

UHPLC ハイフネーテッドトリプル四重極 タンデム質量分析*を用いた動物由来食品 マトリックス中の PFOS および PFOA の 定量

アプリケーションノート

食品

著者

Dunming Xu, Shuang Zhou, Yu Zhou,
Xiamen Entry-Exit Inspection and
Quarantine Technical Centre, Xiamen
361026, China

Meiling Lu, Shan Zhou, WW Food Team
China Segment, Agilent Technologies,
Beijing 100102, China

Xiaogang Chu, China Academy of
Inspection and Quarantine, Beijing,
100123, China

概要

Agilent UHPLC 1290 ハイフネーテッドトリプル四重極 6460 タンデム質量分析計を用いて、食品中のペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) およびペルフルオロオクタン酸 (PFOA) を同時に定量する超高感度メソッドを開発しました。まず、メタノールを用いてサンプルを抽出したのち、弱アニオン交換カートリッジを用いて精製しました。それにより得られた溶液を、逆相 UHPLC 分離およびトリプル四重極 MRM 検出により分析しました。PFOA と PFOS の直線ダイナミックレンジは、それぞれ 0.01~10 ng/mL および 0.1~40 ng/mL で、直線相関係数は 0.999 以上でした。検出下限 (LOD) (シグナル/ノイズ比 (S/N) = 3) はそれぞれ 0.002 および 0.02 µg/kg、定量下限 (LOQ) (S/N=10) は 0.01 および 0.1 µg/kg でした。魚、エビ、卵の各マトリックスにおける 3 種類の濃度の平均添加回収率は 79.2%~113.1% で、相対標準偏差 (RSD) は 3.2~10.7% (n=6) の範囲内でした。複数ラボ間のバリデーションにより、メソッドの精度と信頼性がさらに実証されました。ここで開発したメソッドには、高感度、高回収率、優れた選択性という利点があります。そのため、動物由来食品中の PFOA および PFOS のルーチン分析への適用が可能です。

*初期研究は、2012 年の中国有機質量分析年次国内会議で発表されました。



Agilent Technologies

はじめに

ペルフルオロアルキル化合物 (PFAS) は、高度にフッ素化された脂肪族化合物で、高い温度安定性と化学安定性、表面活性を備えています [1]。数十年以上前から、保冷剤、麻酔剤、殺虫剤、除草剤、潤滑剤、コーティング剤など、工業生産分野で広く用いられています。また、加水分解、光分解、生物分解に対する耐性を備えているため、難分解性の有機汚染物質に分類されます。PFOA と PFOS は、産業由来の環境汚染物質として、食物連鎖中で検出されることが多くなっている主要化合物です。この2つの化合物は、水 [2,3]、土壌、シルト [4]、鳥類、魚類、その他の水性生物、卵白 [5,6] などのマトリックスで検出されています。生物蓄積により、PFOA および PFOS の人体曝露の危険性が高くなり、ヒトの母乳中からもこれらの化合物が検出されています [3]。

実験動物を用いた研究では、PFAS により、肝毒性、発達毒性、神経行動毒性、免疫毒性、生殖毒性、肺毒性、ホルモンへの影響など、さまざまな健康被害が生じることが明らかになっています [1]。最近の疫学研究では、PFAS の曝露が増大すると、児童の定期予防接種において、体液性免疫反応が低下することが指摘されています [7]。EFSA (欧州食品安全機関) は 2008 年に、1日あたりの耐容摂取量 (TDI) を PFOS については 150 ng/kg b.w.、PFOA については 1,500 ng/kg b.w. とすることを推奨しています [8]。そのため、食品中の PFAS の濃度のルーチン測定をおこなうためには、感度と選択性、信頼性の優れたメソッドを開発する必要があります。

食品中の PFAS の測定に関しては、環境分析に重点を置いて、多くのメソッドが開発されています。この研究では、中国全土の動物由来食品に含まれる PFOS および PFOA の濃度を測定するために、感度と精度の優れた高速参照メソッドを開発しました。

