

Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いた EPA 537.1 および EPA 533 による飲料水中のペル/ポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) の分析

著者

Agustin Pierri
Weck Laboratories Inc.,
Industry, CA, USA
Tarun Anumol and Emily
Parry
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE, USA

概要

このアプリケーションノートでは、民間ラボ環境における飲料水中のペル/ポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) の EPA メソッド 537.1 および 533 のバリデーションについて解説します。両方のメソッドで、Agilent Poroshell EC-120 カラムを使用して成分を分離しました。ピークの非対称性係数は、10 分未満の分析時間を達成しつつ EPA ガイドラインの範囲内に収まり、EPA メソッドの分析時間にわたりスループットが大幅に向上しました。EPA メソッド 537.1 および 533 に記載されているプロトコルに従い、250 mL サンプルの固相抽出後の対象成分の回収率は 70 % ~ 130 % でした。メソッドレポートレベルは EPA ガイドラインに従い計算しました。記載よりも少ない注入量を使用しましたが、レベルは 2 ng/L 未満で、EPA メソッドの単一ラボにおけるバリデーションに記載の数値よりも低くなりました。

はじめに

PFAS は独自の化学的特性を有しています。日用製品におけるこれらの化学物質の使用は手近になり、また不可欠になっています。PFAS は 1940 年代以降、商業分野、産業分野、パーソナルケア製品で使用されており、環境中に広く存在しています¹。PFAS は長く存在し続け、生体蓄積性および毒性があります²。そのため、米国環境保護庁 (EPA)、欧州化学物質庁 (ECHA) などの規制および政府機関は、環境における PFAS の存在を制限することを検討しています。

現在、米国には、飲料水中の PFAS をモニタリングし定量するための標準メソッドが 2 つあります。EPA 537.1 では飲料水中の低 ng/L レベルの検出のために、最初に固相抽出 (SPE) を使用してから、タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を組み合わせた液体クロマトグラフィー (LC) を実施することで、18 種の PFAS 化合物を分析します。2019 年に US EPA は、25 種の PFAS 化合物を分析するための新しいメソッド EPA 533 を発表しました。このメソッドには、SPE と LC/MS/MS を用いた、飲料水中の短い鎖長 (C 鎖 6 未満) および新規 PFAS の分析が含まれています。このアプリケーションノートでは、民間のラボで測定した両メソッドのバリデーションデータについて説明します。データの取得には SPE と、Agilent 1290 Infinity II LC および Agilent Ultivo タンデム四重極 MS システムを用い、EPA メソッドの要件を優に満たす結果が得られました。

実験方法

サンプル前処理

EPA メソッド 537.1 および EPA 533 の記載に従い、250 mL の飲料水サンプルセットを抗菌剤と塩素系反応停止剤で処理しました。サンプルは同位体標識サロゲート標準物質をスパイクしました。次に、それぞれの EPA メソッドに記載のプロトコルに従い、SPE を用いて抽出しました。抽出物に内部標準をスパイクして、最終的に 1 mL になるまで濃縮し、LC/MS 分析のために保存しました。短い鎖長の PFAS の回収率を向上させるために、最終的に 1 mL になった抽出物は、EPA メソッド 537.1 では 96/4 メタノール/水で、EPA 533 では 80/20 メタノール/水で調製しました。サンプル前処理プロトコルのほか、最適化された回収率、予測された再現性および精度の詳細については、その他のアジレントアプリケーションノート^{3,4}を参照してください。

標準液の調製

適切に標準原液を希釈し、各濃度 (30、20、10、5、1、0.5 ng/mL) のキャリブレーション溶液を作製しました。EPA メソッド 537.1 または EPA 533 に従い、それぞれをメタノール/水で調製しました。

装置構成

ハイスピードポンプ搭載 1290 Infinity II LC と Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS を組み合わせて分析をしました。LC は 20 μ L 注入ループとマルチサンブラで構成しました。PFAS 汚染や、溶媒および LC システムからのバックグラウンドを回避するために、表 1 に記載のディレイカラムを使用しました。詳細な設定については、他のアジレントアプリケーションノート⁵で解説しています。

