

Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS を用いた EPA メソッド 533 による 飲料水中のペル/ポリフルオロアルキル 化合物の分析

著者

Ralph Hindle and Kathy Hunt
Vogon Laboratory Services
Cochrane, AB, Canada

Tarun Anumol
Agilent Technologies Inc.
Wilmington, DE, USA

はじめに

米国環境保護庁 (USEPA) は、飲料水中の特定のペル/ポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) の分析用に、メソッド 533 を開発しました。このメソッドは、 C_4 酸および C_5 酸ならびにスルホン酸用の USEPA メソッド 537 および 537.1 における分析困難な化合物のいくつかに対処するものです。さらに、鎖長を C_{12} 酸に制限し、新たに登場した PFAS をメソッドに加えています。ここに示す調査は、EPA メソッド 533 を評価するための第 2 のラボ実証として行われました。

PFAS は、オフライン固相抽出 (SPE) によって水から抽出し、トリプル四重極質量分析 LC/MS/MS システムによる分析を行いました。 C_4 から C_{12} までの酸、 C_4 から C_8 までのスルホン酸、フッ素テロマー、パーフルオロモノエーテル、パーフルオロポリエーテルなど、25 の化合物を測定しました。メソッド 537 の化合物 14 種のうち 10 種に加えて、メソッド 537.1 の別の化合物 4 種が含まれます。US EPA メソッド 533 は、サンプル前処理における回収を評価するための同位体希釈類縁体および天然化合物に代わる内部標準添加物を含みます。分岐 PFHxS、直鎖 PFHxS ならびに分岐 PFOS および直鎖 PFOS それぞれの異性体は、これらの化合物のキャリブレーションで定量した総和です。これらについては、USEPA メソッドでより詳しく説明されています。

PFAS 分析には、解決策が相反する問題がいくつかあり、単一の包括的なメソッドを開発することは困難です。微量の PFAS は、フィルタ、ピペット、バックグラウンドの LC システムや移動相溶媒といった、サンプルの採取ツールや前処理ツールによってもたらされる可能性があります。サンプル中の PFAS バックグラウンド化合物を分離するため、LC ポンプとオートサンプリング間にディレイカラムを使用して適切に定量が行えるようにしました。このメカニズムと設定については、アジレントの他のアプリケーションノートで詳しく説明しています。鎖長が長い化合物は溶液中に残存するため、最終抽出でより高濃度のメタノール (MeOH) (USEPA 537.1 で 96%) を必要とし、これがまさに、より小さな、溶出の早い化合物のピーク形状の歪みを引き起こすという問題もあります。最終抽出でのメタノール濃度を 80% にまで抑えることで溶出の早い化合物のピーク形状が改善し、リテンションが長くなるものの、鎖長が長い化合物の溶解度が低下して溶液中に含まれなくなるため、定量の真度と精度の低下を引き起こします。

このアプリケーションノートでは、Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS/MS システムを用いて行った、USEPA メソッド 533 の 2 番目のラボ実証で得られた結果について説明します。

MS 機器条件

パラメータ	設定値
MS	Agilent 6470 トリプル四重極 MS/MS (Agilent Jet Stream ESI ソース搭載)
ソースパラメータ	
ガス温度	230 °C
ガス流量	4 L/min
ネブライザ	20 psi
シースガス温度	375 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧 (負)	2,500 V
ノズル電圧 (負)	0 V

dMRM トランジション

このメソッドでは、ダイナミックマルチブルリアクションモニタリング (dMRM) を用いて、Agilent 6470 LC/MS/MS をエレクトロスプレーネガティブモードで動作させました。

プリカーサイオン、プロダクトイオン、フラグメンタ電圧、コリジョンエネルギーを含むすべてのコンジナーパラメータを、化合物ごとに Agilent オプティマイザソフトウェアによって最適化しました (表 1)。詳細については、アプリケーションノート 5991-7951EN を参照してください。すべての化合物で、セル加速電圧は 2 V を選択しました。