実験

試薬と試料

PFOA (MW: 414.10) と PFOS (MW: 538.22) を AccuStandard Inc. (米国) から購入しました。図 1 に分子構造を示しています。 $^{13}\text{C}_8$ -PFOA および 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 標準化合物を、それぞれ Wellington Laboratories Inc (ゲルフ、オンタリオ州、カナダ) および Cambridge Isotope Laboratories Inc (米国) から入手しました。HPLC グレードのメタノール、酢酸アンモニア、酢酸、アンモニア水を Fisher Scientific (フェアローン、ニュージャージー州、米国) から入手しました。実験全体をつうじて、Mill-Q 水を使用しました。その他の試薬は、すべて分析グレードのものを使用しました。

メタノールを用いて PFOA、PFOS、 $^{13}\text{C}_8$ -PFOA、1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS の標準溶液原液を作成し、最終濃度をそれぞれ 100.00、100.00、10.00、50.00 ng/mL としました。

標準溶液原液 (100 ng/mL) をメタノールで希釈して較正用標準を作成し、PFOA の最終濃度を 0.010、0.020、0.10、1.00、2.00、10.0 ng/mL、PFOS の最終濃度を 0.10、0.20、1.00、10.0、20.0、100.0 ng/mL としました。上述の較正用標準に $^{13}\text{C}_8$ -PFOA および 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS を添加し、最終濃度をそれぞれ 1.00 ng/mL および 5.00 ng/mL としました。

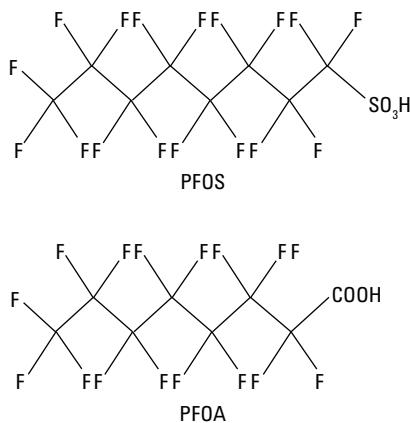


図 1. PFOS と PFOA の分子構造

魚、エビ、卵のサンプル

この実験では、魚、エビ、卵という3種類のマトリックスから得た多くのサンプルを使用しました。皮を除去したマトリックスをポリエチレン容器で混合し、-18 °C で冷凍して使用しました。サンプルの PFOS と PFOA の濃度を測定しました。PFOS および PFOA の濃度がもっとも低かったマトリックスを、回収率試験のブランクマトリックスとして使用しました。

サンプル前処理

まず、サンプル 5.00 g (± 0.01 g) を 1.0 ng ¹³C₄-PFOA および 5.0 ng 1, 2, 3, 4-¹³C₄-PFOS と混合し、較正用の内部標準としました。その後、メタノール 10 mL を用いてサンプルを抽出し、メタノール層を回収しました。メタノール 10 mL を用いて残留物をさらに 2 回抽出し、得られたメタノール層を 1 つにまとめました。1 つにまとめたメタノール抽出液を、最終濃度が 1 mL になるまで窒素により蒸発させました。その後、抽出物を 2 % メタノールで 5 mL に調整したのち、15 分間超音波処理を行ってから精製しました。

抽出したサンプルを、弱アニオン交換カラム (WAX) を用いて精製しました。まず、メタノール 2 mL と水 1 mL によりカラムを活性化させたのち、2 % 酢酸 2 mL により平衡化しました。その後、超音波処理したサンプルをカラムに移し、2 % 酢酸 2 mL を用いて洗浄し、メタノール 2 mL と 4 % アンモニア水 4 mL を用いて順次溶出しました。溶出液を回収し、窒素により溶媒を蒸発させました。残留物をメタノール 1 mL に再溶解し、分析しました。

