

Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS システムを用いた野菜中 PFAS 一斉分析における試料精製法の検討

著者

滝埜 昌彦

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

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）は、優れた撥水性と撥油性の両性質を有していることから、さまざまな分野で利用されています。一方で、これら化合物は安定性と難分解性のために生態系や人間への暴露が懸念されています。食品に関しては、食品安全委員会が2024年に、PFOS/PFOAの耐容一日摂取量（TDI）を20 ng/kg 体重/1日と設定しました。既報¹⁾で作物中PFAS分析に多機能カラムである Captiva EMR Food Food I を用いた精製法を報告しました。このアプリケーションノートでは野菜中PFASの分析に固相抽出カラムを組み合わせた方法による試料前処理法および大量注入 LC/TQ 法を用いた高感度一斉分析法を紹介します。

はじめに

既報¹⁾で作物中 PFAS 分析に相分離抽出法と多機能カラムを用いた簡便な試料前処理法を報告しましたが、より精製効果が高い方法として作物中色素を除去するカーボンカラムと極性化合物を除去する弱アニオン交換（WAX）カラムを組み合わせた方法があります。しかし、従来型のグラファイトカーボンは炭素数の大きな PFAS 類は吸着し、パズスルー型としての使用ができません。一方、アジレント製 Carbon S は炭素含有量と細孔構造を最適化した先進のハイブリッド炭素材料で炭素数の大きな PFAS 類の吸着が無くパズスルー型カラムとして使用が可能です。

そこでこのアプリケーションノートでは、Bond Elut Carbon S と Bond Elut PFAS WAX を組み合わせた試料前処理法と LC/TQ 法による野菜中 PFAS の高感度分析を検討した結果について報告します。

測定システム

- Agilent 1260 Infinity III LC システム
- G7104C フレキシブルポンプ
- G7167C ハイブリッドマルチサンブラ
- G7116B マルチカラムサーモスタット
- Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS

試料前処理

今回測定対象とした化合物は ISO 21675:2019 にて規定されている PFAS 29 成分とし、標準物質混合溶液は Wellington Laboratories 社より購入しました。検量線作成のため、混合溶液を 0.056 % アンモニア/メタノールで希釈し、濃度 0.2 ~ 100 ng/L の溶液を調製しました。コンタミネーションを防ぐため、バイアルはポリプロピレン製のものをを用いました。

野菜は市場で購入したズッキーニ、キュウリ、ナスおよびホウレン草を使用しました。予め Retsch 製 GRINDMIX GM200 で粉碎した試料は、既報²⁾と同様に QuEChERS 抽出キット（P/N：5982-5650CH）を使用し 50 mL 遠沈管に正確に秤量（10 g）し、付属のセラミックホモジナイザおよび 1 % 酢酸含有アセトニトリル（15 mL）を添加し 60 秒間激しく振とうすることで抽出しました。その後、付属の塩（4 g 硫酸マグネシウム、1 g 塩化ナトリウム、1 g クエン酸ナトリウムおよび 0.5 g クエン酸二ナトリウムセスキ水和物）を添加し 60 秒間激しく振とう後、遠心分離（4000 rpm/5 分）を行いました。

上記抽出法で得られた粗抽出液は色素および非イオン性マトリックス成分を除去する目的で Bond Elut Carbon S（250 mg/6 mL）（P/N：5610-2082）および Bond Elut PFAS WAX（150 mg/6 mL）（P/N：5610-2150）で精製を行いました。精製方法は図 1 に示した通り、粗抽出液は Bond Elut Carbon S に負荷し全量を捕集しました。この捕集液はアセトニトリル溶液であることから更なる WAX による精製のため、純水で 2 倍希釈しました。この精製液-1 は Bond Elut PFAS WAX に負荷し、メタノールで洗浄後（洗浄液は捕集、定容およびろ過後中性 PFAS 測定）、0.056 % アンモニア/メタノール液で溶出、定容（2 mL）し 0.45 μm のフィルター（P/N：5190-5107）でろ過後、LC-MS に供しました。