LC 機器条件

パラメータ	設定値														
LC	Agilent 1260 シリーズ Infinity バイナリポンプ、G1367E Infinity ALS、G1316A Infinity カラムコンパートメント														
分析カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、3 × 50 mm、1.8 μm (p/n 959757-302)														
ディレイカラム	Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 × 50 mm、3.5 μm (p/n 835975-902)														
カラム温度	50 °C														
注入量	10 μL														
移動相	A) 20 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (LC グレード) B) MeOH (LC グレード)														
グラジエント流量	0.4 mL/min														
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>3.0</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>18.0</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0.0	5	0.5	5	3.0	40	16.0	80	18.0	80	20.0	95
時間 (分)	%B														
0.0	5														
0.5	5														
3.0	40														
16.0	80														
18.0	80														
20.0	95														
ストップタイム	20.0 分														
ポストタイム	6 分														

注：システムに蓄積した汚染物を除去するため、ワークリスト開始時に少なくとも 1 回はブランク注入を動作させることを強く推奨します。

表 1. 化合物パラメータ

化合物	プリカーサイオン	プロダクトイオン	リテンションタイム (分)	フラグメンタ (V)	コリジョンエネルギー (V)
11Cl-PF30UdS	630.9	450.9	17.67	165	32
11Cl-PF30UdS	630.9	82.9	17.67	165	32
¹³ C ₂ -4:2FTS	329.0	309.0	9.18	125	20
¹³ C ₂ -6:2FTS	429.0	409.0	13.06	125	24
¹³ C ₂ -8:2FTS	529.0	509.0	15.96	170	28
¹³ C ₂ -PFDoA	614.9	570.0	18.09	79	5
¹³ C ₂ -PFOA	415.0	369.9	13.17	80	8
¹⁵ C ₂ -PFOA	415.0	168.9	13.17	80	20
¹³ C ₃ -HFPO-DA	287.0	184.9	10.03	160	20
¹⁵ C ₃ -HFPO-DA	287.0	168.9	10.03	160	4
¹³ C ₃ -PFBA	216.0	171.9	4.91	65	8
¹³ C ₃ -PFBS	302.0	80.0	7.71	100	45
¹⁵ C ₃ -PFHxS	402.0	80.0	11.58	100	45
¹³ C ₄ -PFBA	217.0	172.0	4.91	60	8
¹³ C ₄ -PFHpA	367.0	322.0	11.40	72	0
¹³ C ₄ -PFOS	502.9	98.9	14.73	180	48
¹³ C ₄ -PFOS	502.9	79.9	14.73	180	52
¹⁵ C ₅ -PFHxA	318.0	273.0	9.37	70	8
¹³ C ₅ -PFPeA	268.0	223.0	7.24	60	8
¹³ C ₆ -PFDA	519.0	474.0	15.99	81	4
¹³ C ₇ -PFOA	570.0	525.0	17.12	73	5
¹³ C ₈ -PFOA	421.0	376.0	13.16	69	4
¹³ C ₈ -PFOS	507.0	80.0	14.72	100	50
¹³ C ₉ -PFNA	472.0	427.0	14.68	66	4

表 1. 化合物パラメータ (続き)

化合物	プリカーサイオン	プロダクトイオン	リテンションタイム (分)	フラグメンタ (V)	コリジョンエネルギー (V)
4:2FTS	327.0	306.9	9.18	125	20
4:2FTS	327.0	80.9	9.18	125	36
6:2FTS	427.0	406.8	13.06	125	24
6:2FTS	427.0	80.9	13.06	125	40
8:2FTS	527.0	506.8	15.96	170	28
8:2FTS	527.0	80.9	15.96	170	40
9Cl-PF3ONS	530.9	350.9	15.52	145	28
9Cl-PF3ONS	530.9	83.0	15.52	145	32
ADONA	377.0	250.9	11.72	80	12
ADONA	377.0	85.0	11.72	80	36
HFPO-DA-CO2	285.0	184.9	10.03	155	16
HFPO-DA-CO2	285.0	168.9	10.03	155	4
NFDHA	295.0	201.0	9.10	75	5
NFDHA-CO2	251.0	84.9	11.71	130	20
PFBA	213.0	168.9	4.91	60	8
PFBS	298.9	98.9	7.71	100	29
PFBS	298.9	80.0	7.71	100	45
PFDA	513.0	469.0	15.99	81	4
PFDA	513.0	218.7	15.99	100	16
PFDoA	613.0	569.0	18.09	79	5
PFDoA	613.0	268.7	18.09	100	20
PFEESA	314.9	134.9	8.57	110	24
PFEESA	314.9	69.0	8.57	110	60
PFHpA	362.9	319.0	11.40	72	0
PFHpA	362.9	169.0	11.40	72	12
PFHpS	448.9	98.7	13.26	100	44
PFHpS	448.9	79.7	13.26	100	52
PFHxA	313.0	268.9	9.37	70	8
PFHxA	313.0	119.0	9.37	70	18
PFHxS	398.9	99.0	11.59	100	45
PFHxS	398.9	80.0	11.59	100	49
PFMBA	279.0	84.9	7.91	70	12
PFMPA	229.0	84.9	5.95	60	12
PFNA	463.0	419.0	14.69	66	4
PFNA	463.0	219.0	14.69	66	17
PFOA	413.0	369.0	13.17	69	4
PFOA	413.0	169.0	13.17	69	12
PFOS	498.9	99.0	14.73	100	50
PFOS	498.9	80.0	14.73	100	50
PFPeA	263.0	218.9	7.24	60	8
PFPeS	348.9	98.9	9.69	135	40
PFPeS	348.9	79.9	9.69	135	40
PFOA	563.0	519.0	17.12	73	5
PFOA	563.0	269.0	17.12	100	20

