

ウシ腎臓中の 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.

はじめに

Agilent Captiva EMR PFAS Food カートリッジは、食品中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（PFAS）の分析専用開発および最適化されています。本研究の目的は、ウシ腎臓中の 30 種類の PFAS を測定する完全なワークフローを開発および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拡張マトリックス除去（EMR）ミックスモードパススルークリーンアップと、Agilent 6495D トリプル四重極 LC/MS（LC/TQ）による検出を使用しています。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）2023.003¹ に従ってバリデーションしました。

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。

溶液および標準

標準溶液とその他の試薬の前処理は、以前のアプリケーションノートに記載しています。² 唯一の違いは、この研究で使用する ISTD スパイク溶液が 1,000 ng/mL のメタノール (MeOH) 溶液であることです。

実験装置および材料

この研究では、Agilent 1290 Infinity II LC システム、および 6495D LC/TQ と Agilent Jet Stream iFunnel エレクトロスプレーイオン (ESI) 源を組み合わせて使用しました。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。

この研究でサンプル前処理に使用したその他の機器は、過去の研究と同じです。²

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、2.1 mm、1.8 μm、圧力上限 120 MPa、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。

- 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)
- Captiva フィルタバイアル、0.2 μm、ナイロン、100 個 (部品番号 5610-5936)
- ポリプロピレン (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)

本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/MS/MS メソッド条件は、以前のアプリケーションノートに記載しています。²

サンプル前処理

ウシ腎臓は、食料品店で購入しました。新鮮なサンプルを洗い、細断して、-20 °C で一晩冷凍しました。冷凍サンプル片のすりつぶしとホモジナイズには、電動ミキサーを使用しました。次にこのサンプルホモジネートをサンプル抽出に使用しました。

ホモジナイズされたサンプルごとに、2 g のサンプルホモジネートを計量し、クリーンな 50 mL PP チューブに入れて抽出しました。非標識 PFAS スパイク溶液と ISTD スパイク溶液 (1,000 ng/mL) を品質管理 (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。これで、図 1 のサンプル前処理手順を進める準備ができました。

