

環境試料を想定したPFAS分析の固相抽出カラムの基礎評価

Basic study of solid-phase extraction columns for PFAS analysis in environmental samples cleanup

○ 高原玲華¹、陳杏玲¹、高柳学¹、石井一行¹、太田茂徳¹（¹ジーエルサイエンス株式会社）



はじめに

有機フッ素化合物であるPFAS (Per- and PolyfluoroAlkyl Substances) は、環境汚染物質として国内外で高い注目を集めている。多くの国で規制が設けられ、水道水や環境水だけでなく、土壌などの媒体における実態調査が積極的に行われている。環境水や土壌などの環境試料は、分析結果に影響を及ぼす可能性がある夾雑成分を含まれていることが多い。EPA Method 1633では、夾雑成分のクリーンアップ方法としてWAX固相抽出カラムと、dispersive Solid-Phase Extraction (d-SPE)法によるグラファイトカーボン(GCB)の使用が記されている。d-SPE法精製は採取や攪拌操作が煩雑であるため、GCB固相抽出カラムによる精製も記されている。今回、GCBを利用した環境試料のPFAS分析における前処理方法と夾雑成分のクリーンアップ方法に関する基礎評価を行ったので報告する。

評価内容

本検討では、大きく分けて2項目について評価を行った。

- 検討1、クリーンアップ用固相抽出カラムの評価
- 検討2、クリーンアップ操作の効率化のための積層固相の評価

使用した固相抽出カラムは以下のとおりである。（*印以外は、GL Sciences社製）

- 検討1：GCB固相抽出カラムは以下 4 種類を用意した
InertSep GC：① 50 mg/6 mL、② 100 mg/3 mL、③ 250 mg/3 mL、④ 300 mg/6 mL
- 検討2：GCBをWAXカラムに積層させたときのクリーンアップ効果を確認するため以下2種類の固相抽出カラムを用意した。
弱陰イオン交換ミックスモード固相：InertSep WAX FF (150 mg/6 mL)
弱陰イオン交換ミックスモード/GCB積層固相：InertSep WAX FF/GCB (200 mg/50 mg/6 mL)

固相抽出操作には、自動固相通水装置のアクアローダー AL898とPFAS用自然落下ラックを使用した。
精製水は、PFOS、PFOA分析用超純水（GL Sciences Inc.）、メタノールは、残留農薬、PCB用（関東化学製）を使用した。
測定対象成分のPFASは、Native 40成分とLabeled 24成分の合計64成分とし、Cambridge Isotope Laboratories社製、Wellington Laboratories社製およびAccuStandard社製の標準試薬を使用した。

分析方法

使用した分析機器、LCカラムと分析条件をTable 1に、各成分のトランジション条件をTable 2に示した。LCシステムや移動相からの汚染によるバックグラウンドの影響を低減するために、高純度活性化度ビーズを充填したディレイカラムである、Delay Column for PFAS (GL Sciences Inc.)をインジェクターとポンプの間に接続した。

Table 1 : LC-MS/MS Conditions									
HPLC System	Exion (SCIEX)					MS/MS System	QTRAP 6500+ (SCIEX)		
Column	InertSustain AQ-C18 3 μm 2.1×150 mm (GL Sciences Inc.)					Ion Source	ESI		
Delay Column	Delay Column for PFAS 3.0×30 mm (GL Sciences Inc.)					Mode	SMRM		
Mobile Phase (A)	2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution / Methanol = 90:10					Polarity	Negative		
Mobile Phase (B)	Methanol					Temp.	300 °C		
Gradient	Time (min)	0	3.0	15.0	20.0	20.1	27.0	CUR	35
	A %	90	50	0	0	90	90	CAD	12
	B %	10	50	100	100	10	10	IS	-4500
Flow Rate	0.22 mL/min	Column Temp.			40 °C		Ion Source gas1		40
Injection Volume	2 μL	Sample Cooler			10 °C		Ion Source gas2		70

