

乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵中の 30 種類の ペルフルオロアルキル化合物および ポリフルオロアルキル化合物の測定

Agilent Captiva EMR PFAS Food II
パススルークリーンアップと LC/MS/MS 検出を使用

著者

Limian Zhao,
Matthew Giardina, and
Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵中のペルフルオロアルキルおよびポリフルオロアルキル化合物（PFAS）の多成分残留分析メソッドの開発とバリデーションについて説明します。このメソッドでは、QuEChERS 抽出の後に、Agilent Captiva EMR PFAS Food II カートリッジによる EMR ミックスモードパススルークリーンアップと、LC/MS/MS 検出を使用しています。このメソッドの特長は、簡素で効率的なサンプル前処理、高感度な LC/MS/MS 検出、適切な標準検量線を用いた信頼性の高い定量です。新しい Captiva EMR PFAS Food II カートリッジは、動物由来の食品と植物由来の穀類、豆類の食品に含まれる PFAS の分析専用開発および最適化されています。このメソッドの適合性、感度、真度、精度などについて、AOAC 標準メソッド性能要件（SMPR）2023.003 に基づいてバリデーションしました。このメソッドが、乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵に含まれる 4 種類の主要な PFAS ターゲット（ペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）、ペルフルオロオクタン酸（PFOA）、ペルフルオロノナン酸（PFNA）、ペルフルオロヘキサンスルホン酸（PFHxS））とその他の 26 種類の PFAS ターゲットに必要な定量下限（LOQ）、回収率、再現性（RSD）を満たしていることを証明しました。

はじめに

ここ数年で、食品中の PFAS 残留物の測定に対する関心は高まっており、より多くの注目を集めるようになってきました。2023 年 4 月に、欧州委員会は鶏卵、魚、魚介類、肉、内臓に含まれる 4 種類の主要な PFAS 化合物 (PFOS、PFOA、PFNA、PFHxS) に関する規制を施行しました。¹ 2023 年 11 月には AOAC が、農産物、飲料、乳製品、鶏卵、魚介類、肉製品、飼料に含まれる 30 種類の PFAS の分析について、SMPR 2023.003 をリリースしました。²

PFAS 分析用の LC/MS/MS ベースのメソッドは、環境水や土壌の分析に広く適用されています。^{3,4} PFAS 化合物には酸性基が含まれるため、ネガティブモードで容易かつ効率的にイオン化でき、メソッドの感度や選択性の面で有利に働きます。

食品分析では、効率的な PFAS 抽出、マトリックス共溶出物の除去、サンプルの濃縮や希釈 (必要な場合) に、サンプル前処理メソッドが重要な役割を果たします。食品マトリックスは多種多様で複雑なため、サンプル前処理メソッドでは、サンプル抽出とマトリックスクリーンアップの効率性だけでなく、メソッド全体のシンプルさ、サンプル処理の効率性、さまざまなマトリックスへの対応が求められます。水、土壌、その他のマトリックスなどの環境サンプルにおける PFAS 分析には、弱アニオン交換 (WAX) 充填剤ベースの固相抽出 (SPE) メソッドが広く使用されてきました。ただし SPE メソッドは、複雑な固体食品のサンプル前処理には適していません。食品サンプルはカートリッジにロードする前に抽出する必要があるためです。また、一般的な SPE 手順にはコンディショニング、平衡化、ローディング、洗浄、溶出が含まれており、多くの時間と溶媒が必要です。

食品サンプル中の PFAS の前処理には、QuEChERS 抽出の後に一般的な分散 SPE (dSPE) クリーンアップが使用されてきました。^{5,6} ただし、dSPE クリーンアップでは多くの食品マトリックスで効率的なマトリックス除去ができず、食品の低い LOQ 要件に対応できません。このため、dSPE クリーンアップの後に、WAX SPE を用いた別のクリーンアップステップが追加されています。⁵ このため、このメソッドには時間と手間がかかり、サンプル処理の生産性に大きな影響が出ます。また、このタイプのサンプルクリーンアップでは、PFAS ターゲットが失われます。

Agilent Captiva EMR PFAS Food カートリッジは、総合的なミックスモードパススルークリーンアップに対応しており、食品中の PFAS の分析専用が開発および最適化されています。多種多様な食品マトリックスに対応するため、2 種類のカートリッジ (I および II) が設計されました。この研究の目的は、乳児用調整粉乳、牛乳、鶏卵に含まれる 30 種類の PFAS を測定する完全なワークフローを開発してバリデーションすることです。このメソッドでは、QuEChERS 抽出の後に、Captiva EMR PFAS Food II カートリッジによるパススルークリーンアップと、Agilent 6495D トリプル四重極 LC/MS による検出を使用しています。

実験方法

材料および試薬

非標識 PFAS と同位体標識された内部標準 (ISTD) 溶液は、Wellington Laboratories (ゲルフ、オンタリオ州、カナダ) から購入しました。メタノール (MeOH)、アセトニトリル (ACN)、イソプロピルアルコール (IPA) は、VWR (ラドナー、ペンシルベニア州、米国) から購入しました。酢酸 (AA) と酢酸アンモニウムは、MilliporeSigma (バーリントン、マサチューセッツ州、米国) から購入しました。

溶液および標準

28 種類の PFAS ターゲット用にそれぞれ、非標識 PFAS 溶液を MeOH で 200、20、2 ng/mL の濃度に希釈して、3 種類の非標識 PFAS スパイク溶液 (I、II、III) を用意しました。ただし、例外として他の 28 種類のターゲットの濃度に対して、PFBA では 10 倍、PFPeA では 2 倍の濃度としました。

ISTD スパイク溶液は、ISTD 一次溶液を MeOH で 100 ng/mL の濃度に希釈して用意しました。

非標識 PFAS スパイク溶液と同位体 ISTD スパイク溶液を使用して、非標識 PFAS ターゲットの添加用標準の濃度が 20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000 ng/L、ISTD の濃度が 1,000 ng/L になるように、MeOH で希釈しました。これらは、マトリックスのプレスパイク QC サンプルにも使用しました。すべての標準を 4 °C で保管し、2 週間以内に使用しました。

1 % の AA を含む ACN 抽出溶媒は、10 mL の氷酢酸を 990 mL の ACN に加えて用意し、室温で保存しました。LC 移動相 A は 5 mM の NH₄OAc 水溶液、移動相 B は MeOH です。

実験装置および材料

この研究では、1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)、1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A) で構成される Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用しました。この LC システムを、Agilent Jet Stream iFunnel エレクトロスプレーイオン (ESI) 源を搭載した Agilent 6495D LC/TQ に連結しました。データの取り込みと解析には、Agilent MassHunter Workstation ソフトウェアを使用しました。

サンプル前処理に使用したその他の機器は以下のとおりです。

- Centra CL3R 遠心機 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)
- ジェノグラインダー (メアチエン、ニュージャージー州、米国)
- Multi Reax 試験管シェーカー (Heidolph、シュヴァーバツハ、ドイツ)
- ピペットとリピーター (Eppendorf、ニューヨーク州、米国)
- Agilent 加圧式マニホールド SPE カートリッジ 48 本用 (PPM-48、部品番号 5191-4101)
- CentriVap および CentriVap コールドトラップ (Labconco、ミズーリ州、米国)
- 超音波洗浄器 (VWR、ペンシルバニア州、米国)