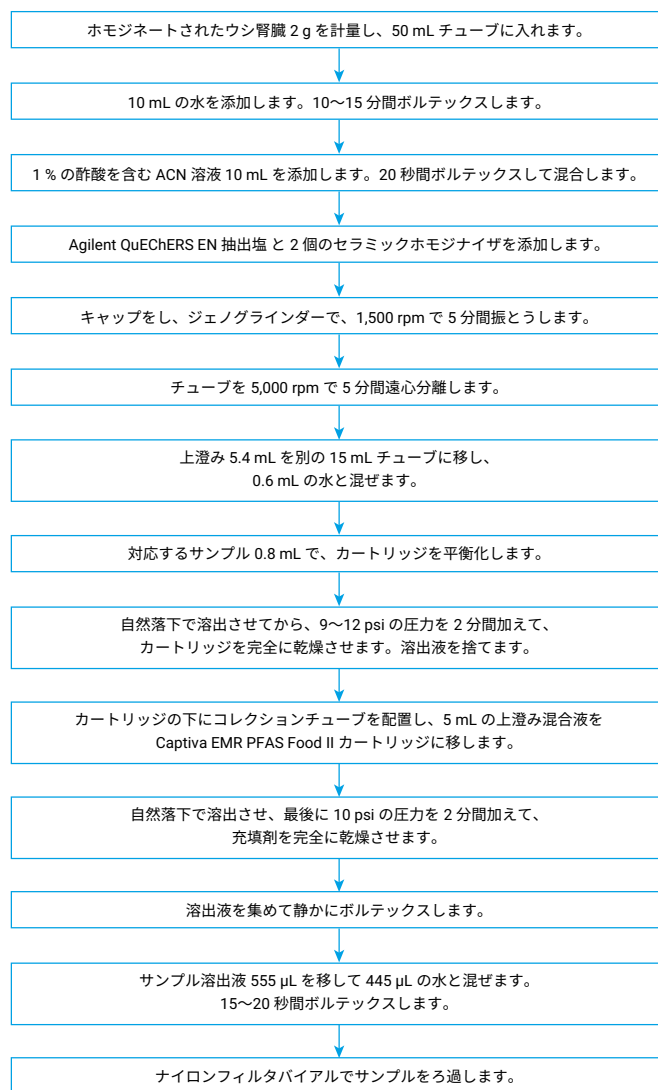


図 1. ウシ腎臓での PFAS 分析のサンプル前処理手順

メソッド性能の評価

このメソッドの定量下限 (LOQ)、回収率、精度を検証しました。ウシ腎臓では、いくつかの要因 (この研究で使用される高 ISTD スパイク溶液の量が限られる、コスト上の考慮事項、動物内臓マトリックスに必要な LOQ が高いなど) により、4 種類のプレススパイクした QC レベルサンプルを、0.2、0.4、1.0、5.0 µg/kg のレベルで 4 回繰り返し前処理しました。ウシ腎臓での ISTD プレススパイクレベルは 10.0 µg/kg でした。さらに、定量用にプレススパイクした 10.0 µg/kg の ISTD で、マトリックスブランクを 5 回のレプリケートで前処理しました。

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

PFAS ターゲットの回収率について、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 クリーンアップを比較しました。図 2 に、QuEChERS 抽出後にウシ腎臓未処理抽出液で 100 ng/L の PFAS をスパイクした場合の PFAS ターゲット回収率の比較を示します。

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では、従来の dSPE クリーンアップと比べて、PFAS ターゲット回収率が大幅に向上したことがわかります。

