

第2節 多成分分析法

1 ペルフルオロアルキル化合物 (PFAS) の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

- (1) 分析対象化合物 PFAS (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サン酸 (PFHxS) 及びペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS))
- (2) 適用範囲 配合飼料、とうもろこし、魚粉、魚油、稲わら、イタリアンライグラスサイレージ及びとうもろこしサイレージ
- (3) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 各 PFAS 標準原液^{注2,3} PFOA 標準液 (50 µg/mL)、PFNA 標準液 (50 µg/mL)、PFOS 標準液 (50 µg/mL) 及び PFHxS 標準液 (50 µg/mL) を各標準原液とする。
- 2) 各 PFAS 標準液 PFAS 標準原液各 1 mL をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加えて各 PFAS 標準液を調製する (これらの液各 1 mL は、PFOA、PFNA、PFOS 及び PFHxS として各 1 µg を含有する)。
- 3) PFAS 混合標準液 各 PFAS 標準液の一部を混合し、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中に PFOA、PFNA、PFOS 及び PFHxS として各 200 ng を含有する PFAS 混合標準液を調製する。
- 4) 各安定同位体標識 PFAS 内標準原液^{注3} 安定同位体標識 PFOA (¹³C₈-PFOA) 標準液 (50 µg/mL)、安定同位体標識 PFOS (¹³C₈-PFOS) 標準液 (50 µg/mL) 及び安定同位体標識 PFHxS (¹⁸O₂-PFHxS) 標準液 (50 µg/mL) を各内標準原液とする。
- 5) 各安定同位体標識 PFAS 内標準液 各内標準原液各 1 mL をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加えて各内標準液を調製する (これらの液各 1 mL は、¹³C₈-PFOA、¹³C₈-PFOS 及び ¹⁸O₂-PFHxS として各 1 µg を含有する)。
- 6) 安定同位体標識 PFAS 混合内標準液 各内標準液の一部を混合し、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中に ¹³C₈-PFOA、¹³C₈-PFOS 及び ¹⁸O₂-PFHxS として各 100 ng を含有する混合内標準液を調製する。
- 7) シリンジスパイク標準原液^{注3} *N*-エチル-d5 ペルフルオロ-1-オクタンスルホン酸アミド酢酸 (d5-*N*-EtFOSAA) 標準液 (50 µg/mL) を標準原液とする。
- 8) シリンジスパイク標準液^{注4} シリンジスパイク標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中に d5-*N*-EtFOSAA として 20 ng を含有するシリンジスパイク標準液を調製する。
- 9) 検量線作成用混合標準液 使用に際して、PFAS 混合標準液、安定同位体標識 PFAS 混合内標準液及びシリンジスパイク標準液^{注4}の一部をメタノールで希釈し、1 mL 中に PFOA、PFNA、PFOS 及び PFHxS として 0.025~50 ng を含有し、かつ ¹³C₈-PFOA、¹³C₈-PFOS、¹⁸O₂-PFHxS 及び d5-*N*-EtFOSAA として 1 ng を含有する数点の検量線作成用混合標準液を調製する。同時に PFAS 混合標準液を加え

ずに同様に操作し、濃度 0 ng/mL の検量線作成用標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL のポリプロピレン製ねじ口試験管に入れ、更に安定同位体標識 PFAS 混合内標準液 20 µL を正確に加えた後、水 15 mL、アセトニトリル 10 mL 及びギ酸 150 µL を加え、1 分間振り混ぜる。硫酸マグネシウム（無水）6 g（5.5~6.4 g）及び塩化ナトリウム 1.5 g（1.45~1.54 g）を加え、直ちに手で振り混ぜ、更に 1 分間振り混ぜた後、2,000×g で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層（上層）を分散型固相抽出に供する試料溶液とする。