1290 Infinity II LC システムの変更には、Agilent InfinityLab PFC ディレイカラム、4.6 × 30 mm (部品番号 5062-8100) を含む Agilent InfinityLab PFC フリー HPLC 変換キット (部品番号 5004-0006) を使用しました。クロマトグラフィーによる分離には、Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm (部品番号 959758-902) と Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラム、2.1 mm、1.8 μm、圧力上限 1200 bar、UHPLC ガード (部品番号 821725-901) を使用しました。

この他に、次のようなアジレントの消耗品を使用しました。

- Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キット、EN 15662 メソッド、バッファ塩、セラミックホモジナイザ (部品番号 5982-5650CH)
- Captiva EMR PFAS Food II カートリッジ、6 mL、750 mg (部品番号 5610-2232)
- ポリプロピレン (PP) スナップキャップおよびバイアル、1 mL (部品番号 5182-0567 および 5182-0542)
- PP スクリューキャップ型バイアルおよびキャップ、2 mL (部品番号 5191-8150 および 5191-8151)
- チューブおよびキャップ、50 mL、50 個 (部品番号 5610-2049)
- チューブおよびキャップ、15 mL、100 個 (部品番号 5610-2039)

研究で使用した消耗品はすべて、許容可能な PFAS 清浄度についてテストおよび検証済みです。

LC/MS/MS 機器の条件

LC バイナリポンプの条件を表 1 に、マルチサンブラプログラムを表 2 に示します。カラム温度は 55 ± 0.8 °C に設定しました。MS データはネガティブイオンモードで、166 V の一定のフラグメンタ設定で取り込みました。ESI イオン源の設定は乾燥ガスが 150 °C、18 L/min、シースガスが 390 °C、12 L/min、ネブライザガスが 15 psi、キャピラリー電圧が 2,500 V、ノズル電圧が 0 V です。

表 1. LC/MS/MS 用の LC ポンプ条件

| パラメータ | 設定 | | | |
|--------|------------------------------|-------|--------|-------------|
| 移動相 A | 5 mM NH ₄ OAc 水溶液 | | | |
| 移動相 B | MeOH | | | |
| グラジエント | 時間 (分) | %A | %B | 流量 (mL/min) |
| | 0.00 | 98.00 | 2.00 | 0.400 |
| | 2.00 | 98.00 | 2.00 | 0.400 |
| | 2.50 | 45.00 | 55.00 | 0.400 |
| | 6.50 | 30.00 | 70.00 | 0.400 |
| | 8.00 | 20.00 | 80.00 | 0.460 |
| | 14.20 | 0.00 | 100.00 | 0.460 |
| | 17.00 | 0.00 | 100.00 | 0.400 |
| 17.10 | 98.00 | 2.00 | - | |
| ポストタイム | 3.0 分 | | | |

表 2. LC/MS/MS 用の LC マルチサンブラプログラム

| パラメータ | 設定 | | | | |
|----------|-------------------|-----|--------|-------------|--------|
| 注入プログラム | 水 10 μL を吸引 | | | | |
| | サンプル 10 μL を吸引 | | | | |
| | ニードルを洗浄 | | | | |
| | 水 50 μL を吸引 | | | | |
| | 空中で 10 μL を 5 回混合 | | | | |
| | 注入 | | | | |
| マルチウォッシュ | ステップ | 溶媒 | 時間 (秒) | シートバックフラッシュ | ニードル洗浄 |
| | 1 | IPA | 10 | 有効化 | 有効化 |
| | 2 | ACN | 10 | 有効化 | 有効化 |
| | 3 | 水 | 10 | 有効化 | 有効化 |
| | 初期条件 | 水 | NA | 有効化 | 有効化 |

サンプル前処理

乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵のサンプルは、地元の食料品店で購入しました。新鮮な牛乳と乳児用調製粉乳のサンプルは、そのまま抽出に使用しました。新鮮な鶏卵は割り、抽出前にポリプロピレン製のボトル内で十分に混ぜました。

サンプル前処理のため、乳児用調製粉乳では 5 g のサンプル、牛乳と鶏卵では 10 g のサンプルを抽出に使用しました。非標識 PFAS スパイク溶液と ISTD スパイク溶液を QC サンプルに適切に添加し、ISTD のみをマトリックスブランクに添加しました。スパイク後に、サンプルを 10 ~ 15 秒間ボルテックスしました。これで、図 1 のサンプル処理手順を進める準備ができました。

表 3. PFAS ターゲット、ISTD、コロール酸の干渉をモニタリングするための、(Agilent 6495D LC/MS システムでの) MS 取り込み条件

| 化合物 | RT (分) | 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 (V) | コリジョン セル加速電圧 (V) | iFunnel モード |
|------------|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| PFBA | 4.78 | 213 | 169 | 8 | 2 | 標準 |
| PFPeA | 5.29 | 263 | 219 | 4 | 2 | 標準 |
| PFHxA | 5.93 | 313 | 269 119 | 8 24 | 2 | 標準 |
| PFHpA | 6.72 | 363 | 319 169 | 8 16 | 2 | 標準 |
| PFOA | 7.6 | 413 | 369 219 | 8 16 | 2 | 標準 |
| PFNA | 8.51 | 463 | 419 219 169 | 8 16 20 | 2 | 標準 |
| PFDA | 9.3 | 513 | 469 269 219 | 12 16 20 | 2 | 標準 |
| PFUnDA | 9.88 | 563 | 519 319 269 | 12 20 20 | 2 | 標準 |
| PFDoA | 10.35 | 613 | 569 319 269 | 8 20 24 | 2 | 標準 |
| PFTrDA | 10.77 | 663 | 619 319 169 | 12 20 32 | 2 | 標準 |
| PFTeDA | 11.17 | 712.9 | 669 219 169 | 12 28 32 | 2 | 標準 |
| PFBS | 5.39 | 298.9 | 99 80 | 34 36 | 2 | 標準 |
| PFPeS | 5.99 | 348.9 | 99 80 | 40 44 | 2 | 標準 |
| PFHxS | 6.76 | 398.9 | 99 80 | 40 56 | 2 | 標準 |
| PFHpS | 7.63 | 448.9 | 99 80 | 42 50 | 2 | 標準 |
| PFOS | 8.50 | 498.9 | 99 79.9 | 50 54 | 2 | 標準 |
| PFNS | 9.29 | 548.9 | 99 80 | 52 56 | 2 | 標準 |
| PFDS | 9.86 | 598.9 | 99 80 | 56 60 | 2 | 標準 |
| PFUnDS | 10.31 | 648.9 | 99 79.8 | 56 76 | 2 | 標準 |
| PFDoS | 10.73 | 698.9 | 99 80 | 62 67 | 2 | 標準 |
| PFTrDS | 11.13 | 748.9 | 98.9 79.6 | 64 80 | 4 | 標準 |
| PFOSA | 10.0 | 497.9 | 169 78 48 | 36 36 110 | 3 | 標準 |
| 9Cl-PF3ONS | 9.03 | 530.9 | 350.9 83 | 28 32 | 3 | 標準 |