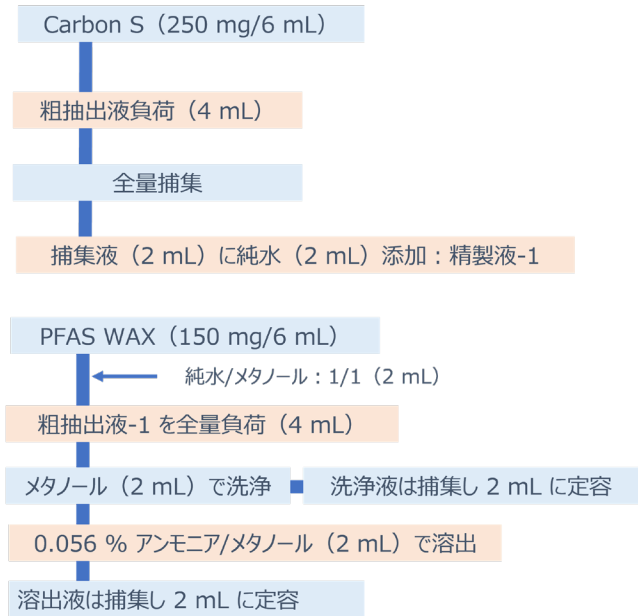


図 1. Carbon S および PFAS WAX を用いた野菜中 PFAS の精製法

分析条件

分析条件は既報¹⁾の通りで、主な条件は表 1 に示しました。

表 1. 分析条件

LC	1260 Infinity III Prime LC システム
注入量	30 μL Feed 注入
Feed 注入条件	Feed 速度：20 μL/min フラッシュアウト容量：20 μL
流量	0.2 mL/min
分析カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD (2.1 mm x 100 mm, 1.8 μm) (P/N：959758-902)
ディレイカラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm × 50 mm, 5 μm) (P/N：959946-902)
カラム温度	40 °C
移動相	A：2 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B：メタノール
グラジエント	1 %B/1 min→ (4 min) →40 %B→ (35 min) →100 %B
試料溶媒	0.056 % アンモニア/メタノール
MS	Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS システム
イオンソース	Agilent Jet Stream (AJS-ESI)
極性	ネガティブ
測定モード	ダイナミック MRM モード
乾燥ガス設定	200 °C，10 L/min
シースガス設定	350 °C，12 L/min
ネブライザー (psi)	20
キャピラリー電圧 (V)	3000
ノズル電圧 (V)	0

結果

固相抽出

今回、精製に使用した固相抽出カラムの Bond Elut Carbon S と Bond Elut PFAS WAX について溶出プロファイルの確認を行いました。Bond Elut Carbon S は試料マトリックスをカラムに吸着除去するパススルー型固相抽出カラムであることから標準液をカラムに負荷し、その後 1 mL 毎に捕集しました (Fr.1 ~ Fr.4)。さらに、0.056 % アンモニア/メタノール (1 mL) で追加溶出、捕集 (Fr.5) しました。一方、Bond Elut PFAS WAX は測定対象化合物をカラムに保持させて試料マトリックスを除去するカラムであることから、予め純水でコンディショニングしたカラムに標準液 (50 % メタノール水溶液) を負荷 (Fr.1) 後、メタノール (Fr.2)、0.056 % アンモニア/メタノール (Fr.3) 各 1 mL で溶出、捕集しました。各固相抽出カラムの溶出プロファイルは、各フラクションの回収率から作成しました。

結果は図 2 に示しました。

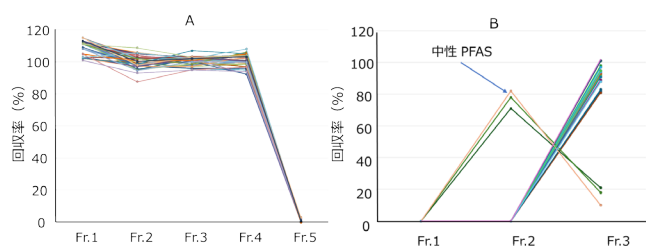


図 2. 固相抽出カラムによる溶出プロファイル
A : Bond Elut Carbon S, B : Bond Elut PFAS WAX

その結果、Bond Elut Carbon S では、Fr.1 から全 PFAS が溶出し、Fr.4 まで良好な回収率でした。また、Fr.5 では PFAS は溶出しなかったことから、追加溶出を必要としない、パススルーによる精製 (色素除去) が可能でした。Bond Elut PFAS WAX では、試料負荷時の破かはほとんど観察されず、メタノール (Fr.2) では中性 PFAS である N-EtFOSA、N-MeFOSA および FOSA が 80 % 以上溶出しましたが、イオン性 PFAS は溶出しませんでした。Fr.3 ではイオン性 PFAS が 80 % 以上溶出しました。

