.009	0.05	≤ 5

赤字は、許容基準を満たしていない結果を示します。

ND = 不検出

* = LOQ 計算値

太字 = 主要な PFAS ターゲット

大半の検出は 0.02 µg/kg 未満でしたが、PFBA と 6:2 FTS は例外で、特に 6:2 FTS は高い濃度を示しました。6:2 FTS および PFOA については、LOQ 計算値が報告されています。コーヒーおよび魚油は、LOQ しきい値が比較的高いため、実験値が計算値にかかわらず、すべての LOQ が要求される下限を下回りました。プロテインパウダーのマトリックスは最も高い PFAS バックグラウンドを示し、その検出の頻度と程度が高くなりました。この結果、算出される LOQ が増加し、6:2 FTS については要求される LOQ が満たされませんでした。

メソッドの回収率と再現性：3 種類のマトリックスについて、5 種類のプレスバイク QC レベルを使用して 1 レベルあたり 6 回の繰り返し分析を実行し、メソッドの回収率と再現性のバリデーションを行いました。最終的なバリデーション結果は、マトリックスごとに 3 種類の QC レベル (LOQ、中、高) で報告しました。LOQ 計算値を使用する場合は、その LOQ レベルでの回収率と RSD の報告に、LOQ 計算値に最も近いスパイク QC レベルを選択しました。中レベル QC の結果は LOQ の 5 ~ 20 倍の濃度に相当し、高レベル QC の結果は LOQ の 50 ~ 100 倍の濃度を表しています。

メソッドのバリデーション結果を図 3 (粉末コーヒー)、図 4 (プロテインパウダー)、および図 5 (魚油) にまとめます。各図で、背景が緑色の領域は回収率の許容ウィンドウを表し、青色の領域は RSD の許容ウィンドウを示します。また、実線は、3 種類の QC レベルで得られた回収率の結果、破線は RSD の結果を表します。これらの QC レベルは色分けされており、緑色が LOQ、紫色が中レベル QC、青色が高レベル QC の結果です。マトリックスブランクで成分が検出された場合は、成分の回収率を計算するためにブランクのバックグラウンドを補正しました。

3 種類のスパイクレベルで、すべての PFAS ターゲット成分について、許容可能な回収率と RSD の結果が報告されました。中レベルおよび高レベル QC では、3 種類のマトリックスに含まれる全成分が優れた回収率 (80 ~ 120 %) と低い RSD (10 % 未満) を示しました。LOQ レベルでは、80 % 未満または 120 % を超える回収率や 10 % を超える RSD も見受けられました。以上の結果から、このメソッドにより、粉末コーヒー、プロテインパウダー、および魚油中の PFAS 30 種について、AOAC SMPR 要件を満たした真度と精度に優れた定量測定を高い信頼性で行えることが確認されました。