表 1 と表 2 に LC と MS のパラメータを示します。

表 1. LC パラメータ

パラメータ	EPA 537.1	EPA 533
液体クロマトグラフ	Agilent 1290 Infinity II	Agilent 1290 Infinity II
ディレイカラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 50 mm, 4 μ m (p/n 699770-902T)	Agilent Poroshell 120 EB-C18, 2.1 \times 50 mm, 4 μ m (p/n 699770-902T)
分析カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.9 μ m (p/n 699675-902)	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.9 μ m (p/n 699675-902)
カラム温度	55 °C	55 °C
移動相	A) 0.1 % 酢酸水溶液 B) メタノール	A) 20 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B) メタノール
合計分析時間	9 分	9 分
ポストタイム	2.5 分	2.5 分
注入量	4 μ L	7 μ L
流量	0.7 mL/min	0.7 mL/min

表 2. MS パラメータ

パラメータ	EPA 537.1	EPA 533
質量分析計	Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS	Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS
イオン化モード	ネガティブ ESI	ネガティブ ESI
キャピラリー電圧	3500 V	3500 V
ノズル電圧	500 V	500 V
ネプライザ圧力	45 psi	45 psi
ドライガス温度	300 °C	300 °C
ドライガス流量	9.0 L/min	9.0 L/min
ソースガス温度	260 °C	260 °C
ソースガス流量	11.0 L/min	11.0 L/min

MS 取り込みメソッド

Agilent MassHunter を用いてダイナミック MRM (dMRM) 取り込みを実行しました。データ処理はすべて、MassHunter 定量ソフトウェアと Quant-My-Way テンプレートを使用了。表 3 は、EPA 537.1 および 533 による Ultivo トリプル四重極 LC/MS での PFAS 測定に関する最適化されたトランジションと化合物のパラメータを示しています。

表 3. 化合物固有のパラメータ

メソッド	化合物名	ISTD	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	フラグメンタ (V)	コリジョンエネルギー (V)
537.1	PFTeDA	なし	712.9	668.5	100	12
537.1	PFTeDA	なし	712.9	169	60	0
537.1	PFTrDA	なし	663	618.7	101	8
537.1	PFTrDA	なし	663	169	101	15
両方	11Cl-PF3OUdS	なし	631	451	70	38
両方	11Cl-PF3OUdS	なし	631	85	70	30
533	PFDaA-13C2	あり	614.9	570	104	5
両方	PFDaA	なし	613	268.7	100	7
両方	PFDaA	なし	613	568.9	79	12
537.1	Et-FOSAA-D5	なし	589	419	115	15
537.1	Et-FOSAA	なし	584	525.9	115	15
537.1	Et-FOSAA	なし	584	419	115	15
537.1	Me-FOSAA-D3	あり	573	418.9	115	19
537.1	Me-FOSAA	なし	570	482.9	115	15
537.1	Me-FOSAA	なし	570	418.9	115	12
533	PFA-13C7	なし	570	525	98	8
両方	PFA	なし	563	519	83	8
両方	PFA	なし	563	218.7	100	15
両方	9Cl-PF3OUdS	なし	531	351	100	28
両方	9Cl-PF3OUdS	なし	531	351	98	20
両方	9Cl-PF3OUdS	なし	531	83	98	30
533	8-2 FTS-13C2	あり	529	80.9	173	56
533	8-2 FTS	なし	527	506.8	173	28
533	8-2 FTS	なし	527	81	173	56
533	PFDA-13C6	あり	519	474	102	5
537.1	PFDA-13C2	なし	514.9	469.9	91	8
両方	PFDA	なし	513	468.6	91	8
両方	PFDA	なし	513	218.7	100	8
533	PFOS-13C8	あり	507	80	210	50
両方	PFOS-13C4	あり	502.9	80	110	46
両方	PFOS	なし	498.9	99	100	46
両方	PFOS	なし	498.9	80	100	46
533	PFNA-13C9	あり	472	427	66	5
両方	PFNA	なし	462.9	418.9	76	8
両方	PFNA	なし	462.9	169	76	17
533	PFHpS	なし	448.9	98.7	170	44
533	PFHpS	なし	448.9	79.7	170	52
533	6-2 FTS-13C2	あり	429	81	161	48
533	6-2 FTS	なし	427	407	116	24
533	6-2 FTS	なし	427	81	116	48
533	PFOA-13C8	あり	421	376	79	8
両方	PFOA-13C2	あり	415	370	79	8
両方	PFOA	なし	412.9	368.9	79	8
両方	PFOA	なし	412.9	169	79	17
533	PFHxS-13C3	あり	401.9	99	164	45
両方	PFHxS	なし	398.9	99	80	42