Table 2 : MRM Transition for PFAS Native 40 and Labeled 24 compounds																	
No.	Compound	R.T.(min)	Transition 1			Transition 2			No.	Compound	R.T.(min)	Transition 1			Transition 2		
1	PFPA	3.51	163	119	-16				22	8:2 FTUCA	16.9	457	393	-18	457	343	-52
E-1	¹³ C ₉ PFBA	6.51	217	172	-14	E-12	¹³ C ₈ :8:2 FTUCA	16.9	459	394	-18						
2	PFBA	6.52	213	169	-14	23	¹³ C ₈ PF2KNS	17.2	531	351	-40	531	83	-56			
3	PFPHS	7.34	249	80	-52	24	8:2 FTS	17.6	527	507	-40	527	83	-82			
4	PFHBA	7.57	229	85	-16	25	¹³ C ₈ :8:2 FTS	17.6	529	509	-40						
E-2	¹³ C ₉ PFPA	9.29	268	223	-12	25	PFDA	17.6	513	469	-19	513	219	-27			
5	PFPAa	9.31	263	219	-11	E-14	¹³ C ₉ PFDA	17.6	519	474	-16						
E-3	¹³ C ₉ PFBS	9.79	302	80	-64	26	NMeFOSAA	18.1	570	419	-28	570	483	-22			
6	PFBS	9.82	299	80	-59	E-15	¹³ C ₉ NMeFOSAA	18.1	573	419	-28						
7	PFMPA	10.1	279	85	-14	27	PFDS	18.5	599	80	-94	599	299	-91			
8	PFPEAA	10.8	315	135	-30	28	PFUHA	18.6	563	519	-19	563	269	-28			
9	NFBA	11.4	295	201	-12	E-16	¹³ C ₉ PFUHA	18.6	570	525	-16						
10	8:2 FTS	11.5	327	307	-28	29	PFDA	18.6	498	78	-85	498	169	-40			
11	PFPAH	11.7	313	269	-15	E-17	¹³ C ₉ PFUHA	18.6	506	78	-85						
E-4	¹³ C ₉ PFPAH	11.7	318	273	-14	30	NMeFOSA	18.7	584	419	-28	584	526	-22			
12	PFPHS	12	349	80	-88	31	10:2 FTUCA	18.7	589	419	-28						
E-5	¹³ C ₉ HPFOA	12.3	332	185	-32	E-18	¹³ C ₉ NMeFOSA	18.7	597	420	-28	597	243	-52			
13	HPFOA	12.4	329	169	-16	32	11Cl-PF3KOUS	19.2	631	451	-40	631	83	-90			
14	PFPA	13.7	363	319	-14	33	PFDOA	19.8	613	569	-17	613	269	-29			
E-6	¹³ C ₉ PFPAH	13.7	367	322	-14	E-19	¹³ C ₉ PFDOA	19.8	615	570	-18						
15	PFPHS	13.8	399	80	-80	34	PFUHA	20.8	663	619	-19	663	269	-32			
E-7	¹³ C ₉ PFPHS	13.8	402	80	-84	35	NMeFOSA	21	517	169	-37	517	219	-34			
16	ADONA	13.9	377	251	-14	E-20	¹³ C ₉ NMeFOSA	21	515	169	-37						
17	8:2 FTS	15.1	427	407	-32	37	NMeFOSA	21.2	713	669	-19	713	319	-36			
E-8	¹³ C ₉ :8:2 FTS	15.1	429	81	-72	E-21	¹³ C ₉ PFUHA	21.2	715	670	-20						
18	PFDA	15.2	413	369	-14	E-22	¹³ C ₉ NMeFOSA	21.3	531	169	-37						
E-9	¹³ C ₉ PFDA	15.2	421	376	-14	38	NMeFOSA	21.4	526	169	-37	526	219	-34			
19	PFPHS	15.3	449	80	-104	39	PFHDA	21.7	813	769	-20	813	319	-34			
20	PFOS	16.5	499	80	-97	E-23	¹³ C ₉ PFHDA	21.7	815	770	-24						
E-10	¹³ C ₉ PFOS	16.5	507	80	-86	E-24	¹³ C ₉ :8:2 PFAP	21.8	993	97	-112						
21	PFNA	16.5	463	419	-16		8:2 PFAP	21.9	989	969	-54	989	543	-35			
E-11	¹³ C ₉ PFNA	16.5	472	427	-16		PFDOA	22	913	869	-20	913	369	-40			

