

3 汚泥肥料中の PFHxS 及び PFNA の分析法の開発

－室間共同試験による妥当性確認－

眞鍋典子¹, 橋本良美²

キーワード 有機ふっ素化合物, PFHxS, PFNA, 汚泥肥料, 液体クロマトグラフタンデム質量分析法

1. はじめに

ペルフルオロアルキル化合物及びポリフルオロアルキル化合物(以下,「PFAS」という.)は1万種類以上の物質が存在するとされている. 撥水・撥油性, 熱・化学的安定性等の性質を示すことから, コーティング剤, 泡消火剤など^{1, 2)}に幅広く利用されてきたが, 環境中における難分解性, 高蓄積性から生体への有害性が懸念されているため^{3~5)}, 現在は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)及び化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)でペルフルオロオクタンスルホン酸(以下,「PFOS」という.), ペルフルオロオクタン酸(以下,「PFOA」という.)及びペルフルオロヘキサンスルホン酸(以下,「PFHxS」という.)の3物質が国内外での製造等が規制対象となっている^{6, 7)}. 加えて令和7年6月に新たに長鎖ペルフルオロカルボン酸(LC-PFCA, 炭素鎖9~21)が規制対象として追加された⁸⁾.

汚泥肥料中のPFOS及びPFOAの分析法は, 令和3年度の室間共同試験により妥当性が確認され, 肥料等試験法(2025)⁹⁾にその方法が収載されている. 今回, 農林水産省消費・安全局農産安全管理課長より, 汚泥肥料中のPFHxS及びペルフルオロノナン酸(以下,「PFNA」という.)の分析法開発の要請を受けたことから, 本試験法を用いて単一試験室による妥当性の評価を行ったところ, その妥当性が確認された¹⁰⁾. そこで本報では, PFHxS及びPFNA分析における本試験法の性能評価のため, 国際的に標準と認められる室間共同試験を実施し, 妥当性の確認(Harmonized Collaborative Validation: HCV)を行ったので概要を報告する.

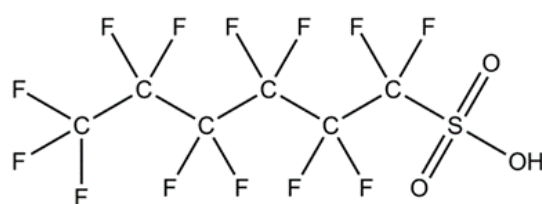


Figure 1-1 Structural formula of PFHxS

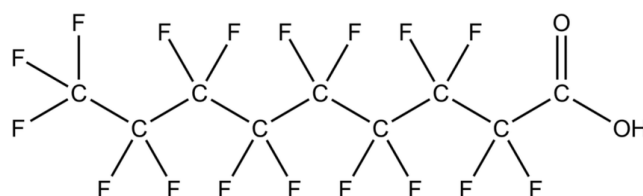


Figure 1-2 Structural formula of PFNA

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部(現名古屋センター肥料検査課)

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2. 材料及び方法

1) 均質性確認用試料及び共同試験用試料の調製

分析用試料として、PFHxS 及び PFNA 共に検出下限¹¹⁾未満の汚泥肥料 1～4, PFHxS は検出されなかったが PFNA は検出された汚泥肥料 5, PFHxS 及び PFNA 共に検出された汚泥肥料 6 の合計 6 種類を選定した. 各汚泥肥料を 40 °C で約 70 時間乾燥した後, 超遠心粉碎機で目開き 500 µm のスクリーンを通過するまで粉碎し, 均質となるよう混合した. 粉碎した汚泥肥料 6 種類について, アルミ袋に約 3.8 g 充填して密封したものを汚泥肥料 1 は 32 袋, 汚泥肥料 2, 3 は各 36 袋, 汚泥肥料 4 は 32 袋, 汚泥肥料 5, 6 は各 50 袋の合計 236 袋調製した. 汚泥肥料の種類別にアルファベット(A～L)及び試料番号を付して袋を識別し, 検出試料である汚泥肥料 5, 6 については, ランダムに 10 袋ずつ抜き取り均質性確認用試料とした. 各アルファベットの試料からランダムに 1 袋ずつ抽出したものを共同試験用試料とし, 以下の参加試験室に配付した. なお, 今回用いた汚泥肥料の PFHxS 及び PFNA の存在形態については Table 1 に示した.

(共同試験参加試験室)

- ・アジレント・テクノロジー株式会社 APAC テクニカルソリューション本部
 - ・一般財団法人東海技術センター
 - ・一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所
 - ・株式会社環境科学研究所
 - ・株式会社島津テクノリサーチ 環境事業部 分析研究センター
 - ・公益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
 - ・公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所
 - ・ジーエルサイエンス株式会社 カスタマーサポートセンター
 - ・地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所
 - ・中外テクノス株式会社 本部環境技術センター
 - ・独立行政法人農林水産消費安全技術センター 肥飼料安全検査部 肥料鑑定課
 - ・内藤環境管理株式会社
 - ・三浦工業株式会社 三浦環境科学研究所 科学分析センター
- (50 音順)

Table 1 Forms of PFHxS and PFNA in the samples

Sludge fertilizer (Sample ID)	PFHxS	PFNA
1 (B, F)	Linear chain compound ^{a)}	Linear chain compound
2 (D, K)	Linear chain compound	Linear chain compound
3 (G, I)	Linear chain compound	Linear chain compound
4 (H, L)	Linear chain compound	Linear chain compound
5 (A, J)	Linear chain compound	Linear chain compound + Branched chain isomer ^{b)}
6 (C, E)	Linear chain compound + Branched chain isomer	Linear chain compound + Branched chain isomer

a) Spiked the standard solution to the blank samples

b) Contained in the samples

2) 装置及び器具

各試験室が保有する液体クロマトグラムタンデム質量分析計(以下、「LC-MS/MS」という)、LC 用分離カラム、化学天びん、超音波発生器、遠心分離機、高速遠心分離機、マニホールド、濃縮装置、試験管ミキサーを使用した。

3) 標準液等

添加用標準液は次の手順で調製した。L-PFHxS 標準液(50 µg/mL, WELLINGTON)及び PFNA 標準液(50 µg/mL, WELLINGTON)をメタノール(残留農薬・PCB 試験用(5000 倍濃縮)、富士フィルム和光純薬)でそれぞれ希釈した。各標準液を一定量ずつ全量フラスコに採取して混合し、メタノールで定容して任意の濃度の添加用標準液とした。これら添加用標準液にアルファベット(a~l)を付して、1)で調製した共同試験用試料(A~L)と対になるように、1 本ずつ参加試験室に配付した。また、PFNA が検出された汚泥肥料 5 には PFHxS のみを含む添加用標準液、PFHxS 及び PFNA が検出された汚泥肥料 6 にはメタノールを添加用として配付し、同一の操作を行うよう条件を揃えた。