結果と考察

化合物は十分にクロマトグラフィー分離され、ターゲットピークはEPAメソッド基準を優に満たすピークの非対称性係数で適切に分離されました。両方のEPAメソッドで、Agilent Poroshell EC-120カラムを用いて分離を行いました。カラムは粒子径が2 µm未満の表面多孔性であり、背圧は高くなく高流量でシャープなピークを得られます。結果として、クロマトグラフィーがEPA要件に適合し、EPA 533および537.1の両方で分析メソッドは10分未満の分析時間（ポストタイム2.5分）に短縮されました。分析時間が20分を超えるEPAメソッドと比較し、高流量を使用することでスループットが大幅に向上しました。ラボのバリデーションで分析されたEPA 537.1およびEPA 533によるPFASの代表的なクロマトグラムが、図1および2に示されています。

検量線は重み付け1/xの線形適合法を使用して生成し、両方のEPAメソッドの要件に従い検量線がゼロを通過するようにしました。今回の実験では、各化合物に使用したキャリブレーション標準液で最低5つのポイントを使用し、EPA 533および537.1の両方ですべての成分に対してR²は0.99を上回り、良好な直線性が得られました。

メソッド	化合物名	ISTD	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	フラグメンタ (V)	コリジョンエネルギー (V)
両方	PFHxS	なし	398.9	80	110	45
両方	ADONA	なし	377	251	95	1
両方	ADONA	なし	377	84.9	95	38
533	PFHpA-13C4	あり	367	322	66	5
両方	PFHpA	なし	362.9	319	82	1
両方	PFHpA	なし	362.9	169	82	17
533	PFPeS	なし	349	99	110	45
533	PFPeS	なし	349	80	110	45
533	4-2FTS-13C2	なし	329	309	113	20
533	4-2FTS	なし	327	307	113	20
533	4-2FTS	なし	327	80.9	113	28
533	PFHxA 13C5	あり	318	272.9	66	5
537.1	PFHxA 13C2	なし	314.9	269.9	70	4
533	PFEESA	なし	315	135	103	20
533	PFEESA	なし	315	69.1	103	56
両方	PFHxA	なし	313	268.6	70	4
両方	PFHxA	なし	313	119	70	22
533	PFBS-13C3	あり	302	98.9	133	29
両方	PFBS	なし	298.9	98.9	110	30
両方	PFBS	なし	298.9	80	110	42
533	NFDHA	なし	295	201	83	0
533	NFDHA	なし	295	85	83	24
両方	HFPO-DA-13C3	あり	287	169	100	1
両方	HFPO-DA	なし	285	185	100	12
両方	HFPO-DA	なし	285	169	100	1
533	PFMBA	なし	279	235	68	0
533	PFMBA	なし	279	85	68	4
533	PFPeA-13C5	あり	268	223	59	4
533	PFPeA	なし	263	219	59	0
533	PFMPA	なし	229	185	89	8
533	PFMPA	なし	229	85	89	8
533	PFBA-13C4	あり	217	171.7	62	4
533	PFBA-13C3	あり	216	171.7	62	4
533	PFBA	なし	213	168.7	62	4