LC および MS 条件

LC 構成および条件

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1260 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1200 シリーズオートサンブラサーモスタット (G1330B)
- Agilent 1200 シリーズカラムコンパートメント SL (G1316B)

カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 100 mm x 2.1 mm, 1.8 μm
カラム温度	30 °C
注入量	5 μL
ニードル洗浄	フラッシュポート (100 % メタノール)、5 秒
移動相	A = 5 mM 酢酸アンモニア水溶液 B = メタノール
グラジエント流量	0.2 mL/min

表 1 にグラジエント溶出プロフィールを示します。

表 1. グラジエント溶出プロフィール

時間	溶媒 A (%)	溶媒 B (%)
0	70	30
1.0	70	30
1.01	50	50
9.0	20	80
9.01	70	30
10.0	70	30

総分析時間: 10 分 (平衡化時間 1 分を含む)

MS 構成および条件

Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS、JetStream イオン源搭載

イオン化モード	ネガティブイオン化
スキャンモード	マルチプルリアクションモニタリング (MRM)
キャピラリ電圧	-3,500 V
ノズル電圧	-500 V
ネプライザ圧力	45 psig
乾燥ガス温度	300 °C
乾燥ガス流量	6 L/min
シースガス温度	260 °C
シースガス流量	11 L/min

最適化した定量イオンと定性イオン、関連するコリジョンエネルギーを表 2 に示します。

表 2. PFOS および PFOA 検出の MRM パラメータ

化合物	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	フラグメンタ 電圧 (V)	CE (V)	ドウェル タイム (msec)
PFOA	412.9	368.9*	-80	-4	100
		219.0	-80	-12	100
		169.0	-80	-16	100
PFOS	498.9	130.0*	-200	-50	100
		99.0	-200	-55	100
		80.0	-200	-90	100
¹³ C ₄ -PFOA	417.1	372.0*	-85	-3	100
		172.1	-85	-12	100
1, 2, 3, 4- ¹³ C ₄ -PFOS	503.1	80.1*	-170	-65	100
		99.1	-170	-50	100

注: * は定量イオンです。Q₁ および Q₂ の分解能は、ユニット分解能に設定しました。

添加回収

ブランクサンプルに3種類の濃度でPFOAとPFOSを添加しました。各添加サンプルのPFOAの濃度は0.01、0.05、0.10 µg/kg、PFOSの濃度はPFOAの10倍(0.1、0.5、1.0 µg/kg)としました。その後、添加サンプルを室温で5分間ボルテックスしました。 $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 1.0 ng および 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 5.0 ng を添加サンプルに加えしました。得られたサンプルをさらに5分間ボルテックスしたのち、サンプル前処理セクションで説明した手順に従い、サンプルを抽出および精製し、LC トリプル四重極 MRM 測定により分析しました。

結果と考察

LC/MS 分析条件

溶媒中のPFOSおよびPFOA濃度が高いと、分析の精度と感度に影響を与えることがあります。水性溶媒による干渉を低減するために、LCシステムを若干変更しました。水性溶媒ポンプチャンネルとグラジエントポンプのミキシングポイントの間に、C18トラップカラム(30 x 3.5 mm、5 µm)を設置しました[9]。接続にはステンレススチールチューブを使用しました。この変更により、LCシステムから生じる問題が大幅に減少しました。まず、ネガティブイオン化モードを用いてPFOAおよびPFOS標準溶液をQ₁ MSスキャンで分析し、各化合物に適したプリカーサイオンを特定しました。その後、特定したプリカーサイオンについて、プロダクトイオンスキャンを実施しました。標準化合物のフラグメントイオンを図2および図3に示しています。

