

パーフルオロオクタンスルホン酸塩(P F O S)

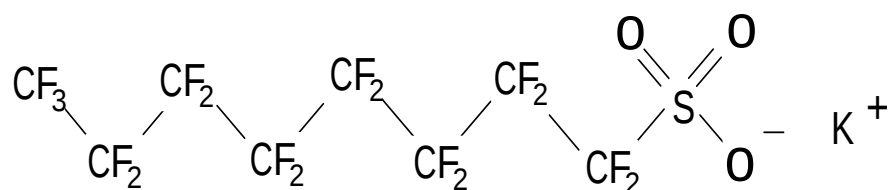
パーフルオロオクタン酸塩(P F O A)

構 造 式

1. パーフルオロオクタンスルホン酸 (P F O S)

Perfluorooctane Sulfonate, Heptadecafluorooctanesulfonate

CAS No. : 2795-39-3 (Potassium Salt)



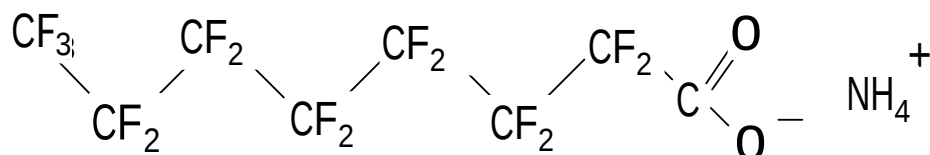
化学式 : $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{SO}_3^-$

分子量 : 498.93 (PFOS-イオン)

2. パーフルオロオクタン酸塩 (P F O A)

Perfluorooctanoate, Pentadecafluorooctanoate,

CAS No. : 3825-26-1 (Ammonium Salt)



化学式 : $\text{C}_8\text{F}_{15}\text{O}_2^-$

分子量 : 412.96 (PFOA-イオン)

物理化学的性状及び用途

物質名	融点	水溶解度(mg/L)	用 途
PFOS (K ⁺ salt)	>=400	570(24-25)	コーティング剤・界面活性剤・難燃剤
PFOA (NH ₄ ⁺ salt)	130 (Sub)	20000 gels	フッ化ポリマー(テフロン)の製造 コーティング剤・界面活性剤

検出情報

物質名	試料	実施年度	検出範囲	検出頻度	検出下限値
PFOS	魚・血液	2000-2002	2 ~ 489 ng/mL	20/20	1 ng/g 2-10 ng/g
	魚・肝臓	2000-2002	37 ~ 558 ng/g		
	野生生物				
	血漿	1990-2001	<1 ~ 2220 ng/mL		
	肝臓	1990-2001	<2-10 ~ 4800 ng/g		
	人・血清	1998-2000	4.9 ~ 96.7 ng/mL		
	海水	2000-2002	8 ~ 59 ng/L		
	水質	2002	24 ng/L(最大検出濃度)		0.04 ng/L
PFOA	野生生物			20/20	0.04 ng/L
	血液	1991-2000	1.3 ~ 48.9 ng/mL		
	肝臓	1991-2000	7.5 ~ 444 ng/g		
	人・血清	2000	1.9 ~ 52.3 ng/mL		
	水質		100 ng/L(最大検出濃度)		

§ 1 分析法

(1) 分析法の概要

イオンペア-溶媒抽出法により抽出し、液・液抽出用ケイソウ土カラムで脱脂後、固相抽出カートリッジ(逆相及び陽イオン交換)にて精製し、LC/MS/MS で定量する。

(2) 試薬・器具

〔 試 薬 〕

PFOS標準品：ヘプタフルオロオクタンスルホン酸カリウム塩($C_8F_{17}SO_3K$, Fluka)

PFOA標準品：ペンタフルオロオktan酸アンモニウム塩($C_7F_{15}COONH_4$, Fluka)

アセトニトリル：HPLC 用(和光純薬工業製)

SEP-PAK AC-2 を通過させたものを使用。(注 1)

メタノール：HPLC 用(和光純薬工業製)

t-ブチルメチルエーテル：有機精密分析用(Merck, スパラルブ)または相当品

SEP-PAK AC-2 を通過させたものを使用。(注 1)

ヘキサン：残留農薬試験用

アセトン：電子工業用(EL アセトン, 関東化学)

硫酸ナトリウム(無水)：PCB 分析用(関東化学)

炭酸ナトリウム(無水)：試薬特級(シグマアルドリッチ)

炭酸水素ナトリウム：試薬特級(シグマアルドリッチ)

酢酸アンモニウム：試薬特級(シグマアルドリッチ)

水酸化ナトリウム：試薬特級(シグマアルドリッチ)

0.2 mol/L 炭酸緩衝液(pH 10)：0.2 mol/L 炭酸ナトリウム溶液(10.6 g を精製水 500 ml に溶解) 100 ml と 0.2 mol/L 炭酸水素ナトリウム(8.4 g を精製水 500 ml に溶解) 90 ml を混合し、精製水 200 ml を加えたもの

0.04 mol/L 炭酸緩衝液：0.2 mol/L 炭酸緩衝液を精製水で 50 倍希釈

硫酸水素テトラブチルアンモニウム：和光特級(和光純薬工業)

0.1 mol/L TBA 溶液：硫酸水素テトラブチルアンモニウム 6.8 g を精製水 200 ml に溶解後，2mol/L 水酸化ナトリウム溶液約 10 ml で pH 10 としたもの

精製水：超純水製造装置(ミリポア製 Milli Q Plus)で調製した水を OASIS HLB を通過させたもの(注 1)

固相抽出逆相カートリッジ：OASIS™ HLB 200 mg (Waters)

固相抽出イオン交換カートリッジ：OASIS™ MCX 60 mg (Waters)

液・液抽出用ケイソウ土カラム：Chem Elute 5 ml (Varian)

水系クロマトディスク(ジーエルサイエンス，25A)

〔試薬の安全性・毒性〕

硫酸水素テトラブチルアンモニウム：急性経口毒性がある。LD50:555mg/kg(マウス)

アセトニトリル：吸入したとき、皮膚に触れるとき及び飲み込んだとき有害である。

水酸化ナトリウム：皮膚に触れると有害である。眼に入ると失明することがある。

〔器 具〕(注 2)

ロータリーエバポレ - ター

遠心分離機，振とう機

ホモジナイザー(日本精機株式会社 バイオミキサーBM-2)

固相抽出装置(マニホールド，アスピレ - ター)

三角フラスコ(100 ml)，濃縮用試験管(10 ml)

ナス形フラスコ(100 ml，200 ml)

遠心管(200 ml)

パスツールピペット

メスフラスコ(100 ml，50 ml，20 ml)，ホールピペット類

(3) 分析法

【試料の採取及び採取試料の保存】

環境庁「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。

採取用容器は EL アセトンまたは HPLC 用メタノールで洗浄したガラス瓶，あるいはポリエチレン製の瓶を使用する。栓の密封にテフロンシールは用いない。

対象物質は安定であるため，通常に冷凍保存する。

【試料の前処理及び試料液の調製】

試料 5 g を共栓付遠心管にとり，0.2 mol/L 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH 10，以下「炭酸緩衝液」とする。) 25 ml 及び 0.1 mol/L テトラブチルアンモニウム塩溶液(以下「TBA 溶液」とする。) 5 ml を加え，ホモジナイザーで 2 分間攪

拌する。t-ブチルメチルエーテル (以下「MTBE」とする。)80 ml を加え 10 分間振とう抽出し、遠心分離(2500rpm, 5 分)(注 3)を行う。上層をパスツールピペットで 100 ml 用三角フラスコに分取する。下層に MTBE 40 ml を加え軽く振とう後、同様に遠心分離及び分取の操作を行う。分取した MTBE 溶液に無水硫酸ナトリウム約 10 g を加え振り混ぜて 10 分間放置し、脱水を行う。脱脂綿を詰めたロートでろ過し、200 ml 容ナス形フラスコに受ける。ろ液を 40℃以下で減圧濃縮(注 4)し、窒素ガスを通じて乾固させ、残留物をヘキサン 8 ml に溶解する。

ヘキサン溶液 4 ml を分取し、液・液抽出用ケイソウ土カラム(ケムエルート 5 ml)に負荷し、5 分間放置する。アスピレ-ターで 20 分間吸引しヘキサンを除去した(注 5)後、5%含水アセトニトリル 20 ml で PFOS 及び PFOA を溶出させる(注 6)。溶出液を 50 ml 容ナス形フラスコにとり、40℃以下で減圧濃縮後(注 7)、窒素ガスで乾固させる。

残留物に 0.004 mol/L 炭酸緩衝液 5 ml を加え、超音波で十分に分散させた後、あらかじめアセトニトリル 5 ml、精製水 5 ml の順に洗浄した固相抽出カートリッジ(OASIS HLB)にパスツールピペットを用いて負荷する。自然落下させ、ナスフラスコを 0.004 mol/L 炭酸緩衝液 5 ml で洗い負荷する。落下後、精製水 5 ml でカートリッジを洗浄する。カートリッジ内の間隙水をアスピレ-ターで約 20 分間吸引して(注 8)除いた後、OASIS HLB 下部に OASIS MCX を接続し、アセトニトリル 10 ml で PFOS 及び PFOA を溶出させる(注 9)。溶出液を 50 ml 容ナス形フラスコにとり、40℃以下で減圧濃縮後、窒素ガスで乾固させる。