^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL)は次の手順で調製した。 $^{13}\text{C}_3$ -PFHxS 内標準液(50 µg/mL, WELLINGTON)及び $^{13}\text{C}_9$ -PFNA 内標準液(50 µg/mL, WELLINGTON)をメタノールで希釈し、 $^{13}\text{C}_3$ -PFHxS 内標準液(1 µg/mL)及び $^{13}\text{C}_9$ -PFNA 内標準液(1 µg/mL)をそれぞれ調製した。これら内標準液を一定量ずつ全量フラスコに採取して混合し、メタノール：水(1+1)で定容して 20 ng/mL となるように調製した。

検量線用混合標準液は次の手順で調製した。L-PFHxS 標準液(50 µg/mL, WELLINGTON)及び PFNA 標準液(50 µg/mL, WELLINGTON)をメタノールで希釈し、L-PFHxS 標準液(1 µg/mL)及び PFNA 標準液(1 µg/mL)をそれぞれ調製した。これら標準液を一定量ずつ全量フラスコに採取して混合し、メタノール：水(1+1)で定容して混合標準液(200 ng/mL)を調製した。さらに混合標準液(200 ng/mL)を全量フラスコに段階的にとり、 ^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL)を 2 ng/mL となるよう添加し、メタノール：水(1+1)で定容して、L-PFHxS 及び PFNA の濃度が 0.1 ng/mL~50 ng/mL の 9 濃度となるよう調製した。

上記のとおり調製した添加用標準液、 ^{13}C -混合内標準液及び検量線用混合標準液を参加試験室に配付した。なお、標準液中の PFHxS 及び PFNA の存在形態はいずれも直鎖体である。

4) 試験操作

汚泥肥料中の PFHxS 及び PFNA の分析は、肥料等試験法(2025)の 8.7.a) 有機ふっ素化合物-高速液体クロマトグラフトンデム質量分析法に準じて実施した。内標準物質には $^{13}\text{C}_3$ -PFHxS 及び $^{13}\text{C}_9$ -PFNA を使用し、試料溶液及び検量線用混合標準液中の直鎖 PFHxS 及び分岐鎖 PFHxS の異性体の含量(以下、「PFHxS 含量」という)、直鎖 PFNA 及び分岐鎖 PFNA の異性体の含量(以下、「PFNA 含量」という)を算出した。分析試料用添加溶液(添加用標準液又はメタノール)を採取した試料に添加し、その後は肥料等試験法に従って操作を行った。また、弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムは InertSep MA-2(充填剤 500 mg, リザーバー容量 6 cc)を使用した。

測定における LC-MS/MS の LC システム及びパラメータの一例を Table 2-1 に示した。なお、各試験室が保有しているカラムで直鎖 PFHxS 及び分岐鎖 PFHxS 並びに直鎖 PFNA 及び分岐鎖 PFNA を分離して測定できるように、それぞれの試験室において Table 2-1 を参考に各条件を設定した。また、Table 2-2 に示す質量分析計のパラメータ以外の項目については、各試験室が保有している機器に合わせて設定することとした。さらに、Table 2-3 に示したプレカーサーイオン及びプロダクトイオンは、質量分析計の最適化を実施し、微調整してよいこととした。

各イオンの選択反応検出 (MRM) クロマトグラムを記録し, それぞれのピーク面積を求め, PFHxS, PFNA 及びそれらの内標準物質の定量用イオンのピーク面積比を算出した. 検量線用混合標準液中の PFHxS 及び PFNA 濃度と算出したピーク面積比から検量線を作成し, 試料溶液中の濃度を求め, 分析試料中の PFHxS 及び PFNA の濃度を算出した.

参考として, 分析法のフローシートを Scheme 1 に, 標準液及び試料溶液の定量用プロダクトイオンの選択反応検出クロマトグラムの例を Figure 2 に示した.

Table 2-1 Example of parameter of LC system

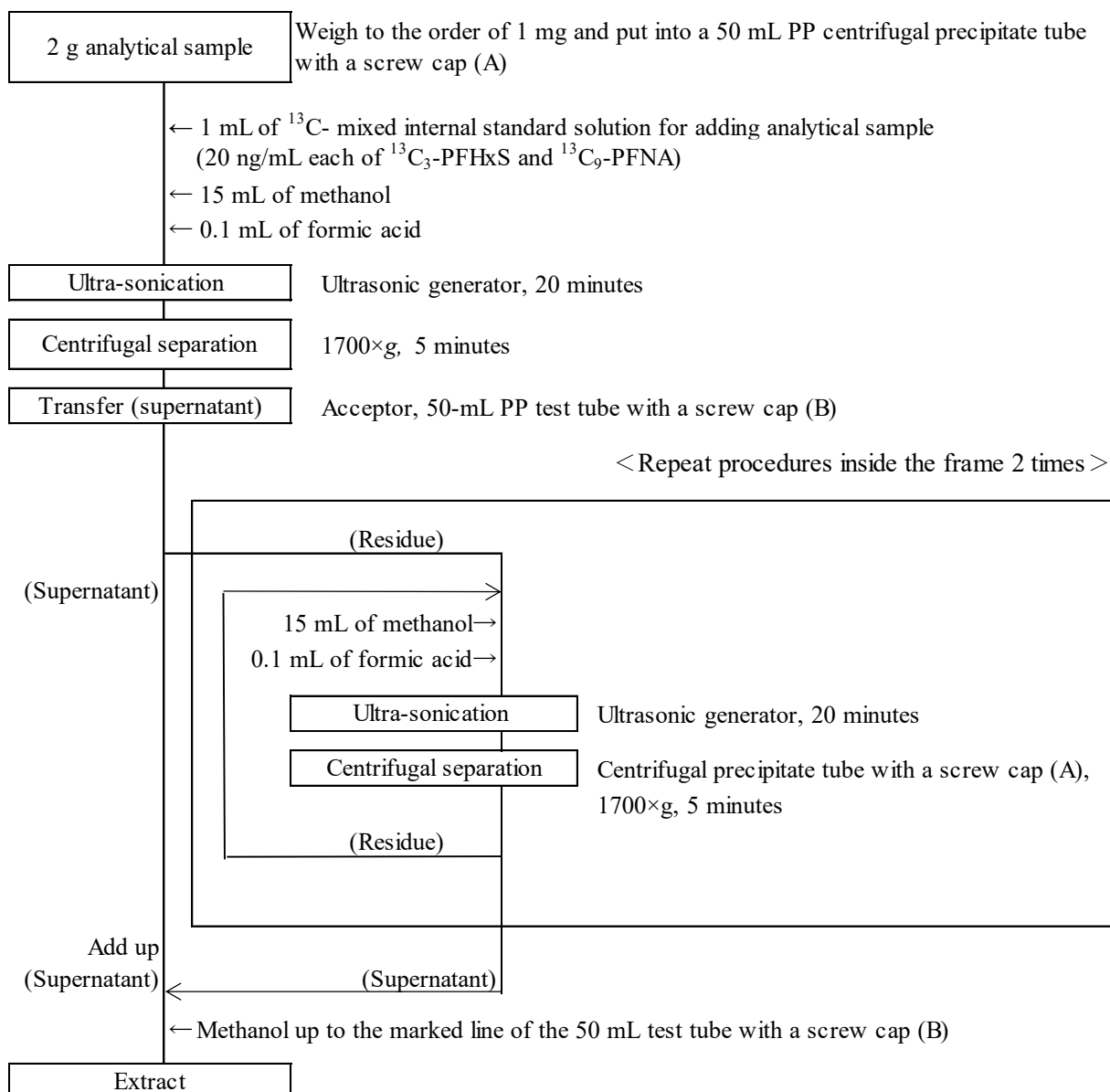
Column: Silica gel column (chemically bonded with octadecyl group)			
(2 mm - 3 mm I.D. , 50 mm - 150 mm L, 1.6 μ m - 3.0 μ m)			
Flow rate: 0.2 mL/min - 0.5 mL/min			
Mobile phase: A: 10 mmol/L ammonium acetate solution B: Acetonitrile			
Gradient program	0.0 ~ 2.0 min	A: 80	B: 20
	2.0 min ~ 15.0 min	A: 80→0	B: 20→100
	15.0 min ~ 15.1 min	A: 0→80	B: 100→20
	15.1 min ~ 20.0 min	A: 80	B: 20 (%)
Column temperature: 40 °C			
Injection volume: 5 μ L			

