

# Agilent Captiva EMR-Lipid と LC-MS/MS による 生体サンプル中のペル/ポリフルオロアルキル 化合物 (PFAS) の分析

## 著者

Tarun Anumol, Joan Stevens,  
Xiaomi Xu  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

ペル/ポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) の LC-MS/MS 分析の前の効率的なサンプル前処理は、多成分残留分析を行う環境汚染分析ラボにとって、重要な検討事項です。血漿サンプルの LC-MS/MS 分析におけるマトリックス効果の主な原因は、リン脂質 (PPL) であることがわかっています。このアプリケーションノートでは、ウェル内 PPT の後に Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジで PPL を除去して、PFAS の血漿サンプル前処理および LC-MS/MS 分析をする方法を説明します。Captiva EMR-Lipid カートリッジでは、よりクリーンな溶離液が生成されました。具体的には、血漿マトリックスから不要な PPL が 99 % 超除去され、ターゲット化合物の回収率が 75 % を超え、RSD は 14 % 未満でした。5 ng/mL で PFAS を分析すると、適度なシグナルノイズ比 (S/N) の理想的なピーク形状になりました。すべての PFAS の検量線は 0.1 ~ 50 ng/mL において直線性があり、 $R^2$  は 0.992 を超えました。

## はじめに

ペル/ポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) は、界面活性剤、難燃剤、防水材、付着/汚れ防止剤として広く使用されている人工化合物です。PFAS はその固有の特性により、あらゆる環境や動物内に存在し、また長くとどまりやすいという性質があります。研究の結果、PFAS が生殖、発育の問題 (肝臓、腎臓、免疫効果、腫瘍、コレステロールの変化など) の原因となりうるということがわかっています。飲食によって PFAS を摂取すると、簡単に吸収されますが排出には時間がかかり、動物組織内に蓄積していく可能性があります。炭素鎖長が 7 を超える PFAS は、生体内蓄積<sup>1</sup> のリスクが非常に高いという調査結果が出ています。

PFAS の LC-MS/MS 分析の前の効率的なサンプル前処理は、多成分残留分析における重要な検討事項です。サンプル前処理によってシステムの汚染を減らし、データインテグリティとメソッド選択性を改善し、分析感度を上げることができます。血漿中の主な干渉は、タンパク質とリン脂質 (PPL) の 2 つです。PPL は、LC-MS/MS バイオ分析におけるマトリックス効果の主な原因であることがわかっています。これは、エレクトロスプレーイオン化 (ESI)<sup>2</sup> 中に形成される液滴の表面スペースの競合によるものです。

研究ラボにおける血漿および全血の一般的なサンプル前処理法としては、除タンパク処理 (PPT)、固相抽出 (SPE)、液液抽出 (LLE)、保持型液液抽出 (SLE) などがあります。各手法とも、速度、コスト、生成データの品質に関する長所と短所があります。例えば PPT、LLE、SLE では PPL が除去されず、SPE を実行するには時間と手間がかかります。ただしこれらの手法の中では、PPT が最も幅広く使用されています。PPT を使用すると、ACN や MeOH などの有機変性溶媒を所定の割合で生体サンプルに追加することで、タンパク質を簡単に除去できます。タンパク質が変性すると沈殿物が形成され、ろ過や遠心分離で簡単に除去できます。PPL は有機変性溶媒に溶けるため、PPT によって除去されることはありません。

オフライン PPT、遠心分離、希釈などの特定のサンプル前処理段階を省き、効率的なウェル内 PPT や PPL 除去を実行できるサンプル前処理法が理想的です。このアプリケーションノートでは、Agilent Captiva EMR-Lipid を使用して、成分を損失することなく、シンプルなパススルー形式で干渉 (特に PPL) を除去する方法を説明します。この結果、抽出物がクリーンになり、イオン抑制の可能性と、カラムおよび質量分析計の汚染が低減します。