以上の結果から 2 種類の固相抽出カラムを使用した試料抽出液の精製は図 1 の通りとしました。中性 PFAS はメタノール洗浄液を捕集、定容して測定しました。

図 3 および図 4 は Carbon S と PFAS WAX を使用した試料精製法によるマトリックス効果と添加回収率を示しましたが、マトリックス効果は相対強度で 80 ~ 120 % の範囲内、添加回収率も 80~120 % の範囲内と良好な結果でした。

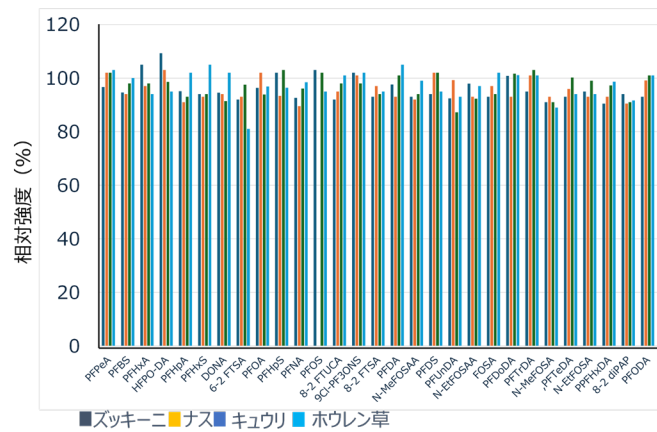


図 3. Carbon S および PFAS WAX を使用した試料精製法によるマトリックス効果
相対強度=試料の精製液に標準液を後添加した検液の強度/標準液の強度×100

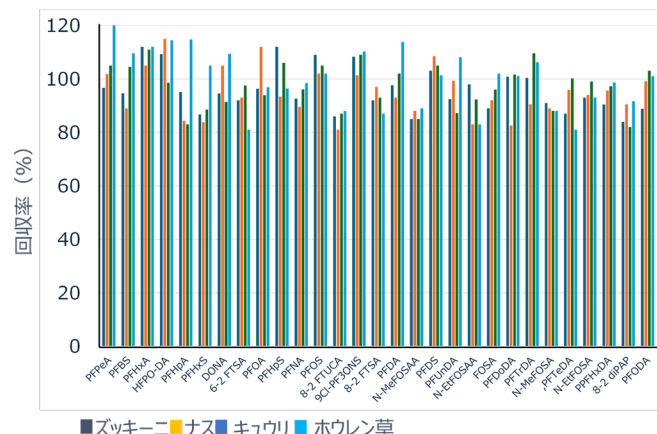


図 4. Carbon S および PFAS WAX を使用した試料精製法による回収率
回収率=標準液を添加した試料を精製した検液の強度/試料の精製液に標準液を後添加した検液の強度×100

図 5 は各野菜抽出液を精製した前後の Scan モードによるトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示しました。

その結果、精製前の TIC (A) と比較して Carbon S のみ (B) では色素は除去できましたが、TIC で観察されるピークの顕著な違いは認められませんでした。一方、Carbon S で精製した精製液-1 をさらに PFAS WAX で精製した精製液 (C) では保持時間の遅い部分に溶出する脂肪酸類は観察されましたが、保持時間の早い領域のピークは顕著に減少しました。これらは、中性マトリクス成分と推定され PFAS WAX で除去できたと考えられます。