Table 2-2 Parameter of MS/MS

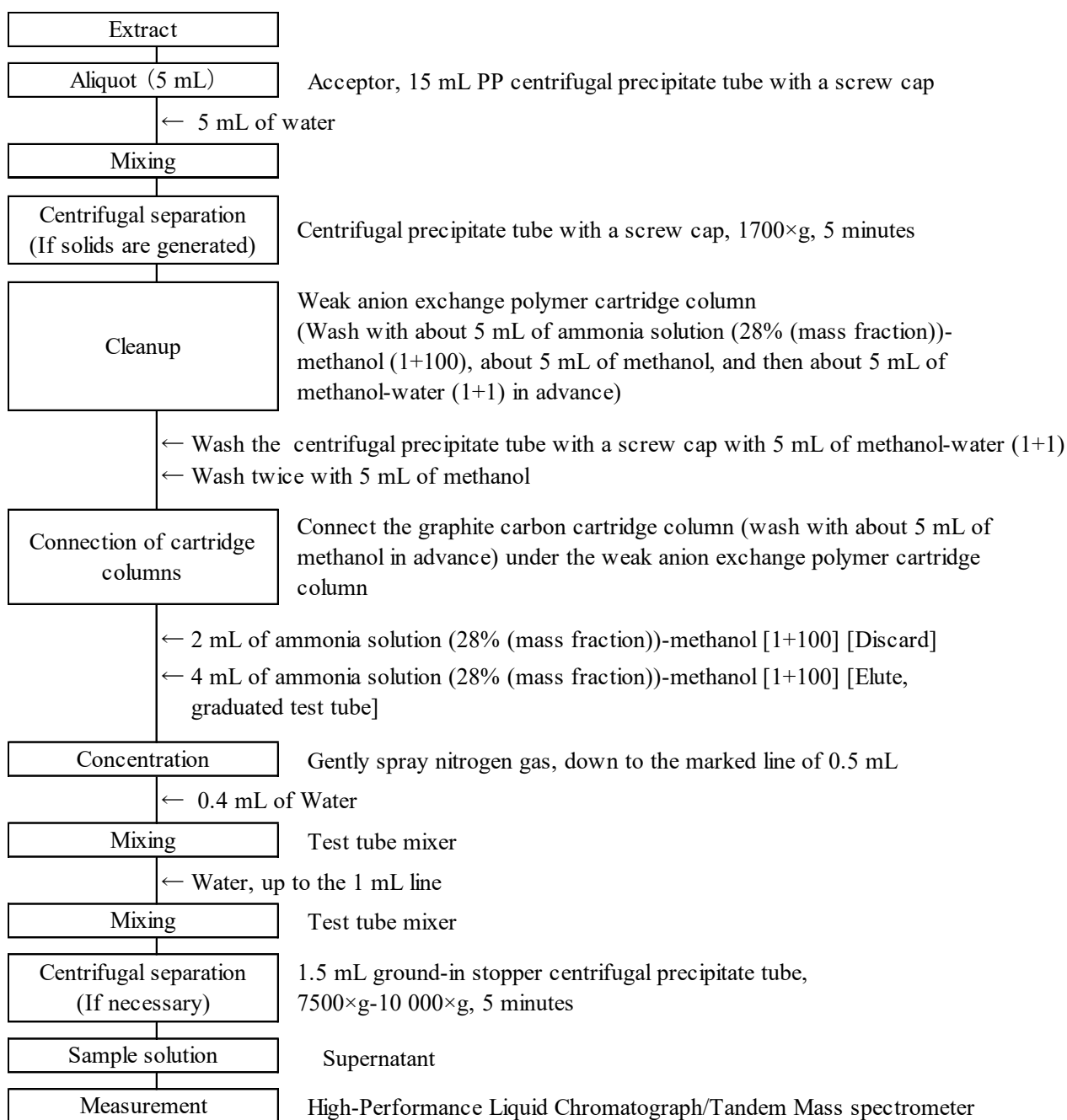
Ionization: Electrospray ionization (ESI)
Mode: Negative

Table 2-3 Monitor ion

Compound	MRM transition (m/z)		
	Precursor ion	Product ion	Product ion
		(For determination)	(for validation)
PFHxS	399	80	99
¹³ C ₃ -PFHxS	402	80	99
PFNA	463	419	219
¹³ C ₉ -PFNA	472	427	223



Scheme 1-1 Flow sheet for PFAS in sludge fertilizers (Extract procedure)



Scheme 1-2 Flow sheet for PFAS in sludge fertilizers (Cleanup and measurement procedures)