残留物をメタノール - 水の混液(1:1) 1 ml(注 10)に溶解し、HPLC 用前処理フィルター (水系クロマトディスク(注 11)でオートサンプラー用バイヤル(注 12)にろ過し、試験溶液とする。

【空試験液の調製】

試料を用いずに【試料の前処理及び試料液の調製】の項に従って操作し得られた液を空試験液とする。

【標準液の調製】

〔標準原液の調製〕

PFOS 標準品 107.9 mg 及び PFOA 標準品 104.4 mg(PFOS または PFOA として 100 mg)をそれぞれ(注 13)はかりとり、メタノールに溶解し 100 ml 定容(1 mg/ml)とし標準原液とする。

〔混合標準溶液の調製〕

各標準原液をメタノール及び水の混液(1:1)を用いて希釈し、0.05 ~ 20 ng/ml の混合標準溶液を調製する。

【試料液の保存・安定性】

〔標準物質の保存〕

室温でも，長時間安定である。

〔試料液の保存〕

冷蔵保存で，一週間安定である。

【測定】

〔高速液体クロマトグラフ - 質量分析計(LC/MS/MS)操作条件〕

HPLC 部

機種：Agilent 1100 Series

カラム：Capcel Pak C₁₈ MG- ，5 μ m， ϕ 2.0mm×150mm (注 14)

移動相：A 液；0.01 mol/L 酢酸アンモニウム，B 液；アセトリル (注 15)

0～10 min 60：40 (定流量)

10～15 min 60：40 → 10：90 (グラジエント)

15～20 min 10：90 (定流量)

20～25 min 10：90 → 60：40 (グラジエント)

25～35 min 60：40 (定流量)

流量：0.2 ml/min

カラム槽温度：40

注入量：5 μ l (注 16)

MS 部(注 17)

機種：Applied Biosystems API4000

イオン化法：ESI(ネガティブ)

ネブライザーガス：60 psig

カーテンガス：30 psig

コリジョンガス：6 psig

プローブ温度：400

イオンスプレー電圧：-4500 V

ドリフト電圧：-90 V(PFOS)，-35 V(PFOA)

コリジョン電圧：-82 V(PFOS；498.9→80.0)，-74 V(PFOS；498.9→98.8)

-14 V(PFOA；412.9→368.8)，-26 V(PFOA；412.9→168.9)

設定質量数(M/Z)：PFOS 498.9→80.0(定量用)，498.9→98.88(確認用)

PFOA 412.9→168.9(定量用)，412.9→368.8 (確認用)

〔検量線〕

混合標準溶液の 5 μ l を LC/MS/MS に注入し，ピーク面積と PFOS 及び PFOA 重量から検量線を作成する。

〔定量及び濃度の算出〕(注 18)

測定用試料液 5 μ l を LC-MS/MS に注入し 検量線から検出量を求め，以下の式により，

試験溶液からの濃度を算出し、同時に行った操作ブランク値を差し引いて、試料中の濃度を算出する。

$$\text{試験溶液からの濃度} \quad (\mu\text{g/kg}) = \frac{\text{検出量}(\text{pg})}{\text{注入量}(\mu\text{l})} \times \frac{8 \text{ ml (中間定容)}}{4 \text{ ml (分取)}} \times \frac{\text{最終液量}(1 \text{ ml})}{\text{試料量}(5 \text{ g})}$$

$$\text{試料中の濃度} \quad (\mu\text{g/kg}) = \text{試験溶液からの濃度} \quad (\mu\text{g/kg}) - \text{操作ブランクの試料換算濃度} \quad (\mu\text{g/kg})$$

〔装置検出下限及び装置定量下限〕

本分析法での PFOS 及び PFOA の装置検出下限(IDL) 及び装置定量下限(IQL)を表- 1 に示し、クロマトグラムを図-1 に示した。装置検出下限(IDL)は標準溶液を 7 回繰り返し測定し、次式により求めた。

$$\text{装置検出下限(IDL)} = 3 \times \text{Sd} , \text{装置定量下限(IQL)} = 10 \times \text{Sd}$$

Sd：標準偏差

表-1 PFOS 及び PFOA の装置検出下限(IDL) 及び装置定量下限(IQL)

化合物		PFOS	PFOA
試料量 (g)		5	5
最終液量 (ml)		2	2
標準溶液濃度 (ng/ml)		0.025	0.05
装置注入量 (μl)		5	5
測定値 (ng/ml)	1 回目	0.0310	0.0384
	2 回目	0.0332	0.0494
	3 回目	0.0334	0.0438
	4 回目	0.0322	0.0400
	5 回目	0.0332	0.0462
	6 回目	0.0322	0.0400
	7 回目	0.0348	0.0440
平均値(pg)		0.0329	0.0431
標準偏差		0.0012	0.0039
IDL(ng/ml)		0.0036	0.012
IQL(ng/ml)		0.012	0.039
IDL 試料換算濃度(μg/kg)		0.00144	0.0048
変動係数(%)		3.65	9.08

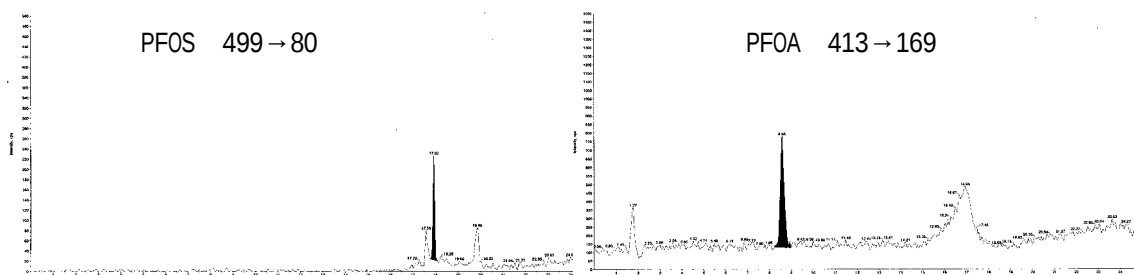


図-1 IDL の MRM クロマトグラム

〔分析法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)〕

本分析法での PFOS 及び PFOA の検出下限及び定量下限を表-2 に示した。

予想される検出下限濃度付近で添加回収試験を繰り返し行い、次式により検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)を求めた。

$$\text{分析法の検出下限(MDL)} = t(n-1, \alpha) \times Sd$$

$$\text{分析法の定量下限(MQL)} = 10 \times Sd$$

α : 危険率

$t(n-1, \alpha)$: 自由度 $n - 1$, $\alpha=0.01$ における t 値(2.821)

Sd : 標準偏差

表-2 PFOS 及び PFOA の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)

化合物		PFOS			PFOA		
試 料		ブランク	無添加	添加	ブランク	無添加	添加
測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1 回目	0.0143	0.114	0.206	0.0763	0.184	0.265
	2 回目	0.0132	0.0826	0.193	0.0960	0.125	0.274
	3 回目	0.0170	0.0892	0.194	0.0751	0.148	0.270
	4 回目	0.0142	0.0854	0.200	0.0828	0.146	0.250
	5 回目	0.0159	0.0950	0.184	0.0842	0.133	0.241
	6 回目	0.0148	0.118	0.169	0.0740	0.187	0.235
	7 回目	0.0146	0.0879	0.169	0.0773	0.153	0.195
	8 回目	0.0104	0.0847	0.164	0.0581	0.122	0.204
	9 回目	0.0117	0.0878	0.187	0.0762	0.145	0.206
	10 回目	0.0096	0.0973	0.172	0.0806	0.161	0.192
平均値($\mu\text{g}/\text{kg}$)		0.0136	0.0952	0.186	0.0781	0.150	0.233
標準偏差		0.0022	0.0116	0.0130	0.0091	0.0210	0.0302
MDL($\mu\text{g}/\text{kg}$)		0.0062	0.033	0.037	0.026	0.059	0.085
MQL($\mu\text{g}/\text{kg}$)		0.022	0.116	0.130	0.091	0.21	0.30
変動係数		16.5 %	12.3 %	7.0 %	11.6 %	13.4 %	11.2 %

ブランク ; 全操作ブランク

無添加 ; 無添加(スズキ)試料の分析結果

添加 ; 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (試料 5 g に 0.0005 μg 添加) して試験。

表-2 の結果より，無添加の結果を検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)とし，表-3 に示した。

表-3 検出下限及び定量下限 単位； $\mu\text{g/kg}$ (注 19)

