

ペルフルオロオクタンスルホン酸

Perfluorooctanesulfonic acid

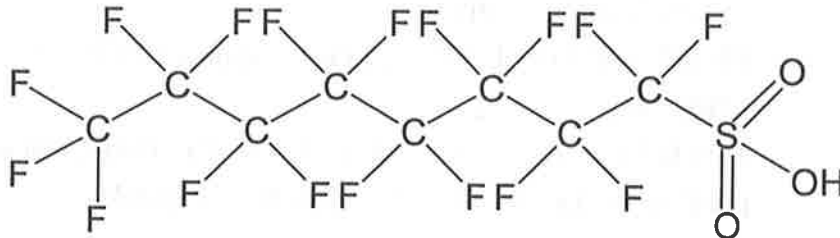
(別名：PFOS)

ペルフルオロオクタン酸

Perfluorooctanoic acid

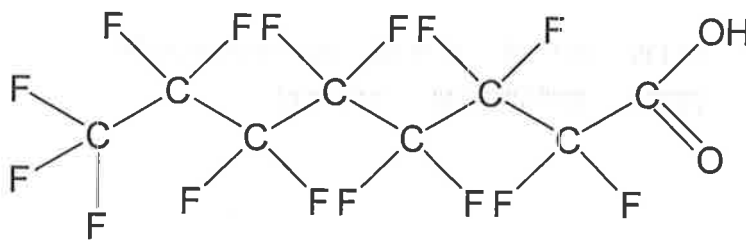
(別名：PFOA)

【対象物質及び構造式】



Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)

CAS 番号 1763-23-1



Perfluorooctanoic acid (PFOA)

CAS 番号 335-67-1

【物理化学的性状】

	分子量	沸点 (°C)	蒸気圧 (mmHg)	水溶解度	log P _{ow}
PFOS (C ₈ F ₁₇ SO ₃ K)	538.2	277~280	3.31*10 ⁻⁴ (20 °C)	1 g/L	—
PFOS (C ₈ F ₁₇ SO ₃ H)	500	149/15 mmHg	—	>10 wt%	4.9 *1
PFOA (C ₈ F ₁₅ CO ₂ H)	414.1	37-50)	1333 (25 °C)	3400 mg/L	6.30 *2

*1 : NCBI PubChem 検索による

*2 : MEYLAN,WM & HOWARD,PH (1995)

【毒性、用途等】

毒性情報 : 反復投与毒性 : PFOS

経口投与(サル) NOAEL= 0.15 mg/kg・d (182 日間、K 塩)

経口投与(ラット) LOAEL = 2 mg/kg・d (K 塩、肝臓酵素増加、肝臓空胞変性及び肝細胞肥大、

胃腸障害、血液異常、体重低下、発作、死亡

経口投与(ラット) NOAEL = 0.5ppm(オス)、2ppm(メス) (52 週間、K 塩、肝臓障害所見)

LOAEL = 2ppm(オス)、5ppm(メス) (52 週間、K 塩、肝臓障害所見)

反復投与毒性 : PFOA

経口投与(CD-1 マウス) LOEL= 3ppm (2 週間、アンモニウム塩、肝臓肥大)

経口投与(ニュージーランドシロウサギ) LOAEL=50 mg/kg ・ d (懐胎 6 ~ 18 日、アンモニウム塩、生殖毒性)

急性毒性等 : PFOA

LD₅₀ (ラット、腹腔内) >189 mg/kg

用途 : PFOS 消化剤、撥水剤、紙の表面処理剤

PFOA 樹脂改質剤、合成原料

§1 分析法

(1) 分析法の概要

全血および母乳 3 ml に 2 ng のサロゲート物質 ($^{13}\text{C}_4$ -PFOS、 $^{13}\text{C}_4$ -PFOA : 50 ng/mL)、12 ml の 1%ギ酸溶液を加え、攪拌した後、超音波抽出を 5 分間行う。次に固相カートリッジに通した後、ミリQ水 10 mL、40%メタノール/水 5 mL で洗浄し、2%アンモニア水/メタノール 5 mL で溶出させる。抽出液を窒素気流下で約 2 mL に濃縮する。その検液を LC-MS/MS(ESI negative)にて測定する。

なお必要に応じて、0.2 μm のフィルターでろ過したものを分析試料とする。

(2) 試薬・器具

【試薬】

- ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) : 3M Co. (St. Paul, MN, USA)
又は FLULKA 社 Heptadecafluorooctane sulfonic acid Potassium salt
(lot + Filling No. 451564/1 33103304)
- ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) : 3M Co. (St. Paul, MN, USA)
又は FULKA 社 Pentadeca fluorooctane acid Ammonium salt
(lot + Filling No. 444131/1 50705017)
- $^{13}\text{C}_4$ -ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) : WELLINGTON LABORATORIES
- $^{13}\text{C}_4$ -ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) : WELLINGTON LABORATORIES
- 固相カートリッジ : Oasis HLB Plus Waters 社製(200 mg-6 mL)
- メタノール : 残留農薬試験用 (5000 倍濃縮)
- アセトニトリル : 残留農薬試験用 (5000 倍濃縮)
- ミリQ水 (超純水) : 超純水装置で精製した比抵抗 16 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水 (ミリQ水)
- ぎ酸 : 和光純薬工業製 特級 (純度 99%以上)
- アンモニア水 : 和光純薬工業製 特級 (25%以上)

【器具】

- PP 製容器 (ふた付) : 50 mL 又は 15 mL (注 1)
- バイアル : HPLC 用バイアル
- 0.2 μm フィルター :
- 遠心分離器

(3)分析法

【試料採取】

環境省「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。

【試料溶液の調製】

全血または母乳 3 mL に PFOS/PFOA 各 2 ng のサロゲート物質 ($^{13}\text{C}_4$ -PFOS、 $^{13}\text{C}_4$ -PFOA : 50 ng/mL)、12 mL の 1%ギ酸水溶液を加えて攪拌した後、超音波抽出を 5 分間行う。次に予め、メタノール 10 mL、ミリQ水 10 mL でコンディショニングした Oasis HLB 固相カートリッジに通した後、ミリQ水 10 mL、次いで 40%メタノール/水 5 mL で洗浄する。その後、測定対象物質を 2%アンモニア水/メタノール 5 mL で溶出させる。その抽出液を窒素気流下で約 2 mL に濃縮する。その検液を LC-MS/MS(ESI negative)にて測定する。(注 2)

全血試料について、抗凝固剤が予め添加されていない場合、フィブリンや血餅が発生するため、Oasis HLB 固相カートリッジに添加する前に取り除く操作が必要である。また採血後すぐに測定できない場合、一旦凍結保存を行い、解凍後使用する全血試料は、血球が溶血するために不要物が発生する可能性がある。この場合も同様に不要物を除いた試料で Oasis HLB 固相カートリッジに添加する必要がある。