キャリブレーション用標準の作成

すべての分析対象物を含む 500 ng/mL の化合物希釈済み標準液で高濃度の標準溶液を調製しました。これに続き、MeOH 80 % を維持して高濃度の標準溶液を 1:4 で連続希釈してキャリブレーションを作成しました。同位体希釈標準および内部標準を添加した後に分析を実施しました。

抽出

EPA メソッド 533 に従って、250 mL の水サンプルに同位体希釈類縁物を添加し、弱アニオン交換カートリッジで抽出しました。サンプルは水酸化アンモニウム/MeOH 溶液で溶出させ、乾燥させて濃度を高めたのち、80 % の MeOH で再溶解しました。内部標準を添加した後に分析を行いました。

クロマトグラフィー

図 1 に示すクロマトグラムは、化合物群ごとに分けられた 1.5 ng/mL (バイアル) から得られたものです。

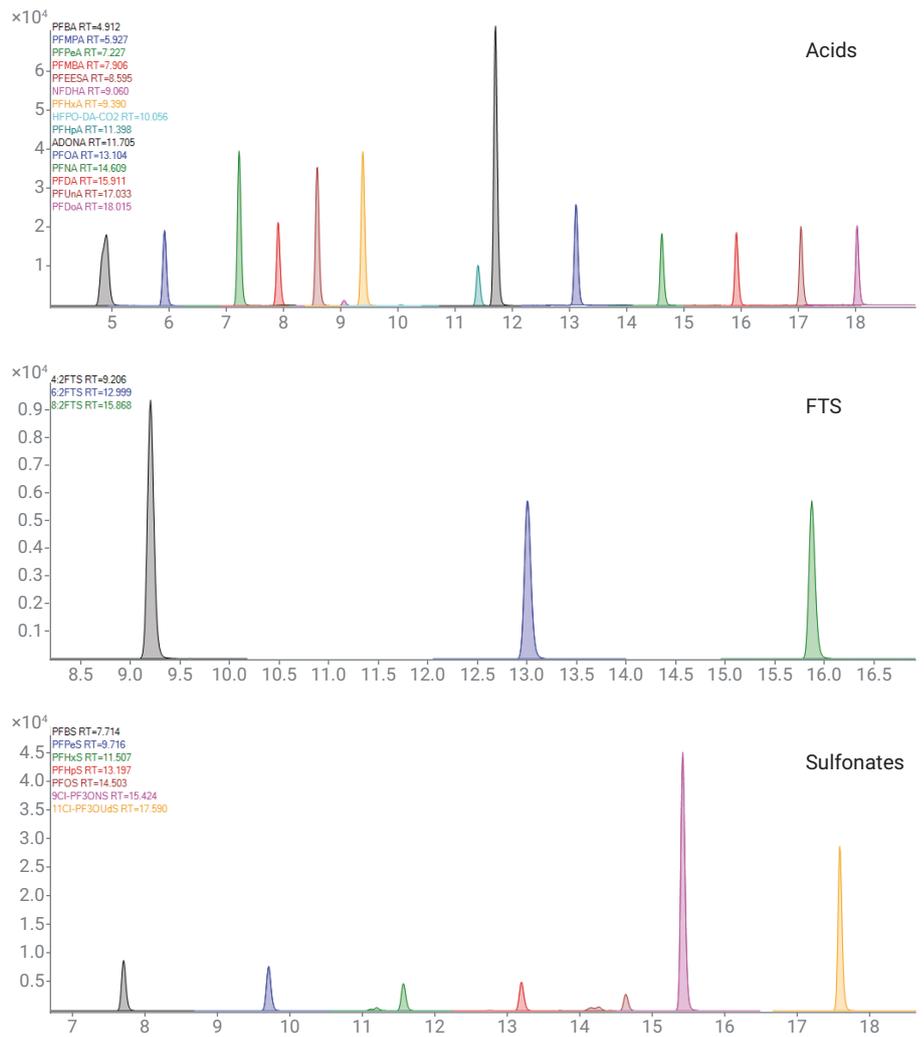


図 1. 化合物グループごとのクロマトグラム

性能：精度と真度

このメソッドの精度と真度は、48 ng/L の試薬と自治体処理水道水サンプルの繰り返し分析を5回補強実施して評価しました。

真度と精度は EPA 要件に適合していました。試薬および水道水での PFAS 化合物の回収率は 87～103 % で、試薬で最大 5 % の RSD (相対標準偏差)、水道水で最大 12 % の RSD でした。真度と精度は、USEPA メソッド記載のとおり、EPA 要件に適合していました。

表 2. メソッドの真度および精度

化合物	RT	化合物群	試薬水回収率	試薬水 %RSD	水道水回収率	水道水 %RSD
PFBA	4.93	酸	98 %	3 %	97 %	10 %
PFMPA	5.95	酸	101 %	2 %	92 %	10 %
PFPeA	7.23	酸	98 %	3 %	94 %	11 %
PFMBA	7.91	酸	97 %	3 %	94 %	11 %
PFEESA	8.58	酸	99 %	2 %	96 %	11 %
NFDHA	9.04	酸	92 %	5 %	87 %	11 %
PFHxA	9.37	酸	97 %	3 %	93 %	11 %
HFPO-DA	10.03	酸	96 %	5 %	87 %	11 %