ウェル内 PPT で血漿から PFAS を抽出した後、Captiva EMR-Lipid カートリッジで PPL を除去しました。その後、Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムで定量分析をして、PPL 除去の効率を評価しました。評価対象の PFAS のメソッド再現性および回収率も検討しました。

## 分析方法

### 試薬

表 1 に、分析対象の PFAS を示します。すべての標準および内部標準は、Wellington Laboratories (ゲルフ、オンタリオ州、カナダ) から購入しました。LC-MS グレードの酢酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich から購入しました。すべての溶媒は LC-MS グレード以上で、Burdick and Jackson (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。

表 1. 分析対象の PFAS と IS、および対応するトリプル四重極 MRM 採取パラメータ

化合物	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コリジョン エネルギー (eV)	リテンション タイム (分)
PFTrDA	663	618.7	8	3.16
PFDoA	613	268.7	20	2.92
PFDoA- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	614.9	570	5	2.92
N-EtFOSAA	584	526	20	3.40
10:2 FTA	577	463	6	2.51
N-MeFOSAA	570	511.8	24	3.23
N-MeFOSAA d <sub>3</sub>	573	515	24	3.23
PFUdA	563	519	8	2.70
PFDA	513	468.6	8	2.48
PFDA	513	218.7	16	2.48
PFDA- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	514.9	469.9	5	2.48
PFOS	498.9	99	50	2.61
PFOS	498.9	80	50	2.61
PFOS- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	502.9	80	50	2.61
8:2 FTA	477	393	14	2.12
PFNA	462.9	418.9	5	2.25
PFNA	462.9	169	17	2.25
PFOA	412.9	368.9	5	2.00
PFOA- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	416.0	371.9	5	2.00
PFHxS	398.9	99	45	2.10
PFHxS- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	401.9	79.8	52	2.10
6:2 FTA	377	293	18	1.51
PFHpA	362.9	319	5	1.67
PFHxA	313	268.6	4	1.07
PFHxA- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	314.9	269.9	5	1.07
PFBS	298.9	98.9	29	1.15
PFPeA	263	218.7	0	0.63
PFBA	213	168.7	4	0.47
PFTeDA	712.9	668.5	8	3.33

## 溶液

PFAS のメタノール混合標準溶液を 10 ug/mL で作製しました。同位体標識した PFAS を、10 ug/mL でメタノール標準溶液と混合し、内部標準 (IS) として使用しました。PFAS がガラスに付着したり、標準溶液が汚染されたりしないように、すべての標準溶液をスナップキャップおよびポリプロピレンラインセプタム付のポリプロピレンバイアルに保存しました。

## キャリブレーション標準と品質管理サンプル

プレスパイクした品質管理 (QC) サンプルを、適切な濃度になるまで標準溶液に 7 回添加しました。血漿中の濃度 1、5、および 20 ng/mL に対応して、低 QC (LQC)、中 QC (MQC)、高 QC (HQC) の QC サンプルを用意しました。IS は QC レベルごとに 10 ng/mL でスパイクしました。

Captiva EMR-Lipid でクリーンアップした後のブランクマトリックスを、対応する標準溶液でポストスパイクし、1、10、および 20 ng/mL の濃度の PFAS を生成しました。IS を最終濃度の 10 ng/mL になるまで、5 回スパイクしました。

マトリックス適合検量線を、標準溶液を使用して調製しました。Captiva EMR-Lipid で処理した後のブランクマトリックスを、0.1、1、5、10、25、および 50 ng/mL の濃度に対応するように血漿でポストスパイクしました。IS はキャリブレーション濃度ごとに 10 ng/mL でスパイクしました。

## 機器および消耗品

表 2 に、分析に使用した機器と消耗品を示します。

## LC-MS/MS 分析

この LC-MS/MS 分析では、Agilent 1290 Infinity II LC システムと Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムの組み合わせを使用しました。表 3 と表 4 に、使用した LC および MS の分析条件を示します。サンプル抽出物 (4 µL) は LC システムに直接注入しました。

