

SCIEX QTRAP® 4500 システムを使用した EPA 537.1 試験法による飲料水中の PFAS 分析

537.1 試験法の要件を達成できる頑健な 10 分間の分析法

Simon Roberts, Craig Butt, Dan Wright, Stephen Somerville, KC Hyland, Chris Borton
SCIEX, Redwood City, CA
EQI, Columbia, SC

米国では、飲料水中の 14 種類のペルフルオロ化合物およびポリフルオロ化合物 (PFAS) の分析のためのサンプル調製、報告ガイドライン、および品質管理が EPA の 537.1 試験法に記載されています。EPA の 537.1 試験法ガイドラインでは、液体クロマトグラフィタンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法に若干の柔軟性を持たせています。このガイドラインの範囲内で、カラムケミストリー、クロマトグラフィ、移動相、グラジエントプロファイルおよび MS/MS トランジションを含む、メソッドの最適化を行いました。EPA 537.1 に記載しているサンプルの保存および調製に関するガイドラインは規範的なものであるため、厳密に順守しました。

表 1. EPA 537.1 試験法に含まれる 14 種類の PFAS 化合物の名称、略語、および試験法検出限界 (MDL)、ならびに 6 種類の PFAS 化合物の UCMR3 ガイドラインに記載されている報告限界 (MRL)。ここでは、MDL と MRL は ng/L (ppt) で示します。

化合物	略語	試験法検出限界 (ng/L)	UCMR3 報告限界 (ng/L)
ペルフルオロヘキサンカルボン酸	PFHxA	0.09	-
ペルフルオロヘプタン酸	PFHpA	0.1	10
ペルフルオロオクタン酸	PFOA	0.1	20
ペルフルオロノナン酸	PFNA	0.09	20
ペルフルオロデカン酸	PFDA	0.1	-
ペルフルオロウンデカン酸	PFUnDA	0.1	-
ペルフルオロドデカン酸	PFDoA	0.1	-
ペルフルオロトリデカン酸	PFTriDA	0.2	-
ペルフルオロテトラデカン酸	PFTeDA	0.2	-
ペルフルオロブタンスルホン酸	PFBS	0.1	90
ペルフルオロヘキサンスルホン酸	PFHxS	0.08	30
ペルフルオロオクタンスルホン酸	PFOS	0.1	40
n-エチルペルフルオロオクタンスルホンアミド酢	n-EtFOSAA	0.1	-
n-メチルペルフルオロオクタンスルホンアミド酢	n-MeFOSAA	0.09	-

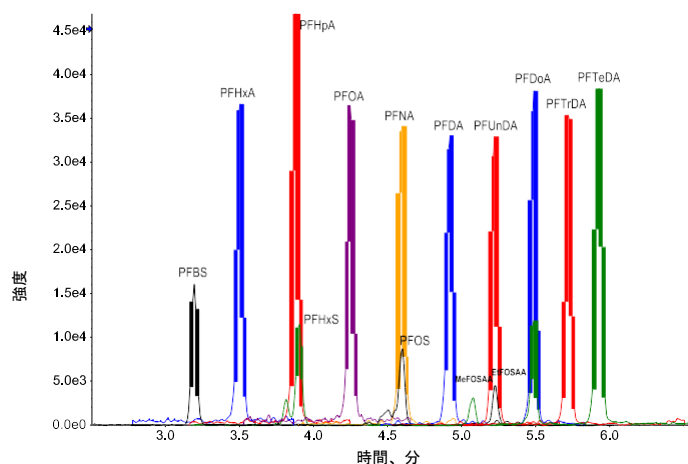


図 1. EPA 537.1 に記載がある全 14 種類の PFAS 化合物を含む、50 ng/L (ppt) の PFAS 標準物質混合物の 10 µL の注入において、合計 11 分間のランタイムで 6 分間以内にすべての化合物が溶出しています。

SCIEX QTRAP®4500 システムによる PFAS 分析の主な特長

- 測定値の適格な真度および精度、非対称係数および直線性が得られる頑健で再現性のある結果
- オートサンプラーの設定およびシステムのデッドボリュームにより、サンプルのランの合計時間はわずか 8 分間～10 分間です
- PFAS 化合物全 14 種類について、0.08 ng/L～0.2 ng/L の高感度な MDL が得られます