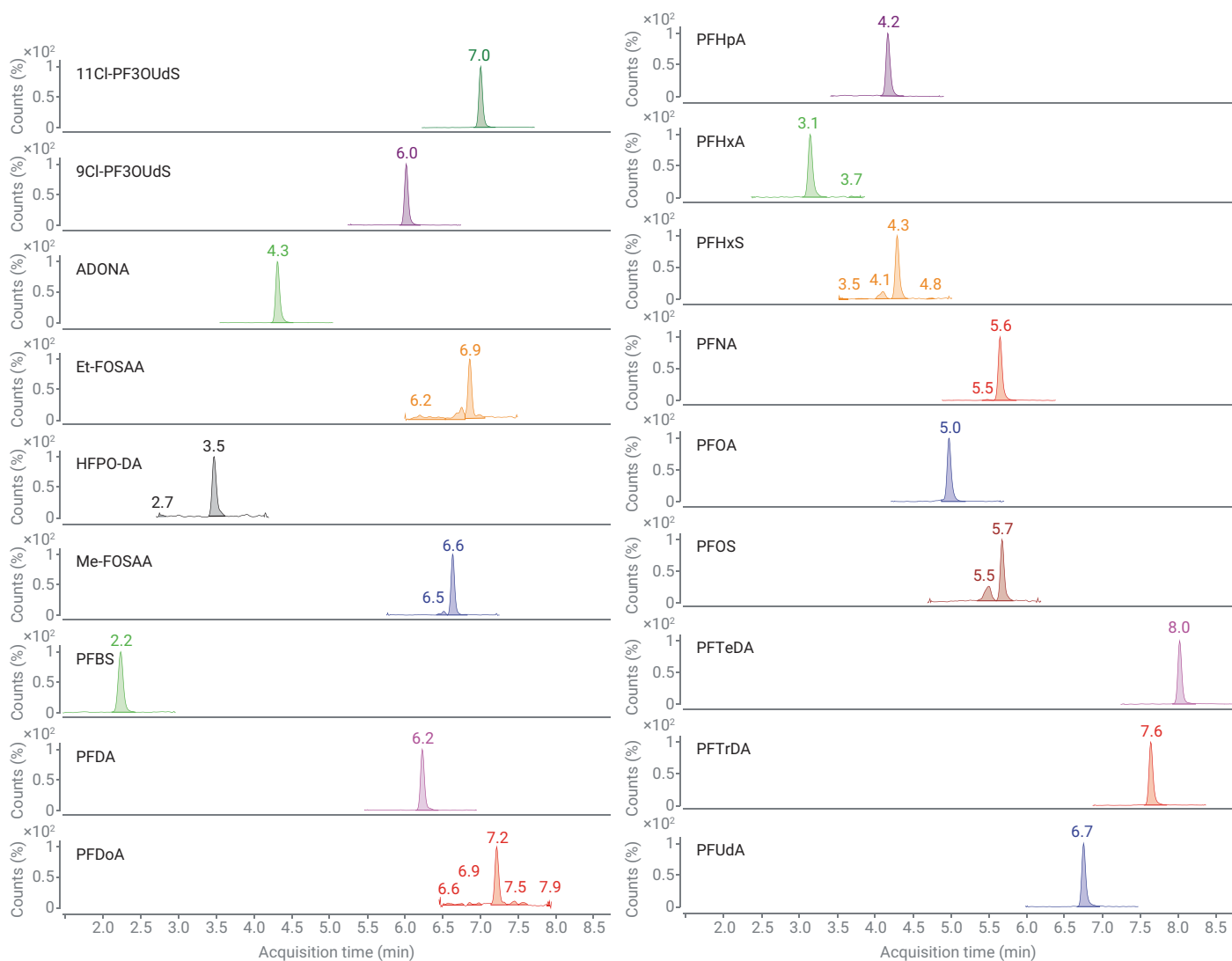


図 1. EPA 537.1 による、飲料水中に 2 ng/L スパイクした 18 種の PFAS の MRM クロマトグラム

ブランクコンタミネーション

この実験では、ディレイカラムを使用することにより、バックグラウンド PFAS コンタミネーションが大幅に低下し、両方の EPA メソッドのメソッドレポートレベルを下回りました。さらに、キャリアオーバー調査を実施し、最高濃度キャリブレーション標準液の分析後に、ブランク標準液における PFAS コンタミネーションの有無を調べました。多くの場合、キャリアオーバーは観察