表 1 に、モニタリング対象の PFAS 化合物ごとのトリプル四重極のダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (DMRM) 採取パラメータを示します。Captiva EMR-Lipid による PPL 除去を評価するため、11 種類の主要な PPL 化合物のプリカーサイオン、および m/z 184 のプロダクトイオンフラグメントをモニタリングしました。表 5 を参照してください。

表 2. サンプル前処理および分析用の機器と消耗品

項目	部品番号
<b>サンプル前処理</b>	
Agilent Captiva EMR-Lipid、1 mL カートリッジ	5190-1002
Agilent Vac Elut SPS 20 マニホールド、13 × 100 mm 試験管用コレクションラック付き	12234101
VWR 13 × 100 mm 培養試験管 8 mL ポリプロピレン	
エッペンドルフピペットとリピーターピペッタ (VWR、NJ、USA)	
<b>液体クロマトグラフィーシステム</b>	
Agilent 1290 Infinity II LC システム	
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 50 mm、3.5 µm (デュレイカラム)	959943-902
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、2.7 µm	699775-902T
Agilent 1290 Infinity インラインフィルタ 0.3 µm	5067-6189
クリンプ / スナップトップポリプロピレンバイアル、1.0 mL、100 個	5182-0567
クリンプ / スナップキャップとポリプロピレンセプタ、100 個	5182-0542
<b>質量分析システム</b>	
iFunnel 技術搭載 Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システム	
Agilent MassHunter ソフトウェア (バージョン 08.00)	

表 3. LC 分析条件

パラメータ	設定値
流量	0.5 mL/min
カラム温度	50 °C
オートサンブラ温度	5 °C
注入量	4 µL
移動相	A) 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B) アセトニトリル
ニードル洗浄: マルチウォッシュ	S1) H <sub>2</sub> O S2) H <sub>2</sub> O:ACN (50:50) S3) ACN それぞれ 10 秒間洗浄
グラジエント	時間 (分)    %B 0.0            30 0.5            30 3.5            90 4.5            100
ストップタイム	5.0 分
ポストタイム	1.5 分

表 4. MS 分析条件

パラメータ	設定値
イオン化モード	ネガティブ ESI
ガス温度	130 °C
ガス流量	15 L/min
ネブライザ	35 psi
シースガスヒーター	375 °C
キャピラリー電圧	2,000V
フラグメンタ電圧	500
デルタエレクトロンマルチプライアの電圧 (EMV)	200
極性	ネガティブ

表 5. PPL のトリプル四重極 MRM 採取パラメータ

プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)
808.4	184.4	30
806.4	184.4	30
786.4	184.4	30
784.4	184.4	30
760.4	184.4	30
758.4	184.4	30
704.4	184.4	30
524.4	184.4	30
522.4	184.4	30
520.4	184.4	30
496.4	184.4	30

Agilent MassHunter ソフトウェア (バージョン 08.00) を機器コントロール、および定性/定量データの処理と分析に使用しました。PFAS のメソッドの再現性と回収率を測定しました。

### サンプル前処理手順

#### 血漿からの PFAS の抽出

- 400  $\mu$ L の ACN (1 % FA) を Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジに追加します。
- 100  $\mu$ L のスパイク済みまたはブランクのヒト血漿 (スピン済み) を追加します。
- ウェル内混合をします。
- 2 ~ 4 psi の低真空に引いて、流量が 3 ~ 5 秒で 1 滴となるように制御します。
- ポリプロピレン試験管内の抽出物を収集します。
- ポリプロピレンオートサンプリャルを使用して、LC-MS/MS システムに直接注入します。

MeOH で形成される沈殿物の粒子は ACN より小さいため、Captiva EMR-Lipid での処理の前に PPT を最大化してゲル化を防ぐには、ACN の使用を推奨します。1:3 ~ 1:5 の比率範囲 (サンプル/溶媒) を推奨します。血漿サンプルは変性溶媒の後に追加します。酸 (ギ酸) によってタンパク質を粉砕し、タンパク質との結合を最小限に減らすことができます。