分散型固相抽出 試料溶液を分散型固相抽出吸着剤^{注5}入りの 15 mL のポリプロピレン製遠心沈殿管に入れ、2 分間振り混ぜた後、2,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 5 mL（試料が稲わら、イタリアンライグラスサイレージ又はとうもろこしサイレージである場合は 2.5 mL）を 15 mL のポリプロピレン製ねじ口試験管に入れ、60 °C 以下に加温しながら窒素ガスを送って約 1 mL まで濃縮した後、水 11 mL を加え混合し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 弱塩基性陰イオン交換体ミニカラム（200 mg）^{注6}をアンモニア水-メタノール（1+100）6 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。

試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた後、試料溶液が入っていたポリプロピレン製ねじ口試験管を水 5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加え同様に流出させる。更にメタノール 5 mL をミニカラムに加え流出させた後、ミニカラムの下にあらかじめメタノール 6 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラム（500 mg）^{注7}を連結する。15 mL ポリプロピレン製遠心沈殿管を連結したミニカラムの下に置き、アンモニア水-メタノール（1+100）4 mL を連結したミニカラムに加えて PFAS を溶出させる。

溶出液を 60 °C に加温し、窒素ガスを送ってほとんど乾固するまで濃縮する。残留物にシリンジスパイク標準液^{注4} 50 µL（試料が稲わら、イタリアンライグラスサイレージ又はとうもろこしサイレージである場合は 25 µL）を正確に加えた後、メタノール 950 µL（試料が稲わら、イタリアンライグラスサイレージ又はとうもろこしサイレージである場合は 475 µL）を加えボルテックスミキサーでかき混ぜ、メンブランフィルター（孔径 0.2 µm）でろ過し、液体クロマトグラフタンデム質量型分析計による測定に供する試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 空試験溶液、試料溶液及び各検量線作成用標準液各 10 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入^{注8}し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

（液体クロマトグラフ部）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3.5 µm）^{注9}

ガードカラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 5 mm、粒径 1.7 μm ）^{注 10}

ディレイカラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 50 mm、粒径 3.5 μm ）^{注 9}

溶 離 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－メタノール（9+1）（3 min 保持）→0.1 min→（3+2）→22.9 min→（1+9）（4 min 保持）→0.1 min→（9+1）（3 min 保持）

流 速：0.3 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム質量分析計部^{注 11}）

検 出 器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（負イオンモード）

ネブライザーガス：空気（3 L/min）

乾 燥 ガ ス：窒素（10 L/min）

ヒーティングガス：窒素（10 L/min）

インターフェイス温度：300 °C

ヒートブロック温度：400 °C

D L 温 度：200 °C

コリジョンガス：Ar（230 kPa）

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表 各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン		コリジョン エネルギー (eV)
		定量用 (<i>m/z</i>)	確認用 (<i>m/z</i>)	
PFOA	413	369	-	12
		-	169	17
PFNA	463	419	-	10
		-	219	18
PFOS	499	80	-	54
		-	99	42
PFHxS	399	80	-	45
		-	99	37
¹³ C ₈ -PFOA	421	376	-	11
		-	172	18
¹³ C ₈ -PFOS	507	80	-	49
		-	99	43
¹⁸ O ₂ -PFHxS	403	103	-	35
		-	84	42
d5- <i>N</i> -EtFOSAA	589	419	-	21
		-	531	21

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムから PFOA、PFNA、PFOS、PFHxS、¹³C₈-PFOA、¹³C₈-PFOS 及び ¹⁸O₂-PFHxS のピーク面積又は高さを求めて内標準法^{注 12}により検量線を作成し、試料中の各 PFAS 量を算出する^{注 13}。

- 注1 PFAS 溶出の可能性があるので、全ての操作において PTFE 等のフッ素系樹脂が使用されている容器、器具、装置等は可能な限り使用しないこと。また、使用する器具は必要に応じ事前にメタノールで洗浄したものを使用すること。
- 2 炭素鎖が直鎖状に結合した直鎖体を含有し、この含有量等を保証している標準液を使用すること。なお、PFOS 及び PFHxS はカリウム塩またはナトリウム塩として販売されている。
 - 3 WELLINGTON LABORATORIES 製又はこれと同等のもの
 - 4 シリンジスパイク標準液は各内標準の回収率を算出するため添加する。
 検量線作成用混合標準液の各検量点について、各内標準 ($^{13}\text{C}_8\text{-PFOA}$ 、 $^{13}\text{C}_8\text{-PFOS}$ 及び $^{18}\text{O}_2\text{-PFHxS}$ 、以下 k とする。) と d5-N-EtFOSAA のピーク面積の比を求め、その平均値を相対感度係数 (RRF_k) とする。
 試料溶液において、各内標準のピーク面積と d5-N-EtFOSAA のピーク面積の比及び対応する RRF_k を用いて、次式により各内標準の回収率を計算する。