されませんでした。少数の化合物にわずかなキャリアオーバーが見られました。わずかなキャリアオーバーは少なくとも、最低キャリブレーション標準液の 5 分の 1 でした。このような低濃度での LC/MS/MS 感度 (サンプル中 2 ng/L の 5 分の 1) はトリプル四重極 LC/MS の高感度を証明しており、通常、EPA 537.1 や EPA 533 を実施しているラボには必要ありません。

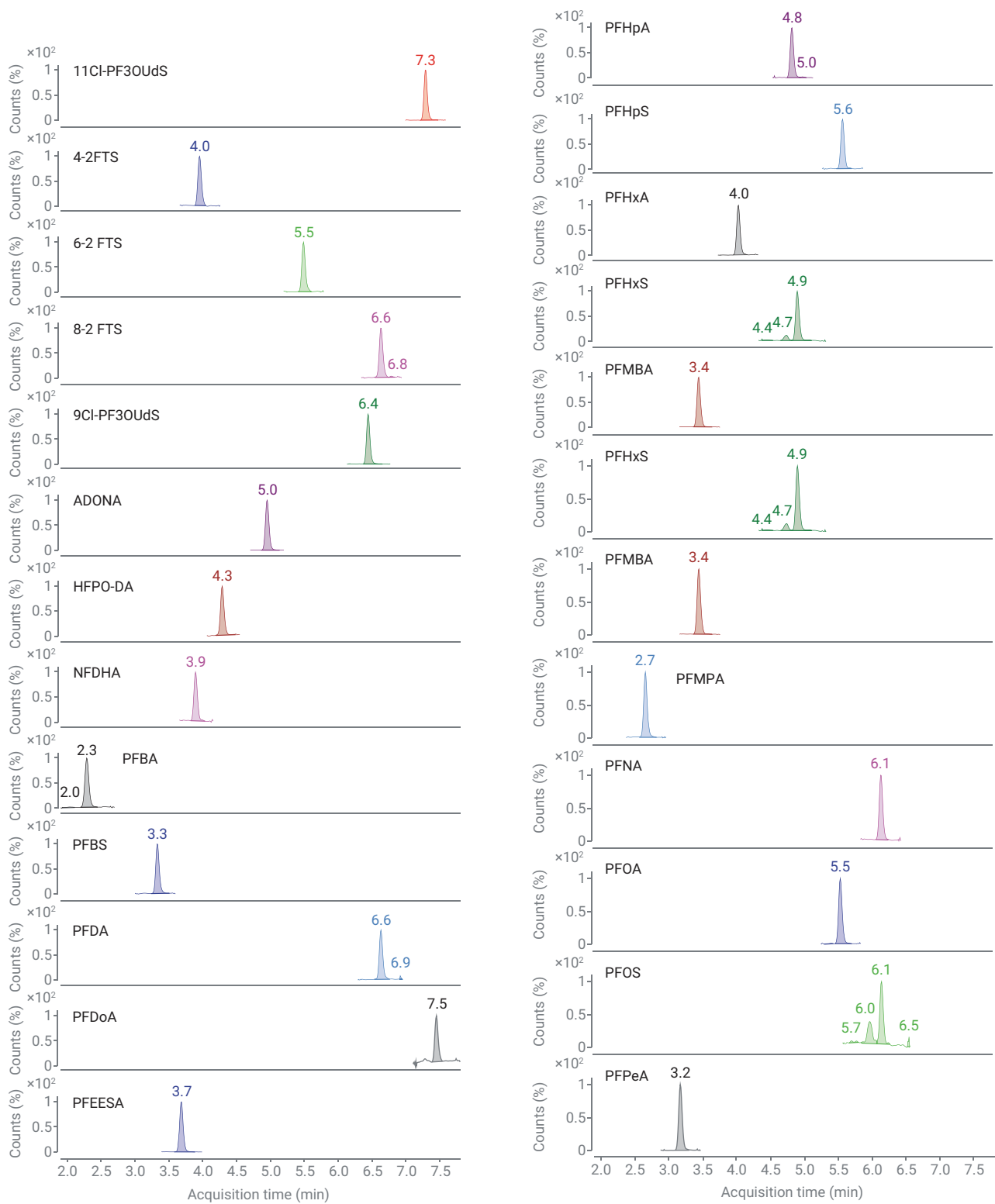


図 2. EPA 533 による、ブランク中の 1 ng/L PFAS (25 種) の抽出 MRM クロマトグラム (定量ランジション)