| 化合物 | RT (分) | 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 (V) | コリジョン セル加速電圧 (V) | iFunnel モード |
|---------------------------------------|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| 11Cl-PF30UdS | 10.14 | 630.9 | 450.9 83 | 36 32 | 2 | 標準 |
| HFPO-DA | 6.15 | 285 | 185 169 119 | 20 4 32 | 5 | Fragile |
| DONA | 6.83 | 377 | 251 85 | 8 32 | 5 | 標準 |
| 4:2 FTS | 5.87 | 327 | 307 81 80 | 20 36 42 | 2 | 標準 |
| 6:2 FTS | 7.55 | 427 | 407 81 80 | 30 32 58 | 2 | 標準 |
| 8:2 FTS | 9.29 | 527 | 507 81 80 | 30 46 50 | 4 | 標準 |
| 10:2 FTS | 10.35 | 627 | 606.9 81 80 | 34 42 54 | 4 | 標準 |
| ¹³ C ₂ -4:2 FTS | 5.87 | 329 | 309 | 24 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₂ -6:2 FTS | 7.55 | 429 | 409 | 28 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₂ -8:2 FTS | 9.29 | 529 | 509 | 28 | 4 | 標準 |
| ¹³ C ₂ -PFDoA | 10.35 | 615 | 570 | 12 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₂ -PFTeDA | 11.17 | 715 | 670 | 12 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₃ -HFPO-DA | 6.15 | 287 | 169 | 4 | 5 | 標準 |
| ¹³ C ₃ -PFBS | 5.39 | 302 | 80 | 44 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₃ -PFHxS | 6.76 | 402 | 80 | 48 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₄ -PFBA | 4.78 | 217 | 172 | 8 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₄ -PFHpA | 6.72 | 367 | 322 | 8 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₅ -PFHxA | 5.93 | 318 | 273 | 8 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₅ -PFPeA | 5.29 | 268 | 223 | 4 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₆ -PFDA | 9.3 | 519 | 474 | 8 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₇ -PFUnDA | 9.88 | 570 | 525 | 8 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₈ -PFOA | 7.6 | 421 | 376 | 8 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₈ -PFOS | 8.52 | 507 | 80 | 54 | 2 | 標準 |
| ¹³ C ₈ -PFOSA | 10 | 506 | 78 | 36 | 3 | 標準 |
| ¹³ C ₉ -PFNA | 8.51 | 472 | 427 | 8 | 2 | 標準 |
| TUDCA | 6.8 | 498 | 124 80 | 53 80 | 4 | 標準 |
| TCDCa | 8.6 | 498 | 124 80 | 65 80 | 4 | 標準 |
| TDCA | 9.0 | 498 | 124 80 | 69 80 | 4 | 標準 |

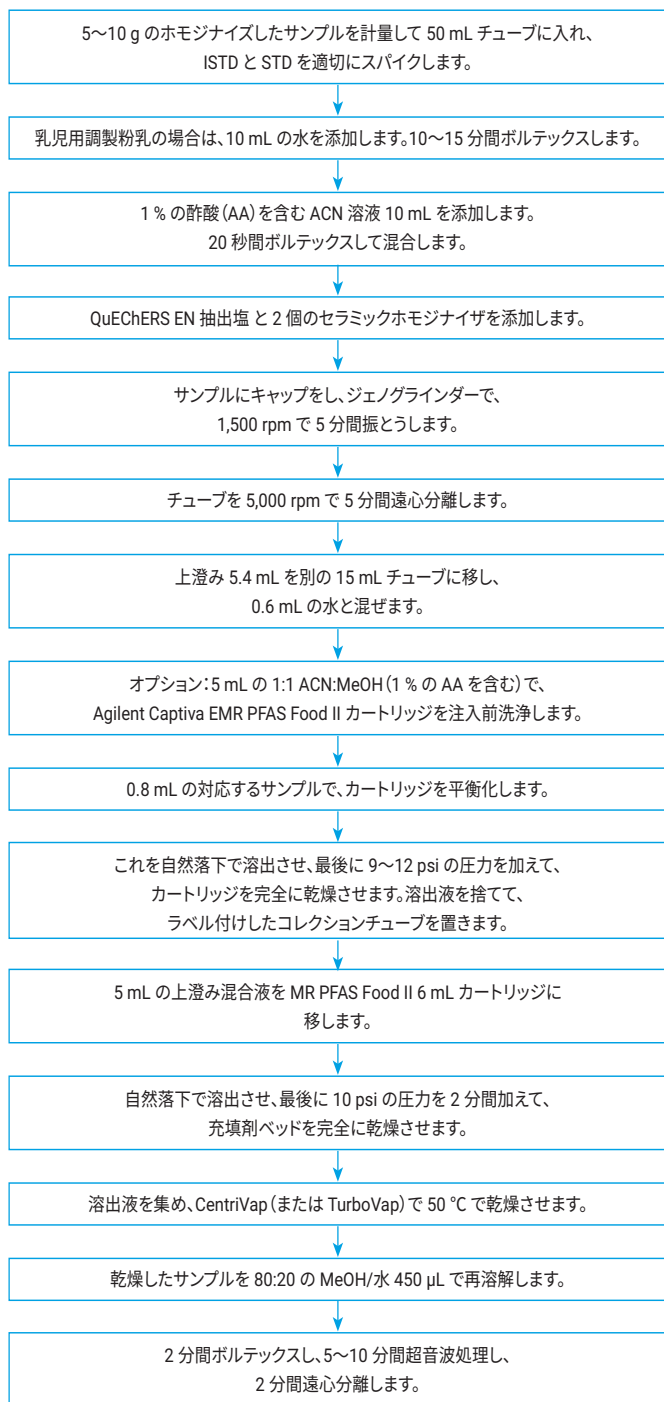


図 1. 乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵での PFAS 分析のサンプル前処理手順

メソッド性能の評価

Captiva EMR PFAS Food II カートリッジを用いた新しいパススルークリーンアップで、カートリッジによるサンプルクリーンアップ中のマトリックス除去、ターゲット回収率、再現性について評価しました。次に、メソッド全体をバリデーションしました。これにはキャリブレーションの調査、メソッド LOQ の測定、回収率の真度と精度が含まれます。ターゲット LOQ の要件はさまざまであるため、5 種類のプレススパイクした QC レベルサンプルを、レベルごとに 4 ~ 5 回レプリケートして前処理しました。さらに、マトリックスコントロールサンプル中のターゲットの定量のために、マトリックスブランクを 5 ~ 7 回レプリケートして前処理しました。これは真度評価のために重要です。一部の PFAS では、マトリックスからの影響が不可避であるためです。表 4 に、マトリックスゼロブランクとプレススパイク QC の PFAS 標準および ISTD スパイクを示します。サンプル前処理で導入されたさまざまな濃度係数によって、マトリックスでの実際のスパイクレベルが変わります。