$$\text{Rc}_k = \frac{A_{\text{CS},k}}{A_{\text{SS}}} \times \frac{1}{\text{RRF}_k} \times 100$$

Rc_k : 内標準 k の回収率 (%)

A_{CS} : 試料溶液中の内標準 k のピーク面積

A_{SS} : 試料溶液中の d5-N-EtFOSAA のピーク面積
 - 5 Q-Sep QuEChERS (Restek 製) 又はこれと同等のもの
 - 6 Strata-XL-AW (Phenomenex 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの
 - 7 Supelclean ENVI-Carb (Merck 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの
 - 8 ピークがブロードになる場合、水を共注入又は注入量を減らすことで改善する。
 - 9 Xbride BEH C18 (Waters 製) 又はこれと同等のもの
 - 10 ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters 製) 又はこれと同等のもの
 - 11 LCMS-8050 (島津製作所製) による条件例
 - 12 PFOA 及び PFNA は $^{13}\text{C}_8\text{-PFOA}$ を、PFOS は $^{13}\text{C}_8\text{-PFOS}$ を、PFHxS は $^{18}\text{O}_2\text{-PFHxS}$ をそれぞれ内標準とする。
 - 13 試料に含まれる分岐異性体について、直鎖体と分岐異性体の感度は同等であると仮定し直鎖体の標準品で作成した検量線により定量する場合、分岐鎖異性体の結果は参考値とする。この際、直鎖体と分岐異性体を可能な限り分離し、直鎖体が検出されるピークの測定値を直鎖体の濃度として把握することが望ましい。なお、分岐鎖異性体を定量する場合は、確認イオンで定量することにより真値に近くなる可能性がある。

(参考) 分析法バリデーション

PFOA、PFNA、PFOS、PFHxS はいずれも直鎖体を指すものとする。

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
PFOA	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	101	7.6
		10	5	105	2.7
	肉豚肥育用配合飼料	0.1	5	104	6.6
		10	5	101	2.7
	肉用牛肥育用配合飼料	0.1	5	99.4	2.2
		10	5	100	3.6
	とうもろこし	2	5	102	6.2
		10	5	93.1	2.6
	魚粉	0.5	5	98.9	2.7
		10	5	99.5	1.8
	魚油	0.5	5	87.3	4.8
		10	5	93.9	3.6
	稲わら	0.2	5	104	4.0
		10	5	105	1.9
	イタリアンライグラス サイレージ	0.18	5	98.4	2.9
		10	5	96.8	3.9
	とうもろこしサイレージ	0.18	5	103	3.4
		10	5	97.1	3.3
PFNA	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	98.3	7.8
		10	5	105	3.6
	肉豚肥育用配合飼料	0.1	5	103	5.3
		10	5	99.4	2.4
	肉用牛肥育用配合飼料	0.1	5	103	7.7
		10	5	95.2	4.8
	とうもろこし	2	5	96.3	3.3
		10	5	93.8	1.0
	魚粉	0.5	5	100	5.3
		10	5	96.4	2.6
	魚油	0.5	5	88.0	5.1
		10	5	93.2	4.7
	稲わら	0.2	5	102	4.6
		10	5	101	2.1
	イタリアンライグラス サイレージ	0.18	5	97.7	2.4
		10	5	101	1.4
	とうもろこしサイレージ	0.18	5	97.1	2.1
		10	5	99.6	2.5