サンプル調製

サンプルの保存および調製は EPA 537.1 試験法のガイドラインに従って行いました。1 g の Trizma を 250 mL のポリプロピレン製ボトルに加えました。採取したサンプルの質量を計算するために、ボトルの重量を予め測定しておきました。水サンプル 250 mL 中の最終濃度が 2 ng/L となるように、サロゲート物質をサンプル容器に加えました。

Phenomenex Strata-XL 固相抽出カートリッジ（6 mL、500 mg）を用いて、以下の手順で水サンプルを抽出しました。

- 1) SPE チューブを水 15 mL、続いてメタノール 18 mL でコンディショニングしました
- 2) サンプルを約 10 mL/分～15 mL/分の流速でチューブに加えました
- 3) チューブを 7.5 mL の水で 2 回すすぎました
- 4) チューブを真空下で 5 分間乾燥させました
- 5) サンプルのボトルをメタノール 4 mL ですすぎ、メタノールを SPE チューブに移して溶出液を採取する操作を繰り返しました
- 6) サンプルを 40°C～60°C の窒素下で蒸発乾固させました
- 7) 内部標準物質 1 ng/L を含む溶液（96%メタノール、4%水）1 mL でサンプルを溶解しました
- 8) 溶液の 0.25 mL をポリプロピレン製バイアルに分注し、残りは保存しました

液体クロマトグラフィ

Agilent 1200 バイナリポンプのすべての透明なフルオロエチレンポリマー（FEP）チューブを 1/8 インチまたは 1/16 インチ PEEK チューブに交換しました。グラジエントミキシングチャンバーとオートサンプラーバルブの間にディレイカラムを接続し、溶出液またはポンプに由来する汚染物質を、分析カラムから溶出するターゲットアナライトよりも 1 分間～2 分間長く保持させました。

表 2：Phenomenex のディレイカラムおよび分析用 HPLC カラム

カラム	カラム名	サイズ
ディレイカラム	Phenomenex Luna C18 (2)	5 μ m, 30 \times 2 mm
分析カラム	Phenomenex Gemini C18	3 μ m, 50 \times 2 mm

Agilent 1200 オートサンプラーにより、各サンプル 10 μ L が 40°C に加熱された分析カラム（Phenomenex Gemini C18）に注入されました。表 2 に示すグラジエントを用いて流速 0.6 mL/分でグラジエント分離を行いました。

表 2：グラジエントプログラム

時間（分）	A% (20 mM 酢酸アンモニウム)	B% (メタノール)
0	95	5
0.1	45	55
4.5	1	99
8	1	99
8.5	95	5

質量分析法

負イオンモードエレクトロスプレーを使用して、表 3 に示すイオンソース条件および付録表 1 に示す Q1/Q3、デクラスタリングポテンシャルおよびコリジョンエネルギーでサンプルをイオン化しました。

表 3：ソースガス、温度および電圧設定

パラメーター	値
CAD	9
CUR	30
GS1	40
GS2	60
IS 電圧	-4500
TEM	450

検量線には 50、100、200、500、1000、2000、5000 および 10000 ng/L の 8 点の濃度を使用し、サロゲート物質および内部標準物質の濃度は、最終サンプル抽出物、標準溶液、ブランクおよび QC サンプルのすべてにおいて 1000 ng/L としました。定量には MultiQuant™ 3.0.2 を使用し、1.0 ポイントのガウススムージングおよび原点を通る 1/x 重み付け線形回帰を行いました（EPA 537.1 要件）。250 mL のサンプルを最終 1 mL の抽出物に濃縮したため、サンプルに 250 の濃度係数が適用されています。

結果

検量線は EPA 537.1 試験法で規定されている下記のガイドラインを達成しました。

- 1) 直線性 ($r^2 > 0.99$) (図 2)
- 2) 真度 (各濃度で $\pm 30\%$)
- 3) 精度 (添加ブランクの 4 回繰り返し測定 of RSD $< 20\%$)
- 4) 非対称係数 (図 3 に示すように、クロマトグラムの最初の 2 つのピークについて > 0.8 および < 1.5)
- 5) サロゲート物質の回収率が理論値の $\pm 30\%$
- 6) ラボ試薬ブランク (LFB) およびフィールド試薬ブランク (FRB) が MRL の 3 分の 1 未満