なお必要に応じて、メタノール 20 mL で予備洗浄した 0.2 μm のフィルター(注 3) でろ過したものを分析試料とする。

【標準原液及び検量線用標準液の調製】

Heptadeca fluorooctanesulfonic acid potassium salt 及び Pentadeca fluorooctane acid Ammonium salt を正確にそれぞれ 10.8 mg 及び 10.4 mg 秤量し、メタノールを用い正確に 10 mL にして標準原液を作成する。PFOS 及び PFOA の標準原液としての濃度は、それぞれ 1.0 ng/mL となる。この標準原液をメタノール：水 (7：3) で順次希釈し、検量線用標準液を作成する。検量線用標準液の各濃度は、0.1～5 ng/mL とする。またそれぞれの検量線用標準液は $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 及び $^{13}\text{C}_4$ -PFOA が 50 ng/mL となるように調整する。

なお各試料にはサロゲート物質 ($^{13}\text{C}_4$ -PFOS、 $^{13}\text{C}_4$ -PFOA : 50 ng/mL) を 40 μL 添加する。

【測定】

<LCMS 測定条件>

[LC 条件]

機種 : SHIMADZU LC-20A システム
カラム : Inertsil ODS-SP 2.1×150 mm (5 μm) GL サイエンス社製
移動相 A : 10 mM 酢酸アンモニウム
移動相 B : アセトニトリル
グラジエント : (検討時)
0-2 min A : 90% B : 10%
2-12 min A : 90→20% B : 10→80%
12-17 min A : 20% B : 80%
17-25 min A : 90% B : 10%

(ブランク低減を考慮した条件)

0-2 min A : 65% B : 35%
2-7 min A : 65→20% B : 35→80%
7-10 min A : 20% B : 80%
10-15 min A : 65% B : 35%

移動相流量 : 0.2 mL/min
カラム温度 : 40 °C
試料注入量 : 10 μL

[MS 条件]

機種 : Applied Biosystems LC-MS/MS API 3200
イオン化法 : ESI negative
モニターイオン : PFOS 498.7→79.9 (定量イオン)
498.7→98.9 (確認イオン)
PFOA 412.7→368.8 (定量イオン)
412.7→169.0 (確認イオン)
¹³C₄-PFOS 502.9→79.9
¹³C₄-PFOA 416.9→372.0

<検量線の濃度>

検量線は、0.1～5 ng/mL の濃度で調製する。

	項目	検量線用標準液濃度
検量線濃度	PFOS	(0.05)、0.1、0.2、0.5、1、5 ng/mL
検量線濃度	PFOA	(0.05)、0.1、0.2、0.5、1、5 ng/mL

[検量線]

検量線用標準液(0.1～5 ng/mL)10 μL を LC-MS/MS に導入し、対象物質のサロゲート物質に対する相対ピーク面積と濃度の比から検量線を作成する。

[定量]

試料溶液 10 μL を LC-MS/MS に導入し、対象物質のサロゲート物質に対する相対ピーク面積を求め、検量線と比較して得られた濃度比から定量値を求める。

[濃度の算出]

試料の濃度 C (ng /g)は、以下の式から算出する。

$$C \text{ (ng /g)} = \frac{As - At}{v}$$

- C : 測定物質の濃度(ng /g)
- As : 試料中の測定対象物質の重量(ng)
- At : 測定対象物質の操作ブランク値(ng)
- v : 試料採取量(g)

[装置検出下限(IDL)]

本分析に用いた LC-MS/MS の IDL を下表に示す(注 4)。

物質	IDL (ng/mL)	試料量 (g)	IDL 試料換算値 (ng/g)
PFOS	0.0110	3	0.0073
PFOA	0.0229	3	0.0153

なお、母乳・臍帯血・血液の比重を 1 として算出した。

[測定方法の検出下限(MDL)、定量下限(MQL)]

本測定法における検出下限及び定量下限を以下に示す(注 5)。

物質	採取量 (mL)	検出下限値 (pg/g)	MDL	定量下限値 (pg/g)	SQL
PFOS(母乳)	3	0.0087		0.0335	
PFOA(母乳)	3	0.0137		0.0527	
PFOS(全血)	3	0.0082		0.0317	
PFOA(全血)	3	0.0101		0.0390	

なお、母乳・臍帯血・血液の比重を 1 として算出した。

全血においては、 $^{13}\text{C}_4$ 安定同位体を用いて検討した結果である。

注 解

(注 1) ガラス器具や PP チューブ等は、使用前にメタノールで洗淨すること。

(注 2) LC-MS/MS 測定時は、ブランクとして大きなピークが検出される場合があるため、HPLC 用メタノールやアセトニトリルを注入し、PFOS 及び PFOA のピークが検出しなくなるまで溶離液を流し装置全体をクリーニングしてから測定すること。

(注 3) 0.2 μm フィルターは、使用前にメタノール 20 mL で洗淨すること。

(注 4)

IDL(装置検出下限値)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 17 年 3 月)に従って算出し、表 1 に示した。(参考)

表 1 装置検出下限(IDL)の算出

対象物質名	PFOS	PFOA
試料量(g mL)	3	3
最終液量(mL)	2	2
注入濃度(ng/mL)	0.1	0.1
装置注入量(μL)	10	10
結果 1 (ng/mL)	0.0995	0.0997
結果 2 (ng/mL)	0.0958	0.102
結果 3 (ng/mL)	0.0967	0.102
結果 4 (ng/mL)	0.0982	0.0996
結果 5 (ng/mL)	0.0950	0.116
結果 6 (ng/mL)	0.0913	0.106
結果 7 (ng/mL)	0.0991	0.100
平均値(ng/mL)	0.0965	0.1036
標準偏差	0.0028	0.0059
IDL(ng/mL)	0.0110	0.0229
IDL 試料換算値(ng/g)	0.0073	0.0153
S/N	15	7
CV(%)	2.9	5.7

※IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

なお、母乳・臍帯血・血液の比重を 1 として算出した。

(注 5)

測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 17 年 3 月)に従って算出し、表 2、3 に示した。

表 2 測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出 (母乳)

[母乳]

対象物質名	PFOS	PFOA
試料量(g)	3	3
標準品添加量 (ng)	0.1	0.1
試料換算濃度 (ng/g)	0.033	0.033
最終液量(mL)	2	2
注入濃度(ng/mL)	0.05	0.05
装置注入量(μL)	10	10
操作ブランク平均(ng/g) ①	0	0
無添加平均(ng/g) ②	0.0091	0.0310
結果 1 (ng/g)	0.0339	0.0662
結果 2 (ng/g)	0.0349	0.0540
結果 3 (ng/g)	0.0410	0.0636
結果 4 (ng/g)	0.0391	0.0614
結果 5 (ng/g)	0.0382	0.0628
結果 6 (ng/g)	0.0355	0.0707
結果 7 (ng/g)	0.0429	0.0591
平均値 (ng/g)	0.0379	0.0625
標準偏差	0.0033	0.0053
MDL (ng/g)	0.0087	0.0137
MQL (ng/g)	0.0335	0.0527
S/N	10	7
CV(%)	8.8	8.4

※MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

※MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

① 操作ブランク平均：

試料マトリックスがない状態で他は同様の操作を行い、測定した値の平均値

② 添加平均：

MDL 算出用試料に標準品を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

③ 試料調製は、30 mL 試料に標準品を 1 ng 添加した

④ なお、母乳・臍帯血・血液の比重を 1 として算出した。

表3 測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出 (全血)

[全血] $^{13}\text{C}_4$ 安定同位体を用いて検討

対象物質名	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA
試料量(g)	3	3
標準品添加量 (ng)	0.1	0.1
試料換算濃度 (ng/g)	0.033	0.033
最終液量(mL)	2	2
注入濃度(ng/mL)	0.05	0.05
装置注入量(μL)	10	10
操作ブランク平均(ng/g) ^①	0	0
無添加平均(ng/g) ^②	0	0
結果 1 (ng/g)	0.0395	0.0315
結果 2 (ng/g)	0.0383	0.0307
結果 3 (ng/g)	0.0338	0.0339
結果 4 (ng/g)	0.0331	0.0310
結果 5 (ng/g)	0.0381	0.0417
結果 6 (ng/g)	0.0405	0.0357
結果 7 (ng/g)	0.0332	0.0360
平均値 (ng/g)	0.0366	0.0361
標準偏差	0.0032	0.0039
MDL (ng/g)	0.0082	0.0101
MQL (ng/g)	0.0317	0.0390
S/N	10	7
CV(%)	8.7	10.8

※MDL= $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

※MQL= $\sigma_{n-1} \times 10$

① 操作ブランク平均：

試料マトリックスがない状態で他は同様の操作を行い、測定した値の平均値

③ 添加平均：

MDL算出用試料に標準品を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

③ 試料調製は、30 mL 試料に $^{13}\text{C}_4$ 安定同位体標準品を 1 ng 添加した

④ なお、母乳・臍帯血・血液の比重を 1 として算出した。

§2 解説

【分析法】

[フローチャート]

以下に分析フローを示す。

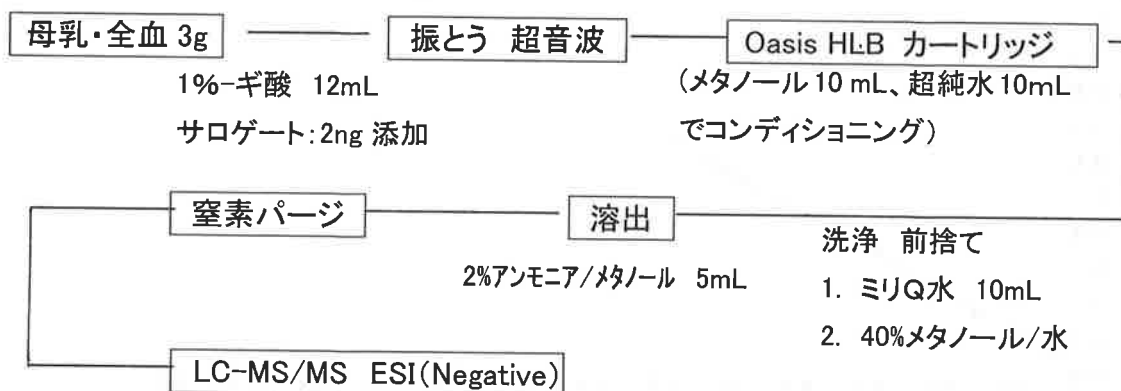


図1 分析フロー図

[検量線及びマススペクトル]

検量線及びマススペクトルを以下に示す。

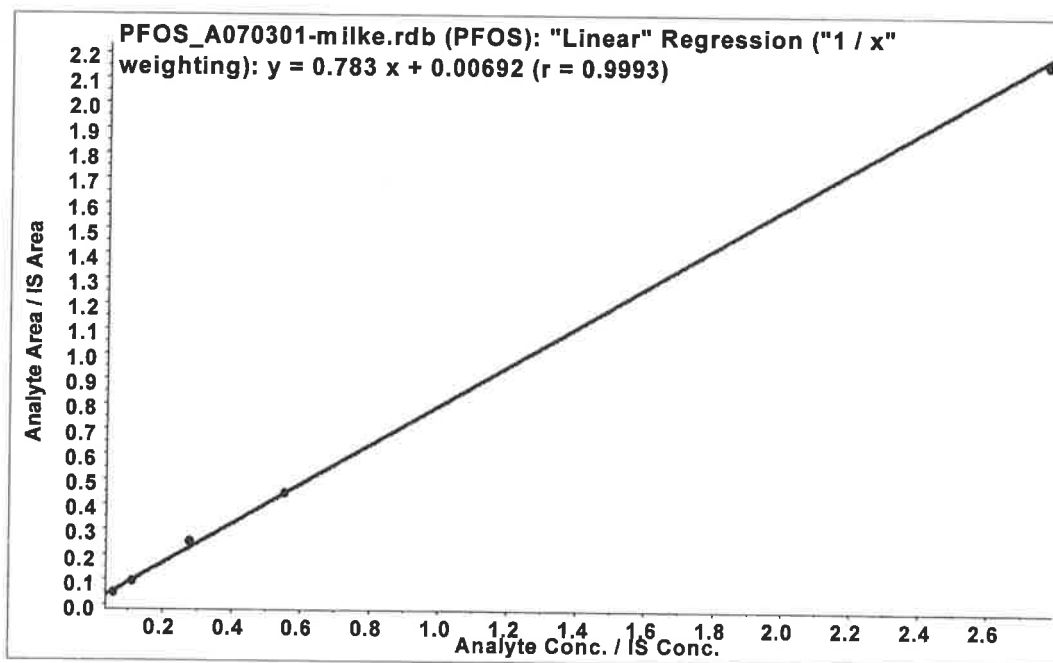


図2 PFOS の検量線 (0.1~5 ng/mL)

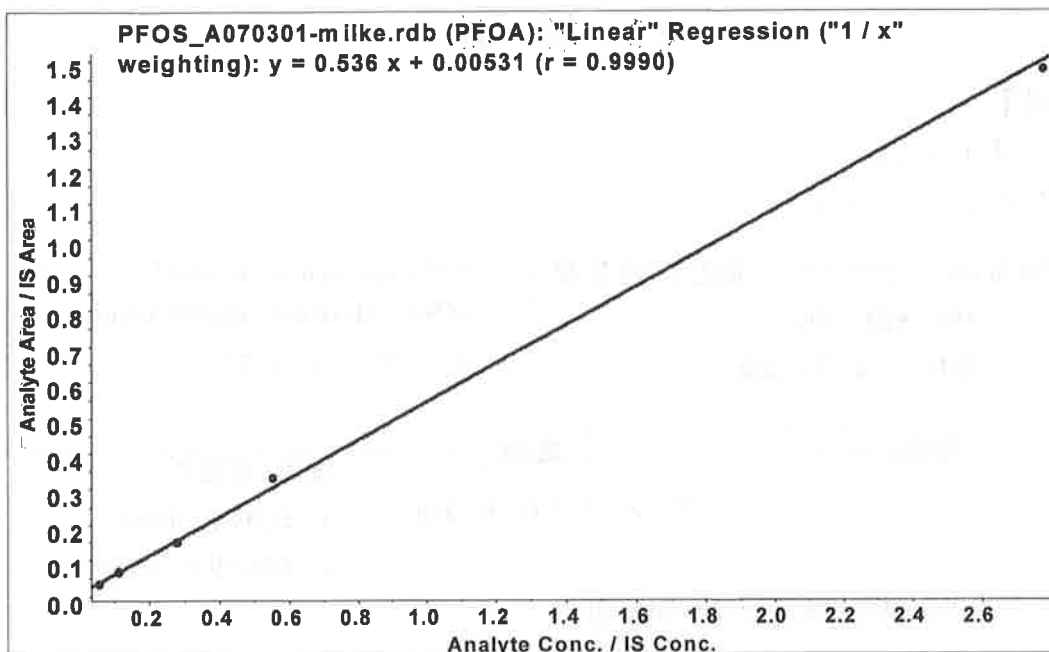


図3 PFOAの検量線 (0.1~5 ng/mL)

