

[ノート]

有機フッ素化合物 (PFASs) の直接注入-LC-MS/MS による分析法の検討

松村 益代* 風見 眞紀子

Studies on the Direct Injection of Per-/poly-fluoroalkyl Substances
Analytical Method by LC-MS/MS in Drinking Water

Masuyo MATSUMURA* and Makiko KAZAMI

*Health Science Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science, 1819-14
Kanno, Kanno-cho, Kakogawa 675-0003, Japan*

Direct injection method of PFASs in drinking water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed. As a result of our investigation, it was confirmed that PFBS, PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA and PFDA can be analyzed when standard solution and sample solution are prepared with 10% methanol. We have conducted a validation test to confirm the validation of the analytical method. The linearity of the calibration curve were obtained in the concentration range from 2 ng/L to 100 ng/L for these 8 compounds. Drinking water ($n = 5$) was added to these 8 compounds (each concentration 5 ng/L) recovery test. As a result, the recoveries of these 8 compounds in drinking water from 95% to 105% were good in results. Regarding the relative standard deviation (RSD) of precision, repeatability ranged from 4.3% to 8.4%, and intermediate precision ranged from 4.6% to 10% of these 8 compounds obtained in the recovery test with drinking water (5 ng/L, $n = 5$, 5 days). This result met the criteria of the guideline for verification of the test method in drinking water notified by the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. We judged that the analysis method we have examined in the present study was applicable to the analysis of these 8 compounds in drinking water.

I はじめに

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS : Perfluorooctane sulfonate) とペルフルオロオクタン酸 (PFOA : Perfluorooctanoic acids) とに代表される有機フッ素化合物 (PFASs: Per-/poly-fluoroalkyl Substances) は、撥水性、撥油性、化学安定性及び熱安定性など優れた性質を有し、様々な用途に大量に用いられてきた。しかし、PFASsは難分解性の化合物であり、環境中に広範囲に存在していることが報告されている¹⁾⁷⁾。

PFASsのうちPFOS又はその塩及びペルフルオロオクタンスルホン酸フルオリド (PFOSF) が「残留性有機汚

染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約)」において 2009 年 5 月に附属書 B (製造, 使用, 輸出入の制限) へ対象物質として新規登録された。国内においては化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) にて第一種特定化学物質に指定され, 2010 年 4 月以降は特定の用途を除き製造・輸入・使用等が禁止されている。PFOA 又はその塩も 2019 年 5 月に附属書 A (製造, 使用, 輸出入の禁止) へ対象物質として追加され, 化審法にて 2021 年 10 月に第一種特定化学物質に指定された。

水道水質に関しては 2020 年 4 月に PFOS 及び PFOA が水質管理目標設定項目に追加され, その目標値は合算で 0.00005 mg/L (暫定) とされた⁸⁾。さらに, 2021 年 4 月にはペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS) が要検討項目となった。

兵庫県立健康科学研究所 健康科学部

* 〒675-0003 兵庫県加古川市神野町神野 1819-14

PFOS, PFOA 及び PFHxS の分析法は、固相抽出ー液体クロマトグラフー質量分析法が示されている⁸⁻¹⁰⁾が、今回、固相抽出による前処理を行わず、液体クロマトグラフータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) による水道水中の PFASs の直接注入法の検討を行った。河川等で炭素数が異なる PFHxS, PFHxA, PFNA などの PFASs の検出状況が報告されており¹⁻⁷⁾、水道水中にも様々な PFASs が含まれている報告^{11,12)}もあることから、PFASs の分析対象を広げ、直接注入法で分析可能な PFASs 化合物の確認を行った。水道水を用いて妥当性評価¹³⁾を行なったところ、PFOS, PFOA, PFHxS の他、PFBS, PFHxA, PFHpA, PFNA 及び PFDA と 8 化合物について良好な結果が得られたので報告する。