媒体	物質名	検出下限(MDL)	定量下限(MQL)
生物試料	PFOS	0.033	0.12
	PFOA	0.059	0.21

(4) 注 解

- 1) MTBE は AC-2 を通過させたものを用いる。PFOA は除去されるが，精製時 PFOS が混入する場合がある。また，精製後長期間放置すると，汚染する可能性があるため，溶媒類は極力用事調製とする。特に，ピペット類を頻繁に挿入するものには注意する。なお，特級又は残農用は汚染されているものがあるため，使用しない。HPLC 用，有機精密分析用(メルク)など，汚染の少ない試薬を精製して使用する。ヘキサンは，残農用でも汚染は認められない。
また，使用する AC-2 は精製する溶媒約 500 ml ごとに交換する。水の精製に使用する OASIS HLB も 500 ml を交換の目安とする。
- 2) 使用するガラス器具は，使用前に必ずメタノール(HPLC 用)または EL アセトンで洗浄して使用する。メタノールは蒸発しにくく乾燥中にブランクを吸収する可能性があるため，揮散しやすい EL アセトンが推奨される。また，ピペット類も同様に洗浄し，駒込ピペット等は使用前共洗いするほうがよい。
パストゥールピペットは使い捨てとする。
- 3) エマルジョンを生成し，有機溶媒層(上層)が十分分取できないときは，MTBE の液量を増やす。
- 4) 溶媒を完全に乾固させると PFOS の回収率が低下するため，1 ml 程度まで濃縮する。
- 5) 完全にヘキサンを除去しないと，回収率が悪くなる。また気中からの汚染を避けるような処置をする。すなわち，可能なら上部にフィルターを設置する，あるいは簡易ドラフト内で吸引するなどを行う。また，このカートリッジカラムのハウジングはポリプロピレン製であるため問題ないが，ガラス製のものはテフロンフリットを用いている場合がある。
- 6) 溶出液が落ちない場合は，カラム上部を手のひら等でふさいで加圧する。
- 7) ロータリーエバポレーターで濃縮する場合，突沸することがあるため，可能であれば圧力を制御して操作する。
- 8) カートリッジ内の水分を極力除去しておかないと回収率にバラツキが出る。この場合も注 5)と同様に汚染に対する配慮が必要である。
- 9) 最初は溶出液が落ちてこないため，スポイド(5 ml 駒込ピペット用)でカラム上部から加圧して 2～3 滴落とし，空気を抜き自然落下するようになった後接続する。
なお，OASIS MCX は使用前，アセトニトリル 3 ml で洗浄しておく。

- 10) メタノール - 水(1:1)は、使用前必ずブランクが検出しないことを確認する。標準溶液 0.025ng/ml の PFOA レスポンスの 1/2 以下を指標とする。
- 11) 非水系フィルターはテフロンを含有しブランクの原因となるため、必ず水系のものを用いる。フィルターの材質を確認して使用する。
- 12) バイアルのセプタムは、テフロン(PTFE)仕様が多いため、可能ならポリエチレンの一体型キャップを使用する。トムシック社の黄色キャップや、Agilent 純正でポリプロピレンバイアルとポリエチレンキャップのセットが使用可能である。簡易的には、セプタムとしてアルミ箔を使用する。
- なお、このポリエチレンセプタムを使用すると、Agilent 社のオートサンプラー (G1367A)では、ニードルシートのライン(注入口ポートと六方バルブを結ぶ配管)が詰まり易い。急激な圧力上昇によりポンプが止まる。この場合、配管をニードルシートごと取りはずし、ポンプに接続し逆洗浄することにより容易に回復する。
- 13) PFOS 及び PFOA を遊離のイオンとして標準溶液濃度を調製する。塩とイオンの関係は次式の通りである。

$$\frac{\text{PFOS 加塩の分子量}}{\text{PFOS}^- \text{ の分子量}} = \frac{538.22}{498.93} = 1.079$$

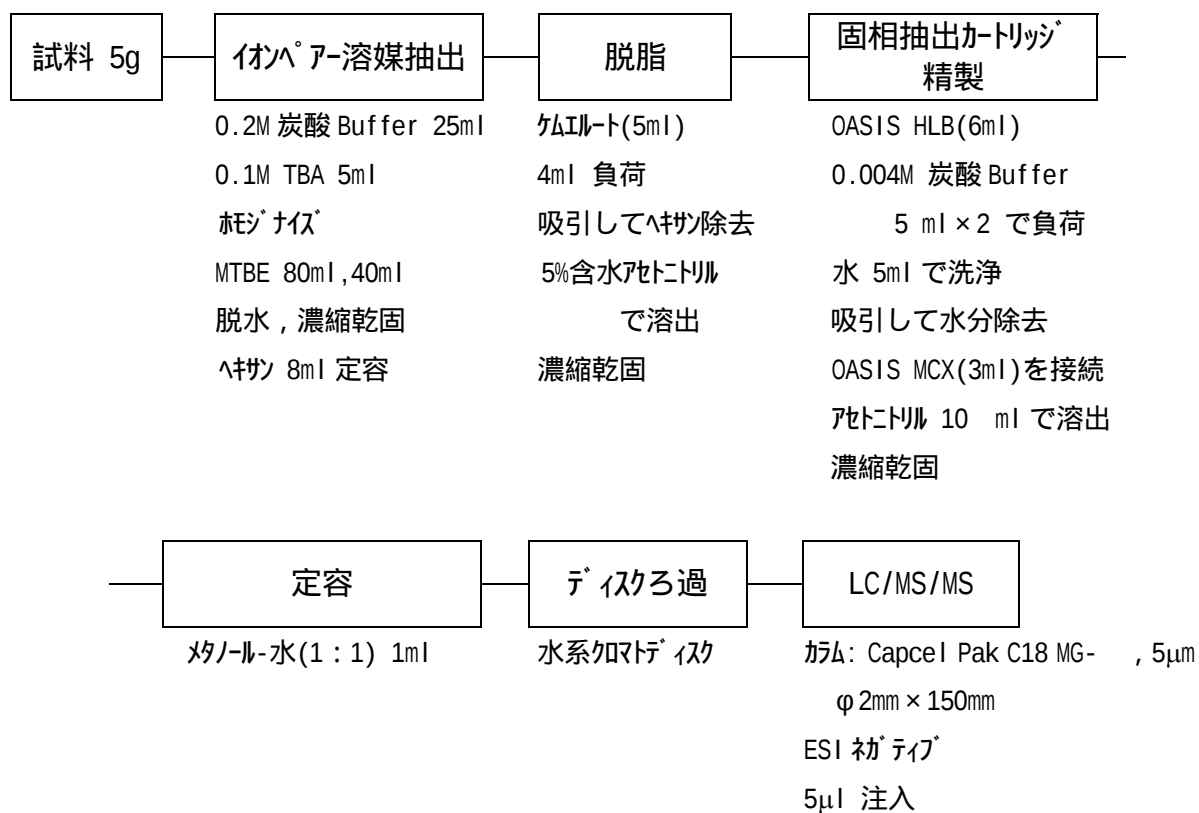
$$\frac{\text{PFOA アンモニウム塩の分子量}}{\text{PFOA}^- \text{ の分子量}} = \frac{431.10}{412.96} = 1.044$$

- 14) HPLC カラムは、Mightysil RP-18、ZORBAX Eclipse XDB-C18 等でもよい。
- 15) 移動相組成によっては、PFOS のピーク形状が悪くなることがある。溶媒リッチなほうがピークがシャープになる。本法では異性体を分離させる条件とした。
- 16) オートサンプラーから PFOA のブランクピークを検出することがある。Agilent 社の Flush Port 注入は、溶媒のラインがテフロンのため使用しないほうがよい。必要なら Wash Bial を使用する。また、Agilent 社のオートサンプラー (G1367A) の 100 サンプルトレイは純正のバイアル以外では注入エラーを生じやすい。
- 17) PFOS 及び PFOA の同時分析を考慮しているため、ガス流量、プローブ温度等は、必ずしも最適条件ではない。以下に異なる主なパラメータの最適条件を示す。
- ・PFOS: カテンガス 20psi、プローブ温度 700
 - ・PFOA: カテンガス 40psi、プローブ温度 400
- 18) 試料分析と並行してブランク試験を N=2 以上で行い、平均値を差引いて定量値とする。PFOS の操作ブランクが表-2 の基礎ブランク値を大きく上回る可能性は薄いですが、PFOA はかなり注意しないと高いブランク値となる。あらかじめ基礎ブランク値を求めておき、日常ブランク値が基礎ブランク値の ± 50% の場合は再試験が必要となる。
- 19) 検量線の安定して検出可能な最低濃度は、PFOS; 0.05 ng/ml、PFOA; 0.1 ng/ml であり、このときの試料中濃度の PFOS; 0.02 µg/kg、PFOA; 0.04 µg/kg を仮に目標検出下限とすると、ブランクは PFOS が目標検出下限の 2 倍以下、PFOA が 2-5 倍の範囲となる。目標検出下限の 5 倍濃度添加試験で MDL を求めるというマニュアル案から、ほぼ目標検出下限の 5 倍濃度に相当する無添加試料から求めたものを採用した。

§ 2 解 説

【 分析法 】

[分析法フローチャート]



[分析法の検討]