表 4. グループ II の食品マトリックスのマトリックス適合 QC サンプルとマトリックスゼロサンプル

| | 乳児用調製粉乳 | 牛乳 | 鶏卵 | | | |
|------------------|----------------|------|------|------|------|------|
| サンプル量 (g) | 5 | 10 | 10 | | | |
| 濃度係数 | 5 倍 | 10 倍 | 10 倍 | | | |
| マトリックススパイク済みサンプル | スパイク濃度 (µg/kg) | | | | | |
| | 標準* | 内部標準 | 標準* | 内部標準 | 標準* | 内部標準 |
| ゼロ | - | 0.2 | - | 0.1 | - | 0.1 |
| PR-QC 1 | 0.01 | 0.2 | 0.01 | 0.1 | 0.01 | 0.1 |
| PR-QC 2 | 0.02 | 0.2 | 0.02 | 0.1 | 0.02 | 0.1 |
| PR-QC 3 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| PR-QC 4 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 |
| PR-QC 5 | 1.0 | 0.2 | 0.5 | 0.1 | 0.5 | 0.1 |

* 濃度は、28 種類の PFAS ターゲットの一般的な濃度のみを示します。一般的な濃度は PFBA では 10 倍、PFPeA では 2 倍です。

結果と考察

EMR ミックスモードパススルークリーンアップ

Captiva EMR PFAS Food カートリッジでは、従来の QuEChERS 抽出後のミックスモードパススルークリーンアップにより、マトリックスを総体的に除去できます。これは、炭水化物、有機酸、色素、脂肪や脂質、その他の疎水性および親水性マトリックス共溶出物などのマトリックス干渉を除去するための、シンプルで効率的な手順です。Captiva EMR PFAS Food I カートリッジにはシンプルな構造の少量の充填剤が含まれており、植物由来の生鮮食品や加工生鮮食品（果物、野菜、離乳食、ジュースなど）の分析に推奨されます。EMR PFAS Food II カートリッジにはより複雑な構造の多量の充填剤が含まれており、動物由来の生鮮食品、加工生鮮食品やドライフード（牛乳、鶏卵、肉、魚、乳児用調製粉乳など）、植物由来の一部の食品（穀類、豆類由来の飼料と食品など）、油の分析に推奨されます。

EMR ミックスモードパススルークリーンアップは、QuEChERS 抽出後に使用される従来の dSPE クリーンアップと比べて、PFAS の回収率と再現性が大幅に改善されています。EMR パススルークリーンアップを用いた PFAS 回収率を、QuEChERS 抽出後の代表的な食品サンプル抽出液（ブドウ、離乳食、乳児用調製粉乳、マグロ、鶏卵、大豆の未処理抽出液）で評価し、一般的な dSPE クリーンアップと比較しました。離乳食とブドウの抽出液のクリーンアップには Captiva EMR PFAS Food I カートリッジを使用し、大豆、乳児用調製粉乳、マグロ、鶏卵の抽出液のクリーンアップには Captiva EMR PFAS Food II カートリッジを使用しました。図 2 に、各食品マトリックス中の各ターゲットの平均回収率に基づく比較結果を示します。この結果を見ると、EMR ミックスモードパススルークリーンアップを使用した場合に、dSPE クリーンアップと比べて回収率が大幅に向上していることがわかります。

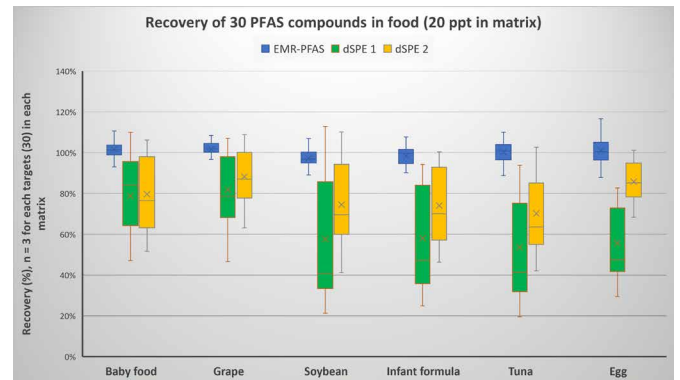


図 2. EMR ミックスモードパススルークリーンアップまたは従来の dSPE クリーンアップを用いた、食品抽出液クリーンアップメソッドの PFAS 回収率の比較

また、GC/MS フルスキャンと LC/Q-TOF トータルイオンクロマトグラム (TIC) スキャンを使用して、サンプルクリーンアップ中のマトリックス除去も評価しました。図 3 と図 4 に、その各クロマトグラムの比較を示します。この結果から、EMR ミックスモードパススルークリーンアップを使用するとマトリックス除去が大幅に改善されることがわかります。