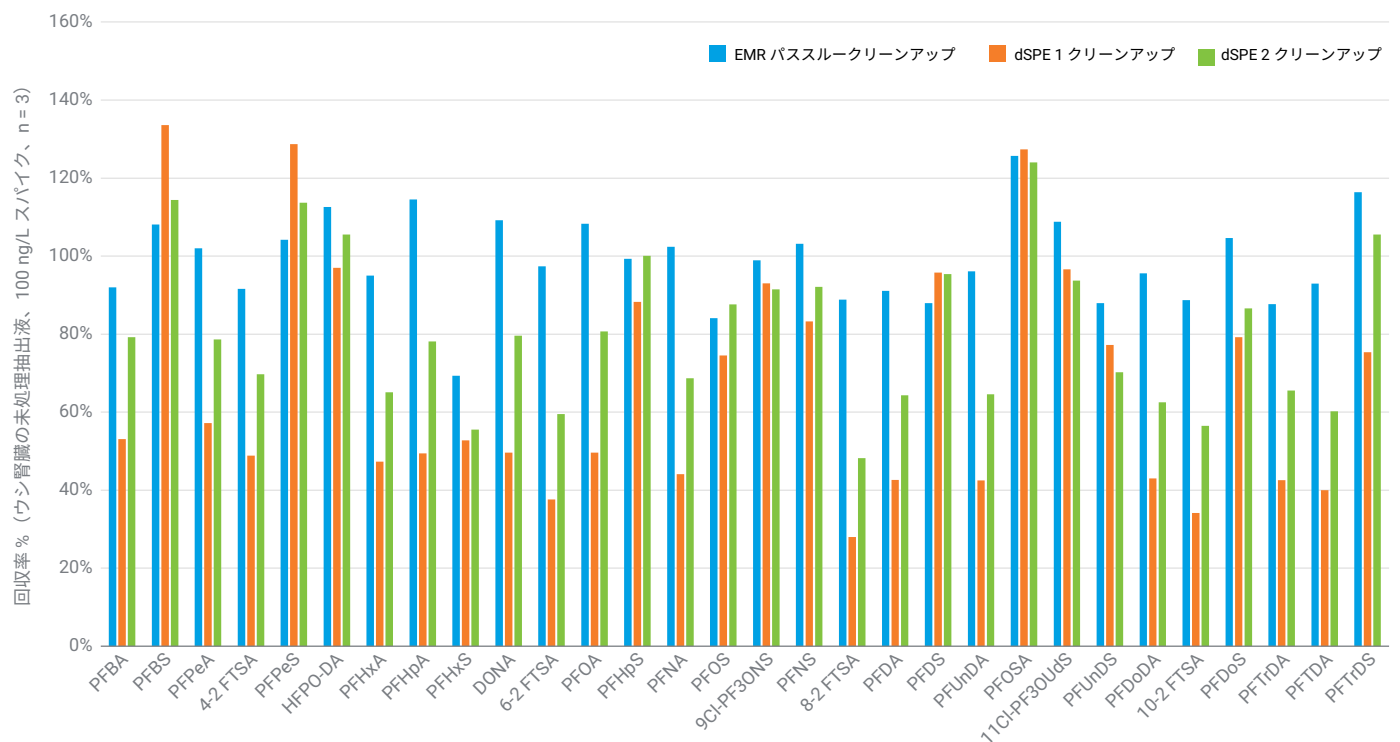


図 2. Agilent Captiva EMR PFAS Food II カートリッジによる EMR パススルークリーンアップと従来の dSPE クリーンアップの、ウシ腎臓抽出液における PFAS 回収率の比較

メソッドバリデーション

AOAC SMPR ガイダンスに従い、ウシ腎臓中の 30 種類の PFAS ターゲットを測定するための新規開発メソッドをバリデーションしました。ウシ腎臓を「食用内臓肉」カテゴリと見なすと、必要な LOQ は、4 種類の主要な PFAS ターゲット (PFOS、PFOA、PFNA、PFHxS) で $\leq 0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、その他の PFAS ターゲットで $\leq 4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ です。² ウシ腎臓は非常に複雑な食品マトリックスであり、必要な LOQ が高いため、後濃縮処理は不要であり、後希釈が適しています。EMR ミックスモードパススルークリーンアップの後に、サンプル溶出液を 1:1 ACN:水で希釈しました。このため、メソッド全体の希釈は 10 倍になりました。後希釈処理によりサンプル乾燥のステップが不要となったため、時間を大幅に節約でき、メソッド手順全体が簡単かつ迅速になりました。後希釈処理の唯一の考慮事項は、ISTD プレスパイク濃度の調整です。サンプル前処理中に希釈係数が導入されるため、プレスパイク ISTD の濃度を上げて希釈係数を補正し、添加用標準溶液での ISTD 濃度を一致させる必要があります。添加用標

準溶液での ISTD 濃度は $1,000 \text{ ng}/\text{L}$ であったため、ウシ腎臓ホモジネートでのプレスパイク ISTD の濃度を $10,000 \text{ ng}/\text{kg}$ に調整しました。このため、この調整には高濃度の ISTD スパイク溶液を使用する必要がありました。

メソッド LOQ

メソッド LOQ は、以前のアプリケーションノートに記載されている手法に基づいて測定しました。² 表 1 に、ウシ腎臓中の各ターゲットのレポート対象最小算出 LOQ (LOQ_{cal}) とバリデーション済みメソッドの LOQ (LOQ_{val}) を示します。バリデーション済みメソッドの LOQ はすべて、食用内臓肉マトリックスで必要な LOQ 以下でした。またウシ腎臓マトリックスブランクでは、より多くの PFAS ターゲットがより高濃度で検出されるという結果となりました。図 3 に、4 種類の主要な PFAS ターゲットの、ウシ腎臓のマトリックスブランクとバリデーション済み LOQ レベルのクロマトグラムを示します。