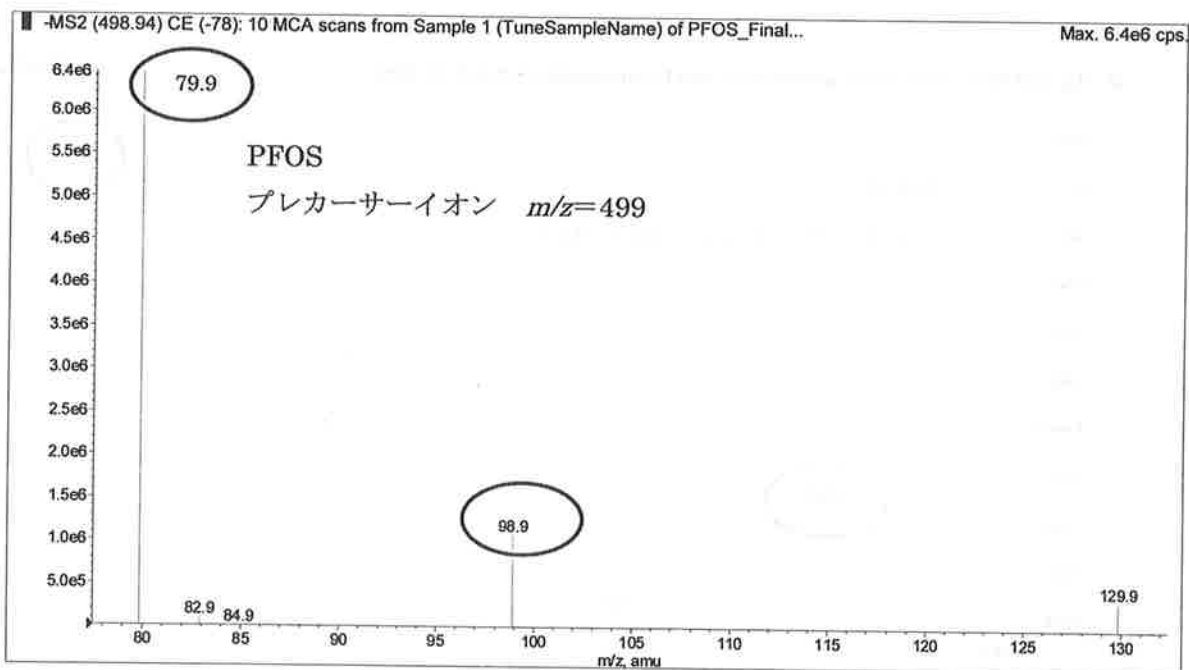
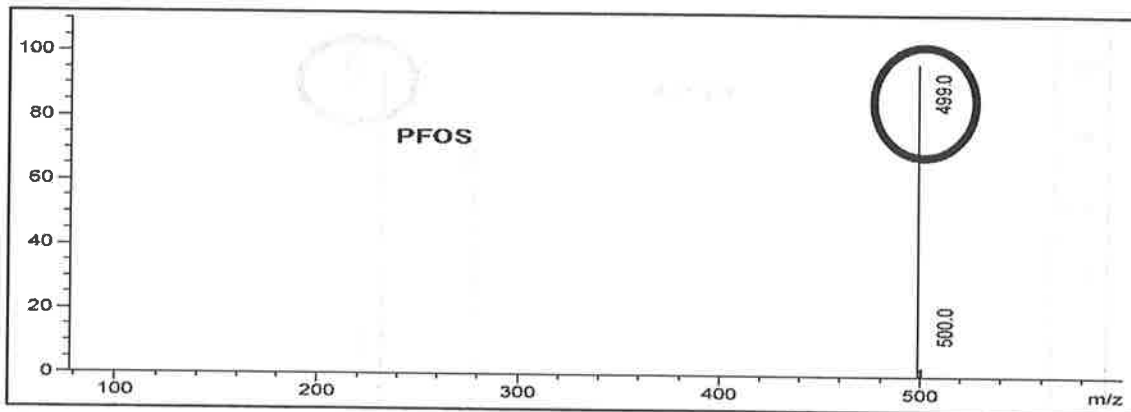


図 4-1 PFOS マススペクトル (MS 及び MS/MS)