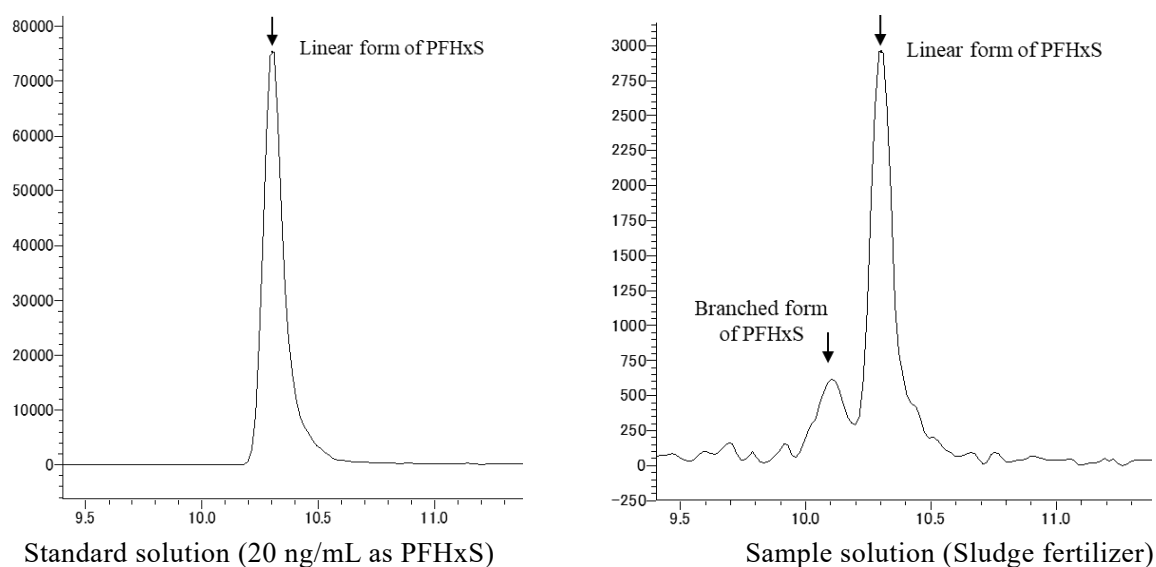


Figure 2-1 MRM chromatogram of PFHxS

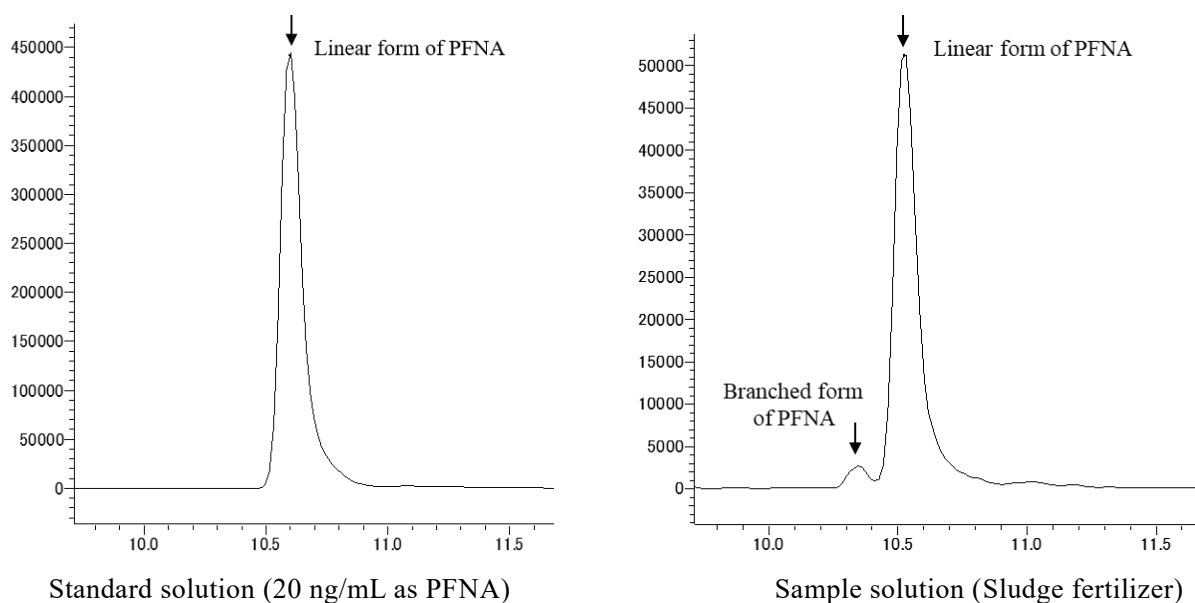


Figure 2-2 MRM chromatogram of PFNA

5) 共同試験用試料の均質性確認

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル(2006)¹²⁾の均質性試験に従い、汚泥肥料 5 及び 6 の共同試験用試料から 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 4) に従って分析した。なお、ねじ口遠心沈殿管にはかり入れる分析試料は 1.8 g とした。また、PFHxS 及び PFNA 濃度はそれぞれ PFHxS 含量、PFNA 含量として算出した。

6) 共同試験

共同試験に参加した 13 試験室が使用した機器及びカラムは Table 3、設定した LC 条件は Table 4 のとおりである。各試験室に配付した計 12 試料(6 種類、非明示 2 反復)について 4) に従い令和 7 年 12 月 23 日から令和 8 年 3 月 6 日まで分析し、報告するよう求めた。また、各試験室への指示事項として、分析は 1 回とし、再試験及び併行試験は禁止した。なお、分析値は $\mu\text{g/kg}$ で表し、有効数字 4 桁目を四捨五入して有効数字 3 桁での報告を求めた。