PFHpA	11.36	酸	99 %	2 %	94 %	10 %
ADONA	11.67	酸	103 %	2 %	96 %	10 %
PFOA	13.10	酸	97 %	3 %	94 %	10 %
PFNA	14.65	酸	99 %	2 %	94 %	10 %
PFDA	15.97	酸	98 %	2 %	94 %	10 %
PFUnA	17.10	酸	100 %	3 %	96 %	11 %
PFDoA	18.08	酸	99 %	3 %	96 %	11 %
4:2FTS	9.19	FTS	97 %	2 %	94 %	11 %
6:2FTS	13.00	FTS	99 %	3 %	96 %	10 %
8:2FTS	15.93	FTS	100 %	3 %	97 %	11 %
PFBS	7.70	スルホン酸	98 %	2 %	94 %	10 %
PFPeS	9.69	スルホン酸	97 %	3 %	95 %	11 %
PFHxS	11.54	スルホン酸	99 %	3 %	96 %	11 %
PFHpS	13.20	スルホン酸	102 %	2 %	97 %	11 %
PFOS	14.69	スルホン酸	97 %	3 %	93 %	11 %
9Cl-PF3ONS	15.49	スルホン酸	99 %	2 %	95 %	11 %
11Cl-PF3OUdS	17.66	スルホン酸	98 %	2 %	92 %	12 %

性能：低いシステムバックグラウンド および LCMRL

低いシステムバックグラウンドであるかどうかは、高濃度キャリブレーションのすぐ後に試薬ブランク (LRB) を注入し、LRB の各成分の濃度を評価することで示されます。LRB は一定の分量の同位体希釈類縁物を添加した試薬水で、フィールドサンプルとして処理されます。LRB は、メソッドの成分がラボ設備、試薬、ガラス容器または抽出器具によってもたらされたものかどうかを見極めるのに用いられます。サンプル前処理などによる汚染が原因の可能性のある、トレースレベルの微量の PFAS が LRB において確認されました。80 % MeOH であった機器ブランクには、PFAS 汚染がまったく見られず、LC/MS/MS は PFAS ゼロであることを示しています。