II 材料と方法

1. 分析対象化合物

PFOS を含むペルフルオロアルキルスルホン酸類 (PFASAs: Per/poly-fluoroalkylsulfonic acid) 及び PFOA を含むペルフルオロカルボン酸類 (PFACAs: Per/poly-fluoroalkylcarboxylic acids) を対象として分析を行なった。分析対象とした PFASs を Table 1 に示した。

Table 1 Target PFASs

Compound name	Abbreviation	
Perfluorobutane sulfonate	PFBS	C4
Perfluorohexane sulfonate	PFHxS	C6
Perfluorooctane sulfonate	PFOS	C8
Perfluorodecane sulfonate	PFDS	C10
Perfluorobutanoate	PFBA	C4
Perfluoropentanoate	PFPeA	C5
Perfluorohexanoate	PFHxA	C6
Perfluoroheptanoate	PFHpA	C7
Perfluorooctanoate	PFOA	C8
Perfluorononanoate	PFNA	C9
Perfluorodecanoate	PFDA	C10
Perfluoroundecanoate	PFUnDA	C11
Perfluorododecanoate	PFDoDA	C12

2. 試薬及び標準液

メタノール及びアセトニトリルは関東化学製の LC/MS 用、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は富士フィルム和光純薬製 HPLC 用、精製水は超純水装置 (メルク社製) を用いて精製したミリ Q 水を使用した。

標準液として PFASs 混合品 (Wellinton 社製, PFAC-MBX), 内部標準液として PFASs 安定同位体混合品 (Wellinton 社製, MPFAC-MXA) を用いた。市販の標準液及び内部標準液は、それぞれ 500 µL を 10 mL のメスフラスコに採り、メタノールを加えて定容したものを標準原液 (100 ng/mL) 及び内部標準原液 (100 ng/mL) とした。これら原液は使用時まで冷凍保管した。分析時に標準原液を 10% メタノールで 10 倍希釈及び 100 倍希釈して 10 ng/mL 及び 1 ng/mL 標準液 (10% メタノール溶液) を調製した。検量線の標準液は 10% メタノールで 2 pg/mL ~ 100 pg/mL になるように調製した。それぞれ標準液 900 µL を分取し、内部標準液 (1 ng/mL) 50 µL を添加し、10% メタノール溶液で 1 mL とし、検量線用標準液を調製した。この時の内部標準液 (1 ng/mL) は、内部標準原液を 10% メタノールで 100 倍希釈を行った (各標準液 1 mL 中に内部標準 50 pg 添加)。

3. 試料の前処理

試料 9 mL に内部標準液 (濃度 10 ng/mL: メタノール溶液) 50 µL, メタノール 950 µL を加えミリ Q 水で 10 mL に定容後、メンブランフィルター (ADVANTEC 製 DISMIC・Cellulose Acetate 0.20 µm) でろ過し、最初の 9 mL を捨てた次のろ液を試料溶液とした。操作ブランクとして、ミリ Q 水を用いて試料と同様の操作を行い、ブランク試験を行った。

4. LC/MS/MS の分析条件

分析には Waters 社製 ACQUITY UPLC 及び Xevo TQ-XS を用いた。分析条件を Table 2 に示した。

5. メタノール濃度の影響

固相抽出法の場合は、分析時の試料溶液はメタノール溶液である。水試料を直接 LC-MS/MS に注入するため、分析時の標準液等のメタノール濃度について検討した。標準液 50 ng/L をミリ Q 水, 10% メタノール溶液, 20% メタノール溶液及び 50% メタノール溶液で調製、それぞれについて分析を行った ($n=3$)。ミリ Q 水で調製した標準液を対象とし、各メタノール濃度標準液で得られたピーク面積との比較を行い、試料調製条件の検討を行った。

6. バイアルの影響

PFASs 標準液 50 ng/L (10% メタノール溶液) を調製し、ガラス製バイアル及びポリプロピレン (PP) 製バイアルに入れ分析を行い ($n=1$)、バイアルによる吸着等の影響及び経時変化を確認した。