1 . 検量線

検量線は, 0.05 ~ 10 ng/ml の範囲で PFOS , PFOA とともに直線性(相関係数 0.999 以上)を示した (図-2 ~ 図-5)。

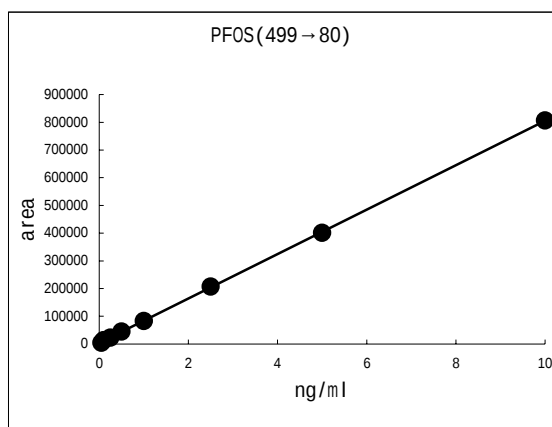


図-2 PFOS(499→80)の検量線

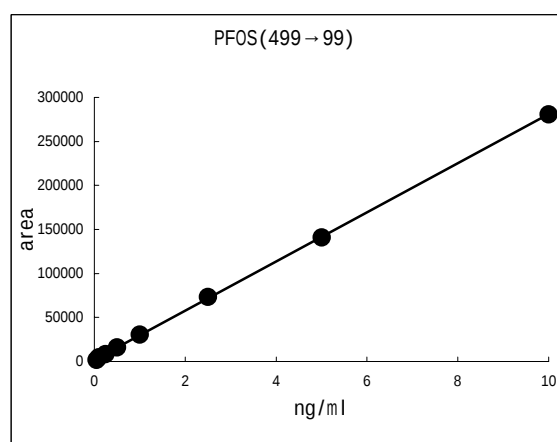


図-3 PFOS(499→99)の検量線

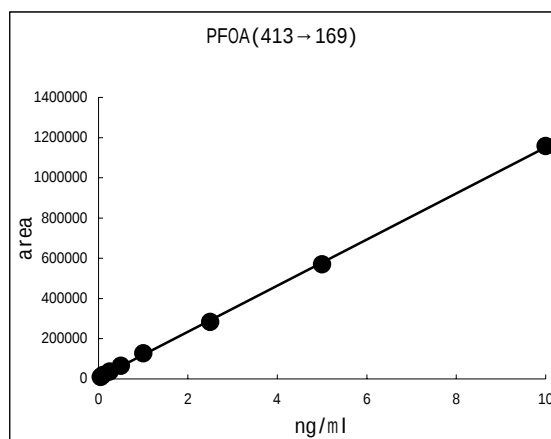


図-4 PFOA(413→169)の検量線

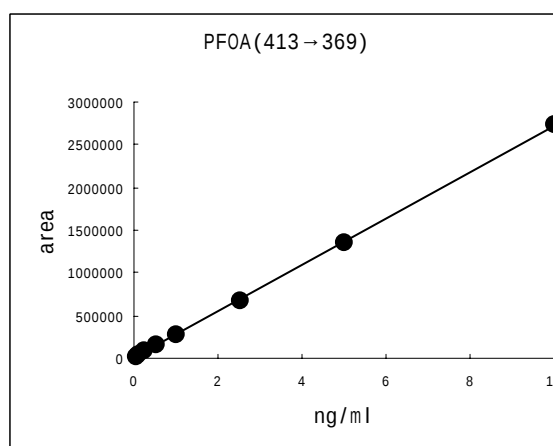


図-5 PFOA(413→369)の検量線

2. 高速液体クロマトグラフ - 質量分析計(LC/MS/MS)操作条件

1) イオン化

PFOS, PFOAともネガティブモードでそれぞれ 499([M-K]⁻), 413([M - NH₄]⁻)イオンが得られた。これらをプレカーサーとしたプロダクトイオンスキャンでは, PFOSは 80.0([SO₃]⁻), 99([SO₃+F]⁻)が得られた。PFOAは, 369([C₇F₁₅]⁻), 169([C₃F₇]⁻)イオンが生成した。

感度及び安定性を考慮し, 定量イオンは PFOS 499→80, PFOA 413→169 とした。

2) 移動相及びカラム

PFOS は側鎖を持つと思われる異性体がメインピークのほかに 2 本認められた。本法では, これらを分離しメインピークで測定する条件に設定した。

また PFOS は, 移動相をグラジエントしたとき, アセトニトリル濃度が高くなるにつれピーク形状がシャープになった。イソクラティック条件(アセトニトリル 45%)では, ブロードなピーク形状であった。グラジエント条件は, できるだけ定流量状態のとき成分が溶出するように条件を調整した。

3. 試薬ブランクについて

試験に使用する溶媒類の操作ブランクを調査した結果を表-4 に示した。

表-4 有機溶媒のブランク 単位 ; pg

溶媒	無処理		I ⁺ ボレーターの留液		活性炭処理	
	PF0A	PF0S	PF0A	PF0S	PF0A	PF0S
M T B E	1.59	0.00	0.63	0.00	0.00	0.11
アセトニトリル	0.23	0.00	0.77	0.49	0.09	0.00

PFOS は試薬由来のブランクは認められないが、操作中に環境から混入する恐れがある。開放系で放置しないこと、また吸引して溶媒を除去する操作で、汚染された空気が入らないようドラフト内で操作する等の配慮が必要であった。

PFOA のブランクは、試薬及び HPLC に使用されているテフロン資材からのものである。従って、有機溶媒類を活性炭(AC-2)で精製し、精製水は固相抽出カラム(OASIS HLB)を通過させたものを使用し、HPLC については、バイアルのセプタム及びオートサンプラーの注入方式に注意が必要であった。

4. 精製法

以下に各操作について列記した。

1) OASIS HLB(逆相カートリッジ)

OASIS HLB は、ポリマー系の逆相カートリッジカラムである。PFOS 及び PFOA の溶出状況を表-5 に示した。

表-5 OASIS HLB の溶出状況

化合物	アセトニトリル液量			
	0 ~ 2 ml	2 ~ 3 ml	3 ~ 4 ml	計
PFOS	93 %	5 %	tr.	98 %
PFOA	90 %	12 %	tr.	102 %

負荷する際の pH を一定とさせるため、0.004 mol/L 炭酸緩衝液を用いることとした。また、試料液の落下が遅い場合は、駒込ピペットのスポイドで加圧して落下させた。また、溶出溶媒をメタノールとした場合、濃縮時突沸しやすいため、アセトニトリルに変更した。

なお、10~20%アセトニトリルの洗浄は、PFOS が溶出されるため適用できなかった。

2) OASIS MCX の溶出状況

OASIS MCX は、ポリマー系の陽イオン交換カートリッジカラムである。PFOS 及び PFOA の溶出状況を表-6 に示した。

表-6 OASIS MCX の溶出状況

化合物	アセトニトリル液量			
	0 ~ 1 ml	1 ~ 2 ml	2 ~ 3 ml	計
PFOS	93 %	1 %	0 %	94 %
PFOA	99 %	2 %	0 %	101 %

OASIS MCX を通すことにより、試料液の着色物が吸着除去される。

3) OASIS HLB + OASIS MCX の溶出状況

OASIS HLB と OASIS MCX を接続した場合、フラクションがずれる可能性があるため接続した状態での溶出パターンを図-6 及び-7 に示した。なお操作は試料液の調製と同様に、負荷、洗浄を行った。

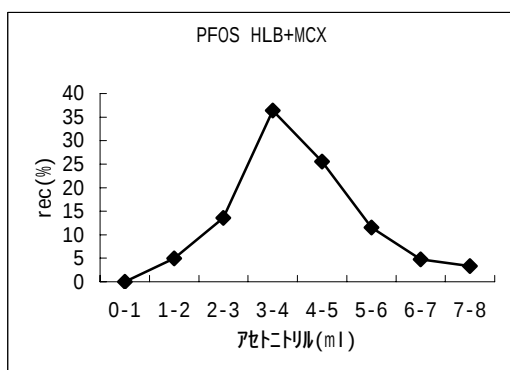


図-6 PFOS HLB+MCX の溶出パターン

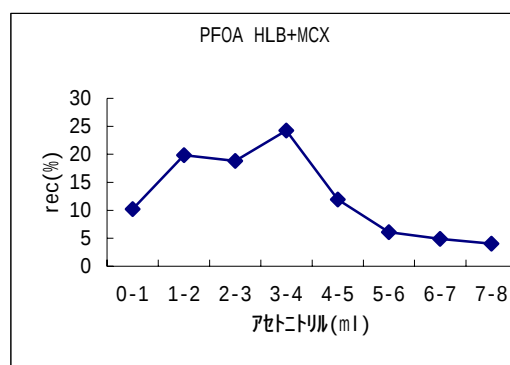


図-7 PFOA HLB+MCX の溶出パターン

4) ケムエルートの溶出状況

ケムエルートは、多孔性ケイソウ土を充填されたカートリッジ型カラムで、液々抽出をカラム上で行うものである。この場合は、ヘキサン-アセトニトリル分配による脱脂を行っている。PFOS 及び PFOA の溶出状況を表-7 に示した。

表-7 ケムエルートの溶出状況

化合物	95%アセトニトリル液量			
	0 ~ 15 ml	15 ~ 20 ml	20 ~ 25 ml	計
PFOS	85 %	11 %	0 %	96 %
PFOA	80 %	17 %	0 %	97 %

負荷時はヘキサンが十分にカラムに浸透させる(2~3分)。また溶出時は、ヘキサンを完全に除かないと、対象化合物がカラム内に残り(ヘキサンに捕捉)回収率がばらつくとともに、濃縮時の突沸を引き起こす。

5. サロゲート(内標)