検討内容と結果

検討1：クリーンアップを想定したGCB固相抽出カラムの評価

(1) 充填量の異なるGCB固相抽出カラムの溶出挙動確認

検討内容：0.1%アンモニアメタノールとメタノールでコンディショニングを行った充填量の異なるGCB固相抽出カラムにメタノールで調製したPFAS40成分の標準試料を1 mL固相に負荷し、メタノールで1 mLずつ3回、その後0.1%アンモニアメタノールで1 mLずつ3回溶出操作を行い、試験管に採取した溶出液をそれぞれLC-MS/MSで分析した。

検討結果：各グラファイトカーボンポリマークリーンアップ用固相抽出カラムの溶出結果をFig.1に示す。InertSep GCの50 mg/6 mLおよび100 mg/3 mLでは、ほとんどの成分がメタノールで溶出できていることが確認できたが、PFOSは回収率が低い傾向が見られた。InertSep GCの250 mg/3 mL及び300 mg/6 mLでは、PFHDAとPFOSの回収が10%程度であった。

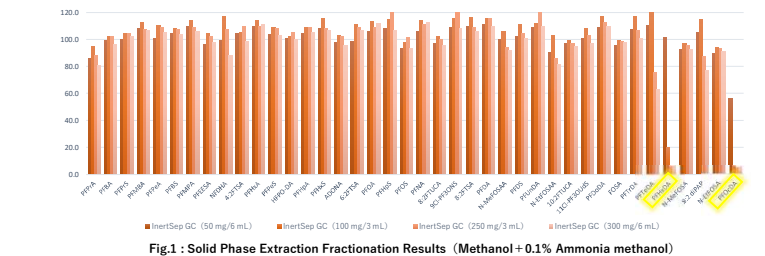


Fig.1: Solid Phase Extraction Fractionation Results (Methanol+0.1% Ammonia methanol)

(2) クリーンアップ用固相抽出カラムを用いた環境模擬試料における、色素除去および夾雑成分による分析影響の確認

検討内容：腐菜土50 gに精製水500 mLを入れて振とう抽出を行った。その後、Fig.2の手順で前処理操作を行い環境模擬抽出液を作製した。5種類のGCB固相抽出カラムに0.1%アンモニアメタノールとメタノールでコンディショニングし、模擬抽出液を1 mL負荷した。追加溶出としてメタノール3 mLと0.1%アンモニアメタノール3 mLで溶出、クリーンアップされた処理液を1 mLに濃縮し色素除去効果を確認した。

検討結果：使用したすべてのクリーンアップ用GCB用固相で、サンプル由来の色素が除去できていることが確認できた (Fig. 3)。



Fig. 3: Cleanup Efficiency of Environmental Simulated Sample Using Different GCB Solid-Phase Extraction Columns

検討2：WAXカラムとGCBを積層させたときのクリーンアップ効果の確認

WAXによる濃縮精製とクリーンアップ操作を同時に行うことで、前処理の効率化を上げるために、弱陰イオン交換ミックスモードとグラファイトカーボンを積層した固相抽出カラムInertSep WAX FF/GCB (200 mg/50 mg/6 mL)を準備した。次の3項目について検討を行った。

(1) InertSep WAX FF/GCBの溶出挙動の確認

検討内容：0.1%アンモニアメタノールとメタノールでコンディショニングしたInertSep WAX FF/GCBにメタノールで調製したPFAS40成分の標準試料を1 mL固相に負荷。1%アンモニアメタノールで1 mLずつ10回溶出し、試験管に採取した溶出液をそれぞれLC-MS/MSで分析した。