回収率と再現性

メソッド全体の回収率と再現性は、250 mL の飲料水サンプルに既知の濃度で全成分をスパイクすることにより評価しました。サンプルを適切に保存処理し、EPA 537.1 または 533 に対応する内部標準を添加しました。5 つの試薬および飲料水サンプルは、EPA 537.1 および 533 に記載の全成分について、それぞれ 4 ng/L をスパイクしま

した。これらのサンプルに SPE を実行し、Ultivo トリプル四重極 LC/MS で分析しました。平均回収率と相対標準偏差 (RSD) を表 4 に示します。回収率は EPA メソッドで要求される 70 % ~ 130 % の範囲内に十分収まっていた。EPA 533 および 537.1 のテスト対象の全成分に関して、試薬と最終飲料水のすべてのケースにおいて RSD は 20 % 未満でした。

メソッドレポートレベル

メソッド検出レベル (MDL) は、EPA 533 および 537.1 両方の全成分に対して EPA メソッドで定められた 50 ~ 150 % の回収率になるまで段階的な低濃度でスパイクし、繰り返し分析を 8 回実施して計算しました。スパイク済みのサンプルに SPE 抽出を行い、濃縮させて、トリプル四重極 LC/MS で分析しました。EPA 533 および 537.1 の

表 4. EPA 533 および 537.1 でテストされた試薬水と最終飲料水中の PFAS の回収率および RSD (%)

成分	試薬水				最終飲料水			
	EPA 533		EPA 537.1		EPA 533		EPA 537.1	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
PFBA	97 %	2 %	–	–	92 %	3 %	–	–
PFMPA	79 %	5 %	–	–	77 %	3 %	–	–
PFPeA	91 %	3 %	–	–	92 %	5 %	–	–
PFBS	96 %	4 %	109 %	5 %	95 %	5 %	106 %	8 %
PFMBA	94 %	3 %	–	–	92 %	6 %	–	–
PFEESA	93 %	6 %	–	–	91 %	5 %	–	–
NFDHA	93 %	8 %	–	–	98 %	7 %	–	–
4:2 FTS	96 %	6 %	–	–	91 %	10 %	–	–
PFHxA	93 %	5 %	119 %	9 %	90 %	3 %	116 %	8 %
PFPeS	95 %	5 %	–	–	96 %	7 %	–	–
HFPO-DA	92 %	12 %	116 %	11 %	93 %	6 %	111 %	10 %
PFHpA	81 %	9 %	–	–	85 %	4 %	–	–
PFHxS	92 %	8 %	102 %	7 %	100 %	8 %	114 %	5 %
ADONA	90 %	2 %	112 %	8 %	87 %	1 %	109 %	8 %
6:2 FTS	101 %	15 %	–	–	104 %	3 %	–	–
PFOA	89 %	7 %	101 %	5 %	89 %	5 %	117 %	7 %
PFHpS	92 %	5 %	–	–	85 %	10 %	–	–
PFNA	95 %	6 %	115 %	6 %	95 %	6 %	113 %	8 %
PFOS	94 %	9 %	98 %	6 %	100 %	6 %	103 %	7 %
8:2 FTS	109 %	3 %	–	–	97 %	8 %	–	–
9Cl-PF3OUdS	110 %	17 %	110 %	6 %	122 %	10 %	109 %	9 %
PFDA	93 %	6 %	112 %	6 %	93 %	6 %	110 %	8 %
PFUnA	94 %	4 %	–	–	89 %	3 %	–	–
11Cl-PF3OUdS	81 %	7 %	106 %	7 %	77 %	8 %	109 %	10 %
PFDoA	96 %	12 %	101 %	14 %	100 %	14 %	96 %	17 %
Me-FOSAA	–	–	126 %	8 %	–	–	122 %	9 %
Et-FOSAA	–	–	120 %	6 %	–	–	118 %	8 %
PFHpA	–	–	122 %	6 %	–	–	126 %	7 %
PFTeDA	–	–	97 %	9 %	–	–	102 %	9 %
PFTriDA	–	–	103 %	5 %	–	–	110 %	9 %
PFUnA	–	–	98 %	4 %	–	–	104 %	9 %