最低濃度の最小報告レベル (LCMRL) は、試薬水に低濃度の成分を徐々に添加し、50 ~ 150 % の範囲の回収率で抽出することで測定しました。

表 3. 低システムバックグラウンドおよび LCMRL

化合物	RT	化合物グループ	機器ブランク (ng/L)	LRB 濃度 (ng/L)	LCMRL (ng/L)	EPA 533 LCMRL [^]
PFBA	4.93	酸	–	0.58	2.6	13
PFMPA	5.95	酸	–	0.01	0.087	3.8
PFPeA	7.23	酸	–	0.13	1.0	3.9
PFMBA	7.91	酸	–	0.01	0.12	3.7
PFEESA	8.58	酸	–	–	0.079	2.6
NFDHA	9.04	酸	–	–	0.16	16
PFHxA	9.37	酸	–	0.11	0.34	5.3
HFPO-DA	10.03	酸	–	–	1.8	3.7
PFHpA	11.36	酸	–	0.38	4.2* (1.3)	2.6
ADONA	11.67	酸	–	–	0.069	3.4
PFOA	13.10	酸	–	0.27	0.68	3.4
PFNA	14.65	酸	–	0.07	0.40	4.8
PFDA	15.97	酸	–	0.07	0.31	2.3
PFUnA	17.10	酸	–	0.05	0.31	2.7
PFDoA	18.08	酸	–	0.09	0.40	2.2
4:2FTS	9.19	FTS	–	0.04	0.17	4.7
6:2FTS	13.00	FTS	–	0.03	0.22	14
8:2FTS	15.93	FTS	–	0.03	0.18	9.1
PFBS	7.70	スルホン酸	–	0.01	0.21	3.5
PFPeS	9.69	スルホン酸	–	–	0.084	6.3
PFHxS	11.54	スルホン酸	–	0.02	0.13	3.7
PFHpS	13.20	スルホン酸	–	–	0.088	5.1
PFOS	14.69	スルホン酸	–	0.15	0.47	4.4
9Cl-PF3ONS	15.49	スルホン酸	–	–	0.11	1.4
11Cl-PF3OUdS	17.66	スルホン酸	–	0.01	0.67	1.6

[^] メソッド開発時に EPA によって測定され、EPA メソッド 533 の表 7 に記載されている、単一ラボの LCMRL。

* PFHpA について、1.6 ng/L の 4 つのスパイクの 1 つに高濃度を示す異常値が確認されました。これらのスパイクの他の化合物はすべて、精度仕様に適合する回収率でした。すべての化合物は、すべての化合物を含む混合物によって添加され、そのバッチの LRB 値は低いため、高い PFHpA の結果は、そのサンプルに用いられた SPE に起因するものと考えられます。図 2A に示すように、PFHpA に対する機器感度は大幅に低くなっています。異常値のない LCMRL はブラケットに示されています。