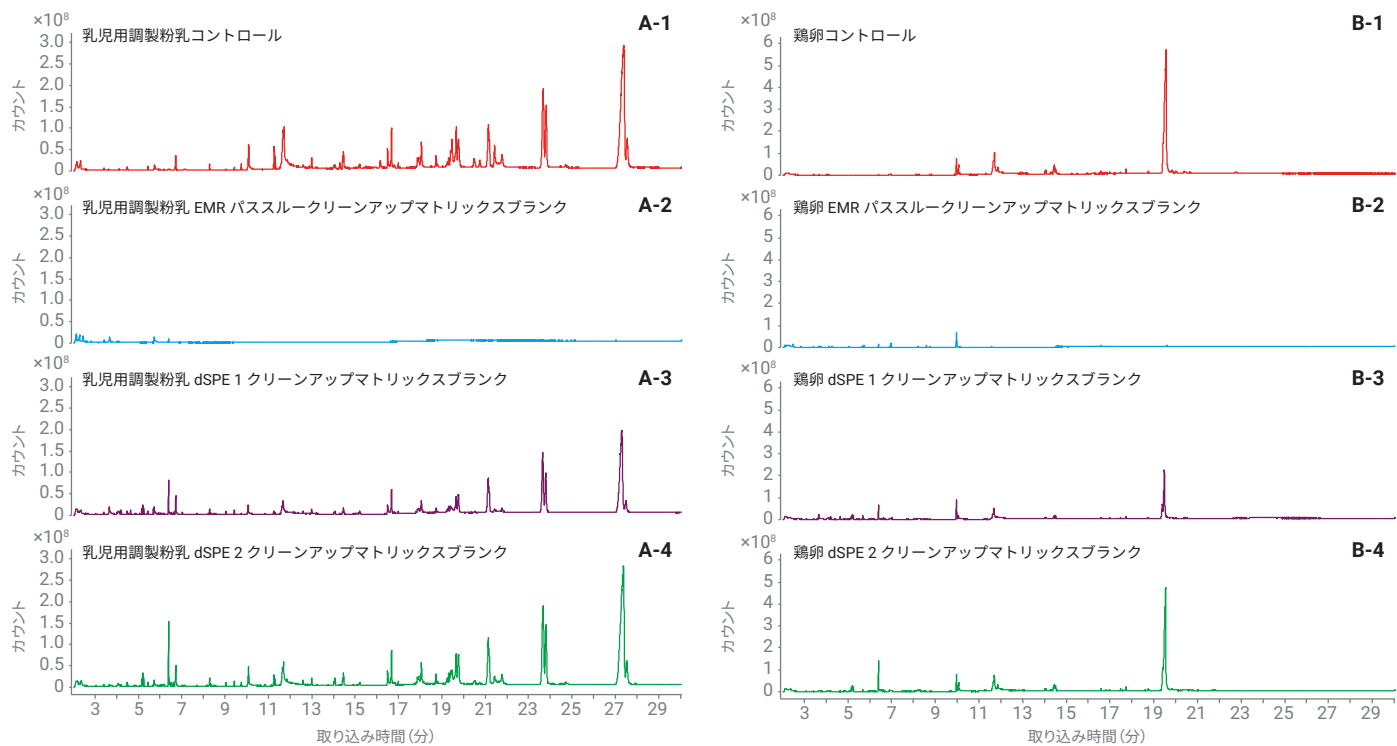


図 3. EMR ミックスモードパススルークリーンアップと従来の dSPE クリーンアップの食品マトリックス除去の比較 (GC/MS フルスキャンを使用)。マトリックスブランク用の (A) 乳児用調製粉乳サンプルと (B) 鶏卵サンプル、(1) クリーンアップなし、(2) EMR パススルークリーンアップ、(3) dSPE 1 クリーンアップ、(4) dSPE 2 クリーンアップ

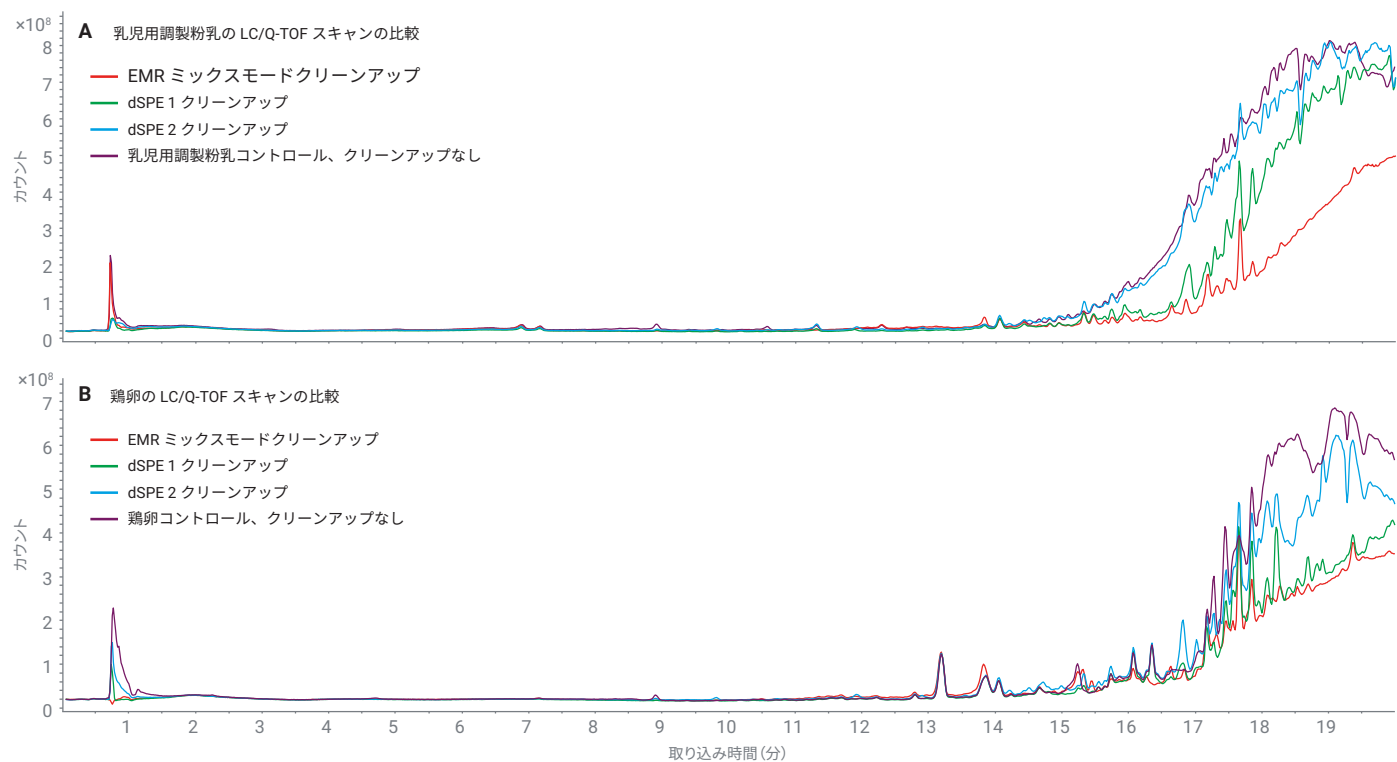


図 4. EMR ミックスモードパススルークリーンアップと従来の dSPE クリーンアップの食品マトリックス除去の比較 (LC/Q-TOF TIC (+) スキャンを使用)。(A) 乳児用調製粉乳サンプル (B) 鶏卵サンプル

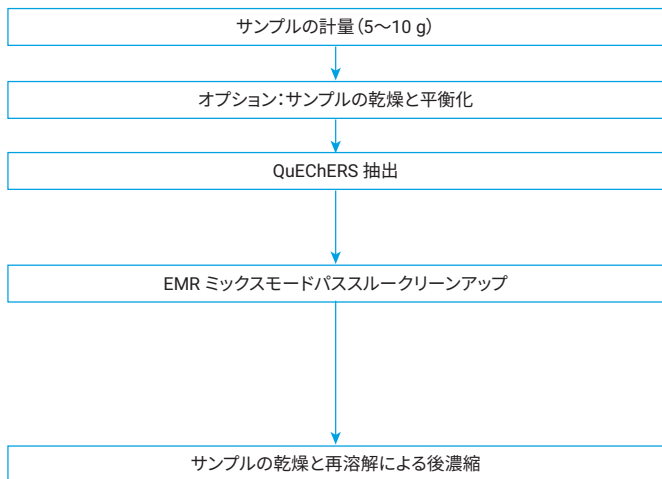
EMR ミックスモードパススルークリーンアップの重要な特長として、PFAS ターゲット回収率とマトリックス除去の改善のほかに、サンプル回収量の向上が挙げられます。サンプル回収量は通常、他の一般的な食品安全性分析（農薬や動物用医薬品の分析）では問題になりません。ただし、食品中の PFAS の分析では必要な LOQ が低～中 ppt レベルであるため、重要となる可能性があります。超低 LOQ では、メソッド感度を上げるために、後濃縮ステップを使用する必要があります。乾燥と再溶解ステップを用いるサンプルクリーンアップの後には、5～10 倍の後濃縮係数を適用することが一般的です。この結果、高い濃度係数と一貫した再溶解を実現するには、サンプル量が重要となります。通常、dSPE クリーンアップのサンプル回収量は約 50 % のみです。つまり、5 mL のサンプル抽出液をクリーニングすると、サンプル量が約 2.5 mL になってしまうということです。一方、EMR ミックスモードクリーンアップのサンプル回収量は 90 % を超えます。5 mL のサンプル抽出液をクリーニングした場合のサンプル量は、約 4.5 mL になるということです。このように大量のサンプルを確保できるため、後濃縮が容易になり、サンプル再溶解の一貫性を確保できます。