両方で全成分の MDL は 1 ng/L 未満となり、Ultivo トリプル四重極 LC/MS の優れた感度が実証されました。これらの検出レベルは、EPA メソッド で報告されている値をはるかに下回っています。この感度は、両方の EPA メソッドで規定された量よりも少ない量の抽出物を注入することにより達成されました。少ない注入量で、よりシャープなピーク形状が得られるとともに、分析 LC カラムおよび MS/MS にロードするマトリックス成分の量を少なくすることで、汚染を低減して、MS イオン源のクリーニングの間隔を伸ばせる可能性があります。

結論

Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MSS システムは、EPA メソッド 533 および 537.1 に必要とされるレベルで PFAS を定量するための優れた感度を実証しました。民間のラボ環境における性能は、このメソッドが EPA メソッドで求められているよりも低いレポートレベルであることを示しています。ディレイカラムと Agilent Poroshell EC-120 カラムを使用することで良好な分離が得られました。また、分析を妨げるバックグラウンドレベルなしで、すべての PFAS の分離と定量に必要なとされる以上のピークの非対称性係数を得られました。分離では、分析時間が EPA メソッドで示された時間よりもはるかに短縮されました。250 mL のサンプルを SPE で抽出した場合、両方の EPA メソッドの試薬水と最終飲料水の回収率は EPA メソッドのガイドラインを上回りました。Ultivo トリプル四重極 LC/MS と組み合わせた 1290 Infinity II LC は、飲料水中の PFAS の分析と定量に最適です。

表 5. EPA 533 および EPA 537.1 で分析されたすべての PFAS のメソッド検出限界

化合物	EPA 533	EPA 537.1
	MDL (ng/L)	MDL (ng/L)
PFBA	0.44	–
PFMPA	0.28	–
PFPeA	0.24	–
PFBS	0.26	0.67
PFMBA	0.33	–
PFEESA	0.13	–
NFDHA	0.42	–
4:2FTS	0.36	–
PFHxA	0.39	0.67
PFPeS	0.41	–
HFPO-DA	0.44	0.81
PFHpA	0.27	–
PFHxS	0.4	0.79
ADONA	0.27	–
6:2FTS	0.67	–
PFOA	0.29	0.39
PFHpS	0.44	–
PFNA	0.41	0.62
PFOS	0.44	0.55
9Cl-PF3ONS	0.48	0.82
8:2FTS	0.49	–
PFDA	0.27	0.68
PFUnA	0.41	–
11Cl-PF30UdS	0.16	0.63
PFDoA	0.59	0.45
Me-FOSAA	–	0.82
Et-FOSAA	–	0.91
PFHpA	–	0.54
PFTeDA	–	0.62
PFTTrDA	–	0.41
PFUnA	–	0.56
ADONA	–	0.46

参考文献

- Zhanyun, W. et al. A Never-Ending Story of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)? Environ. Sci. Technol. **2017**, 51, 5, 2508–2518.
- ATSTR, PFAs Toxicological Profile Key Messages, **2018**.
- Hunt, K. et al. Extraction of Per/Polyfluoroalkyl Substances in Water Using Agilent Offline Solid Phase Extraction, Agilent Technologies application note, publication number 5994-0250EN, **2018**.
- Hindle, R. et al. EPA Method 533 for Analysis of Per/Polyfluoroalkyl Substances in Drinking Water Using Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies application note, publication number 5994-1628EN, **2020**.
- Anumol, T. et al. Recommended Plumbing Configurations for Reduction in Per/Polyfluoroalkyl Substance Background with Agilent 1260/1290 Infinity (II) LC Systems, Agilent Technologies application note, publication number 5991-7863EN, **2017**.

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いません。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, May 12, 2020
5994-1920JAJP
DE.6292361111