7. 妥当性評価

水道水を用いて妥当性評価を行った。標準液及び試料はメタノール濃度 10%になるように調製した。定量に用いる検量線は 2, 5, 10, 20, 50 及び 100 ng/L の 6 点で作成した。検量線標準試料は繰り返し測定 ($n=3$) を行い、直線性 (決定係数, r^2) 及び再現性 (相対精度, RSD%) を求め評価した。

水道水 9 mL に対し, PFOA 及び PFOS の暫定目標値 (50 ng/L) 及びその 1/10 (5 ng/L) となるように添加し, 各 5 試料を調製した。5 ng/L 添加試料水の調製方法は, 水道水 9 mL に PFASs 標準液 (0.9 ng/mL: メタノール溶液) 50 μ L, 内部標準液 (10 ng/mL: メタノール溶液) 50 μ L 及びメタノール 900 μ L を加えて混合した。50 ng/L 添加試料は PFASs 標準液 9 ng/mL を使用し, 同様に調製した。それぞれの試料をメンブランフィルターでろ過し, LC-MS/MS 用試料溶液とした。一定量を LC に注入し MS/MS (MRM) により各化合物のピーク面積を求め, 作成した検量線から試料中の各化合物の濃度定量し, 添加濃度に対する定量濃度の割合を回収率として求めた。これを 5 日間実施し, 繰り返し試験における併行精度を求めた。

Table 2 LC-MS/MS conditions

LC conditions		
Instrument	ACQUITY UPLC (Waters)	
Column	UPLC BEH C18 2.1×100 mm	
Retention gap Column	UPLC BEH C18 2.1× 50 mm	
Mobile Phase	A: 2 mmol/L Ammonium Acetate aq B: 2 mmol/L Ammonium Acetate in Acetonitrile	
gradient	B 10%(0min)-B 30%(2min)-B 50%(7min)-B 80%(14min)- B 90%(15-18min)-B 10%(21-24min)	
Flow rate	0.3 mL/min	
Column temp.	40°C	
Injection volume	30 μ L	
MS conditions		
Instrument	ACQUITY TQ-XS (Waters)	
Ionization Mode	ESI-	
Source temp.	120°C	
Capillary voltage	1 kV	
Desolvation temp.	500°C	
Desolvation gas flow	1100 L/h	
Cone gas flow	100 L/h	
	Quantification ion [m/z]	Confirmation ion [m/z]
PFBS	299> 80	299> 99
PFHxS	399> 80	399> 99
PFOS	499> 80	499> 99
PFDS	599> 80	599> 99
PFBA	213>169	
PFPeA	263>219	
PFHxA	313>269	313 > 119
PFHpA	363>319	363>169
PFOA	413>369	413>169
PFNA	463>419	463>219
PFDA	513>469	513>219
PFUnDA	563>519	563>269
PFDoDA	913>869	913>169

III 結果及び考察

1. 標準液でのメタノール濃度の影響

標準液のメタノール濃度と分析で得られたピーク面積との関係を Fig 1 に示す。ミリ Q で調製した標準液の分析で得られたピーク面積を 100%としたとき, 各メタノール濃度標準液の感度は化合物により異なった。炭素数が多い PFDS, PFUnDA 及び PFDoDA はミリ Q 水に比べ 50%メタノールでピーク面積が 220~690%となり, これらの化合物は直接注入法では適切でないと考え, 分析の対象から外した。炭素数が少ない化合物ではミリ Q 水と 10%メタノール濃度ではほとんど差がなく, バイアル等への吸着を考慮して標準液をメタノール濃度 10% に調製することとした。

直接注入法の対象化合物は, スルホン酸類では炭素数 4~8 である PFBS, PFHxS, PFOS, カルボン酸類では炭素数 6~10 の PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA 及び PFDA とした。