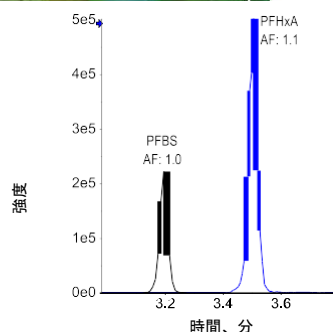


図 3 : 最初の 2 つの溶出ピークである PFBS および PFHxA に関して、標準溶液の中間点の濃度 500 ng/L で算出した非対称係数 (AF)

表 4 に示すように、MDL 算出のためのサンプルおよびその他のサンプルの分析の 8 日後においても、検量線用標準溶液は 14 種類のすべてのアナライトで理論値の $\pm 30\%$ という要件を満たしていました。

表 4 : 初回の検量線作成直後、検量線作成後 6 日目および 8 日目に注入した 50 ng/L の検量線用標準物質の真度

化合物	初回の検量線作成後の日数					
	0	6	8	0	6	8
	計算濃度 (ng/L)			真度 (%)		
PFBS	44.8	54.6	57.7	90%	109%	115%
PFHxA	54.8	52.2	52.6	110%	104%	105%
PFHpA	55.1	50.4	58.0	110%	101%	116%
PFHxS	47.1	53.9	49.3	94%	108%	99%
PFOA	52.2	58.9	53.7	104%	118%	107%
PFNA	55.1	50.9	51.3	110%	102%	103%
PFOS	47.0	45.5	48.7	94%	91%	97%
PFDA	52.7	53.5	52.3	105%	107%	105%
PFUdA	52.9	48.5	52.9	106%	97%	106%
PFDoA	54.5	56.9	55.0	109%	114%	110%
PFTeDA	52.0	54.8	51.5	104%	110%	103%
PFTeDA	51.6	51.0	53.0	103%	102%	106%
n-EtFOSAA	55.7	53.9	57.2	111%	108%	114%
n-MeFOSAA	56.7	61.6	58.2	113%	123%	116%

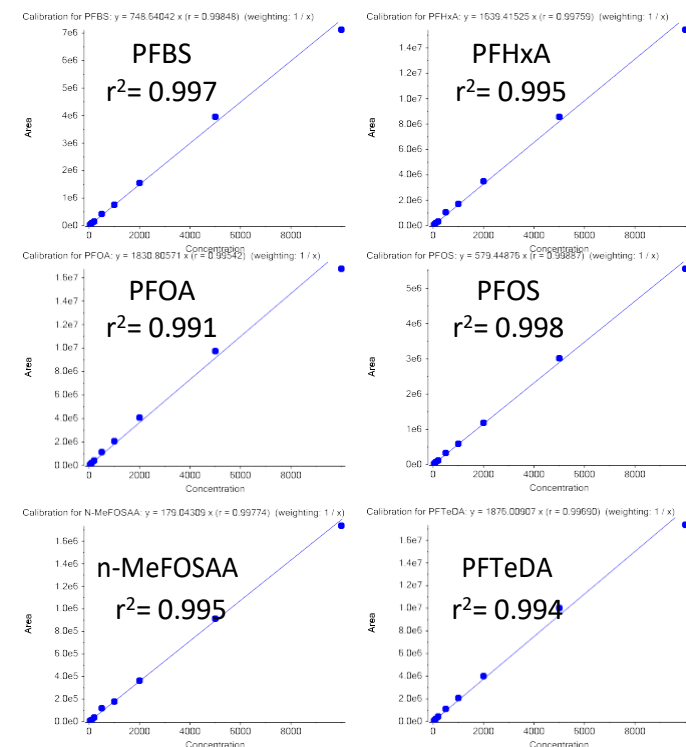


図 2 : PFAS14 種類のうち 6 種類の直線性は、原点を通り $1/x$ 濃度の重み付けを行った直線回帰で $r^2 > 0.99$ を示しました。他の 8 種類の PFAS 化合物も $r^2 > 0.99$ を示しました。