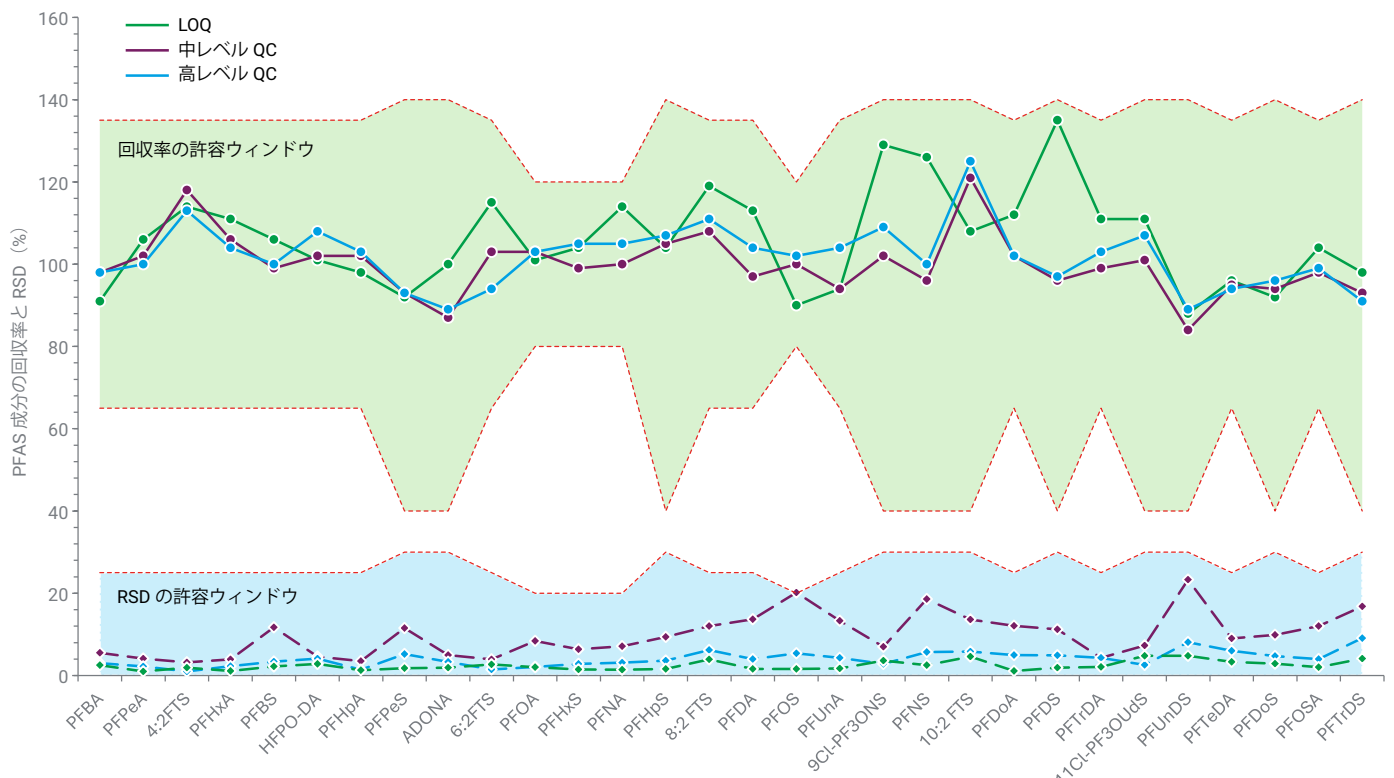


図 3. 粉末コーヒー中の PFAS 30 種に関するバリデーション結果のまとめ。許容基準は AOAC SMPR 2023.003 にもとづいています。

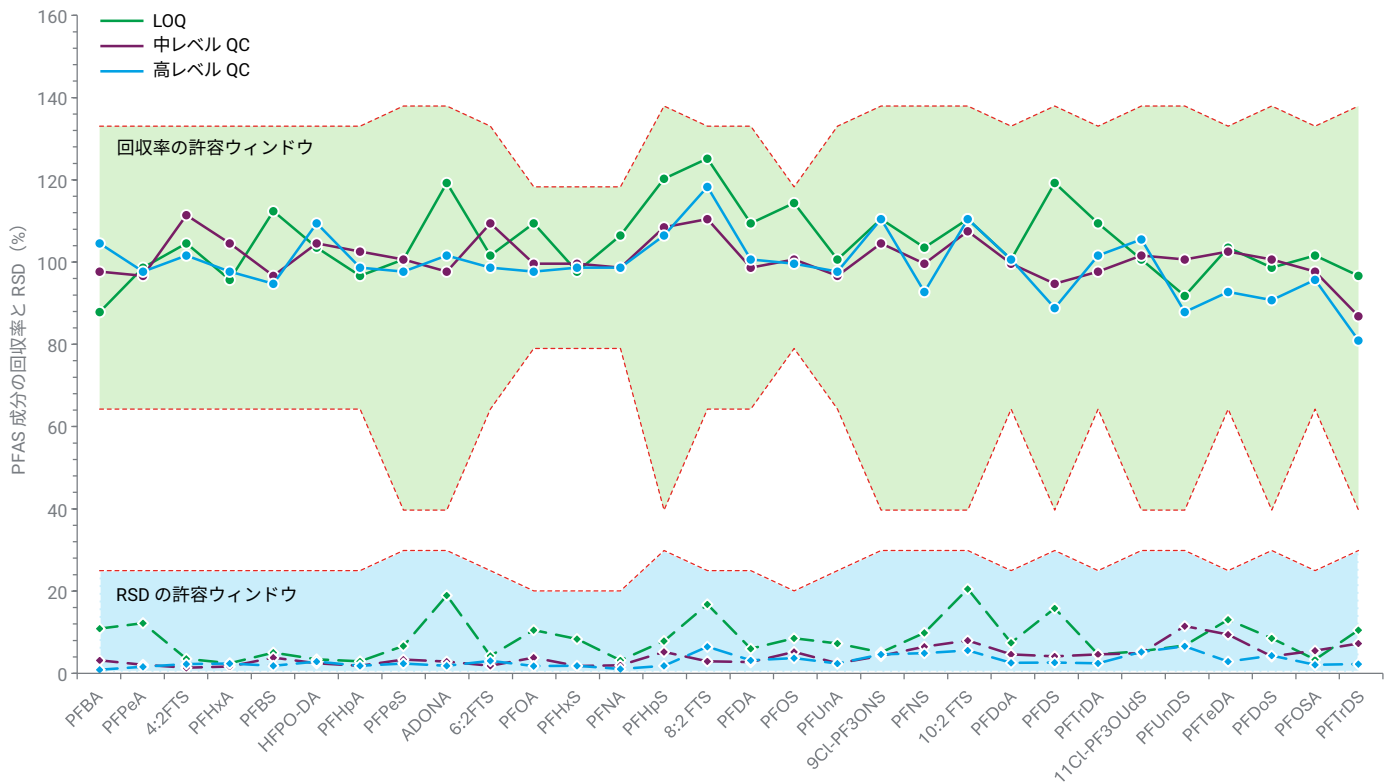


図 4. プロテインパウダー中の PFAS 30 種に関するバリデーション結果のまとめ。許容基準は AOAC SMPR 2023.003 にもとづいています。

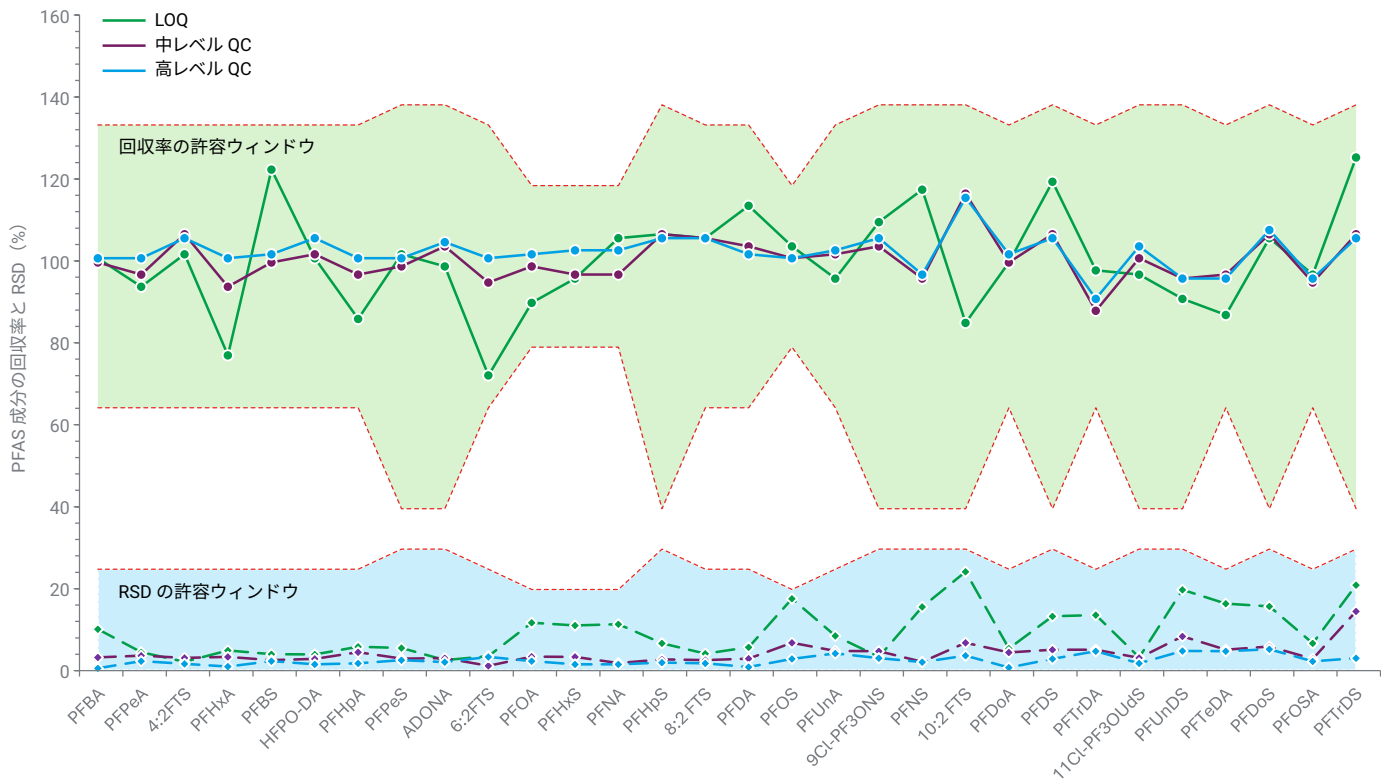


図 5. 魚油中の PFAS 30 種に関するバリデーション結果のまとめ。許容基準は AOAC SMPR 2023.003 にもとづいています。

結論

シンプルで迅速かつ信頼性の高いメソッドを開発し、粉末コーヒー、プロテインパウダー、および魚油中の 30 種類の PFAS ターゲットについてバリデーションを実施しました。この新しいメソッドでは、QuEChERS 抽出に続いて Captiva EMR PFAS Food II によるパススルークリーンアップを行った後、LC/TQ による検出を行います。このサンプル前処理アプローチはシンプルさ、堅牢性、コスト効率を特長とし、時間とリソースを大幅に削減できます。また、メソッドが、AOAC SMPR 2023.003 ガイドラインに要約されている許容基準を満たしていることをバリデーションにより確認しました。本研究により、AOAC SMPR 2023.003 で要求される全 11 カテゴリーの食品にわたって EMR-LC/MS/MS メソッドが有効であることの確認が完了しました。

参考文献

1. EUR-Lex (2023) Consolidated text: Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006.
2. AOAC (2023) Standard Method Performance Requirements (SMPRs) for Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Produce, Beverages, Dairy Products, Eggs, Seafood, Meat Products, and Feed (AOAC SMPR 2023.003)
3. Zhao, L.; Giardina, M.; Parry, E. 乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵中の 30 種類の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の測定, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-7366JAJ, **2024**.
4. Zhao, L.; Giardina, M.; Parry, E. 離乳食中の 30 種類の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の測定, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-7367JAJ, **2024**.
5. Zhao, L.; Giardina, M.; Parry, E. 牛肉、マグロ、エビ中の 30 種類の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の測定, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-7368JAJ, **2024**.
6. Zhao, L.; Giardina, M. 果物、野菜、ジュース中の 30 種類の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の測定, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-7369JAJ, **2024**.
7. Zhao, L.; Giardina, M.; Parry, E. ウシ腎臓中の 30 種類の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の測定, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-7370JAJ, **2024**.
8. Zhao, L.; Giardina, M.; Parry, E. 乾燥大豆中の 30 種類の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の測定, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-7371JAJ, **2024**.

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。

DE-009083

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, September 9, 2025

5994-8610JAJ