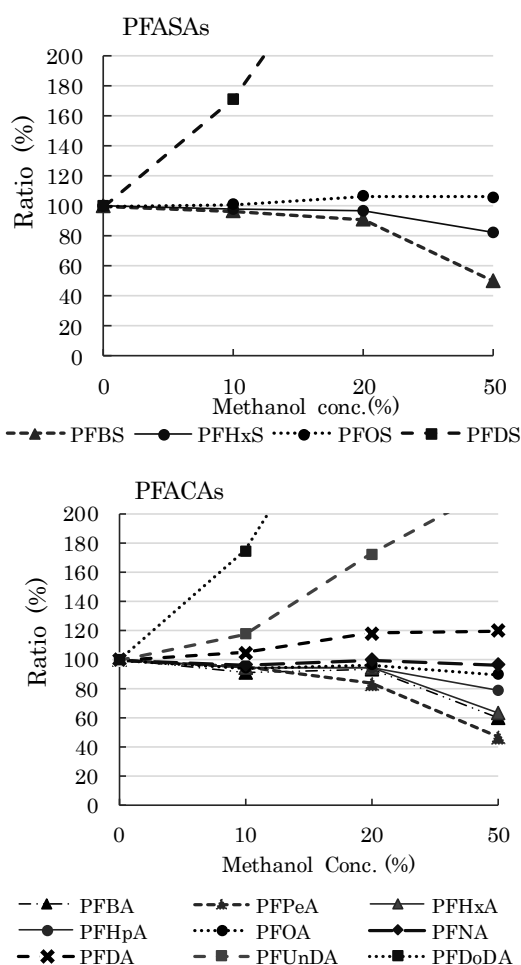


Fig.1 Relationship between methanol concentration and measurement sensitivity ($n=3$)

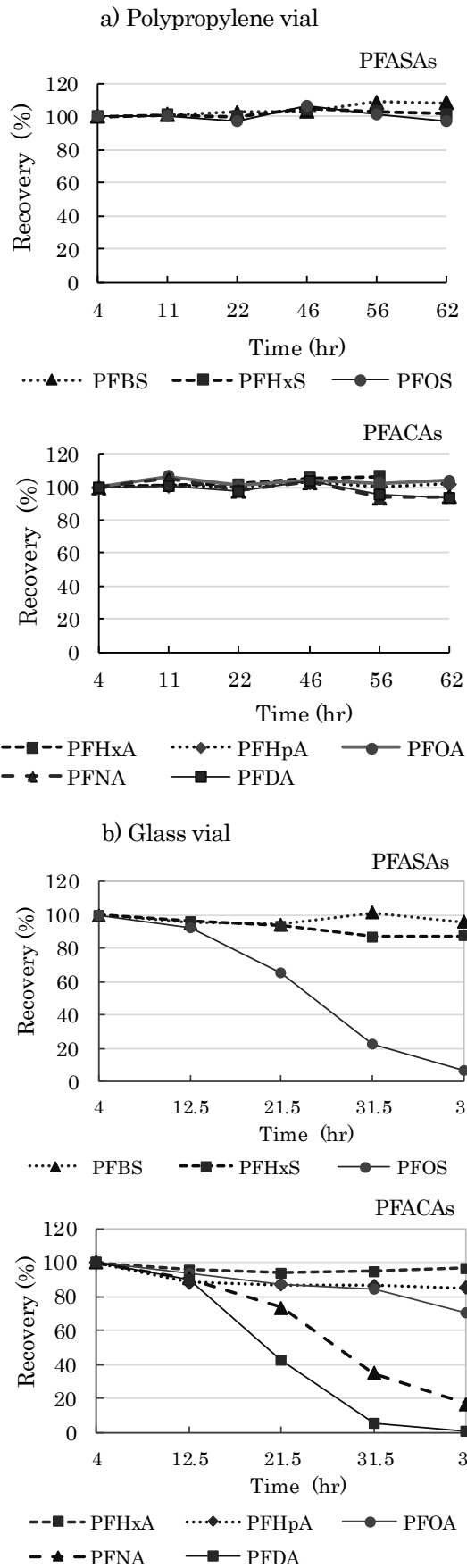


Fig.2 Time course of the area of PFASAs and PFACAs (n = 1)