サロゲート物質として PFDA(パーフルオロデカ酸)を使用を検討したが、環境中に存在すること、及び PFOA を微量含有しているため、操作ブランクの因となるため PFDA は使用しないこととした。安定同位体の登場が待たれる。

6. ガラス器具とテフロンについて

ガラス器具からのブランクは通常は気にする必要はないが、水道水に PFOA が微量含まれていること及び洗剤等からの移行など、器具洗浄の際の汚染が考えられる。

従って、器具の表面をブランクの少ない極性溶媒(HPLC 用メタノール, EL アセト

ンなど)で洗淨して使用する。

テフロンがメタノール，アセトニトリル等の極性溶媒に接触すると，PF0A，PF0Sのブランク値が高くなるため，テフロン(フッ素樹脂全般)は使用しないほうがよい。カートリッジカラム，メンブランフィルター等でテフロン樹脂を含んでいるものの使用は避ける。LC/MS/MS については，注入以降の流路にテフロン樹脂がなければ(通常 PEEK 樹脂)，サンプラーバイヤルのみ注意が必要となる。

7 . 添加回収試験

分析法に従って，生物試料(鹿児島;スズキ)の添加回収試験を行った。
その結果を表-8 に示した。

表-8 生物試料(鹿児島:スズキ)の添加回収試験結果

添加濃度		試行	PFOS	PFOA
0.1 µg/kg 添加	回収率	N=1	111 %	115 %
		N=2	98 %	124 %
		N=3	99 %	120 %
		N=4	105 %	100 %
		N=5	89 %	91 %
		N=6	74 %	85 %
		N=7	92 %	45 %
		N=8	69 %	54 %
		N=9	92 %	56 %
		N=10	77 %	42 %
	平均回収率		90 %	83 %
	変動係数		15.1 %	38.3 %
1 µg/kg 添加	回収率	N=1	87 %	55 %
		N=2	98 %	57 %
		N=3	72 %	63 %
		N=4	101 %	53 %
		N=5	87 %	48 %
		N=6	80 %	61 %
		N=7	100 %	58 %
		N=8	81 %	52 %
		N=9	78 %	62 %
		N=10	85 %	59 %
	平均回収率		87 %	57 %
	変動係数		11.5 %	8.7 %
20 µg/kg 添加	回収率	N=1	84 %	55 %
		N=2	90 %	51 %
		N=3	82 %	48 %
		N=4	93 %	58 %
		N=5	78 %	59 %
		N=6	80 %	53 %
		N=7	80 %	59 %
		N=8	82 %	46 %
		N=9	82 %	58 %
		N=10	77 %	62 %
	平均回収率		82 %	55 %
	変動係数		6.0 %	9.5 %