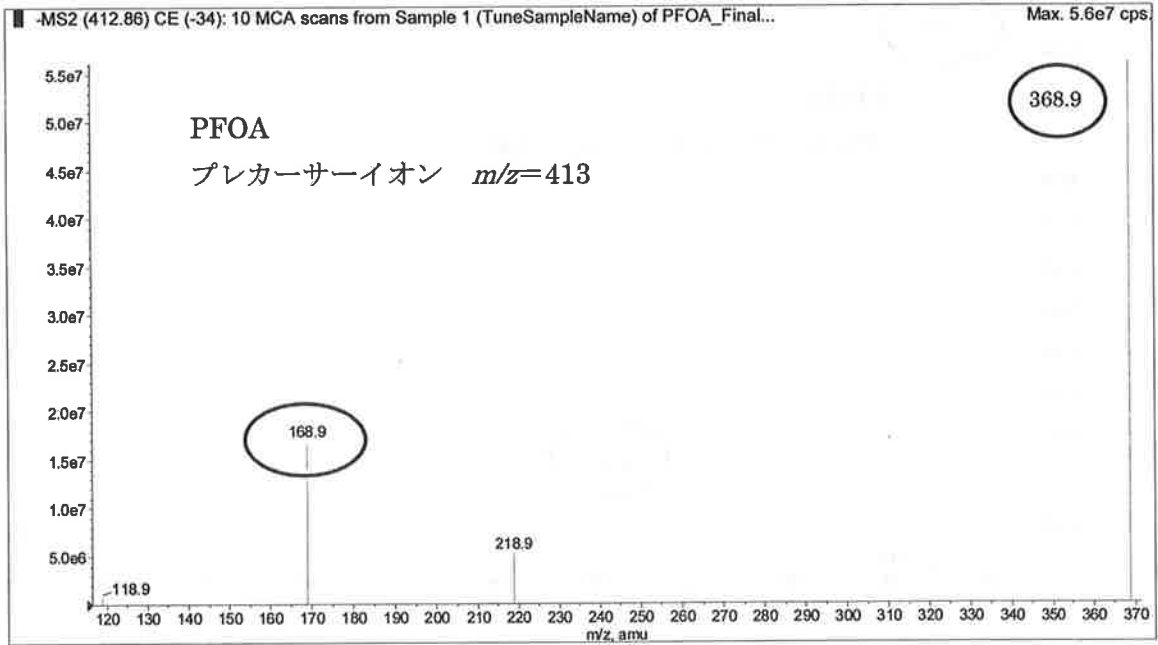
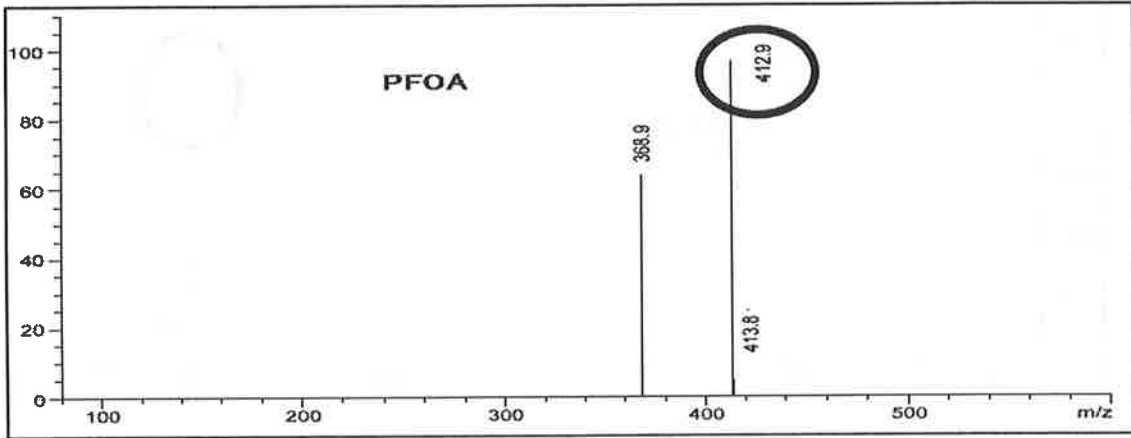


図 4-2 PFOA マススペクトル (MS 及び MS/MS)