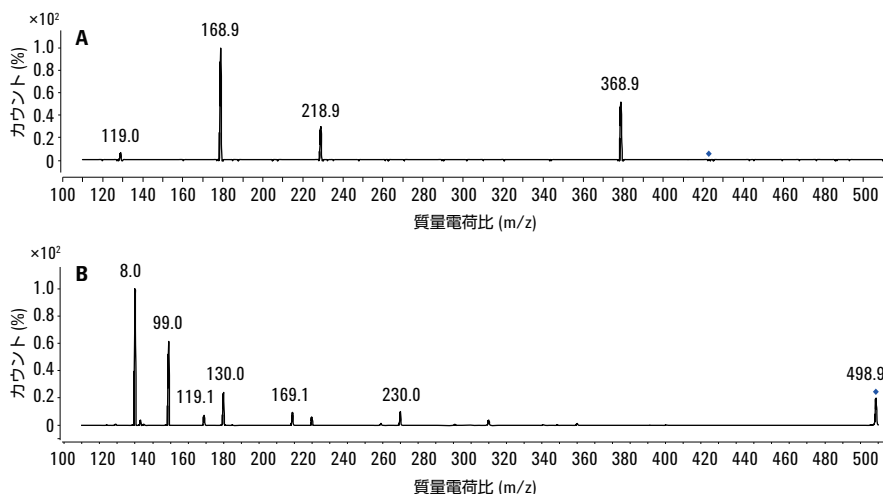


図2. PFOA (A) および PFOS (B) のプロダクトスペクトル

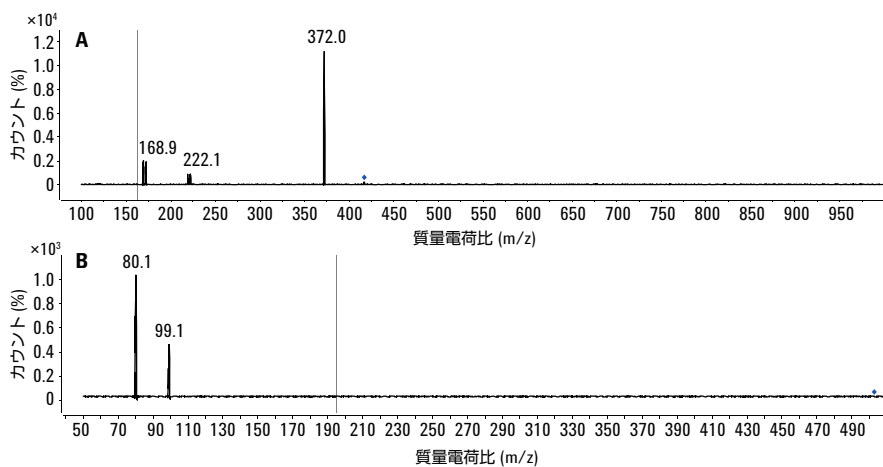


図3. $^{13}\text{C}_6$ -PFOA (A) および 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS (B) のプロダクトスペクトル

フラグメント電圧とコリジョンエネルギーをランピングすることにより、それぞれもっとも高いプリカーサ感度と最適なフラグメンテーションが得られる値を求め、PFOS および PFOA の定量にあたっては、高感度定量のために 498.9/130 および 412.99/368.9 のトランジションを選択しました。表 2 に示すように、定性のために別のトランジションも選択しました。表 2 には、確立さ

れている同位体標準のトランジションも示しています。MRM 選択モニタリングにより、図 4 に示すように、PFOS および PFOA の典型的なクロマトグラムが得られました。PFOS 標準の 2 つのピークは、PFOS 標準が直鎖型と分岐型の両方で存在していることを示しています。そのため、PFOS の定量には、ピーク面積の合計を用いました。