サンプル前処理手順

EMR ミックスモードパススルークリーンアップを使用すると、サンプル前処理手順全体のステップが減って手順が簡素化されるため、時間、手間、消耗品を節約できます。新たに開発されたメソッドには、QuEChERS 抽出と EMR パススルークリーンアップという 2 つの主要プロセスが含まれます。いっぽう従来のメソッドには、QuEChERS 抽出、dSPE クリーンアップ、WAX SPE 抽出という 3 つの主要プロセスが含まれます。⁵

図 5 に、2 つのサンプル前処理メソッド手順の比較を示します。従来のメソッドで使用される WAX SPE ステップは、dSPE クリーンアップ後のサンプル抽出液をさらにクリーンアップするために追加されました。ただし、SPE メソッドを前のサンプル抽出と dSPE クリーンアップのステップと一緒に導入することは困難です。未処理の有機（ACN）抽出液は、カートリッジにロードする前に、90 % 以上の水を含む溶液に切り替える必要があります。このためには乾燥させて水比率の高い溶液で再溶解するか、水で直接希釈する必要があります。どちらの場合も、WAX カートリッジにロードするために、サンプルのロード時間や前処理時間が大幅に増えることになります。また、一般的な SPE 手順にはコンディショニング、平衡化、ローディング、洗浄、溶出が含まれており、多くの時間と溶媒が必要です。前処理用のサンプル量が同じである場合、従来のメソッドでの所要時間は新しいメソッドの最大 3 倍です。また、新しいメソッドでは従来のメソッドより使用する溶媒と消耗品の量が低減します。つまり新しいメソッドを使用すれば、このようなメリットによりラボ全体の生産性が向上します。

A QuEChERS 抽出 + EMR ミックスモードパススルークリーンアップ



B QuEChERS 抽出 + dSPE クリーンアップ + WAX SPE 抽出

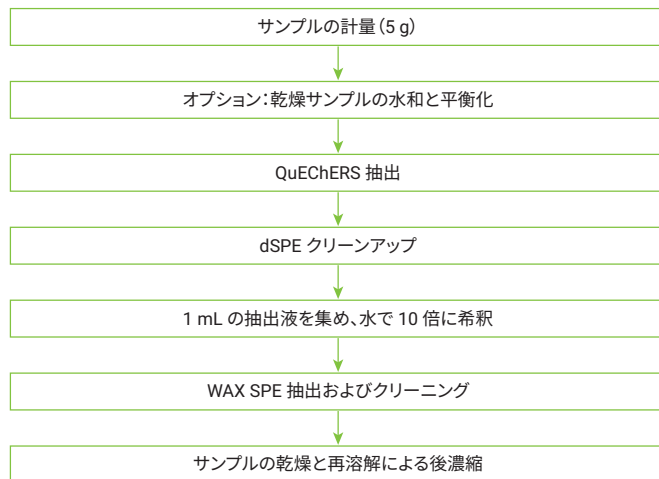


図 5. 食品分析における PFAS のサンプル前処理手順の比較。(A) 新たに開発したメソッド (B) 従来のメソッド

全体的なメソッドバリデーション

AOAC SMPR ガイダンスに従い、乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵中の 30 種類の PFAS ターゲットを測定するための新しいメソッドをバリデーションしました。表 5 に、試験対象食品マトリックスにおける PFAS ターゲット LOQ の要件を示します。

表 5. 乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵での LOQ の AOAC SMPR 要件

| 食品マトリックス | LOQ (µg/kg) | | |
|----------|----------------------|----------------|-----------|
| | PFHxS、PFOA、PFNA、PFOS | PFBA および PFPeA | その他の PFAS |
| 乳児用調製粉乳 | ≤ 0.01 | ≤ 1 | ≤ 0.1 |
| 鶏卵 | ≤ 0.3 | ≤ 3 | ≤ 3 |
| 牛乳 | ≤ 0.01 | ≤ 1 | ≤ 0.1 |

メソッド LOQ

研究の評価対象となった 3 種類すべての食品マトリックスで、マトリックスブランクに正の検出がありました。このため、マトリックスバックグラウンド補正が必要となり、ターゲット回収率計算のメソッドバリデーションで使用しました。マトリックスブランクを 5～7 回のレプリケートで前処理してから、次の式に基づいてメソッドのレポート対象最小 LOQ を計算しました。

$$LOQ_{cal} = 10 \times SD_{MBs}$$

各項の説明：

- LOQ_{cal} は、メソッドのレポート対象定量下限 (LOQ) です。
- SD_{MBs} は、マトリックスブランクの 5～7 回のレプリケートから検出された発生ターゲットの標準偏差 (SD) です。

次に、バリデーション済み QC の最小スパイクレベル (レポート対象の最小 LOQ 以上) に基づいて、メソッドの LOQ を決定しました。表 6 に、各マトリックス中の各ターゲットの、レポート対象最小算出 LOQ_{cal} と、バリデーション済みメソッドの LOQ_{val} を示します。

主要な PFAS ターゲット (PFHxS、PFNA、PFOS) では、3 種類の試験対象マトリックスすべてにおいて、バリデーション済みメソッドの LOQ が必要な LOQ 以下でした。PFOA のバリデーション済みメソッドの LOQ は、牛乳と鶏卵では必要な LOQ 以下でした。乳児用調製粉乳では、マトリックス正の検出の発生により、必要な LOQ を上回りました。その他の PFAS ターゲットでは、3 種類のマトリックスすべてのバリデーション済みメソッドの LOQ が、必要な LOQ 以下となりました (牛乳での正の検出の発生による 6:2 FTS の高い LOQ は除く)。鶏卵中の PFOS の LOQ は、

その他の主要な PFAS ターゲットより高くなっています。これは、498.9 から 79.9 へのクオリファイアトランジションでの TCDCA の大きな干渉によるものです。この結果、低いレベルでクオリファイアの割合が確認できませんでした。ただしそれでも、バリデーション済みメソッドの LOQ (0.1 µg/kg) は、鶏卵で必要な LOQ (0.3 µg/kg) 以下でした。

図 6 に、乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵中の主要な PFAS ターゲットの、マトリックスブランクとバリデーション済みメソッドの LOQ のクロマトグラムを示します。