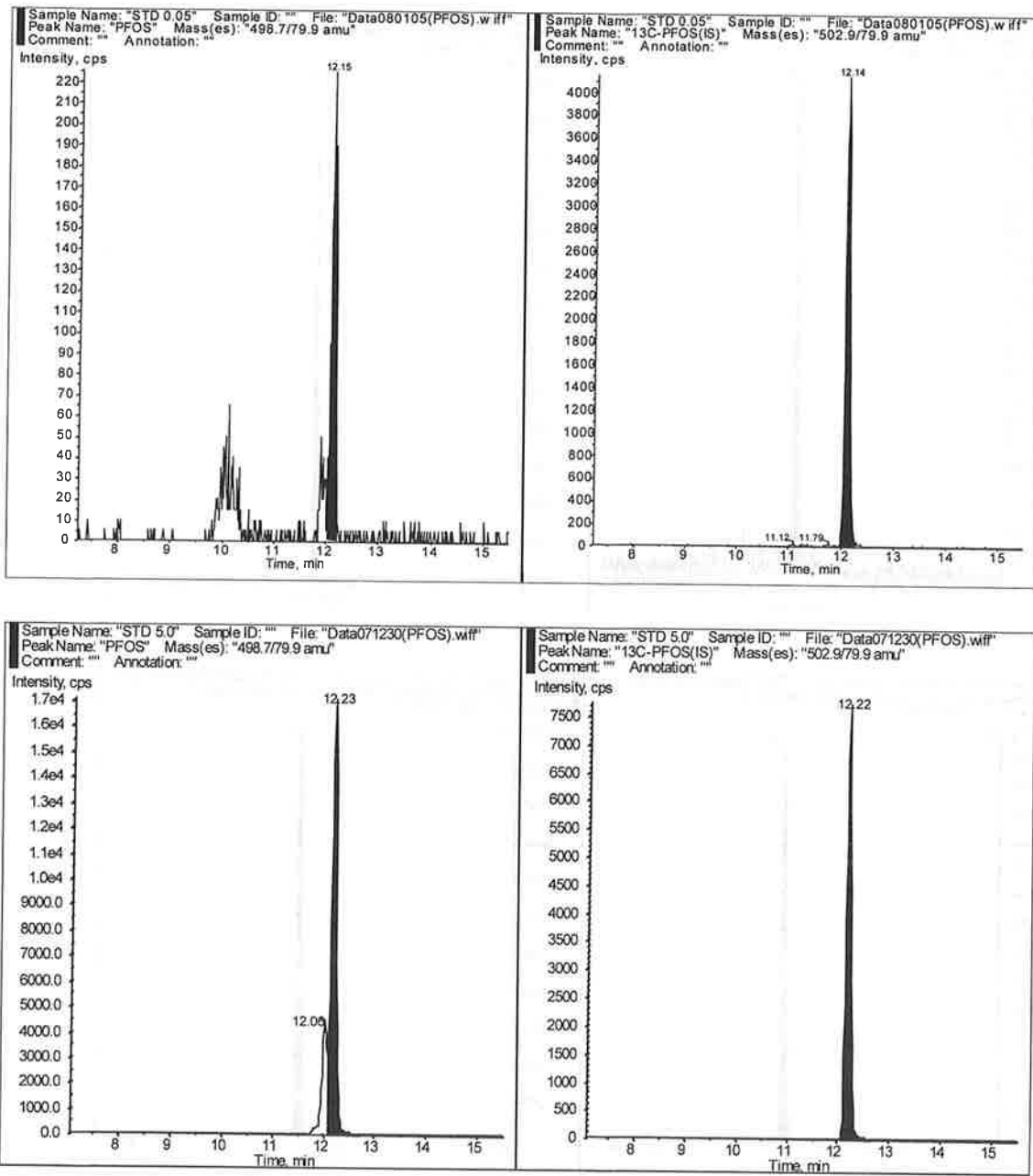


図 5 PFOS 標準品(上段：0.05 ng/mL 下段：5.0 ng/mL) クロマトグラム

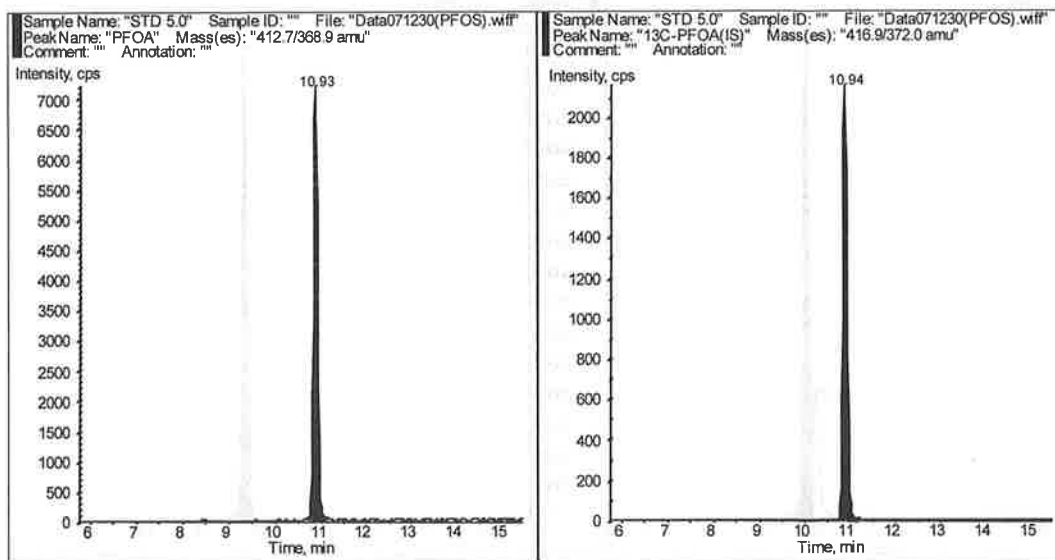
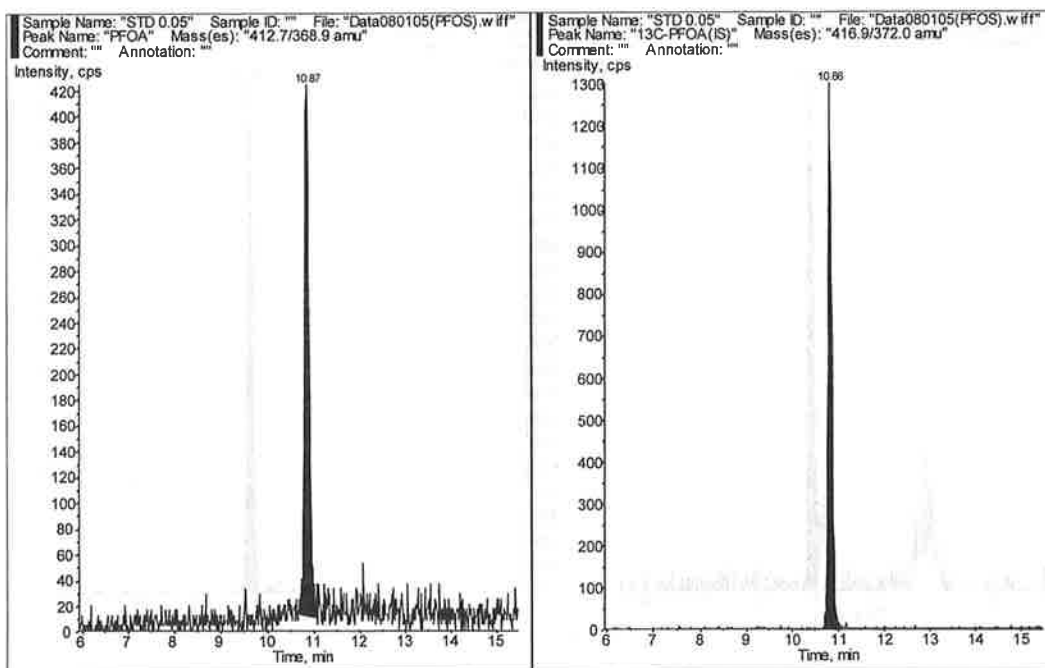