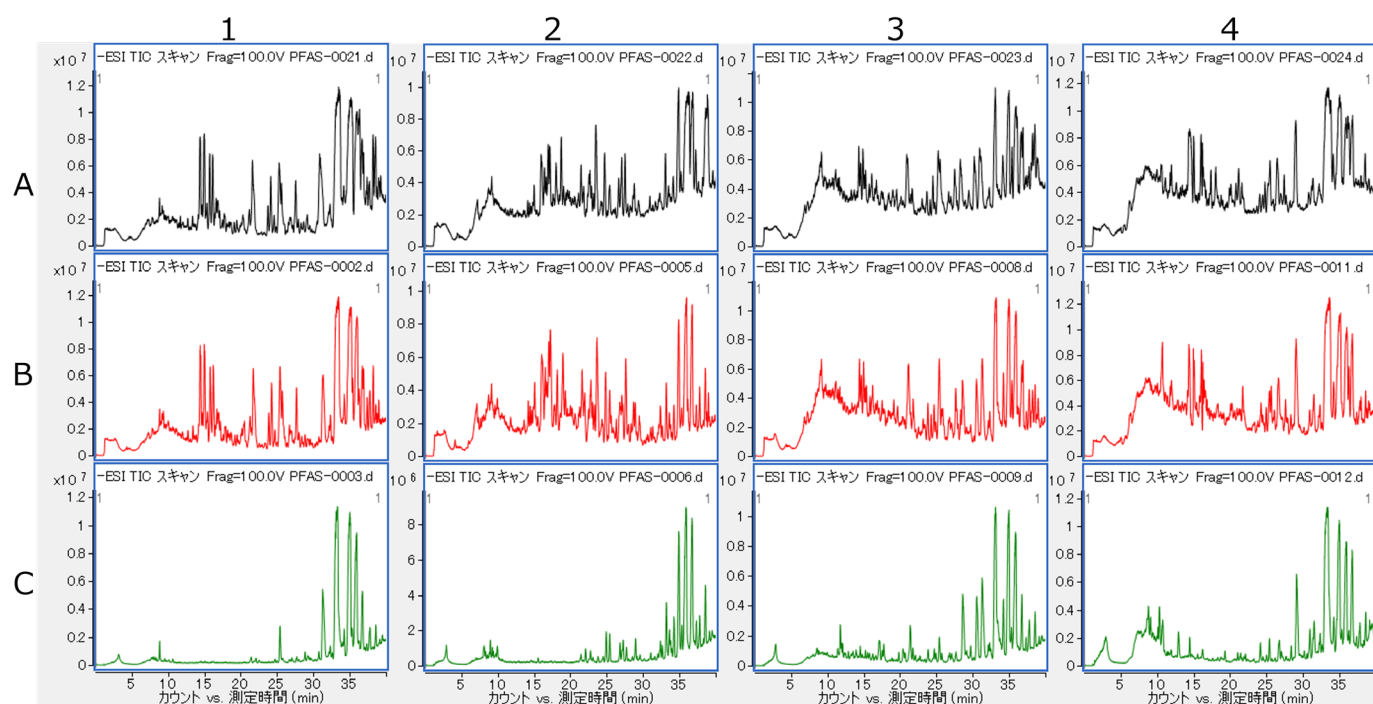


図 5. 各野菜の精製前後での TIC

1: ブロッコリー, 2: ナス, 3: キュウリ, 4: ホウレン草

A: 粗抽出液, B: Carbon S 精製液-1, C: Carbon S+PFAS WAX 精製液

図 6 は抽出も含めた全試料前処理工程での各野菜中 29 種 PFAS の回収率を示しましたが、全ての PFAS の回収率が 79 ～ 116 % と良好でした。

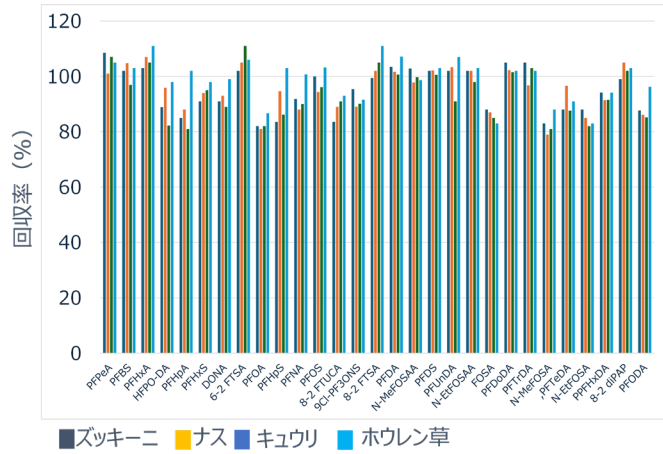


図 6. 全試料前処理工程での回収率
回収率=標準液を添加した試料を抽出精製した検液の強度/標準液の強度×100

図 7 には各野菜 4 種 PFAS の MRM クロマトグラムを示しました。各 PFAS の S/N は 75 ～ 286 で、定量下限値は 0.35 ～ 1.33 ng/kg でした。