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
PFOS	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	102	11
		10	5	105	2.4
	肉豚肥育用配合飼料	0.1	5	90.4	4.6
		10	5	94.4	2.2
	肉用牛肥育用配合飼料	0.1	5	100	13
		10	5	97.2	3.6
	とうもろこし	2	5	109	7.8
		10	5	94.1	3.1
	魚粉	0.5	5	95.3	12
		10	5	97.5	3.1
	魚油	0.5	5	97.5	5.0
		10	5	98.3	3.9
	稲わら	0.1	5	105	10
		10	5	103	1.1
	イタリアンライグラス サイレージ	0.09	5	102	6.6
		10	5	98.1	2.6
	とうもろこしサイレージ	0.09	5	107	7.3
		10	5	97.8	4.1
PFHxS	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	101	10
		10	5	105	3.0
	肉豚肥育用配合飼料	0.1	5	99.2	13
		10	5	100	3.4
	肉用牛肥育用配合飼料	0.1	5	115	1.7
		10	5	101	4.2
	とうもろこし	2	5	110	6.3
		10	5	93.5	2.3
	魚粉	0.5	5	102	9.1
		10	5	104	2.7
	魚油	0.5	5	94.0	5.9
		10	5	98.5	4.5
	稲わら	0.1	5	102	12
		10	5	104	3.0
	イタリアンライグラス サイレージ	0.09	5	114	5.3
		10	5	97.7	2.2
	とうもろこしサイレージ	0.09	5	101	5.8
		10	5	100	3.4

・共同試験

添加成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
PFOA	肉用牛肥育用配合飼料	10	0	7.5	100	6.6	11	0.50
	とうもろこし	8	2	0.2	102	6.4	14	0.62
	魚粉	9	1	12.5	98.3	7.2	17	0.77
	魚油	10	0	1	79.8	11	18	0.83
	稲わら	9	1	0.2	98.4	9.5	14	0.63
	とうもろこしサイレージ	9	1	2.5 ^注	98.8	5.0	10	0.46
PFNA	肉用牛肥育用配合飼料	10	0	7.5	102	7.7	12	0.54
	とうもろこし	8	2	0.2	104	8.4	11	0.50
	魚粉	9	1	12.5	101	5.7	13	0.60
	魚油	10	0	1	81.4	13	16	0.73
	稲わら	9	1	0.2	111	5.6	11	0.49
	とうもろこしサイレージ	9	1	2.5 ^注	102	6.2	10	0.46
PFOS	肉用牛肥育用配合飼料	10	0	7.5	99.0	7.1	13	0.58
	とうもろこし	8	2	0.1	98.7	14	14	0.64
	魚粉	9	1	12.5	95.1	5.8	12	0.56
	魚油	10	0	1	94.1	5.9	13	0.61
	稲わら	9	1	0.1	94.1	3.3	11	0.51
	とうもろこしサイレージ	10	0	2.5 ^注	96.3	7.2	8.9	0.40
PFHxS	肉用牛肥育用配合飼料	10	0	7.5	104	6.5	9.9	0.45
	とうもろこし	9	1	0.1	105	14	18	0.80
	魚粉	9	1	12.5	104	4.0	17	0.78
	魚油	10	0	1	98.7	6.6	11	0.52
	稲わら	9	1	0.1	108	4.5	18	0.80
	とうもろこしサイレージ	10	0	2.5 ^注	101	6.3	13	0.58