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Labs ID ^{a)}	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)	guard column (i.d.×length)	delay column (i.d.×length)
A	LC: LC-40D XS, Shimadzu MS/MS: LCMS-8045, Shimadzu	InertSustain C18 HP, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 µm)	Guard Column for UHPLC InertSustain C18, GL Science (3.0 mm×10 mm)	Delay column for PFAS, GL Science (3.0 mm×30 mm)
B	LC: 1260 Infinity III HPLC, Agilent MS/MS: 6475 Triple Quad LC/MS, Agilent	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, Agilent (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)	-	InfinityLab PFC Delay Column, Agilent (4.6 mm×30 mm)
C	LC: Exion LC, AB SCIEX MS/MS: Triple Quad 4500, AB SCIEX	Betasil®C18, Thermo Fisher Scientific Inc. (2.1 mm×50 mm, 5 µm)	-	InfinityLab PFC Delay Column, Agilent (4.6 mm×30 mm)
D	LC: LC-30AD, Shimadzu MS/MS: Triple Quad 4500, AB SCIEX	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 µm)	-	PFAS Delay Column, Restek (2.1 mm×50 mm, 5 µm)
E	LC: 1290 Infinity II, Agilent MS/MS: Triple Quad 5500+, AB SCIEX	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, Agilent (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)	Fast Guard Ecl. Plus C18, Agilent (2.1 mm×5 mm, 1.8 µm)	InfinityLab PFC Delay Column, Agilent (4.6 mm×30 mm)
F	LC: ACQUITY UPLC H-Class PLUS, Waters MS/MS: Xevo TQ-XS, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 µm)	-	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.7 µm)
G	LC: Exion LC, AB SCIEX MS/MS: Triple Quad 5500+, AB SCIEX	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, Agilent (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)	Fast Guard Ecl. Plus C18, Agilent (2.1 mm×5 mm, 1.8 µm)	InfinityLab PFC Delay Column, Agilent (4.6 mm×30 mm)
H	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	InertSustain C18, GL Science (2.1 mm×50 mm, 2 µm)	-	Delay column for PFAS, GL Science (3.0 mm×30 mm)
I	LC: Exion LC, AB SCIEX MS/MS: Triple Quad 5500+, AB SCIEX	InertSustain AQ-C18, GL Science (2.1 mm×150 mm, 3 µm)	InertSustain AQ-C18, GL Science (2.1 mm×10 mm, 3 µm)	Delay column for PFAS, GL Science (3.0 mm×30 mm)
J	LC: Exion LC, AB SCIEX MS/MS: Triple Quad 6500+, AB SCIEX	InertSustain AQ-C18, GL Science (2.1 mm×150 mm, 3 µm)	-	Delay column for PFAS, GL Science (3.0 mm×30 mm)
K	LC: Exion LC, AB SCIEX MS/MS: QTRAP 5500, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Science (2.1 mm×50 mm, 3 µm)	-	Delay column for PFAS, GL Science (3.0 mm×30 mm)
L	LC: LC-30AD, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4000, AB SCIEX	InertSustain AQ-C18, GL Science (2.1 mm×150 mm, 3 µm)	-	Custom Column (Size unknown, Activated carbon)
M	LC: 1290 Infinity III HPLC, Agilent MS/MS: 6475 Triple Quad LC/MS, Agilent	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, Agilent (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)	-	InfinityLab PFC Delay Column, Agilent (4.6 mm×30 mm)

a) Laboratory identification (In no particular order)

Table 4 Conditions of LC system used in the collaborative study

Labs ID ^{a)}	Mobile phase		Flow rate	Column temperature	Gradient program		
	A	B	(mL/min)	(°C)	Time (min)	A:(%)	B:(%)
A	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.3	40	0.0 ~ 2.0 min	A: 80	B: 20
					2.0 min ~ 15.0 min	A: 80→0	B: 20→100
					15.0 min ~ 15.1 min	A: 0→80	B: 100→20
					15.1 min ~ 20.0 min	A: 80	B: 20
B	2 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.3~0.5	40	0.0 ~ 2.0 min	A: 98	B: 2.0
					2.0 min ~ 2.1 min	A: 98→80	B: 2.0→20
					2.1 min ~ 16.0 min	A: 80→20	B: 20→80
					16.0 min ~ 17.0 min	A: 20→0	B: 80→100
					17 min ~ 17.1 min	A: 0	B: 100
					17.1 min ~ 18.0 min	A: 0	B: 100
					18.0 min ~ 18.1 min	A: 0→98	B: 100→2.0
					18.1 min ~ 21.0 min	A: 98	B: 2.0
C	2 mmol/L ammonium acetate /Methanol (9:1)	Methanol	0.22	30	0.0 ~ 2.0 min	A: 90→50	B: 10→50
					2.0 min ~ 10.0 min	A: 50→0	B: 50→100
					10.0 min ~ 14.0 min	A: 0	B: 100
					14.0 min ~ 15.0 min	A: 0→90	B: 100→10
					15.0 min ~ 20.0 min	A: 90	B: 10
D	2 mmol/L ammonium acetate (2 % Mehtanol contained)	Acetonitrile	0.4	50	0.0 ~ 1.0 min	A: 90	B: 10
					1.0 min ~ 15.0 min	A: 90→5.0	B: 10→95
					15.0 min ~ 16.0 min	A: 5.0	B: 95
					16.0 min ~ 16.01 min	A: 5.0→90	B: 95→10
					16.01 min ~ 20.0 min	A: 90	B: 10
E	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.4	40	0.0 ~ 1.0 min	A: 70	B: 30
					1.0 min ~ 8.5 min	A: 70→25	B: 25→75
					8.5 min ~ 8.6 min	A: 25→2.0	B: 75→98
					8.6 min ~ 11.5 min	A: 2.0	B: 98
					11.5 min ~ 11.6 min	A: 2.0→70	B: 98→30
					11.6 min ~ 14.5 min	A: 70	B: 30
F	2 mmol/L ammonium acetate	Methanol	0.2	40	0.0 ~ 6.0 min	A: 99→50	B: 1.0→50
					6.0 min ~ 16.0 min	A: 50→2.0	B: 50→98
					16.0 min ~ 25.0 min	A: 2.0	B: 98
					25.0 min ~ 25.1 min	A: 2.0→99	B: 98→1.0
					25.1 min ~ 35.0 min	A: 99	B: 1.0
G	2 mmol/L ammonium acetate (5 % Acetonitrile contained)	Acetonitrile	0.4	40	0.0 ~ 0.2 min	A: 98	B: 2.0
					0.2 min ~ 10.0 min	A: 98→5.0	B: 2.0→95
					10.0 min ~ 12.0 min	A: 5.0	B: 95
					12.0 min ~ 12.2 min	A: 5.0→98	B: 95→2.0
H	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.3	40	0.0 ~ 2.0 min	A: 80	B: 20
					2.0 min ~ 15.0 min	A: 80→0	B: 20→100
					15.0 min ~ 18.0 min	A: 0	B: 100
					18.0 min ~ 18.01 min	A: 0→80	B: 100→20
					18.01 min ~ 22.0 min	A: 80	B: 20
I	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.3	40	0.0 ~ 1.5 min	A: 60	B: 40
					1.5 min ~ 10.0 min	A: 60→0	B: 40→100
					10.0 min ~ 13.0 min	A: 0	B: 100
					13.0 min ~ 13.2 min	A: 0→60	B: 100→40
					13.2 min ~ 21 min	A: 60	B: 40
J	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.3	40	0.0 ~ 1.5 min	A: 60	B: 40
					1.5 min ~ 10.0 min	A: 60→2.0	B: 40→98
					10.0 min ~ 12.0 min	A: 2.0	B: 98
					12.0 min ~ 12.1 min	A: 2.0→60	B: 98→40
					12.1 min ~ 16.0 min	A: 60	B: 40
K	2 mmol/L ammonium acetate (5 % Acetonitrile contained)	Acetonitrile	0.4	40	0.0 ~ 1.0 min	A: 98→70	B: 2.0→30
					1.0 min ~ 5.0 min	A: 70→52.5	B: 30→47.5
					5.0 min ~ 5.1 min	A: 52.5→5.0	B: 47.5→95
					5.1 min ~ 7.0 min	A: 5.0	B: 95
					7.0 min ~ 7.1 min	A: 5.0→98	B: 95→2.0
					7.1 min ~ 9.3 min	A: 98	B: 2.0
L	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	40	0.0 ~ 1.5 min	A: 60	B: 40
					1.5 min ~ 10.0 min	A: 60→0	B: 40→100
					10.0 min ~ 12.0 min	A: 0→80	B: 100→20
					12.0 min ~ 12.2 min	A: 80	B: 20
M	2 mmol/L ammonium acetate	Methanol	0.3	40	0.0 ~ 1.0 min	A: 99	B: 1.0
					1.0 min ~ 2.0 min	A: 99→50	B: 1.0→50
					2.0 min ~ 12.0 min	A: 50→30	B: 50→70
					12.0 min ~ 16.0 min	A: 30→5.0	B: 70→95
					16.0 min ~ 21.0 min	A: 5.0	B: 95
					21.0 min ~ 21.1 min	A: 5.0→99	B: 95→1.0
					21.1 min ~ 25.0 min	A: 99	B: 1.0