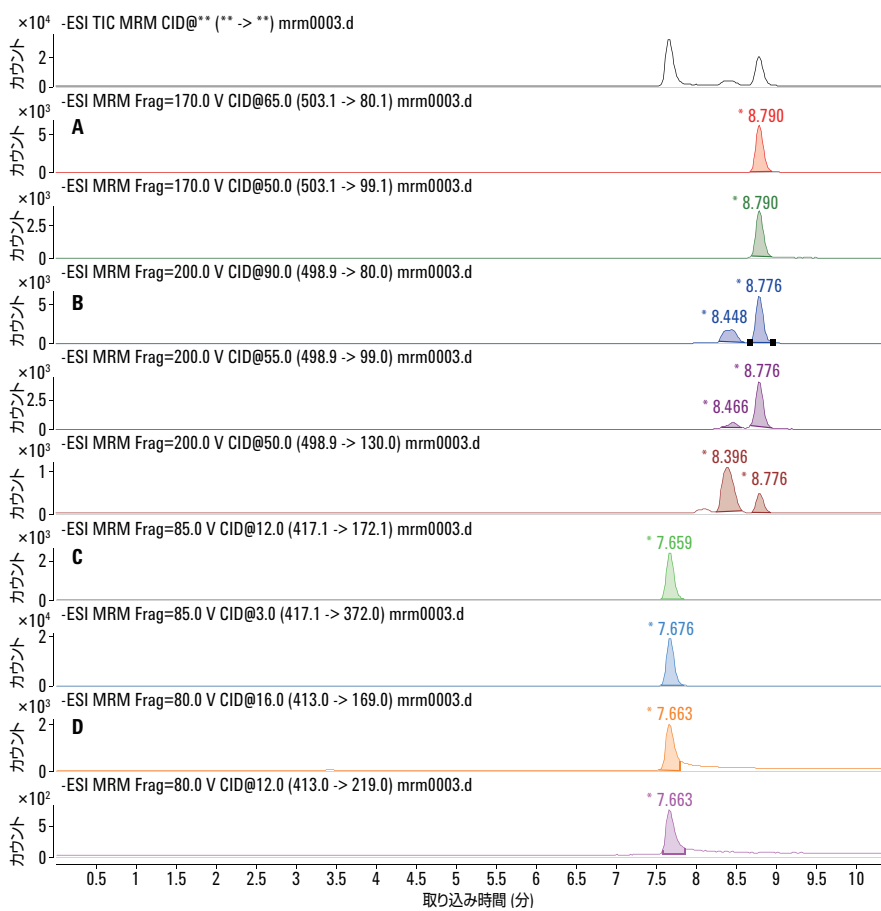


図 4. 1, 2, 3, 4- $^{13}\text{C}_4$ -PFOS (A)、PFOS (B)、 $^{13}\text{C}_8$ -PFOA(C)、PFOA (D) の MRM クロマトグラム

検量線と検出感度

標準溶液原液からキャリブレーション溶液を作成しました。PFOAの濃度は0.010~10 ng/mL、PFOSの濃度は0.1~40 ng/mLです。この実験条件下で、定量イオンに対応する同位体標準の濃度で得られたピーク面積を、化合物の濃度に対してプロットしました。表3に示すように、優れた直線性が得られています。相関係数は0.999以上です。

ブランクサンプルの標準濃度を徐々に減らし、LODとLOQを測定しました。LODはS/Nが3となる濃度、LOQはS/Nが10となる濃度として測定しました。表3に示すように、PFOSのLODとLOQは、それぞれ0.02および0.1 µg/kgでした。PFOAのLODとLOQは、その10分の1でした。この結果は、食品マトリックス中のPFOSおよびPFOAの測定に関して、このメソッドが優れた感度を備えていることを示しています。

メソッドの正確性および精度

魚、エビ、卵という3種類のマトリックスについて、添加実験を実施しました。最適なLC/MS条件下で、分析対象物がマトリックスから良好に分離され、バックグラウンド干渉も低く抑えられました。この3種類のマトリックスに3種類の濃度で添加した2つの化合物の平均回収率は、86.2%~111.6%の範囲内で、相対標準偏差は3.2~10.7%でした。この結果は、メソッドの信頼性が高く、残留物分析の要件を満たしていることを示しています。