また、PFBA 及び PFPeA は目的の検量線の直線性が確保できないため除外した。

2. バイアルの影響

バイアルの吸着等の影響と経時変化を Fig.2 に示した。調製後 4 時間経過した標準液 50 ng/L (10%メタノール溶液) のピーク面積を 100%とした時の回収率 (%) で表した。PP 製バイアルでは 46 時間ではほとんど変化はみられなかったが、ガラス製バイアルでは、PFOS、PFNA 及び PFDA は 24 時間以内で面積値が減少し、吸着が認められたので、PP 製バイアルを使用し、標準系列及び試料調製後、60 時間以内に分析することとした。

以上の検討結果から完成した水道水中 PFASs の直接注入法-LC-MS/MS を Fig.3 に示す。この方法で標準液 (50 ng/L) を分析し得られたクロマトグラムを Fig.4 に示す。

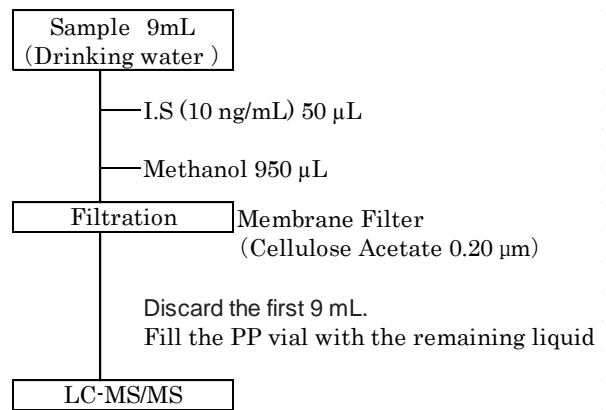


Fig.3 Scheme of the Analytical Method for PFASs

3. 妥当性評価

3.1 検量線の評価

「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン (以下ガイドライン)」¹³⁾に基づき、検量線の直線性や繰り返し測定による精度について評価を行った結果を Table 3 に示した。検量線の直線性を表す指標として決定係数(r^2) 0.996 以上と良好な結果が得られた。検量点の真度は 89.9~109%及び相対標準偏差 (RSD) は 0.12~13%とそれぞれガイドラインの目標 (80~120%及び $\leq 20\%$) を満たしており、良好な結果であった。

3.2 添加試料の真度の評価

5 回の繰り返し試験における添加試料の真度を Table 4 に示した。ガイドラインでは、添加回収試験による妥当性評価における真度の目標として、有機物の項目では 70~130%の範囲が示されている¹³⁾。添加濃度 5 ng/L 及び 50 ng/L の 8 化合物の真度は 95~105%及び 99~

103%とガイドラインの目標を満たす良好な結果が得られた。

3.3 添加試料の併行精度及び室内精度の評価

5 試行, 5 日間の繰り返し試験における併行精度と室内精度を Table 4 に示した。有機物の項目ではガイドラインにおける併行精度(RSD%)及び室内精度(RSD%)の

目標は、 $\leq 20\%$ 及び $\leq 25\%$ となっている¹³⁾。添加濃度の 5 ng/L 及び 50 ng/L の定量値の併行精度は、8 化合物はそれぞれ 4.3~8.4%及び 3.5~7.8%であり、ガイドラインの目標 ($\leq 15\%$) を満たす良好な結果が得られた。また、室内精度においても、それぞれ 4.6~10%及び 6.5~11%であり、ガイドラインの目標 ($\leq 20\%$) を満たす良好な結果が得られた。また、本分析法は、固相抽出による濃縮操作を省略できることで、前処理操作による PFASs の汚染や吸着等の影響を避けることができ、水道水中の PFOS, PFOA 及び PFHxS の検査法として、有効な方法であることが認められた。