表 1. ウシ腎臓マトリックス中の 30 種類のターゲットの、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	ウシ腎臓 LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		ターゲット	ウシ腎臓 LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	LOQ_{cal}	LOQ_{val}		LOQ_{cal}	LOQ_{val}
PFBA	1.183	4.0	9CI-PF3ONS	0.024	0.2
PFPeA	0.374	0.4	8:2 FTS	0.108	0.4
PFBS	0.109	0.2	PFNS	0.247	0.2
4:2 FTS	0.25	0.4	PFDA	0.172	0.4
PFPeS	0.207	0.2	PFDS	0.028	0.2
PFHxA	0.356	0.4	PfUnDA	0.54	1.0
HFPO-DA	0.174	0.2	PFOSA	0.009	0.2
PFHpA	0.195	0.4	11CI-PF3OUdS	0.007	0.2
PFHxS*	0.1	0.2	PFUnDS	NA	0.2
DONA	0.01	0.2	PFDoDA	0.239	0.4
6:2 FTS	0.608	1.0	10:2 FTS	NA	0.2
PFOA*	0.174	0.4	PFDoS	NA	0.2
PFHpS	0.177	0.2	PFTTrDA	NA	0.2
PFNA*	0.176	0.4	PFTTrDS	NA	0.2
PFOS*	0.339	0.4	PFTeDA	0.82	1.0