表3 検量線と検出感度

分析対象化合物	直線範囲 (µg/L)	直線方程式	R ²	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
PFOA	0.01~10	$Y = 1.798e3x + 4501.1$	0.9990	0.002	0.01
PFOS	0.1~40	$Y = 6.819e2x + 383.92$	0.9993	0.02	0.1

表4. 魚、エビ、卵マトリックス中のPFOAおよびPFOSの添加回収率と精度 (n=6)

分析対象化合物	PFOA			PFOS		
	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	RSD (%)	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
魚	0.01	87.2~113.1	6.0	0.1	82.2~90.6	8.2
	0.05	92.8~101.0	3.2	0.5	79.9~97.2	5.8
	0.1	85.8~102.5	4.5	1.0	81.0~99.6	6.0
エビ	0.01	95.7~107.2	6.3	0.1	79.2~88.8	10.7
	0.05	96.3~111.2	6.6	0.5	80.2~89.2	8.12
	0.1	85.2~101.6	6.5	1.0	85.0~88.4	6.0
卵	0.01	85.7~98.6	4.8	0.1	89.7~93.4	7.6
	0.05	95.2~108.8	8.8	0.5	88.3~93.6	6.9
	0.1	84.2~111.6	7.1	1.0	90.8~112.0	4.2

複数ラボ間のバリデーション

5つの独立したラボにより、さらにメソッドのバリデーションをおこないました。3種類のマトリックスについて、3種類の添加濃度の添加回収率と精度を評価しました。表5に結果を示しています。全体の平均回収率は87.1%~105.8%、全体のRSDは10.8%~31.4%でした。この結果から、この研究で開発したメソッドは、参照標準メソッドとしての要件を満たしているといえます。

実際のサンプルの分析

開発したメソッドを用いて、実際のサンプルを分析しました。魚、エビ、卵のサンプルを地元の食料品店で無作為に購入しました。各マトリックスで50サンプルを用意しました。全部で150のサンプルのうち、10サンプルからPFOSが検出されました。陽性率がもっとも高かったのは魚で、相対的に低かったのは卵です。陽性サンプルのPFOS濃度は、0.04~3.0 µg/kgでした。

表5. PFOS および PFOA の濃度、5つの独立ラボにより測定し魚、エビ、卵マトリックスにおける測定の正確性および精度

サンプル	分析対象化合物	添加濃度 (µg/kg)	5つの独立ラボの測定結果 (µg/kg)										平均濃度 (µg/kg)	平均回収率 (%)	RSD (%)
			A	A	B	B	C	C	D	D	E	E			
魚	PFOA	0.01	0.0086	0.0091	0.0076	0.0088	0.0089	0.0096	0.012	0.0112	0.012	0.018	0.01	105.8	28.43
	PFOS	0.1	0.108	0.099	0.111	0.107	0.068	0.073	0.096	0.095	0.099	0.112	0.10	101.3	15.67
	PFOA	0.05	0.048	0.047	0.045	0.047	0.0511	0.0508	0.0513	0.0508	0.0302	0.0395	0.05	92.1	14.45
	PFOS	0.5	0.451	0.485	0.496	0.509	0.514	0.518	0.396	0.372	0.458	0.483	0.47	93.6	10.65
	PFOA	0.1	0.068	0.079	0.089	0.087	0.075	0.086	0.087	0.096	0.101	0.103	0.09	87.1	12.73
	PFOS	1	1.02	1.12	1.04	1.05	1.13	1.14	0.88	0.86	0.79	0.76	0.98	97.9	14.71
エビ	PFOA	0.01	0.0096	0.0099	0.0079	0.0068	0.0102	0.0097	0.0093	0.0086	0.0094	0.0096	0.01	96.8	11.48
	PFOS	0.1	0.088	0.089	0.103	0.108	0.083	0.078	0.087	0.085	0.105	0.112	0.09	92.3	12.76
	PFOA	0.05	0.045	0.048	0.043	0.047	0.0501	0.0509	0.0508	0.0511	0.0399	0.0368	0.05	92.5	10.83
	PFOS	0.5	0.463	0.483	0.476	0.502	0.504	0.049	0.456	0.468	0.498	0.483	0.44	87.6	31.43
	PFOA	0.1	0.097	0.089	0.069	0.077	0.102	0.113	0.097	0.086	0.091	0.103	0.09	92.4	14.02
	PFOS	1	0.86	0.96	0.96	0.96	1.13	1.04	0.87	0.76	0.99	0.86	0.94	93.9	11.22
卵	PFOA	0.01	0.0076	0.0081	0.0086	0.0089	0.0086	0.0098	0.0102	0.0112	0.0086	0.0095	0.01	87.8	11.75
	PFOS	0.1	0.088	0.079	0.103	0.106	0.078	0.083	0.096	0.103	0.105	0.112	0.10	83.3	12.98
	PFOA	0.05	0.0478	0.0467	0.0358	0.0372	0.0501	0.0508	0.0515	0.0513	0.0487	0.0495	0.05	93.9	12.18
	PFOS	0.5	0.481	0.496	0.466	0.369	0.514	0.512	0.397	0.482	0.512	0.516	0.47	94.9	10.85
	PFOA	0.1	0.097	0.089	0.076	0.079	0.105	0.096	0.112	0.096	0.111	0.118	0.10	97.9	14.24
	PFOS	1	1.12	1.03	1.17	0.963	0.896	0.789	0.868	0.856	0.792	0.765	0.92	92.5	15.34