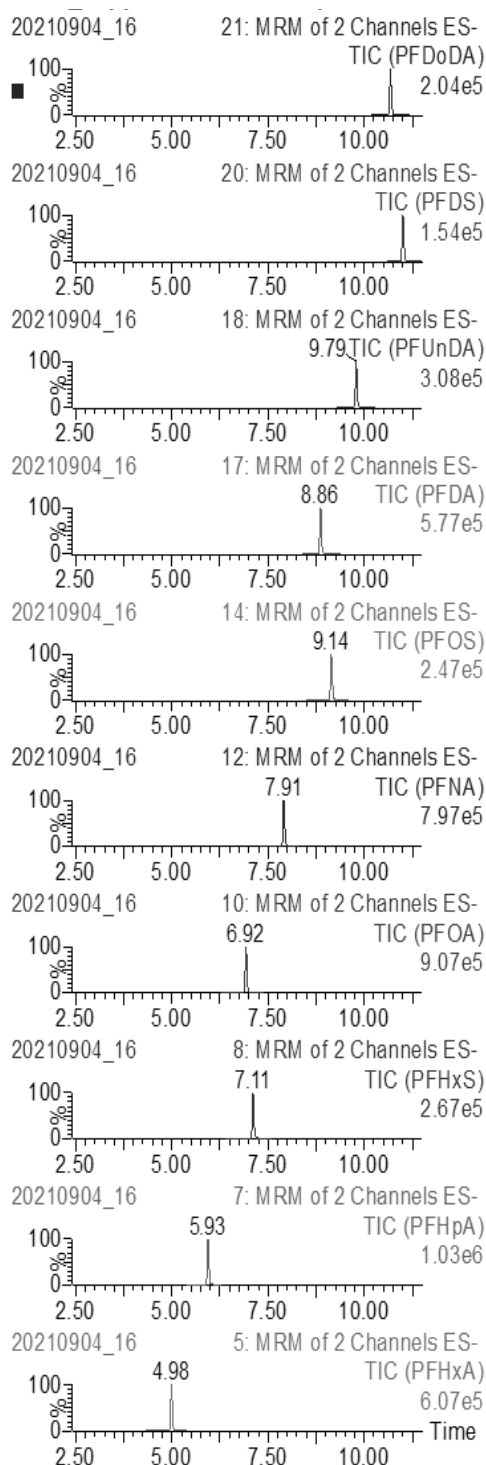


Fig.4 LC/MS/MS chromatograms of a standard solution containing 100 ng/L of PFASs

Table 3 Results of the validation of calibration curve

	Calibration curve	Linearity (r^2)	Accuracy (%)	Precision (RSD %)
PFBS	$y = 0.0230x - 0.0034$	0.998	95~109	1.6~8.7
PFHxS	$y = 0.0176x - 0.0017$	0.997	90~107	0.90~4.0
PFOS	$y = 0.0175x - 0.0019$	0.999	96~105	0.98~11
PFHxA	$y = 0.0177x + 0.0046$	0.998	93~105	0.12~2.4
PFHpA	$y = 0.0268x - 0.0017$	0.998	94~105	0.62~3.2
PFOA	$y = 0.0192x - 0.0001$	0.998	96~105	0.40~6.5
PFNA	$y = 0.0179x + 0.0034$	0.997	91~106	0.17~1.8
PFDA	$y = 0.1847x - 0.0212$	0.996	93~106	1.8~13

Table 4 Results of the validation of PFASs from drinking water at 5 ng/L and 50 ng/L