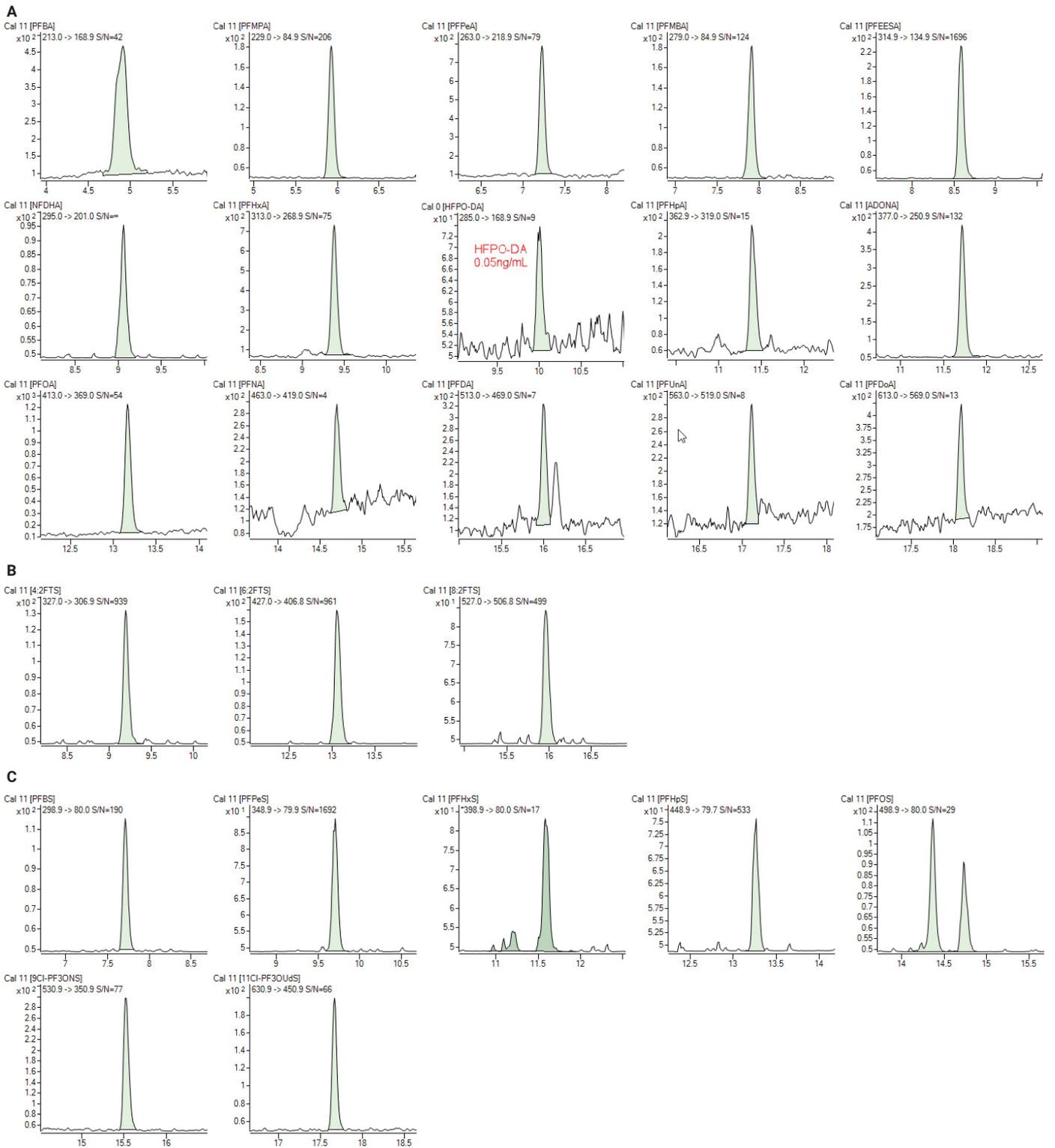


図 2. A、B および C は、それぞれ、バイアルで 0.003 ng/mL のキャリブレーション濃度（HFPO-DA の場合は 0.05 ng/mL）での酸、FTS およびスルホン酸のクロマトグラムを示しています。

結論

EPA メソッドによって、LC カラム、LC 条件および MS 条件の選択が柔軟に行えます。この研究に使用した Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムは、各化合物クラスのすべての化合物に対応するベースライン分解能を有し、すべての化合物における RT のオーバーラップを最小に抑えます。

真度と精度は EPA 要件に適合していました。試薬および水道水での PFAS 化合物の回収率は 87 ~ 103 % で、試薬で最大 5 % の RSD、水道水で最大 12 % の RSD でした。LCMRL 値は、PFHpA を除いたすべてについて、EPA 533 にリストアップされている EPA 値より低い結果となりました。PFHpA には、PFHpA サンプル用 SPE カートリッジに起因する 4 つのスパイクの 1 つに異常値の含有物があつたため、LCMRL 測定値がやや高い結果でした。とはいえ、試験で確認された機器感度は、このメソッドで求められる感度をはるかに超えるものでした。このメソッドの 25 の化合物のうち 22 の LCMRL が、1 ng/mL 以下で測定されています。EPA メソッドで最も低い LCMRL は 1.8 ng/L でした。この研究は EPA メソッド 533 の作成における第 2 のラボ実証として行われ、データは公式メソッドで認められているものになります。

ホームページ

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

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. 2020
Printed in Japan, January 17, 2020
5994-1628JAJP
DE.3925347222