内径の大きなピペットチップを使用して、ウェル内攪拌混合をすることを推奨します。真空圧によって Captiva EMR-Lipid カートリッジ内のフローが開始されます。最適な脂質除去のためには、3 ~ 5 秒ごとに 1 滴となるように流量を制御することを推奨します。カートリッジからサンプルが溶出すると、真空圧が上がり、サンプル回収率が最大限に高まります。ガラス表面への付着による PFAS の損失を防ぐため、ポリプロピレンのコレクションチューブとオートサンプリャルの使用を強く推奨します。

### PPL 除去の評価、PPT のみ

- 400  $\mu$ L の ACN (1 % の FA) を試験管に追加します。
- 100  $\mu$ L のブランク血漿 (スピン済み) を追加します。
- Heidolph Multi Reax で、800 ~ 1,000 rpm で 5 分間ボルテックスします。
- 5,000 rpm で 5 分間遠心分離します。
- 上澄みをピペットでポリプロピレンのオートサンプリャルに移し、LC-MS/MS 分析をします。

## 結果と考察

### 不要な脂質マトリックスの除去

EMR-Lipid は極性、中極性、非極性のターゲット化合物のマトリックス効果を減らし、分析対象物の回収率を上げるために、研究ラボで広く使用できるシンプルな方法です。EMR-Lipid 充填剤では、サイズ排除と疎水性相互作用によって脂質が選択的にトラップされます (図 1)。枝分かれのない炭化水素鎖 (脂質) は充填剤のポアに入りますが、枝分かれした成分は入りません。充填剤に入った脂質鎖は次に、疎水性相互作用によってトラップされます。

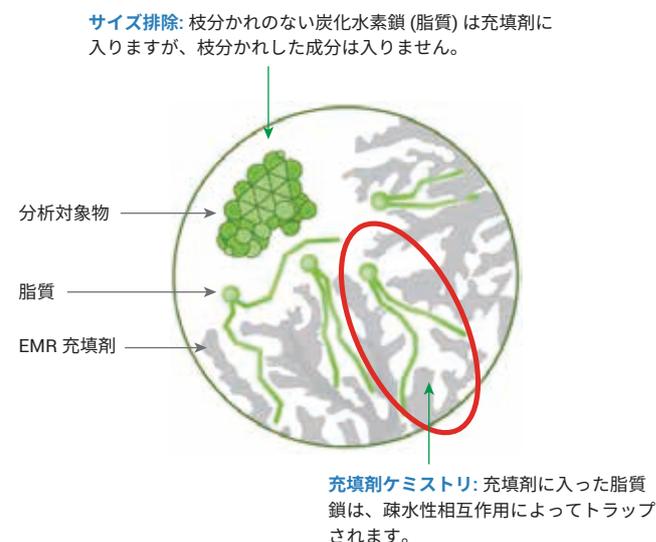


図 1. EMR-Lipid のメカニズム: サイズ排除と疎水性相互作用

図2のPFAS構造には直線の長炭化水素鎖が含まれますが、炭素はフッ素原子と結合し、枝分かれのない炭化水素鎖より立体的に大きくなります。このためEMR-Lipid充填剤のポアに入ることができません。