結論

LC/MS/MS MRM 技術と弱アニオン交換精製、同位体内部標準較正を用いて、魚、エビ、卵に含まれる PFOA および PFOS を測定する分析メソッドを開発しました。メソッドのダイナミックレンジは 3 桁に達し、直線相関係数は 0.999 以上です。PFOA と PFOS の LOD は 0.002 µg/kg と 0.02 µg/kg、LOQ は 0.01 µg/kg と 0.1 µg/kg です。LOQ、LOQ の 5 倍、LOQ の 10 倍の濃度での添加試験では、メソッドの精度が優れていることが実証されています。添加回収率は 79.2~113.1 %、RSD は 3.2~10.7 % (n=6) でした。複数ラボ間のバリデーションにより、メソッドの信頼性がさらに証明されました。全体の添加回収率は 87.1 %~105.8 %、RSD は 10.8 %~31.4 % でした。ここで開発したメソッドを用いた 150 サンプルの分析では、陽性率は 15 % でした。このメソッドには、高感度、高回収率、高精度という利点があります。そのため、動物由来食品マトリックスのルーチン分析に使用することが可能です。

参考文献

1. European Food Safety Authority (EFSA). *EFSA Journal* 2012;10 (6):2743.
2. J.M.Shipley, C.H.Hurst, S.S.Tanaka, *Toxicological Sciences*, 2004, 80:151-160.
3. K. Inoue, F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, *et al. Environ. Health Perspect.* 2004, 112(11):1204-1207.
4. C.P.Higgins, J.A.Field, C.S.Criddle, R.G.Luthy, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39:3946-3956.
5. R. Loos, G. Locoro, T. Huber, *et al. Chemosphere*, 2008, 71:306-313.
6. X. Sun, J. Jin, Y. Wang, *Environ. Pollution and Prevention* (Chinese), 2007, 29(3):216-220.
7. P. Grandjean, E.W.Andersen, E. Budtz-Jorgensen, *et al. JAMA*. 2012, 307(4):391-397.
8. European Food Safety Authority (EFSA). *EFSA*, 2008, 653.
9. J.W.Stone P, L. Côté, J. Gushue, R.J.Letcher, S. Chu, *Agilent App.Note* 2010, 5990-5313.

詳細

本書に記載されたデータは代表的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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. 2013

Printed in Japan

March 4, 2013

5991-1948JAJP



Agilent Technologies