図 6 PFOA 標準品(上段 : 0.05 ng/mL 下段 : 5.0 ng/mL) クロマトグラム

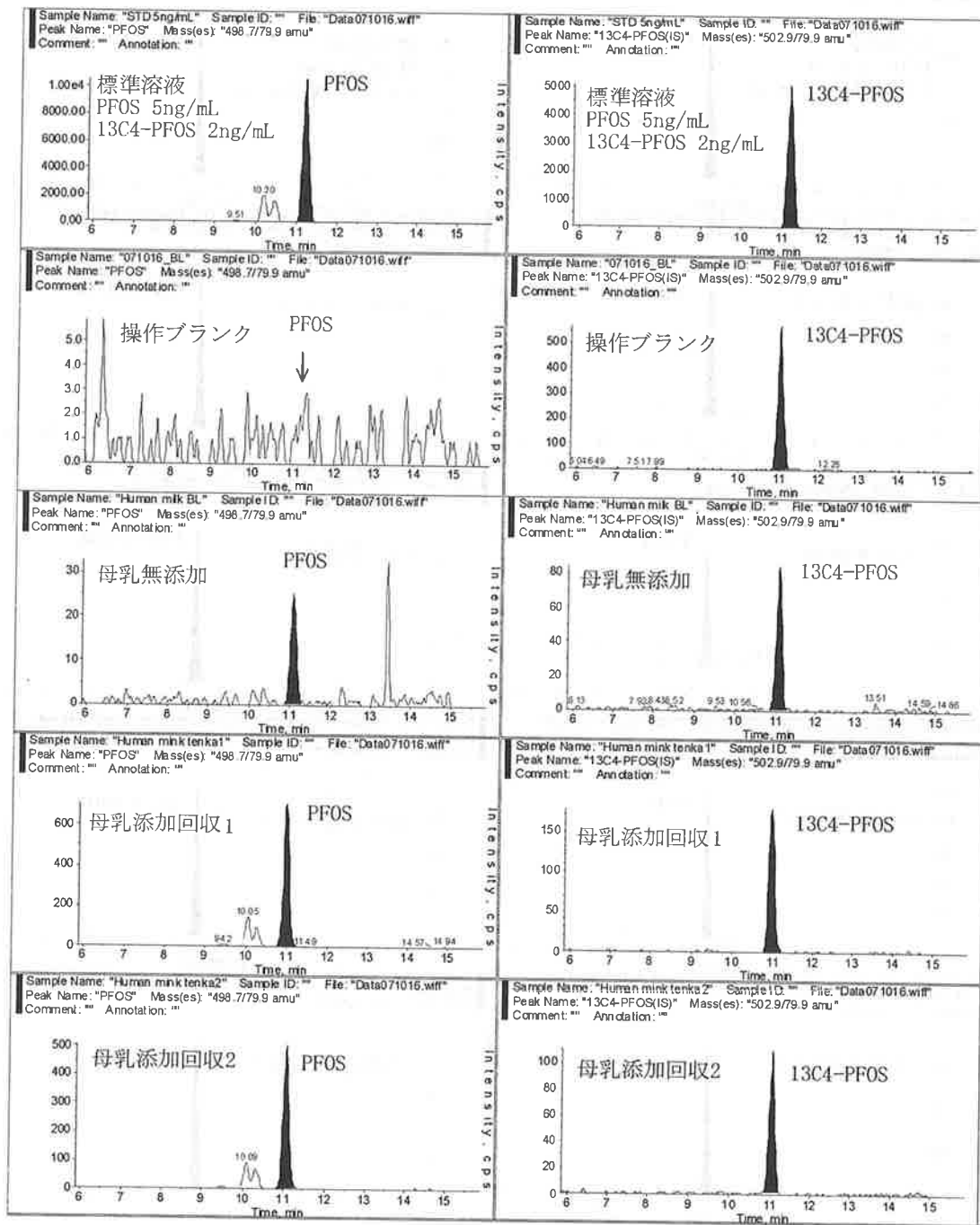


図7 PFOS 母乳添加回収試験クロマトグラム

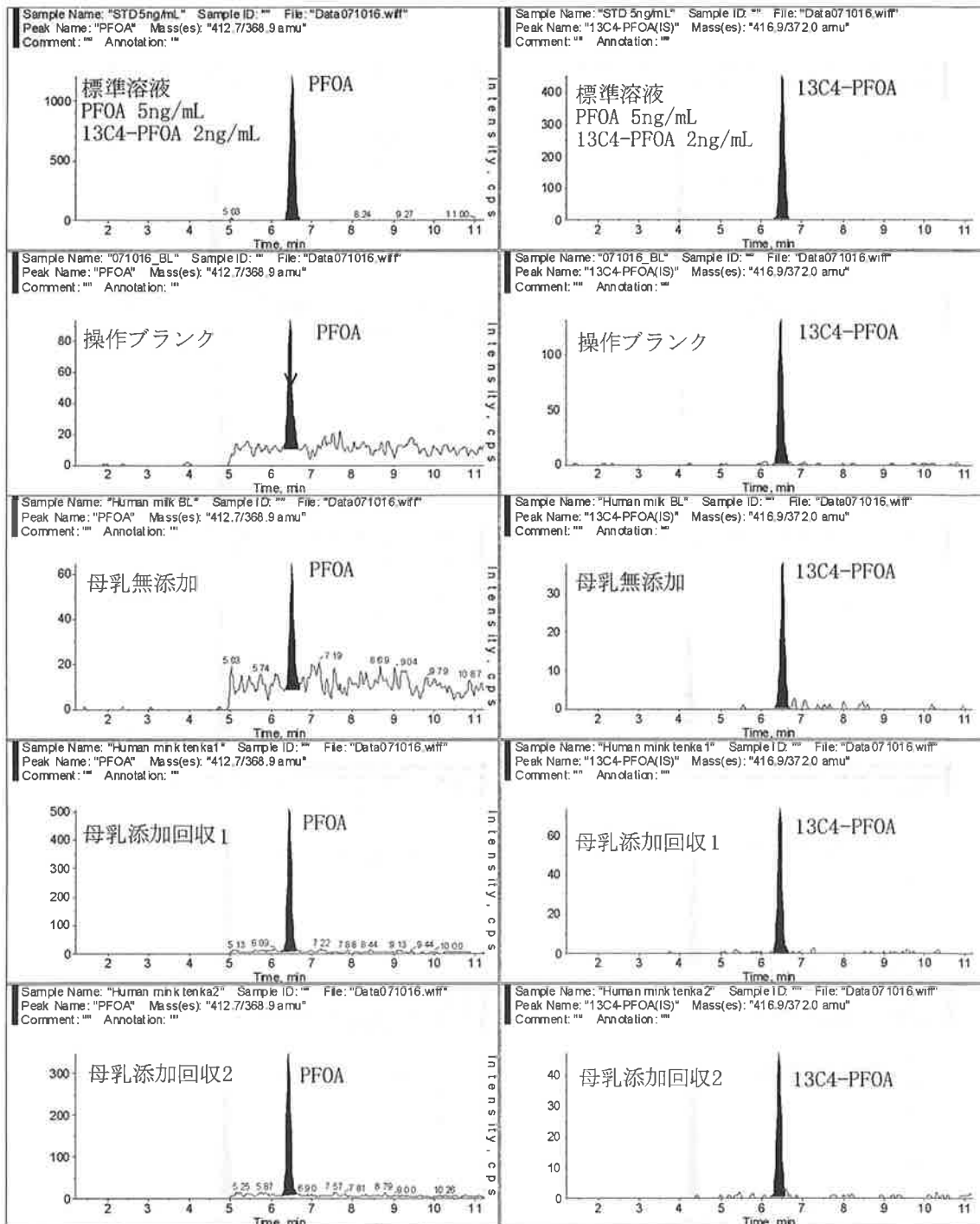


図8 PFOA 母乳添加回収試験クロマトグラム

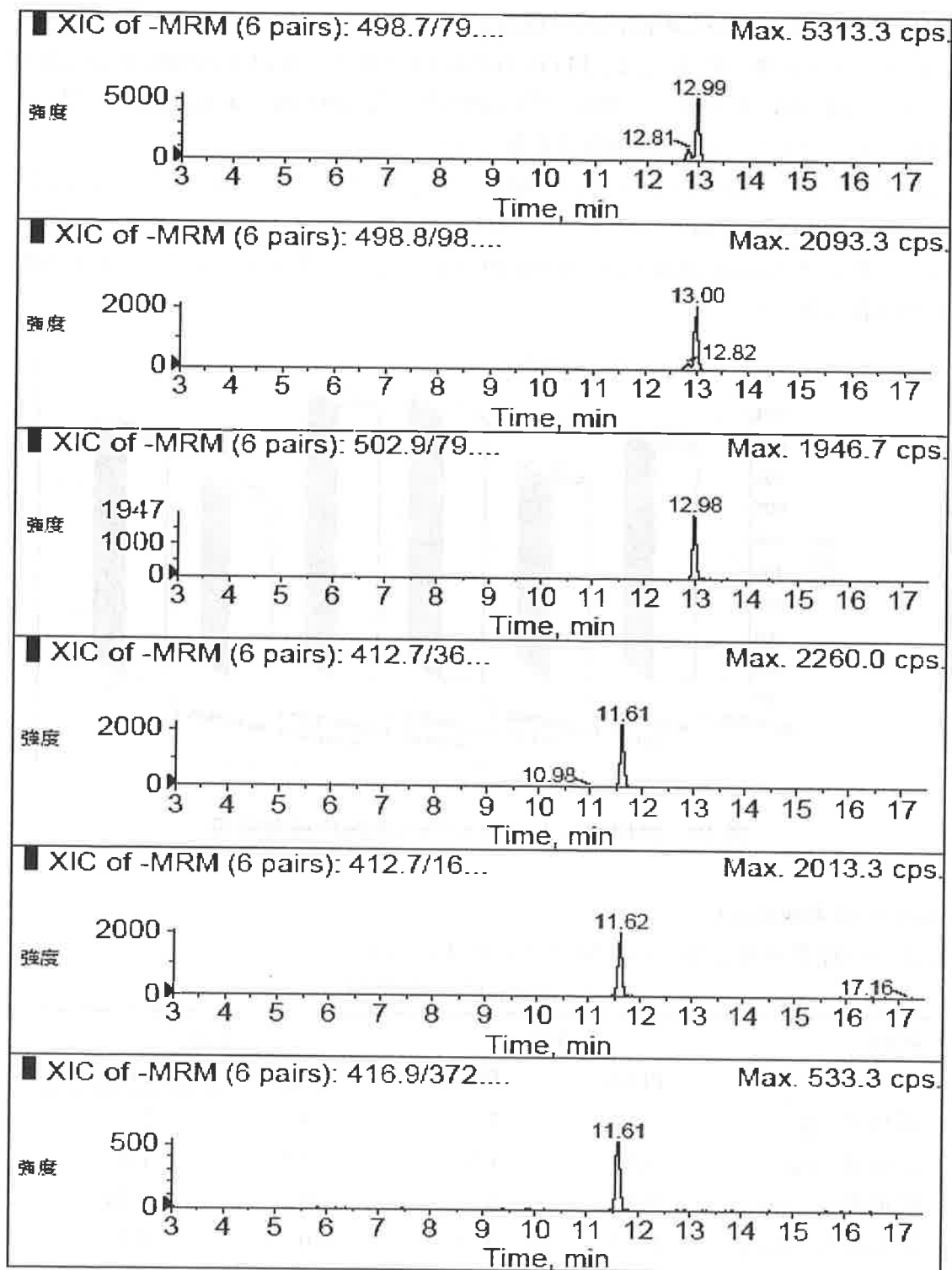


図9 PFOS/PFOA 標準品の確認イオン追加クロマトグラム

[固相カートリッジからの溶出液の検討]

マトリックスが無い状態では、PFOS/PFOA はメタノールのみでの溶出でも問題が無かった。図 10 にサロゲート物質 ($^{13}\text{C}_4$ -PFOS、 $^{13}\text{C}_4$ -PFOA : 50 ng/mL) を用いた固相カートリッジからの溶出検討結果を示す

しかしながら、実際の母乳を用いた検討では、メタノール溶出で、 ^{13}C 安定同位体の回収率は PFOS が 60~90% 程度、PFOA が 45~80% 程度であった。

2%アンモニア/MeOH 溶出では、PFOA/PFOA とともにバラツキが少なく、平均 80% 以上の回収であった。

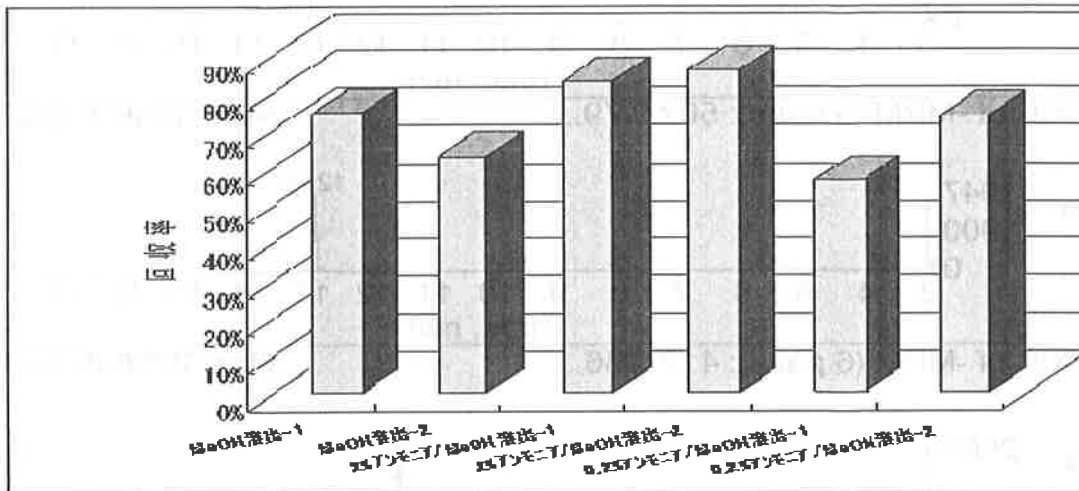


図 10 固相カートリッジからの溶出検討結果

[添加回収実験結果]

母乳への標準物質添加回収実験結果を表 4 に示す。

表 4 添加回収実験結果

試料	母乳		全血	
	PFOS	PFOA	PFOS	PFOA
試料量 : g	3	3	3	3
添加量 : ng	1.5	1.5	1.5	1.0
設定濃度 : ng/g	0.5	0.5	0.5	0.33
注入濃度 : ng/g	0.75	0.75	0.75	0.5