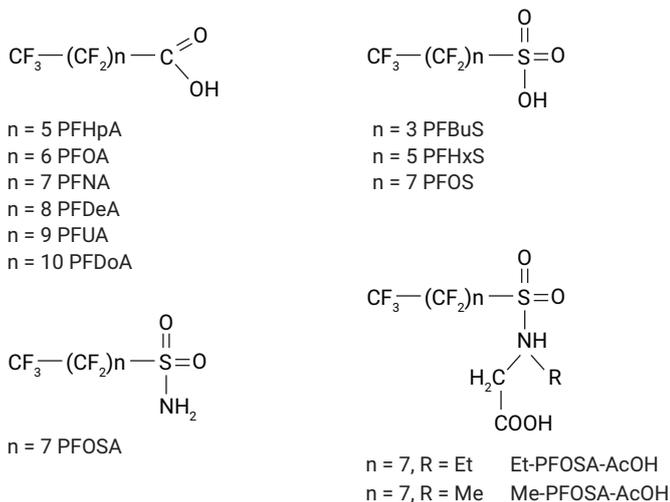


図2. PFASの分子構造

### クロマトグラフィー性能

5 ng/mL でスパイクした血漿のMRMクロマトグラム(図3)は、EMR-Lipidプロトコルで取得できるクロマトグラフィー性能を示しています。5 ng/mLの濃度であっても、マトリックス効果と干渉の減少による分離能とシグナルノイズ比(S/N)の向上によって正確に積分され、理想的なピーク形状となっています。6495トリプル四重極LC/MSシステムを使用すると、血漿中のPFASの分析において、0.1 ng/mL以下の濃度でも正確な検出と定量が可能です。

### PPLの除去

PPLは細胞膜の主成分であり、重大なマトリックス効果<sup>3, 4</sup>の原因となる主要な化合物種です。グリセロホスホコリンとリゾホスファチジルコリンはそれぞれ血漿中の総PPLの70%と10%を占めており<sup>5</sup>、マトリックス効果の主な原因です。Captiva EMR-Lipidカートリッジクリーンアップによる血漿からのPPL除去の効率を測定するため、11種類の天然PPL化合物をモニタリングしました。特にm/z 184のイオンフラグメントを使用して、PPTおよびCaptiva EMR-Lipidによる除去後に血漿抽出物に含まれるPPLをモニタリングしました。

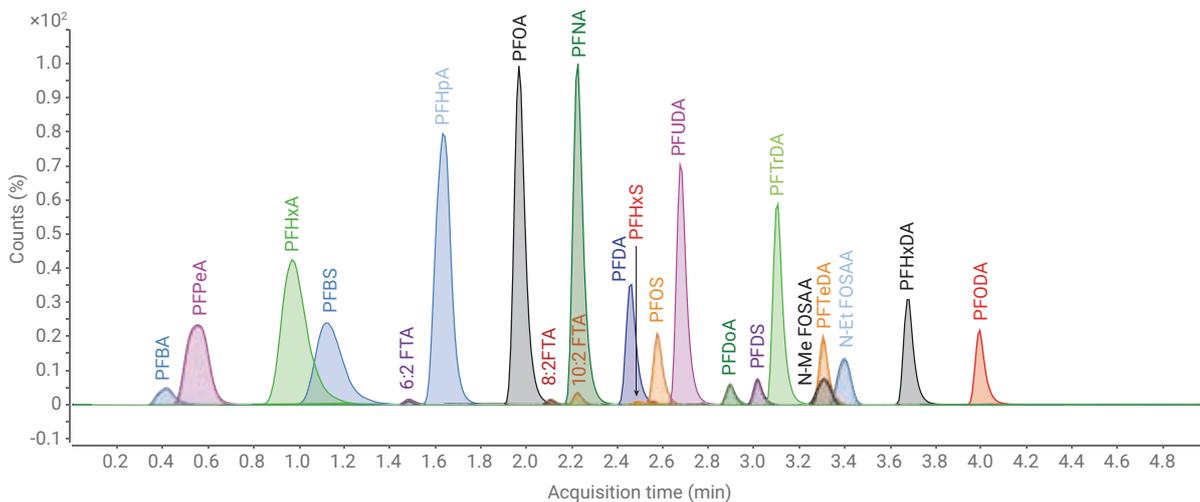


図3. 5 ng/mLでスパイクした血漿のMRMクロマトグラム

図 4 のように、モニタリング対象 PPL の約 99 % (ピーク面積の比較に基づく) が、抽出された血漿サンプルから除去されています。これに対して PPT のみの場合は、その一部がターゲット化合物と共溶出しています。図 4 の PPL の高い相対アブダンス (赤色のトレース) は、検出器の飽和の可能性を示しており、定量の品質に影響する可能性があります。また PPL のアブダンスが高いと、長期的には LC-MS システムの汚染につながる可能性があります。