8. マススペクトル

図-8 に PFOS , 図-9 に PFOA のマススペクトル(MS/MS)を示した。

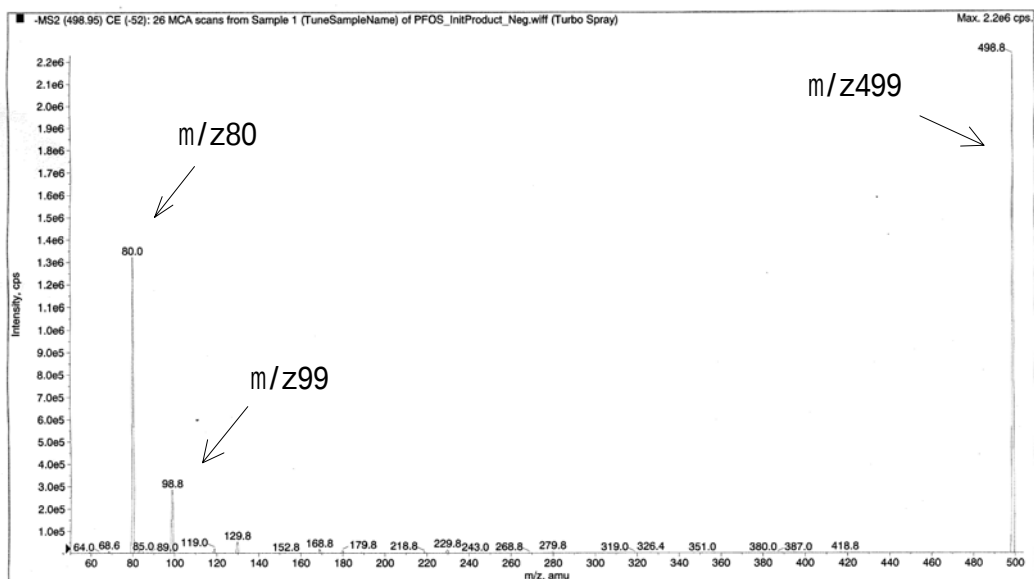


図-8 PFOS の MS/MS スペクトル

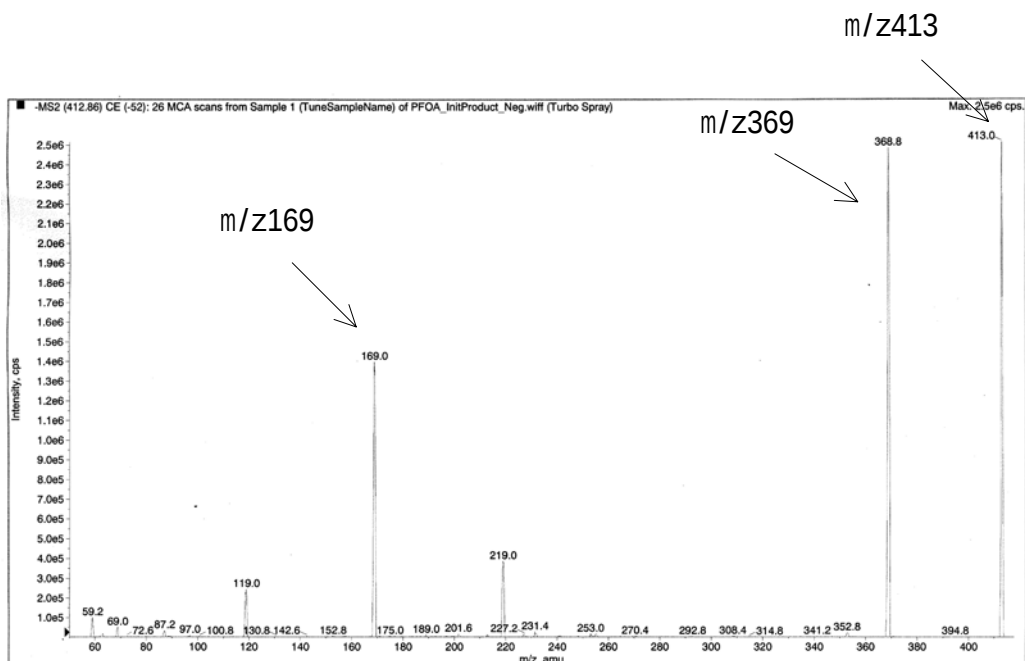


図-9 PFOA の MS/MS スペクトル

9. 測定のカロマトグラム

カロマトグラムを図-10 ~ -17 に示した。

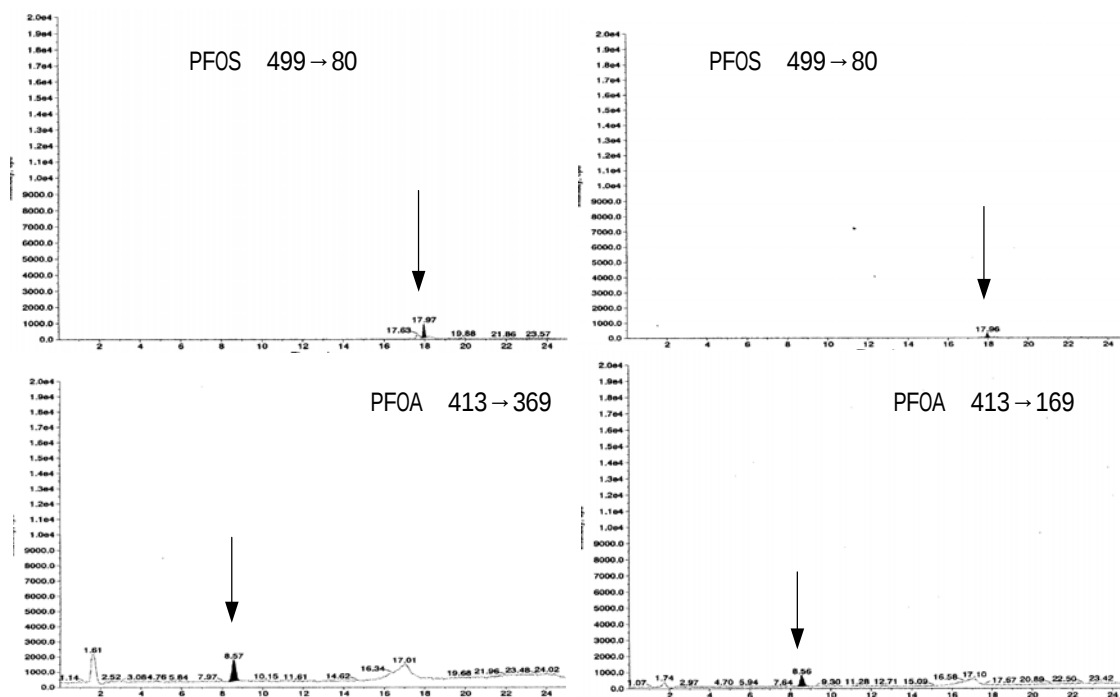


図-10 PFOS , PFOA 標準溶液(0.05 ng/ml)の MRM カロマトグラム

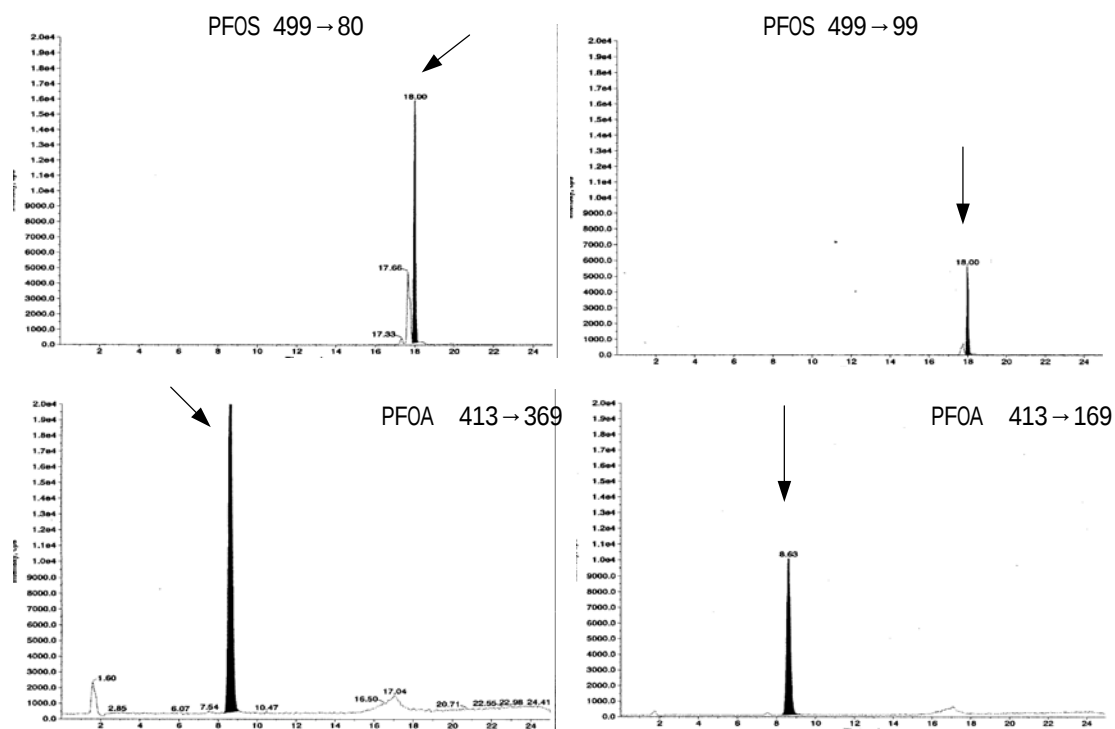


図-11 PFOS , PFOA 標準溶液(1 ng/ml)の MRM カロマトグラム

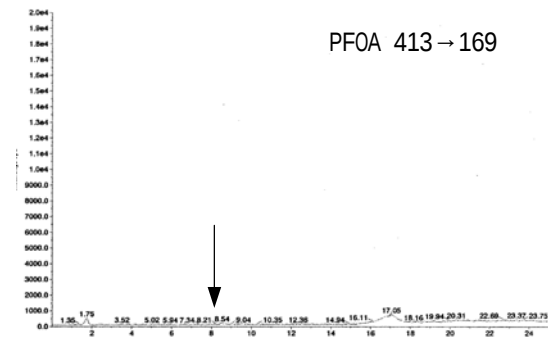
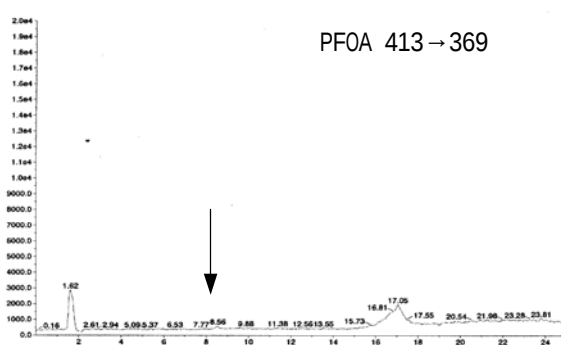
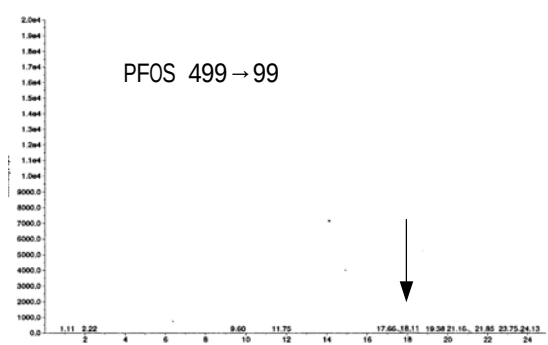
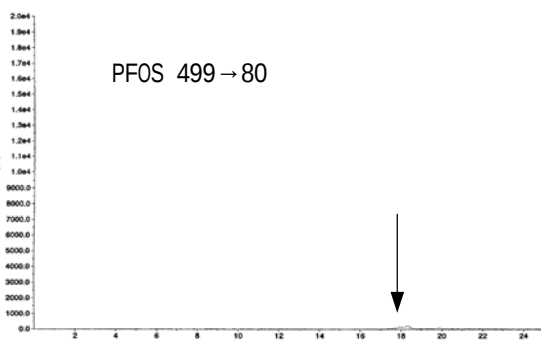


図-12 メタノール - 水(1:1)(注入溶媒)のMRM クロマトグラム

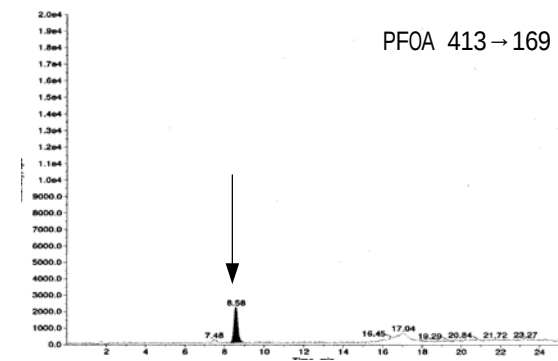
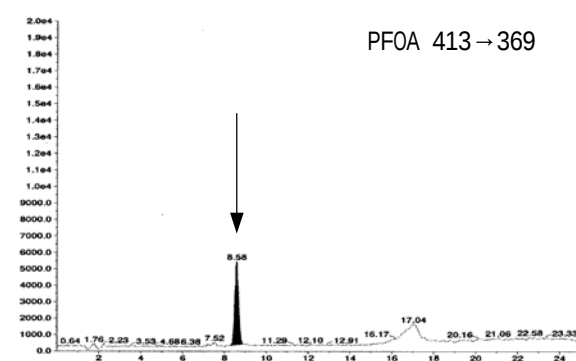
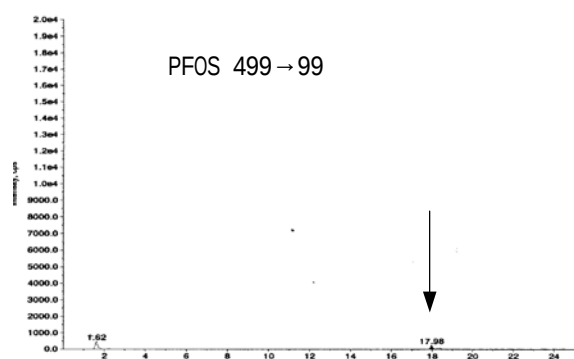
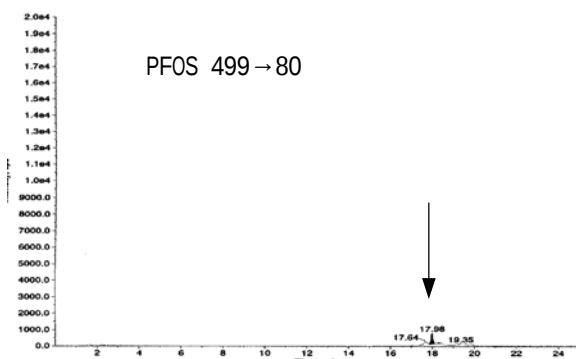