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

PFNA が検出された汚泥肥料 5, PFHxS 及び PFNA が検出された汚泥肥料 6 について, それぞれ 10 試料を 2 点併行で分析した総平均値 ($\bar{x}$), 一元配置分散分析の結果から算出した併行標準偏差 (s_r) 及び試料間標準偏差 (s_{bb}) を Table 5 に示した. さらに, 肥料等試験法附属書 A¹³⁾ に示されている室間再現精度の目安 ($CRSD_R$) 及びそれらから算出 (式 1) した推定室間再現標準偏差 ($\hat{\sigma}_R$) を同じく Table 5 に示した.

均質性の判定は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル (2006) の手順を参考に実施した. まず, 分析結果の等分散性を確認するため, 分析結果について Cochran の検定を実施した. その結果, すべての試料において外れ値は認められなかったため, これらの分析結果について一元配置分散分析を実施し, 併行標準偏差 (s_r) 及び試料間標準偏差 (s_{bb}) を求めた. 併行標準偏差 (s_r) を評価したところ, すべての試料で判定式 (式 2) を満たしていたことから, 均質性確認試験に用いた分析法の併行精度に問題はないことが確認された. 次に, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル (1993)¹⁴⁾ の十分に均質の判定式 (式 3) を用いて均質性の判定を行った結果, すべての試料で判定式 (式 3) を満たしていたことから, 共同試験用試料として妥当な均質性を有していることが確認された.

$$\hat{\sigma}_R = CRSD_R \times \bar{x} / 100 \quad \dots (式 1)$$

$$s_r < 0.5\sigma_p = 0.5\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 2)$$

$$s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 3)$$

$\hat{\sigma}_R$: 室間再現精度の目安 ($CRSD_R$) から算出した推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$: 肥料等試験法に示されている室間再現精度 (室間再現相対標準偏差 (%)) の目安

$\bar{x}$: 総平均値

s_r : 併行標準偏差

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_{bb} : 試料間標準偏差

Table 5 Homogeneity test results

Compound	Sample	sample ^{a)} $p(q)$	$\bar{x}$ ^{b)} ($\mu\text{g/kg}$)	$CRSD_R$ ^{c)} (%)	σ_R ^{d)} ($\mu\text{g/kg}$)	s_r ^{e)} ($\mu\text{g/kg}$)	$0.5 \times \sigma_R$ ^{f)} ($\mu\text{g/kg}$)	s_{bb} ^{g)} ($\mu\text{g/kg}$)	$0.3 \times \sigma_R$ ^{h)} ($\mu\text{g/kg}$)
PFHxS	Sludge fertilizer 6	10(0)	3.5	22	0.76	0.23	0.38	0 ⁱ⁾	0.23
PFNA	Sludge fertilizer 5	10(0)	1.9	22	0.43	0.12	0.21	0.03	0.13
	Sludge fertilizer 6	10(0)	10.5	22	2.3	0.26	1.15	0.13	0.69

a) p =Number of samples after excluding outliers, (q)=Number of samples of outliers

b) Total mean (Number of samples after excluding outliers $\times n=2$)

c) Criteria of precision for Reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers (2025) Annex A

d) The estimated standard deviation of reproducibility calculated based on $CRSD_R$

e) Repeatability standard deviation

f) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (s_r)

g) Standard deviation of sample-to-sample

h) The value for the test: $s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R$

i) When the variance between groups < the variance within a group, s_{bb}^2 was considered as 0

2) 共同試験結果及び外れ値検定

各試験室から報告された試験結果を Table 6 に示した。

試験室 J は、実施要領に従って空試験溶液中の濃度を分析したところ、PFNA が検量線濃度範囲の下限 (0.1 ng/mL) を上回る濃度で検出された。このことについて、試験室による操作手順には問題がなかったこと、また本共同試験は再試験を禁止していたことから、各試料中濃度 (μg/kg) より一律でブランク値を差し引いた値で報告を求め、統計処理を行った。

13 試験室の結果について IUPAC の共同試験プロトコル¹⁵⁾に従って統計処理をした。分析結果の外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定 (Single Grubbs 検定及び Paired Grubbs 検定) を実施した。その結果、13 試験室のうち、PFHxS の汚泥肥料 2 で 1 試験室、汚泥肥料 5 で 1 試験室、汚泥肥料 6 で 1 試験室、PFNA の汚泥肥料 5 で 2 試験室、汚泥肥料 6 で 1 試験室が外れ値として判定された。各検定での外れ値として除外する試験室数は検定開始時の試験室数の $2/9^{16)}$ 以内であり、それ以上に外れ値と判定された試験室はなかった。

Table 6-1 Individual result of PFHxS (μg/kg) (PFHxS/¹³C₃-PFHxS)