検討結果：溶出成分を合計した総回収率結果をFig. 4に示す。すべての成分で3分画目でほぼ回収できていることが確認できた。

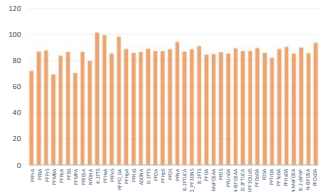


Fig. 4: Solid Phase Extraction Fractionation Results Using InertSep WAX FF/GCB

(2) InertSep WAX FF/GCBとInertSep WAX FFの添加回収試験比較

検討内容：精製水にPFAS40成分の混合標準試料及び24成分の内部標準混合試料を添加して5 ng/Lに調整した試料を用いて、InertSep WAX FF/GCBおよびInertSep WAX FFをFig.2と同様の手順で添加回収試験を行い、比較した。

検討結果：精製水によるWAXとWAX/GCBの添加回収試験結果をFig. 5に示す。InertSep WAX FFでは、PFOS以外成分は70%以上の回収率が得られた。InertSep WAX FF/GCBでは、PFOS以外成分にも10:2FTUCAの回収率が70%未満であった。炭素鎖が長いPFASに低回収の傾向が見られたため、溶出条件の最適化が必要と考えられた。

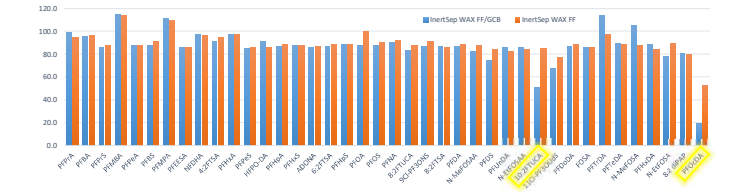


Fig.5: Results of PFAS Spike Recovery Test Using Purified Water and Comparison of InertSep WAX FF/GCB and InertSep WAX FF

(3) InertSep WAX FF/GCBとInertSep WAX FFの環境模擬試料を用いた精製効果の比較

検討内容：「検討1」と同様、腐菜土50 gに精製水500 mLを用いて環境模擬試料を作製し、InertSep WAX FF/GCBおよびInertSep WAX FFをFig.2の手順で前処理操作を行った。得られた抽出液にPFAS40成分の混合標準試料を添加し、それぞれLC-MS/MSで分析を行い、夾雑成分によるマトリックス影響について確認を行った。

検討結果：得られた結果をFig.6に示す。InertSep WAX FF/GCBおよびInertSep WAX FFで比較したところ、マトリックスによる測定値への影響は確認できなかった。ただ、GCBを通す事で色素の除去が可能であったため、カラムやシステムに対する負荷は低減されていると考えられる。

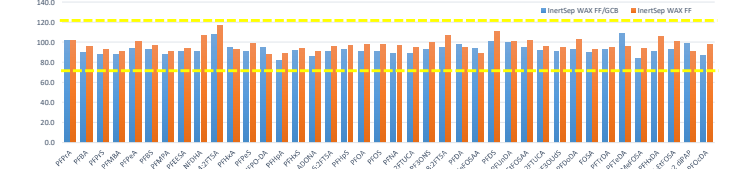


Fig.6: Comparison of Matrix Effects on PFAS Using Environmental Simulated Samples: Differences Between InertSep WAX FF/GCB and InertSep WAX FF

結論

- ✓ GCB固相抽出カラムを用いたクリーンアップを行うことで、簡易に環境試料の色素を除去することができた。
- ✓ GCBにおいては、炭素鎖の多いPFASについてはGCBに対する吸着性が高く、溶出条件の検討が必要と考えられた。
- ✓ InertSep WAX FF/GCB積層カラムを用いることで、環境試料の濃縮とクリーンアップ操作の同時処理が可能となった

謝辞

本検討を実施するにあたり、標準試薬を提供して頂いた大塚製薬株式会社の藤峰様、渋谷様に深く感謝いたします。

参考文献

U.S. EPA Method 1633 : Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Aqueous, Solid, Biosolids, and Tissue Samples by LC-MS/MS