図-13 操作ブランクのMRM クロマトグラム

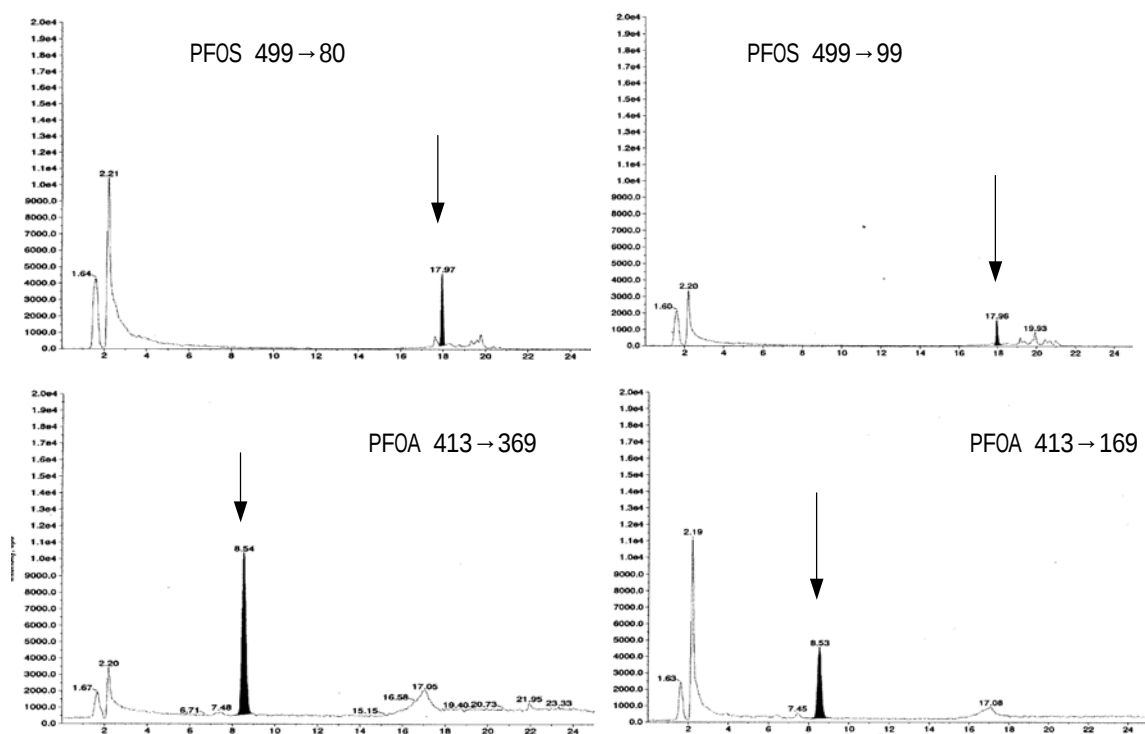


図-14 生物試料(鹿児島スズキ;無添加)のMRM クロマトグラム

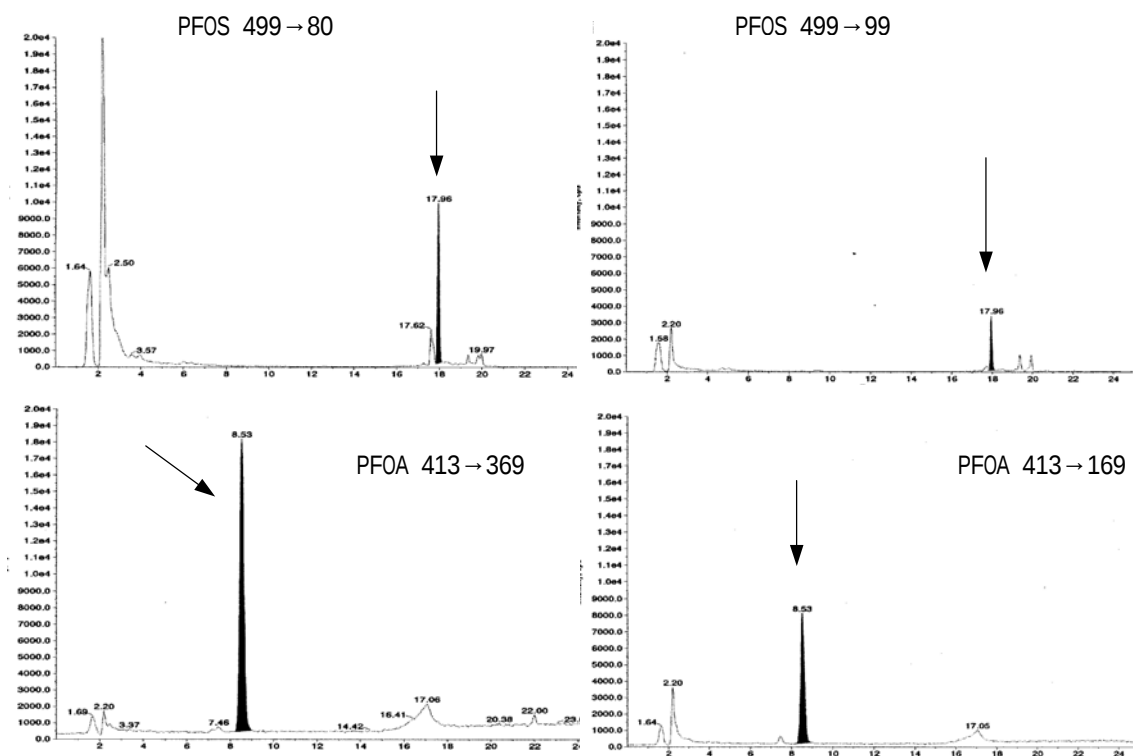


図-15 生物試料(鹿児島スズキ;0.1 µg/kg 添加)のMRM クロマトグラム

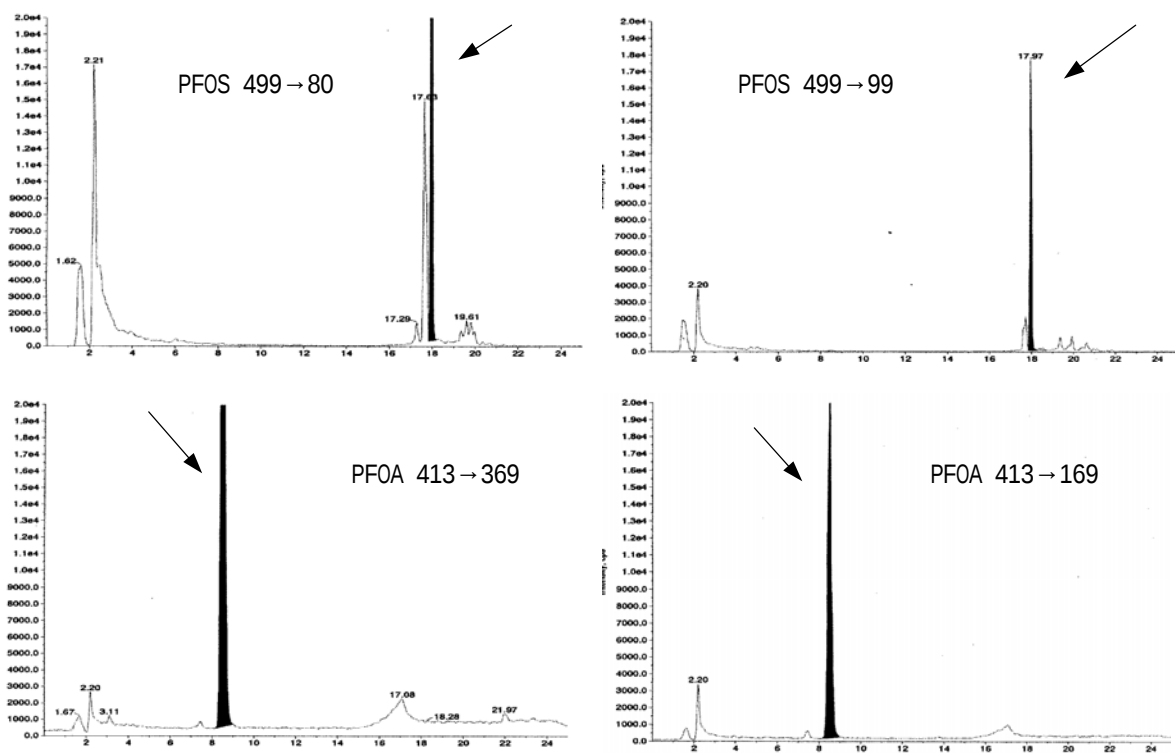


図-16 生物試料(鹿児島スズキ; 1 µg/kg 添加)のMRM クロマトグラム

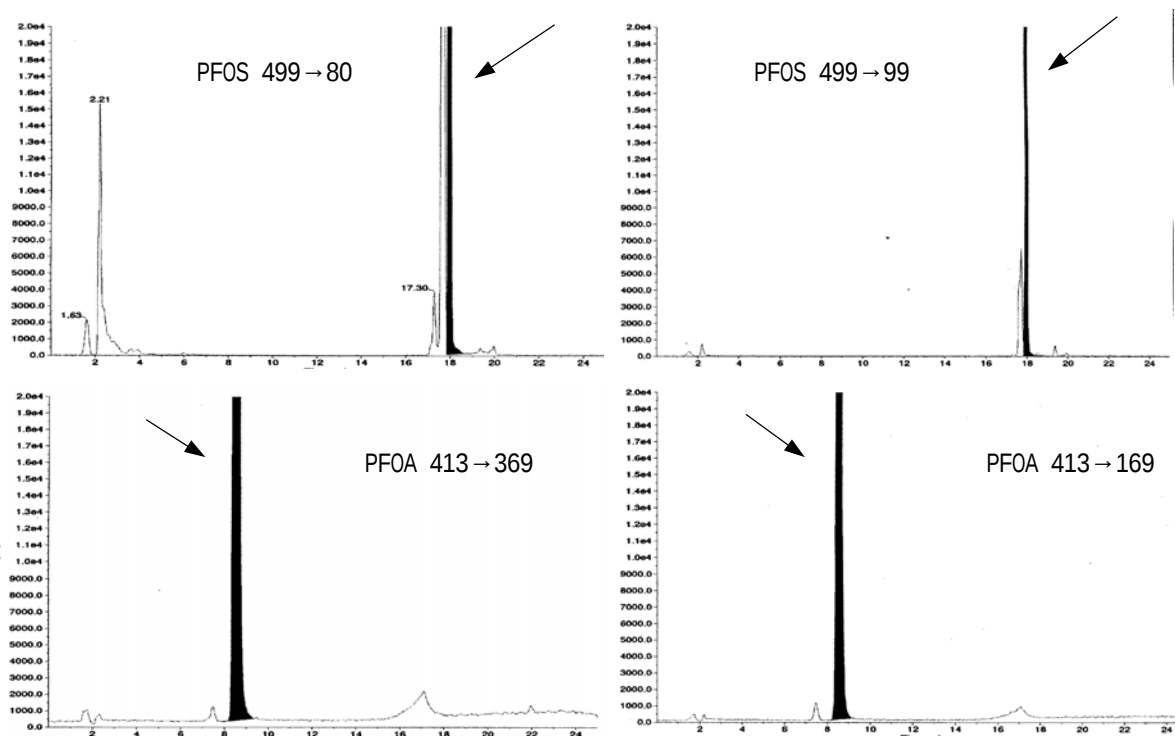


図-17 生物試料(鹿児島スズキ; 20 µg/kg 添加, 5 倍希釈)のMRM クロマトグラム

【評価】

本分析法により，生物試料中の PFOS 及び PFOA を ppb オーダーで測定できる。

参考文献

- 1) Takeshi Ohya, Naomi Kudo, Erika Suzuki, Yoich Kawashima: Determination of perfluorinated carboxylic acids in biological samples by high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr.B, 720, 1-7(1998)
- 2) KRISTEN J. HANSEN, LISA A. CLEMEN, MARK E. ELLEFSON and HAROLD O. JOHNSON: Compound-Specific, Quantitative Characterization of Organic Fluorochemicals in Biological Matrices, Environ. Sci. Technol., Vol 35, No.4, 766-770(2001)
- 3) JOHN P. GIESY and KURUNTHACHALAM KANNAN: Global Distribution of Perfluorooctane Sulfonate in Wildlife, Environ. Sci. Technol., Vol 35, No.7, 1339-1342(2001)
- 4) KURUNTHACHALAM KANNAN, JAANA KOISTINEN, KIMBERLEE BECKMAN, THOMAS EVANS, JAY F. GORZELANY, KRIS J. HANSEN, PAUL D. JONES, EERO HELLE, MADELEIN NYMAN and JOHN P. GIESY: Accumulation of Perfluorooctane Sulfonate in Marine Mammals, Environ. Sci. Technol., Vol.35, No.8, 1593-1598(2001)
- 5) KURUNTHACHALAM KANNAN, J. CHRISTIAN FRANSON, WILLIAM W. BOWERMAN, KRIS J. HANSEN, PAUL D. JONES and JOHN P. GIESY: Perfluorooctane Sulfonate in Fish-Eating Water Birds Including Bald Eagles and Albatrosses, Environ. Sci. Technol., Vol.35, No.15, 3065-3070(2001)
- 6) 第 20 回環境科学セミナー(LC/MS 講演会)講演要旨集(平成 15 年 3 月 17 日):主催 環境省環境保健部環境安全課
- 7) M.Ylinen, Hannu Hanhijarvi, Pekka Peura and Osumo Ramo: Quantitative Gas Chromatographic Determination of Perfluorooctanoic acid as the Benzyl Ester in Plasma and Urine, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 14, 713-717(1985)

担当者；木船 信行

連絡先；財団法人 日本食品分析センター

大阪支所