試験法検出限界を算出するために、9 つの水サンプルに 14 種類の PFAS 化合物をそれぞれ約 0.2 ng/L でスパイクし、完全な分析プロトコールに従って分析しました。

表 1 に示す MDL の計算値は、スパイクサンプルの繰り返し測定の平均値および標準偏差を用いて EPA 537.1 に従って算出しました。全 14 種類の化合物の MDL が 0.2 ng/L 未満であったことから、この分析法の優れた感度が見られました。

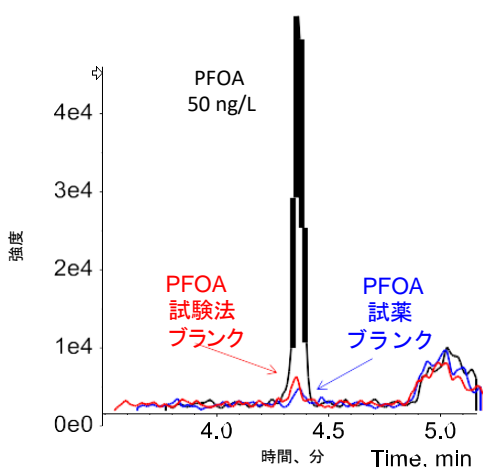


図5：ブランクサンプルのクロマトグラムからは、ブランクサンプル中の汚染物質濃度が 50 ng/L の標準溶液と比較して極めて低いことが分かります。4.9 分で見られる小さなピークは、HPLC ポンプおよび溶出液に由来する PFOA コンタミネーションであり、ディレイカラムから溶出したものです。

ブランクサンプルのレスポンスは非常に低く、MRL の 3 分の 1 未満という要件を常に下回っていました。図 5 には、試験法ブランク（全サンプル調製の過程を通した水サンプル 250 mL）を赤色で、試薬ブランク（オートサンプラーバイアル中で調製した 96%メタノールと 4%水）を青色で示しています。図 5 でクロマトグラムの 4.9 分に見られる小さなピークは、HPLC ポンプまたは溶出液に由来すると考えられる PFOA コンタミネーションの存在を示し、ディレイカラムを設置した結果、定量されるアナライต์ピーク群から十分に分離されていることを示しています。

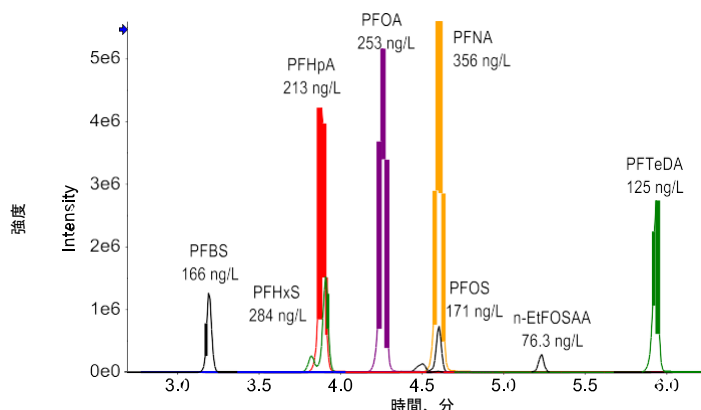


図6：PT サンプルのランを行い、試験法の性能が EPA の要件を満たしていることを確認しました。

PT サンプルは ERA から入手し、MDL 用の反復サンプルと共に分析しました。PT サンプルは水で 10 : 1 に希釈し、上記の手順に従って分析しました。PT CAT : 960 に含まれる 8 つのアナライต์の結果はいずれも PT 試験の規定濃度の $\pm 18\%$ 以内でした。

検証済みのこの 537 試験法の HPLC 法および MS/MS 分析は、いずれも拡張した 25 種類のアナライต์のリストに完全に適合していました。ただし、EPA537 試験法のサンプル調製プロトコルでは、固相抽出（SPE）に疎水性相互作用を利用した逆相を用いているため、ペルフルオロブタン酸やペルフルオロペンタン酸を含む短鎖の PFCA 群を十分に保持できません。固相抽出チューブを Strata-XL から Strata-XL-AW（弱アニオン交換）に変更し、さらに抽出に使用する溶媒を変えてサンプル調製法を改善することで、同一の試験法を使用して、より拡張したアナライต์リストの分析を行うことが可能となります。