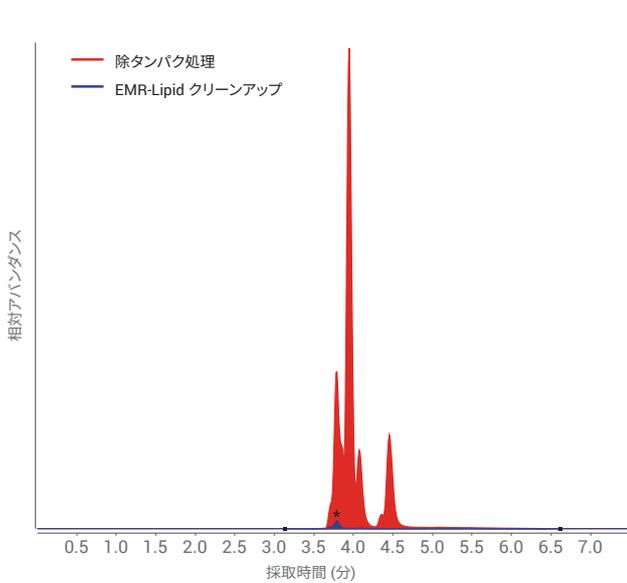


図 4. 11 種類の PPL の MRM クロマトグラムの重ね表示。PPT のみを実行した後 (赤色) と Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ (青色) の後に、m/z 184 でモニタリング。

### 定量性能

検量線の直線性を評価しました。図 5 に、PFOA と PFOS の検量線を示します。6 段階の濃度 (0.1 ~ 50 ng/mL) の試験では、生成した 3 つのケースで、それぞれ良好な直線性が得られました。分析対象のすべての PFAS の平均決定係数 ( $R^2$ ) は 0.992 を超えました (0.1 ~ 50 ng/mL における直線性、直線適合、 $1/x$  の重み付け)。

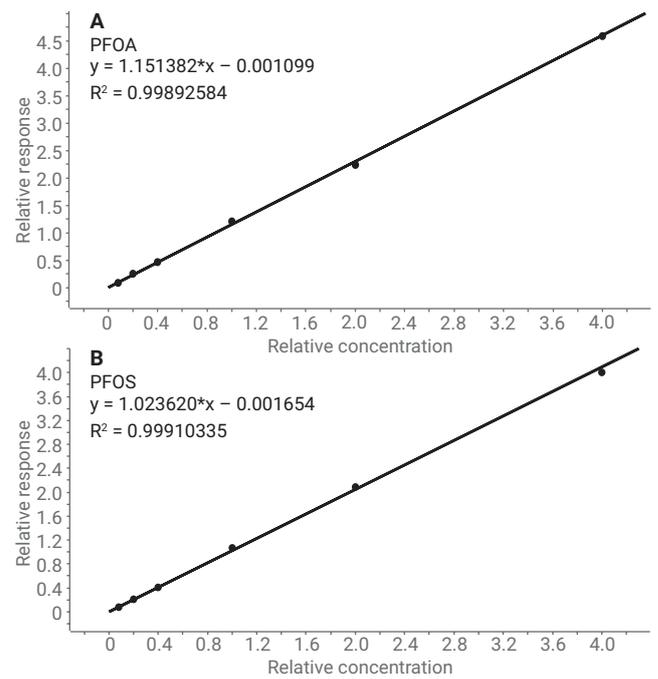


図 5. 検量線。A) PFOA、B) PFOS。血漿中の濃度範囲 0.1 ~ 50 ng/mL。除タンパク処理の後に Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを使用。