564-0051 大阪府吹田市豊津町 3-1

TEL 06-6386-1851

FAX 06-6386-1844

E-mail kibunen@jfrl.or.jp

Perfluorooctane sulfonate(PFOS) Perfluorooctanoate(PFOA)

Abstract & Flow chart

[Biological sample]

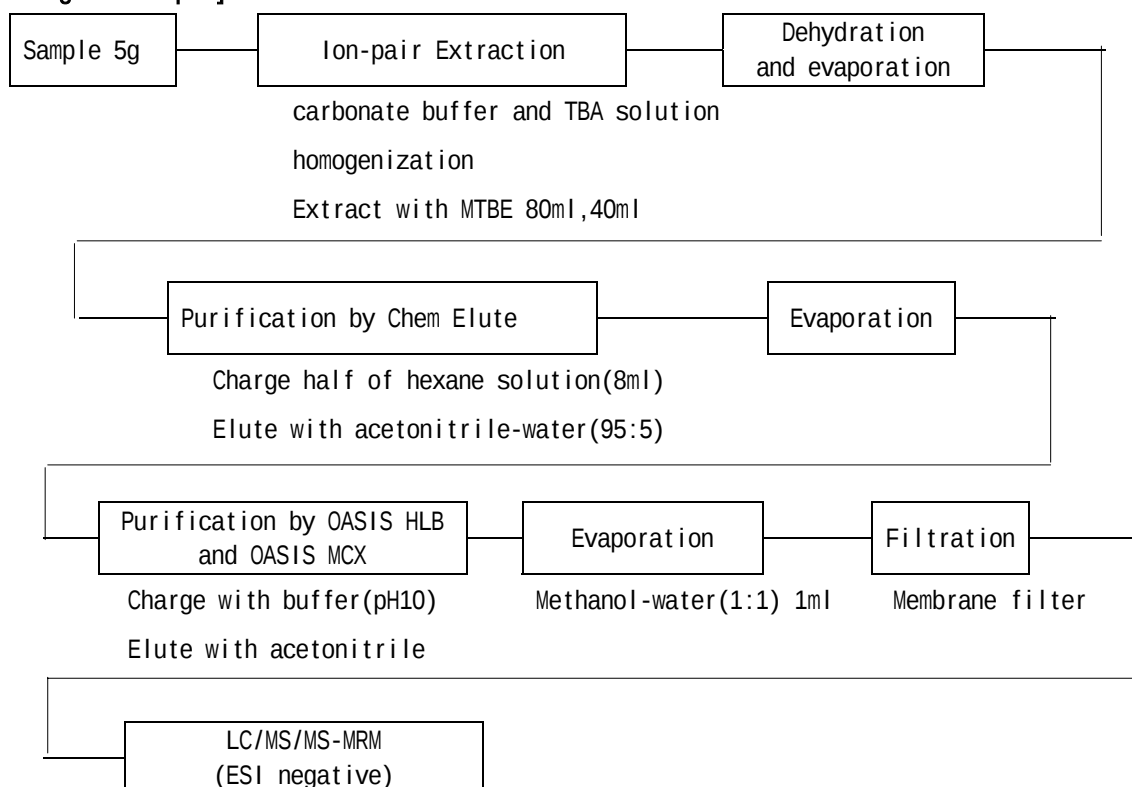
A biological sample(5g) was homogenized with 25ml of carbonate buffer(0.2mol/l, pH10) and 5ml of tetrabutylammonium(TBA) solution(0.1mol/l, pH10). The mixture was shaken for 10 minutes with 80ml of tert-butylmethyl ether(MTBE). After centrifuging, the upper layer was taken. Again the mixture was moderately shaken with 40 ml of MTBE and the upper layer was taken similarly. The joined extract was dehydrated with anhydrous sodium sulfate and then concentrated to dryness.

The residue was dissolved in 8ml of hexane. 4ml of hexane solution was charged onto a Chem Elute™ column(5ml). Removed hexane from Chem Elute™ column in vacuum, the target compounds were eluted with 20ml of 5% hydrous acetonitrile. The elute was concentrated to dryness.

The residue was dissolved in 5ml of carbonate buffer(0.004mol/l, pH10) and charged onto a OASIS HLB™ cartridge column(6ml). The cartridge column was rinsed with 5ml of carbonate buffer and 5ml of purified water. Removed the inside moisture from cartridge, attached OASIS MCX™ cartridge, the target compounds were eluted with 10ml of acetonitrile. The elute was concentrated to dryness.

The above residue was dissolved in 1ml of methanol-water mixed solution(1:1 v/v) and filtrated by the membrane filter(0.45 micron) into a HPLC vial. The prepared test solution was injected into LC/MS/MS(ESI) for determination by MRM.

[Biological sample]



物質名	分析法フローチャート	備考
パーフルオロオクタンルホン酸塩 (PFOS) パーフルオロオクタン酸塩 (PFOA)	(生物) <pre> graph LR A[試料 5 g] --> B[イソヘキサン-溶媒抽出 (MTBE)] B --> C[ヘキサン 定容] C --> D[脱脂 (Chem Elute)] D --> E[固相カートリッジ 精製 (OASIS HLB + MCX)] E --> F[メンブランフィルターでろ過] F --> G[LC/MS/MS MRM] </pre>	LC/MS/MS-MRM カラム: CAPCEL PAK C18 MG- 定量下限 PFOS : 0.12 µg/kg PFOA : 0.21 µg/kg