結論

SCIEX QTRAP® 4500 システムを用いた 1 ラン 10 分間での LC-MS/MS 分析により、測定値の適格な真度、精度、非対称係数および直線性が達成可能な頑健で再現性のある結果が得られます。EPA 537.1 試験法で規定しているサンプル調製およびサンプル保存の厳格なプロトコルを順守し、PFAS 分析のワークフローおよび定量性能をさらに改善するために試験法の最適化を行いました。バックグラウンドコンタミネーションを最小限に抑えるために、LC システムを調整しました（FEP チューブの交換およびディレイカラムの設置）。サンプルの固相抽出に弱アニオン交換担体を選択することで、短鎖 PFCA の分析が改善しました。全 14 種類の PFAS 化合物において、0.08 ng/L ~ 0.2 ng/L の高感度の MDL が達成され、そのすべてが米国 EPA の UCMR3 飲料水リストの要件以上でした。また、検量線用標準溶液の再注入を必要とせずに 8 日間にわたって QC サンプル中の測定濃度の真度が保持されたことから、試験法の頑健性が実証されました。

付録表 1. MRM トランジション、装置の電圧パラメーター、保持時間

化合物名	Q1	Q3	RT (分)	DP	CE	化合物名	Q1	Q3	RT (分)	DP	CE
PFBS	298.9	80	3.2	-20	-56	13C8_PFOS	507	80	4.7	-20	-95
PFBS_2	298.9	99	3.2	-20	-46	PFDA	513	469	5	-10	-17
13C3_PFBS	302	80	3.2	-20	-56	PFDA_2	513	169	5	-10	-27
PFHxA	313	269	3.5	-10	-14	13C2_PFDA	515	470	5	-10	-17
PFHxA_2	313	119	3.5	-10	-25	13C6_PFDA	519	474	5	-10	-16
13C2_PFHxA	315	270	3.5	-10	-14	PFUdA	563	519	5.3	-10	-18
13C5_PFHxA	318	273	3.5	-10	-14	PFUdA_2	563	169	5.3	-10	-28
PFHpA	363	319	3.9	-10	-14	13C7_PFUdA	570	525	5.3	-10	-18
PFHpA_2	363	169	3.9	-10	-25	N-MeFOSAA	570	419	5.2	-50	-28
13C4_PFHpA	367	322	3.9	-10	-14	N-MeFOSAA_2	570	483	5.2	-50	-22
PFHxS	399	80	3.9	-20	-74	d3-MeFOSAA	573	419	5.2	-50	-28
PFHxS_2	399	99	3.9	-20	-60	N-EtFOSAA	584	419	5.3	-50	-28
13C3_PFHxS	402	80	3.9	-20	-74	N-EtFOSAA_2	584	526	5.3	-50	-28
PFOA	413	369	4.3	-10	-14	d5-EtFOSAA	589	419	5.3	-50	-28
PFOA_2	413	169	4.3	-10	-26	PFDaA	613	569	5.6	-10	-18
13C2_PFOA	415	370	4.3	-10	-14						
13C8_PFOA	421	376	4.3	-10	-14						
PFNA	463	419	4.7	-10	-16						
PFNA_2	463	169	4.7	-10	-26						
13C9_PFNA	472	427	4.7	-10	-16						
PFOS	499	80	4.7	-20	-95						
PFOS_2	499	99	4.7	-20	-87						
13C4_PFOS	503	80	4.7	-20	-95						

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2019 AB Sciex. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners.

AB SCIEX™ is being used under license.

Document number: RUO-MKT-02-7657-A MKT02-822A

本社：〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー21F
TEL: 0120-318-551 FAX: 0120-318-040

大阪：〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎3-19-3 ビアスタワー3F

www.sciex.jp Email: jp_sales@sciex.com



株式会社エービー・サイエックス