表 6. 乳児用調整粉乳、牛乳、鶏卵中の 30 種類の PFAS ターゲットの、メソッドのレポート対象最小算出 LOQ (LOQ_{cal}) とバリデーション済み LOQ (LOQ_{val})

| ターゲット | 乳児用調製粉乳 | | 牛乳 | | 鶏卵 | |
|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | LOQ _{cal} | LOQ _{val} | LOQ _{cal} | LOQ _{val} | LOQ _{cal} | LOQ _{val} |
| PFBA | NA | 0.1 | NA | 0.1 | 0.147 | 0.2 |
| PFPeA | 0.005 | 0.02 | 0.003 | 0.02 | 0.011 | 0.02 |
| PFBS | 0.002 | 0.01 | 0.001 | 0.01 | NA | 0.01 |
| 4:2 FTS | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFPeS | NA | 0.02 | NA | 0.02 | 0.005 | 0.01 |
| PFHxA | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| HFPO-DA | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFHpA | 0.001 | 0.01 | 0.002 | 0.01 | 0.001 | 0.01 |
| PFHxS* | 0.004 | 0.01 | 0.002 | 0.01 | 0.001 | 0.01 |
| DONA | 0.001 | 0.01 | 0.045 | 0.1 | NA | 0.01 |
| 6:2 FTS | 0.007 | 0.01 | 0.322 | 0.5 | 0.006 | 0.01 |
| PFOA* | 0.016 | 0.02 | 0.004 | 0.01 | 0.006 | 0.01 |
| PFHpS | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFNA* | 0.005 | 0.01 | 0.002 | 0.01 | 0.003 | 0.01 |
| PFOS* | 0.002 | 0.01 | 0.001 | 0.01 | 0.003 | 0.1 |
| 9Cl-PF3ONS | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| 8:2 FTS | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFNS | 0.006 | 0.01 | 0.002 | 0.01 | 0.001 | 0.01 |
| PFDA | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFDS | 0.002 | 0.01 | 0.002 | 0.01 | 0.001 | 0.01 |
| PFUnDA | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFOSA | 0.001 | 0.01 | 0.001 | 0.01 | NA | 0.01 |
| 11Cl-PF3OUdS | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFUnDS | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFDoA | 0.005 | 0.01 | 0.001 | 0.01 | NA | 0.01 |
| 10:2 FTS | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFDoS | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFTTrDA | 0.002 | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFTTrDS | 0.004 | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |
| PFTTeDA | NA | 0.01 | NA | 0.01 | NA | 0.01 |

* 主要な PFAS ターゲット

赤字は、マトリックスの影響により、LOQ_{val} レベルが必要な LOQ レベルを超えていることを示します。

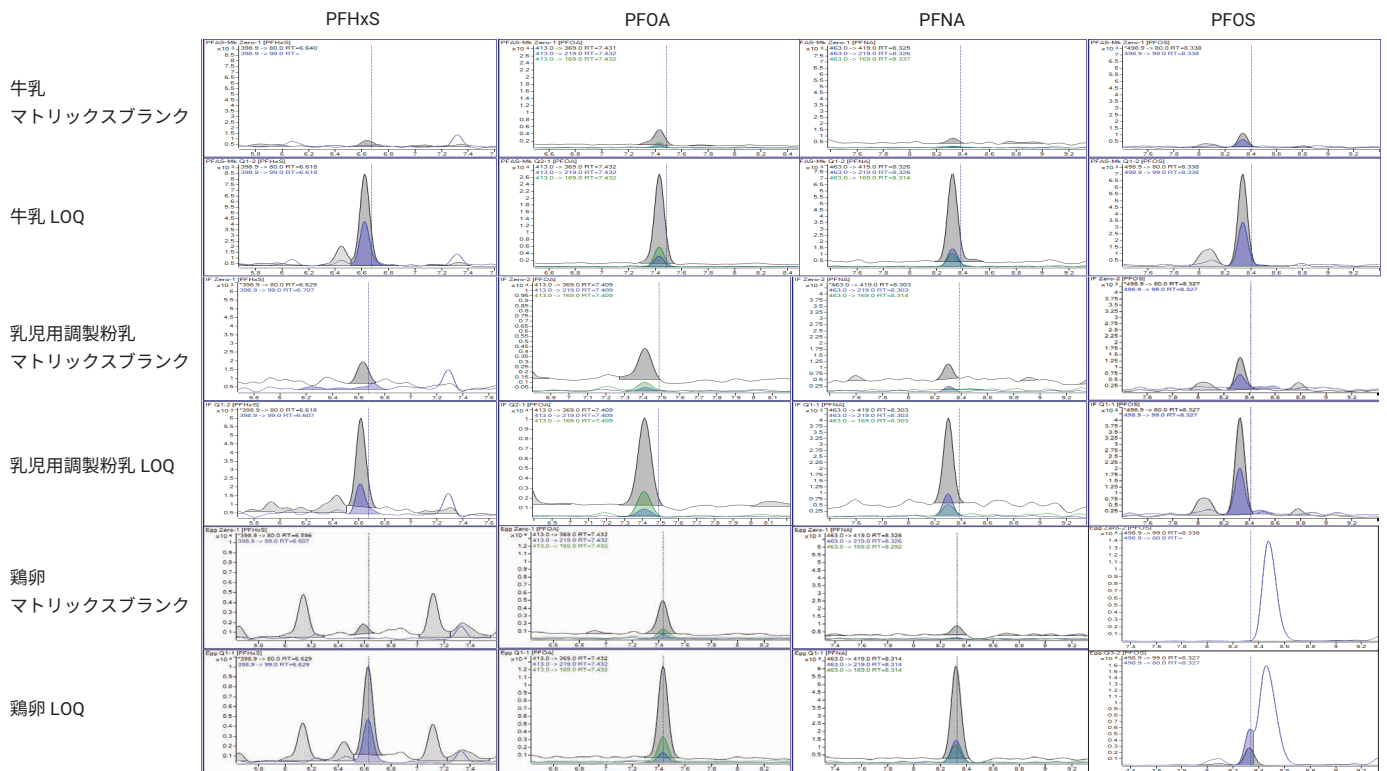


図 6. 主要な PFAS ターゲット (PFHxS, PFOA, PFNA, PFOS) の、マトリクスブランクと LOQ レベルのクロマトグラム。(上) 牛乳、(中) 乳児用調製粉乳、(下) 鶏卵。各マトリクスの LOQ レベルは、表 6 をご覧ください。

メソッドキャリブレーション

18 種類の PFAS の同位体標識 ISTD を使用すると、同じ標準検量線を別の食品マトリクスサンプルの PFAS 定量に使用できます。このため、食品マトリクスごとのマトリクス適合検量線が不要です。これでサンプル試験の生産性を大幅に上げ、時間と人件費、材料費を節約し、サンプル分析の一貫性を改善できます。

検量線の範囲は、食品マトリクスに必要な LOQ、サンプル前処理で導入された濃度係数、機器のメソッド感度に基づいて決定しました。乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵では高い検出レベルが必要なため、20 ~ 10,000 ng/L のキャリブレーション設定範囲を使用しました。この結果、30 種類の PFAS ターゲットすべてで、500 倍の検量線ダイナミックレンジと相関係数 $R^2 > 0.99$ が確認されました。