Labs ID ^{a)}	Sludge fertilizer 1		Sludge fertilizer 2		Sludge fertilizer 3		Sludge fertilizer 4		Sludge fertilizer 5		Sludge fertilizer 6	
A	10.3	9.51	4.26	4.59	24.2	21.9	46.8	48.8	2.01	2.06	4.53	4.54
B	9.75	10.1	4.94	5.08	25.1	24.9	52.7	53.0	2.15	2.25	4.50	4.54
C	9.14	9.45	6.08	6.19	23.2	24.6	48.3	49.5	2.31	2.32	4.47	4.39
D	9.85	10.0	5.04	4.77	26.2	26.1	47.8	49.3	2.11	1.82	4.15	4.03
E	9.83	10.5	5.87	5.84	23.8	24.5	47.8	50.0	2.15	2.25	4.81	4.59
F	10.7	10.4	5.01	5.18	25.3	26.9	52.8	50.6	2.57 ^{b)}	1.91 ^{b)}	4.20	4.38
G	10.3	10.3	4.96	4.95	23.8	26.0	50.5	52.7	2.06	1.97	4.44	4.27
H	10.7	10.2	5.12	5.14	25.3	25.8	50.6	51.1	2.51	2.42	4.45	4.52
I	9.92	10.0	4.94	4.95	26.1	26.7	50.2	50.8	1.97	1.90	4.36	4.24
J	10.6	10.6	5.20	4.69	25.8	25.9	49.8	51.8	2.06	2.04	4.50	4.60
K	10.3	10.6	5.31	5.12	26.5	26.4	48.4	50.4	2.22	2.26	4.65	4.87
L	11.6	11.0	5.25	5.51	27.7	26.9	52.7	50.8	2.33	2.37	5.44 ^{c)}	5.47 ^{c)}
M	10.1	9.91	8.36 ^{c)}	8.39 ^{c)}	24.6	24.8	51.3	52.2	2.65	2.82	4.88	4.81

a) Laboratory identification (In no particular order)

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Single Grubbs test

Table 6-2 Individual result of PFNA (μg/kg) (PFNA/¹³C₉-PFNA)

Labs ID ^{b)}	Sludge fertilizer 1		Sludge fertilizer 2		Sludge fertilizer 3		Sludge fertilizer 4		Sludge fertilizer 5		Sludge fertilizer 6	
A	10.3	10.2	5.07	5.10	25.3	24.9	49.4	50.4	2.46	2.45	14.2	13.6
B	10.3	10.5	5.21	5.14	25.8	25.9	49.7	52.1	2.42	2.42	13.1	12.9
C	10.3	10.4	4.57	4.44	27.1	26.0	49.5	53.1	1.62 ^{c)}	1.71 ^{c)}	12.3	11.6
D	10.4	11.0	5.45	5.04	27.9	25.0	50.3	50.6	2.54	2.28	11.9	11.0
E	9.94	11.0	5.06	4.86	25.0	23.9	49.4	50.0	2.55	2.61	13.5	12.6
F	10.7	10.9	5.29	4.89	26.5	27.6	54.6	52.0	1.94 ^{c)}	1.66 ^{c)}	12.7	12.3
G	9.83	10.6	5.17	5.06	24.4	24.6	51.6	49.6	2.16	2.35	13.1	12.8
H	10.6	10.1	4.95	4.66	23.7	23.2	49.7	47.5	2.62	2.38	13.2	12.7
I	10.6	10.6	5.32	5.30	24.2	23.5	47.0	47.0	2.64	2.58	13.0	12.9
J	9.35	10.3	5.27	5.23	23.3	23.3	48.4	49.6	2.58	2.41	11.3 ^{b)}	13.6 ^{b)}
K	11.1	9.64	5.56	5.19	26.6	26.4	50.7	50.2	2.43	2.44	14.2	14.3
L	10.2	10.1	4.92	4.99	24.4	24.3	53.4	56.9	2.56	2.33	13.4	13.4
M	10.0	9.71	5.09	5.07	24.4	25.8	52.1	50.6	2.52	2.44	13.3	13.5

a) Laboratory identification (In no particular order)

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Paired Grubbs test

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した分析値から算出^{15, 16)}した PFHxS 及び PFNA の平均値, 併行標準偏差 (s_r), 併行相対標準偏差 (RSD_r) 並びに室間再現標準偏差 (s_R) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を Table 7 に示した。なお, 平均値は報告値を元に有効数字 3 桁で示し, 標準偏差は IUPAC の共同試験プロトコルを参考に有効数字が 2 桁となるように四捨五入し, 相対標準偏差は肥料等試験法附属書 A の精度の許容範囲と比較するため小数点一位まで表示した。

PFHxS の平均値は 2.21 $\mu\text{g/kg}$ ~50.4 $\mu\text{g/kg}$ であり, その併行標準偏差 (s_r) は 0.082 $\mu\text{g/kg}$ ~1.2 $\mu\text{g/kg}$, 併行相対標準偏差 (RSD_r) は 2.1 %~3.7 %, 室間再現標準偏差 (s_R) は 0.22 $\mu\text{g/kg}$ ~1.8 $\mu\text{g/kg}$, 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.5 %~10.9 %であった。

PFNA の平均値は 2.46 $\mu\text{g/kg}$ ~50.6 $\mu\text{g/kg}$ であり, その併行標準偏差 (s_r) は 0.11 $\mu\text{g/kg}$ ~1.4 $\mu\text{g/kg}$, 併行相対標準偏差 (RSD_r) は 2.8 %~4.5 %, 室間再現標準偏差 (s_R) は 0.12 $\mu\text{g/kg}$ ~2.3 $\mu\text{g/kg}$, 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 4.5 %~6.2 %であった。

本共同試験の結果, PFHxS 及び PFNA について, いずれの併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) も, 肥料等試験法附属書 A の妥当性確認の順に示されている各濃度レベルにおける精度の許容範囲内であることから, 本法の精度は肥料等試験法の性能基準に適合していることを確認した。

Table 7 Statistical analysis of Collaborative study results for PFHxS and PFNA

Mesure compounds	Sample	Labs $p(q)^a$	Mean ^{b)} ($\mu\text{g/kg}$)	s_r^c ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_r^d (%)	$CRSD_r^e$ (%)	s_R^f ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_R^g (%)	$CRSD_R^h$ (%)
PFHxS ¹³ C ₃ -PFHxS	Sludge fertilizer 1	13(0)	10.2	0.29	2.8	11	0.52	5.1	22
	Sludge fertilizer 2	12(1)	5.17	0.16	3.1	11	0.47	9.0	22
	Sludge fertilizer 3	13(0)	25.3	0.80	3.1	11	1.3	5.2	22
	Sludge fertilizer 4	13(0)	50.4	1.2	2.3	11	1.8	3.5	22
	Sludge fertilizer 5	12(1)	2.21	0.082	3.7	11	0.24	10.9	22
	Liner+Branched chain	12(1)	4.49	0.095	2.1	11	0.22	5.0	22
PFNA ¹³ C ₉ -PFNA	Sludge fertilizer 1	13(0)	10.3	0.46	4.5	11	0.46	4.5	22
	Sludge fertilizer 2	13(0)	5.07	0.16	3.1	11	0.26	5.1	22
	Sludge fertilizer 3	13(0)	25.1	0.76	3.0	11	1.4	5.5	22
	Sludge fertilizer 4	13(0)	50.6	1.4	2.8	11	2.3	4.5	22
	Sludge fertilizer 5	11(2)	2.46	0.11	4.4	11	0.12	4.9	22
	Sludge fertilizer 6	12(1)	13.0	0.36	2.8	11	0.81	6.2	22

a) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier removed and (q)=number of outliers
(n =The number of laboratories(p) $\times$ The number of repetition(2))

b) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retain after outlier

c) Standard deviation of repeatability

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer (2025) Annex A

f) Standard deviation of reproducibility

g) Reproducibility relative standard deviation

h) Criteria of reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer (2025) Annex A