* 主要な PFAS ターゲット
NA = 該当せず

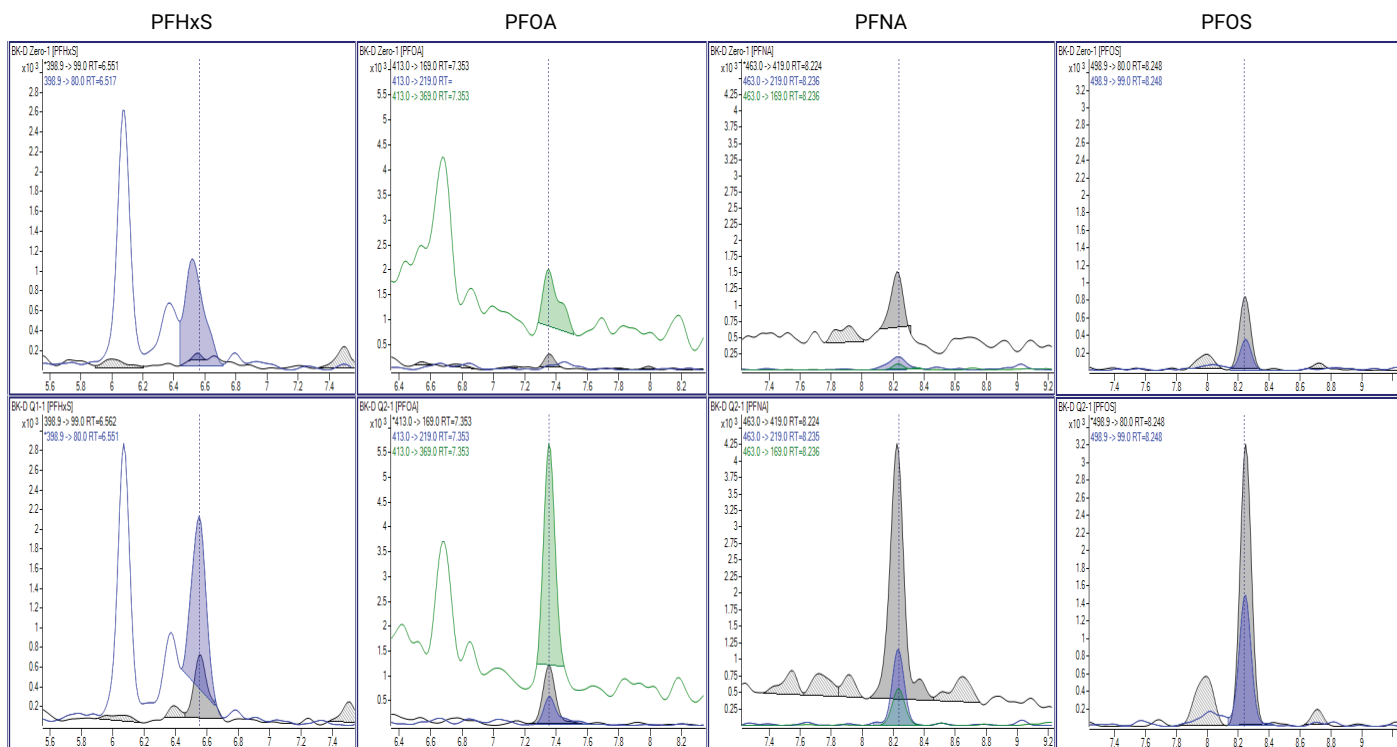


図 3. ウシ腎臓のマトリックスブランク (上) と LOQ (下) の、主要な PFAS ターゲット (PFHxS (0.2 µg/kg)、PFOA (0.4 µg/kg)、PFNA (0.4 µg/kg)、PFOS (0.4 µg/kg) のクロマトグラム

メソッドの真度と精度

食用内臓肉における PFAS の許容基準は、4 種類の主要な PFAS ターゲットでは回収率が 80 ~ 120 %、RSD% が ≤ 20 % で、対応する同位体 ISTD ありのその他の PFAS ターゲットでは回収率が 65 ~ 135 %、RSD% が ≤ 25 % です。対応する同位体 ISTD なしのその他の PFAS ターゲットの場合、この基準は回収率が 40 ~ 140 %、RSD% が ≤ 30 % です。図 4 の最終レポート用バリデーション結果には、ウシ腎臓での 3 つの QC

レベル (LOQ、中、高) が含まれており、ウシ腎臓中のほとんどの PFAS ターゲットについて、メソッドの回収率と再現性が許容基準を満たしていることを示しています。ただし例外もあります。6:2 FTS と PFunDA では、マトリックスブランクから検出される正電荷が大きいため、2 つのスパイクレベルの結果のみがレポート対象となりました。また 4:2 FTS と PFPeS では、マトリックス効果により 1 つのスパイクレベルでの回収率が高くなりました。

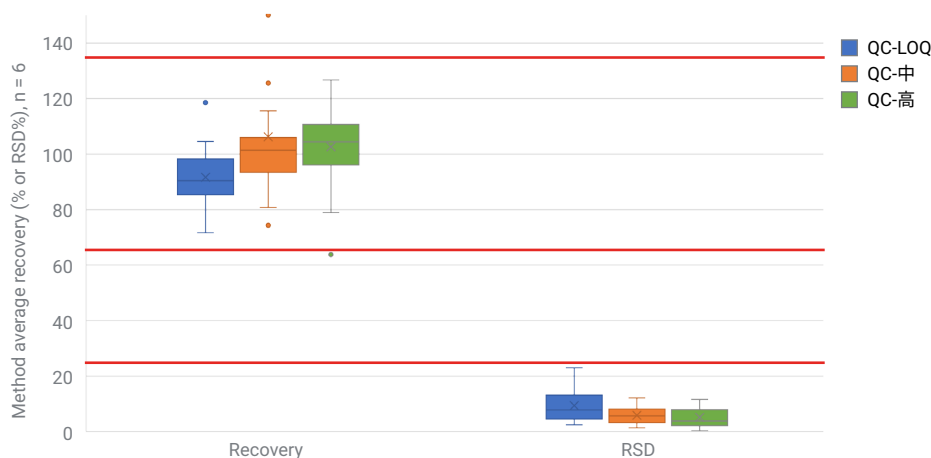


図 4. ウシ腎臓での PFAS 分析のメソッドバリデーションの回収率と再現性 (RSD%) のまとめ

結論

ウシ腎臓中の 30 種類の PFAS ターゲット用に、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 検出を使用する、サ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。許容基準を用いてメソッド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. 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).
2. Zhao, L.; Giardina, M.; Parry, E. Determination of 30 Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Infant Formula, Milk, and Eggs Using Agilent Captiva EMR PFAS Food II Pass-Through Cleanup and LC/MS/MS Detection, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-7366EN, **2024**.

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。

DE38449655

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, June 1, 2024
5994-7370JAJP