メソッドの真度と精度

乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵でメソッドの回収率と再現性をバリデーションしました。PFOS、PFOA、PFHxS、PFNA の許容基準は、鶏卵での回収率が 80 ~ 120 %、乳児用調製粉乳および牛乳での回収率が 65 ~ 135 % です。⁵ その他の PFAS ターゲットの場合、回収率の許容基準は、対応する同位体 ISTD ありのターゲットでも 65 ~ 135 %、対応する同位体 ISTD なしのターゲットで 40 ~ 140 % です。再現性 (RSD%) の許容基準は、鶏卵中の主要な PFAS で ≤ 20 %、牛乳および乳児用調製粉乳中の主要な PFAS で ≤ 25 % です。また、3 種類すべてのマトリックスにおいて、対応する同位体 ISTD ありのその他の PFAS ターゲットで ≤ 25 %、対応する同位体 ISTD なしのその他の PFAS ターゲットで ≤ 30 % です。

メソッドバリデーションの最終結果には、マトリックスごとに 3 つの QC レベル (LOQ、中、高) が含まれます。バリデーション済みメソッドの LOQ を表 6 に示します。中レベルの QC は LOQ の 5 ~ 10 倍の、高レベルの QC は LOQ の 20 ~ 50 倍でレポートされています。牛乳中の 6:2 FTS は例外で、1 つのレベル (0.5 µg/kg) のみがレポート対象です。これは、サンプルマトリックスコントロール中で高い正検出があったためです。

図 7 に、乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵での PFAS 分析のメソッドバリデーションの回収率と再現性 (RSD) のまとめを示します。全体的に、試験対象の食品マトリックス中の 30 種類のターゲットすべてにおいて、メソッドの回収率と再現性の結果は許容要件を満たし、許容可能でした。主要な PFAS ターゲットは、すべてのマトリックスのすべてのスパイクレベルで、許容基準 (回収率 80 ~ 120 % と RSD < 20 %) を満たしました。対応する同位体標識 ISTD ありのターゲットは、対応する同位体標識 ISTD なしのターゲットより、優れた定量結果を示しました。

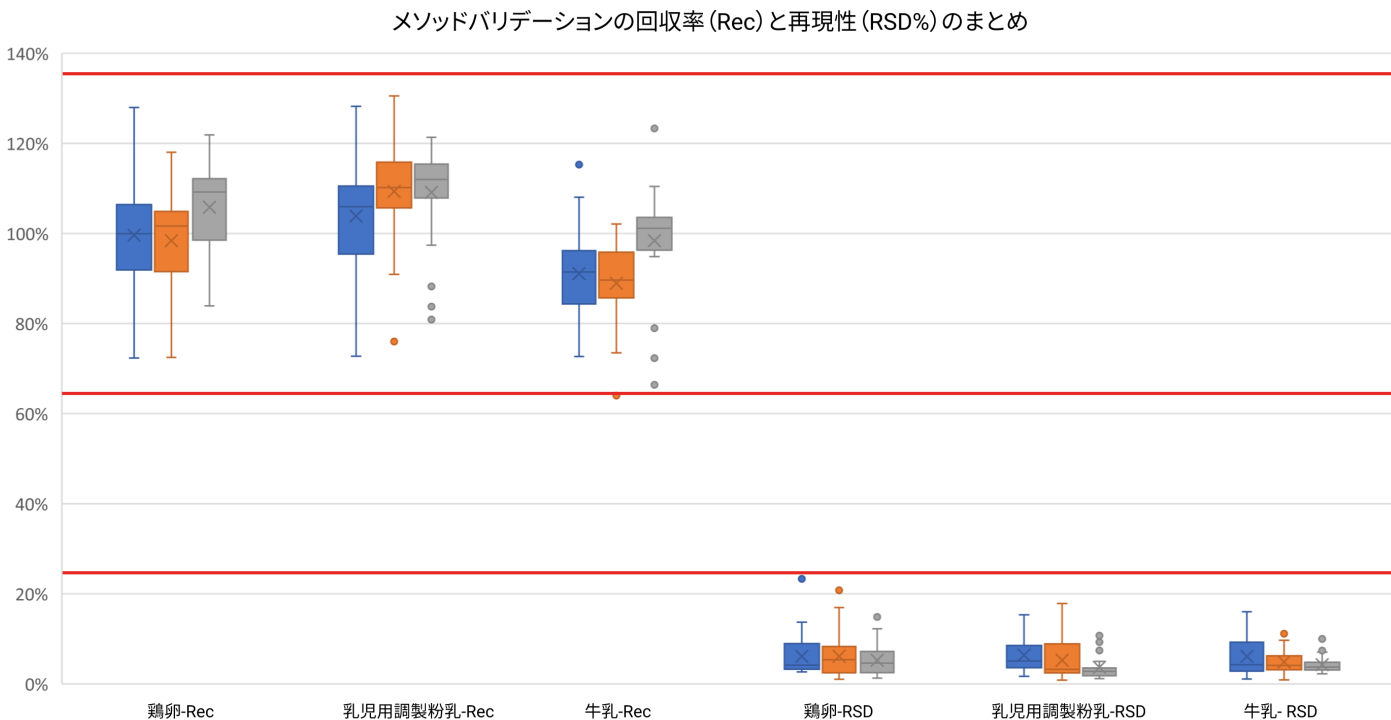


図 7. 乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵での PFAS 分析のメソッドバリデーションの回収率 (Rec) と再現性 (RSD%) のまとめ

結論

乳児用調製粉乳、牛乳、鶏卵中の 30 種類の PFAS ターゲット用に、QuEChERS 抽出の後に Agilent Captiva PFAS Food II カートリッジによるミックスモードパススルークリーンアップと LC/MS/MS 検出を使用する、シンプルで迅速かつ信頼性の高いメソッドを開発してバリデーションしました。この新しいクリーンアップメソッドでは、従来の dSPE クリーンアップと比べて、マトリックス除去、PFAS 回収率、サンプル量回収率が大幅に改善されました。また、このメソッドはシンプルであるため、時間と手間を節約でき、ラボ全体の生産性が向上します。許容基準を用いてメソッド全体のバリデーションを実行し、メソッド性能が AOAC SMPR 2023.003 に記載されている要件を満たすことを示しました。

参考文献

1. EUR-Lex (**2023**) Consolidated text: Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on Maximum Levels for Certain Contaminants on Food and Repealing Regulation (EC) No 1881/2006.
2. AOAC (**2023**) Standard Method Performance Requirements (SMPRs) for Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Produce, Beverages, Dairy Products, Eggs, Seafood, Meat Products, and Feed (AOAC SMPR 2023.003)
3. EPA method 533 Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Drinking Water by Isotope Dilution Anion Exchange Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (EPA 533:2019).
4. EPA method 1633 Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Aqueous, Solid, Biosolids, and Tissue Samples by LC-MS/MS (EPA 1633:2024).
5. Genualdì, S.; Young, W.; Peprah, E.; *et al.* Analyte and Matrix Method Extension of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Food and Feed, *Anal. and Bioanal. Chem.* **2024**, 416, 627–633. doi: 10.1007/s00216-023-04833-1.
6. Hwang, S. H.; Ryu, S. Y.; Seo, D.; *et al.* Development of a Method Using QuEChERS and LC-MS/MS for Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Rice Matrix, *Food Chem.* **2024**, 445, 138687. doi: 10.1016/j.foodchem.2024.138687.

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。

DE90981738

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, July 2, 2024

5994-7366JAJP