4. まとめ

LC-MS/MS を用いた汚泥肥料中の PFHxS 及び PFNA の分析法について, 国際的に標準とされている室間共同試験 (参加試験室数; 13, 配付試料 12 点 (6 種類 $\times$ 2 点)) による妥当性確認 (HCV: Harmonized

Collaborative Validation)を実施した。なお、共同試験用試料中の PFHxS 及び PFNA はそれぞれ分岐鎖を含めた含量として算出し、PFHxS は $^{13}\text{C}_3$ -PFHxS を、PFNA は $^{13}\text{C}_9$ -PFNA を内標準物質として用いた。

その結果、PFHxS は、平均値 $2.21\text{ }\mu\text{g/kg}$ ～ $50.4\text{ }\mu\text{g/kg}$ の範囲でその室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.5% ～ 10.9% であった。PFNA は、平均値 $2.46\text{ }\mu\text{g/kg}$ ～ $50.6\text{ }\mu\text{g/kg}$ の範囲でその室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 4.5% ～ 6.2% であった。共同試験結果の併行相対標準偏差 (RSD_I) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は、肥料等試験法附属書 A の妥当性確認の手順に示されている各濃度レベルにおける精度の許容範囲内であった。

本共同試験に用いた分析法は、単一試験室での妥当性を確認しており (SLV: Single Laboratory Validation)¹⁰⁾、さらに本報により室間共同試験での妥当性確認 (HCV) がされたことから、肥料等試験法における試験法分類 Type B (HCV 及び SLV の結果が肥料等試験法附属書 A の要求事項を満たした試験法) に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力いただきました、アジレント・テクノロジー株式会社 APAC テクニカルソリューション本部、一般財団法人東海技術センター、一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所、株式会社環境科学研究所、株式会社島津テクノリサーチ 環境事業部 分析研究センター、公益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、公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所、ジーエルサイエンス株式会社 カスタマーサポートセンター、地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所、中外テクノス株式会社 本部環境技術センター、内藤環境管理株式会社、三浦工業株式会社 三浦環境科学研究所 科学分析センターの各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部：PFOS 含有廃棄物の処理に関する技術的留意事項，1～2 (2011)
< <https://www.env.go.jp/recycle/misc/pfos/tptc.pdf> >
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構，経済産業省製造産業局化学物質管理課，厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課化学物質安全対策室：製品含有化学物質のリスク評価，ペルフルオロオクタン酸 (PFOA)，7～9 (2020)
< https://www.nite.go.jp/chem/risk/products_risk-PFOA_jp_full.pdf >
- 3) 環境省：PFOS, PFOA に関する Q&A 集 (2024 年 8 月時点)，1～5 (2024)
- 4) 環境省環境保険部リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 6 巻，[19] ペルフルオロオクタンスルホン酸及びその塩，2～3 (2008)
< <https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/pdf/chpt1/1-2-2-19.pdf> >
- 5) 環境省環境保険部リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 9 巻，[12] ペルフルオロオクタン酸及びその塩，2～3 (2011)
< <https://www.env.go.jp/chemi/report/h23-01/pdf/chpt1/1-2-2-12.pdf> >
- 6) 経済産業省：POPs 条約 < https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/int/pops.html >
- 7) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化審法データベース (第 1 種特定化学物質)

< https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/list6.action?category=211&request_locale=ja >

- 8) 環境省：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) 対象物質を化審法第一種特性化学物質に指定することについて (令和 7 年度第 3 回薬事審議会化学物質安全対策部会化学物質調査会 資料 1)

< <https://www.env.go.jp/content/000323032.pdf> >

- 9) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC)：肥料等試験法 (2025), 771~783

< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenhoh/25_8.7.a.pdf >

- 10) 眞鍋典子, 橋本良美：汚泥肥料中の PFHxS 及び PFNA を含む PFAS 13 物質の分析法開発, 肥料研究報告, 19, 19~40 (2026)

- 11) 白井裕治, 沼寄佳奈子, 秋元里乃：有機ふっ素化合物の分析, 肥料研究報告, **15**, 87~107 (2022)

< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/rrf/obj/rrf15-07.pdf> >

- 12) Thompson, M., L. R. Ellison S., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145~196 (2006)

- 13) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC)：肥料等試験法 (2025) 附属書 A

< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenhoh/shikenhoh_2025_fuzokusho_A.pdf >

- 14) Tomson, M., WOOD, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **65**(9), 2123~2144 (1993)

- 15) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)

- 16) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D : Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

**Development of Determination Method for PFHxS and PFNA in Sludge Fertilizer
by Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)
- Harmonized Collaborative Validation -**

MANABE Noriko¹ and HASHIMOTO Yoshimi²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Nagoya Regional Center

² FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department

Using an analytical method for PFOS and PFOA in sludge fertilizer developed in 2021, we conducted a collaborative study to evaluate the performance of the method for PFHxS and PFNA in sludge fertilizer. We sent six samples to each of the 13 collaborative testing laboratories, and they analyzed these samples as blind duplicate.

For PFHxS, the mean values and reproducibility relative standard deviation (RSD_R) were 2.21 µg/kg - 50.4 µg/kg and 3.5 % - 10.9 %, respectively. For PFNA, the mean values and RSD_R were 2.46 µg/kg - 50.6 µg/kg and 4.5% - 6.2%, respectively.

These results indicated that this method has an acceptable precision for the determination of PFHxS and PFNA in these concentration ranges. In conclusion, those results demonstrated the validity of the method for PFHxS and PFNA using LC-MS/MS.

Key words PFAS, PFHxS, PFNA, sludge fertilizer, LC-MS/MS

(Research Report of Fertilizer, **19**, 41-55, 2026)