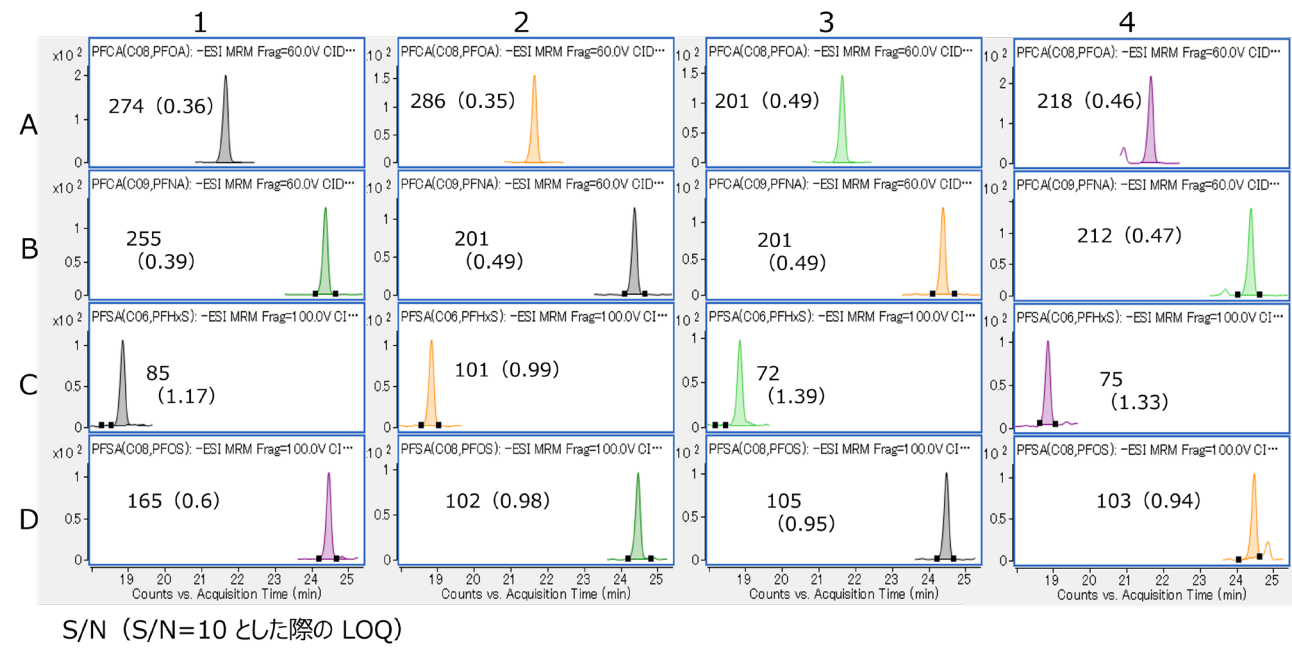


図 7. 全野菜中 4 種 PFAS の MRM クロマトグラム
濃度 : 10 ng/kg

まとめ

本アプリケーションノートでは試料精製に Bond Elut Carbon S と Bond Elut PFAS AWAX を使用し、LC/TQ に Infinity III ハイブリッドマルチサンブラの Feed 注入法を用いることで、精製効果の高い試料前処理が可能となり野菜（ズッキーニ、ナス、キュウリ、ホウレン草）中 29 種 PFAS の高感度分析が可能でした。

野菜中 4 種 PFAS（PFOA、PFNA、PFHxS および PFOS）の定量下限値は 0.35 ～ 1.33 ng/kg でした。

参考文献

- 1) Agilent 6475 LC/MS システムおよび新規固相抽出カラムを用いた作物中 29 種 PFAS の高感度一斉分析法 5994-8271JAJP
- 2) Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS システムを用いた作物中農薬スクリーニング法の評価 5994-6221JAJP.

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。

DE-006135

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2025
Printed in Japan, May 15, 2025
5994-8391JAJP