	Fortified Level (ng/L)	Accuracy ^{a)} (%)	Repeatability ^{b)} (RSD %)	Intermediate Precision ^{b)} (RSD %)
PFBS	5	105	8.4	9.3
	50	103	5.0	6.5
PFHxS	5	102	5.6	8.4
	50	99	3.9	8.4
PFOS	5	95	6.5	7.7
	50	101	4.3	7.0
PFHxA	5	102	5.9	6.6
	50	101	3.5	7.0
PFHpA	5	98	4.3	4.6
	50	101	3.6	7.8
PFOA	5	98	5.9	7.0
	50	100	4.2	7.7
PFNA	5	98	7.3	10
	50	101	3.6	7.6
PFDA	5	104	6.7	6.9
	50	101	7.8	11

a) $n = 5$

b) $n = 25$

IV 結 論

水道水中のPFASsの直接注入によるLC-MS/MS分析法の検討と妥当性を評価した。標準液及び試料の調製で10%メタノール溶液とすることによって、PFBS, PFHxS, PFOS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA及びPFDAの8化合物が分析可能であった。使用するバイアルは、ガラス製バイアルでは、炭素数の大きい化合物で吸着が認められ、PP製バイアルの使用が適切だった。

水道水暫定目標値の1/10濃度である5 ng/L濃度のPFASsの添加回収試験(5試行, 5日間)を水道水で行った。その結果、真度95~105%, 併行精度(RSD%) 4.3~8.4%, 室内精度(RSD%) 4.6~10%とガイドラインの目標を満たす良好な結果が得られ、本分析法は水道水中のPFASsの8化合物について、迅速かつ、高精度な分析が可能であった。

文 献

- 1) 竹峰秀祐, 吉田光方子, 松村千里, 鈴木元治, 鶴川正寛, 中野武: 兵庫県内の河川および海域の有機フッ素化合物の汚染実態について, 財団法人ひょうご環境創造協会兵庫県環境研究センター紀要, **1**, 12-19 (2009)
- 2) 上堀美知子, 清水武憲, 大山浩司: 大阪府内の水環境中における有機フッ素化合物の実態調査, 全環境研会誌, **36**, 44-50 (2011)
- 3) 小原浩史, 東郷孝俊, 宗かよこ, 中牟田啓子: 福岡市内河川水及び博多湾の有機フッ素化合物に関する汚染実態調査, 福岡市保健環境研究所報, **35**, 41-45 (2009)
- 4) 小川綾子, 三木崇, 吉川昌範: 有機フッ素化合物の実態解明に関する調査研究(第2報), 福井県衛生環境研究センター年報, **10**, 57-60 (2011)
- 5) 金井祐貴, 鈴木新, 大塚大, 平山雄一, 宮本廣: 千葉市の水域におけるPFCs調査(第5報), 千葉市環境保健研究所年報, **20**, 77-79 (2013)
- 6) 西野貴裕, 上野孝司, 高橋明宏, 仲摩翔太, 北野大: 多摩川水系における有機フッ素化合物の実態調査, 東京都環境科学研究所年報, 3-8 (2012)
- 7) 西野貴裕, 加藤みか, 下間志正, 北野大: 東京都内地下水における有機フッ素化合物の汚染実態と土壌浸透実験における挙動の考察, 環境化学, **25**(3), 149-160 (2015)
- 8) 厚生労働省健康局長: 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について, 平成15年10月10日, 健発第1010004号(2003)
- 9) 厚生労働省健康局水道課長: 水道基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について, 平成15年10月10日, 健水発1010001号(2003)
- 10) 国立医薬品食品衛生研究所: 目標 31 PFOS 及び PFOA 固相抽出-液体クロマトグラフィー質量分析法質疑応答集(Q&A)
<http://www.nihs.go.jp/dec/section3/qa/pfas.html>
(2021年11月26日確認)
- 11) 今井志保, 川中洋平, 土屋悦輝, 尹順子: 東京都内の水道水中の有機フッ素化合物濃度および組成分布, 水環境学会誌, **35**, 57-64 (2012)
- 12) 高木総吉, 吉田仁: 水道水中におけるペルフルオロおよびポリフルオロアルキル化合物の分析法検討, 水道協会雑誌, **90**(6), 2-15
- 13) 厚生労働省健康局水道課長: 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて, 健水発0906第1号(2012)

(令和4年2月1日受理)