22 種類の PFAS のメソッド回収率および再現性 (RSD) は、5 ~ 20 ng/mL で血漿に標準を 5 回スパイクして測定しました。全体の回収率は 75 ~ 125 % という高い数値でした (図 6)。ほとんどの PFAS の回収率は 90 ~ 110 % でした。広く研究されている PFAS、PFOS および PFOA の平均回収率は、血漿の両方のスパイク濃度でそれぞれ 92.7 ± 6.6 % と 93.1 ± 5.0 % でした。相対標準偏差も良好で、5 ~ 20 ng/mL の濃度で 0.8 ~ 14 % でした。

## 結論

このアプリケーションノートでは、PFAS の LC-MS/MS 分析用の血漿サンプルを調製するためのシンプルで迅速なワークフローについて説明しました。ウェル内 PPT で血漿から 22 種類の PFAS を抽出した後、パススルー形式の Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジで PPL を除去しました。Captiva EMR-Lipid では、血漿マトリックスから不要な PPL の 99 % を効率的に除去できました。またターゲット化合物の回収率も高いものでした。PPT のみを使用した場合よりサンプル抽出物がクリーンであるため、イオン抑制や LC-MS/MS システムの汚染およびダウンタイム発生の可能性も低下しました。ウェル内 PPT には、サンプルの処理と移送が少ないという利点があります。

5 ng/mL で PFAS を分析した結果、理想的なクロマトグラフィーピーク形状と適度な S/N を得ることができました。6 種類の濃度 (0.1 ~ 50 ng/mL) における PFAS の応答は直線性があり、 $R^2$  は 0.992 を超えました。試験対象の PFAS の回収率は 75 % 以上と高く、RSD は 14 % 未満でした。この結果から、このメソッドは PFAS の多成分残留物の抽出と分析に適していることがわかります。

Captiva EMR-Lipid は、研究ラボの既存のワークフローに簡単に組み入れることができます。また、サンプル前処理用に追加の機器やガラス器具を用意する必要もありません。Captiva EMR-Lipid は、96 ウェルプレートと 1 mL カートリッジのいずれの形式でも、自動化および高スループットアプリケーションに対応しています。フリット設計のため、つまりのない、簡単かつ効率的なサンプル溶出が可能です。

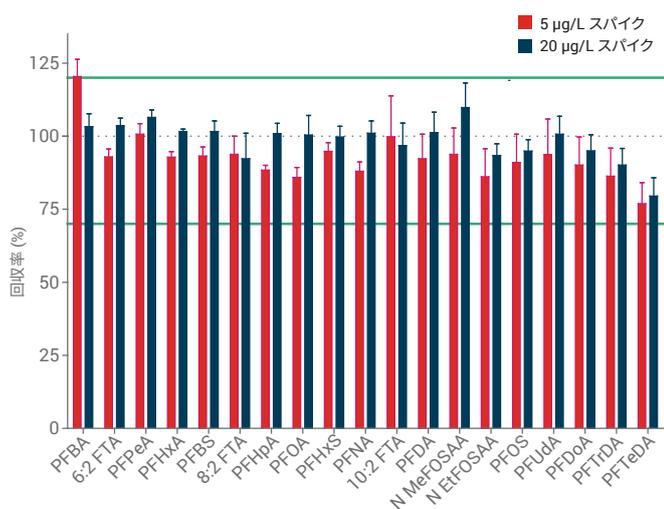


図 6. 5 および 20 ng/mL で評価した PFAS の回収率と RSD

## 参考文献

1. United States Environmental Protection Agency. Research on Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS). Retrieved October 11, 2017. <https://www.epa.gov/chemical-research/research-and-polyfluoroalkyl-substances-pfas>
2. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, 75(13), 3019-3030.
3. Little, J. L.; Wempe, M. F.; Buchanan, C. M. Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma. *J. Chromatogr. B* **2006**, 833, 219.
4. Ismaiel, O. A.; et al. Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma. *J. Chromatogr. B* **2007**, 859, 84–93.
5. Chambers, E.; et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J. Chromatogr. B* **2007**, 852, 22-34.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2017  
Printed in Japan, November 6, 2017  
5991-8656JAJP