注 分析試料（風乾物）に対する添加濃度

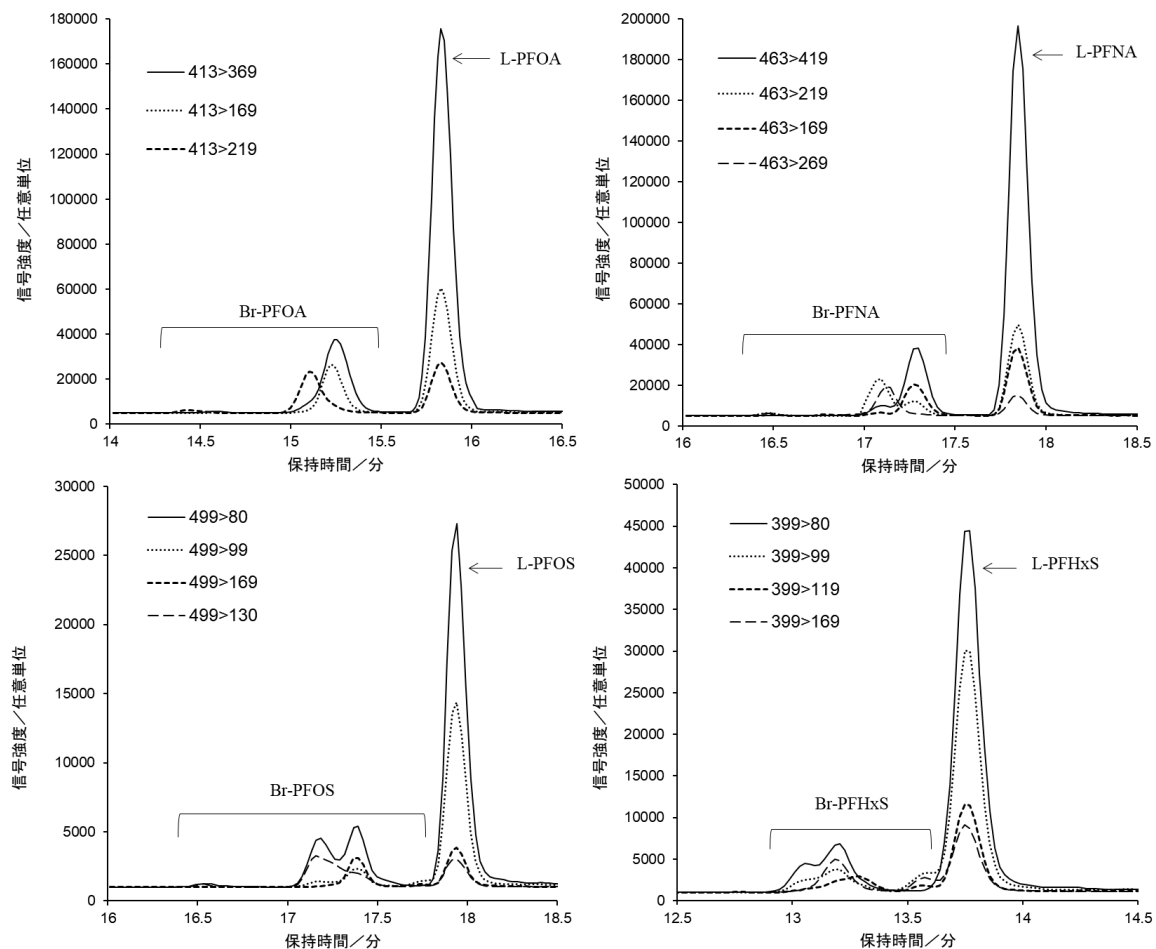
・定量下限（共同試験による確認）

	配合飼料、 とうもろこし 及び稲わら ($\mu\text{g/kg}$)	魚粉及び魚油 ($\mu\text{g/kg}$)	イタリアンライグラスサイレージ（風乾物） 及びとうもろこしサイレージ（風乾物） ($\mu\text{g/kg}$)
PFOA及びPFNA	0.2	0.5	0.4
PFOS及びPFHxS	0.1	0.5	0.2

・検出下限（単一試験室による確認）

	配合飼料，とうもろこし及び稲わら ($\mu\text{g/kg}$)	魚粉，魚油， イタリアンライグラスサイレージ（風乾物） 及びとうもろこしサイレージ（風乾物） ($\mu\text{g/kg}$)
PFOA及びPFNA	0.1	0.1
PFOS及びPFHxS	0.05	0.1

(参考) クロマトグラム例



分岐鎖異性体を含む標準液のクロマトグラム (各 0.05 ng/mL)

(Br-は分岐鎖異性体、L-は直鎖体の保持時間を示す。)