試行回数	5	5	5	5
回収率 : %	97-110	72-87	71-96	63-90
	平均 : 104	平均 : 80	平均 : 82	平均 : 80
CV : %	5.2	8.0	16	17

なお母乳・臍帯血・血液には、サロゲート物質 ($^{13}\text{C}_4$ -PFOS、 $^{13}\text{C}_4$ -PFOA : 50 ng/mL) を添加して検討した。

[LC 条件の検討結果]

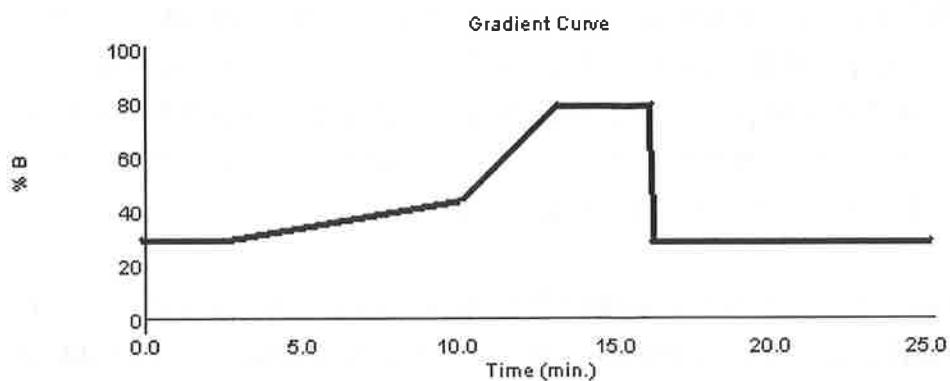
分析初期条件における移動相の安定化時間の長短によっても PFOA のブランク値は異なってくる。LC 条件において、特に初期のアセトニトリル溶媒の割合が低い場合、かなり大きな PFOA ピークが確認される。出来るだけ感度を損なわず、ブランクを下げるためには、移動相のグラジエント条件を工夫する必要がある。一例として LC 条件 1~4 (図 11~14) を記載した。

結果は、

1. 移動相 B のアセトニトリルの初期割合を 35%~40%程度にすることで、LC 装置や移動相等に含まれる PFOA のカラムヘッド面に濃縮される PFOA 量は低減される。
2. 移動相の急激な濃度勾配条件では、PFOS のピーク分離が不十分となる。
3. PFOA の溶出する時間における有機溶媒割合により、感度が大きく異なる。

先に示した LC 条件で PFOA ブランクが高く検出される場合は、事項に示す 4 例を参考に、上記の点を留意しながら、LC 条件の変更が必要である。なお、どうしても改善されない場合は、移動相条件をアイソクラテックで行うとよい。

<LC 分析条件-1>



移動相 A : 10 mM 酢酸アンモニウム溶液 B : アセトニトリル
 標準品濃度 0 ng/mL のクロマトグラム

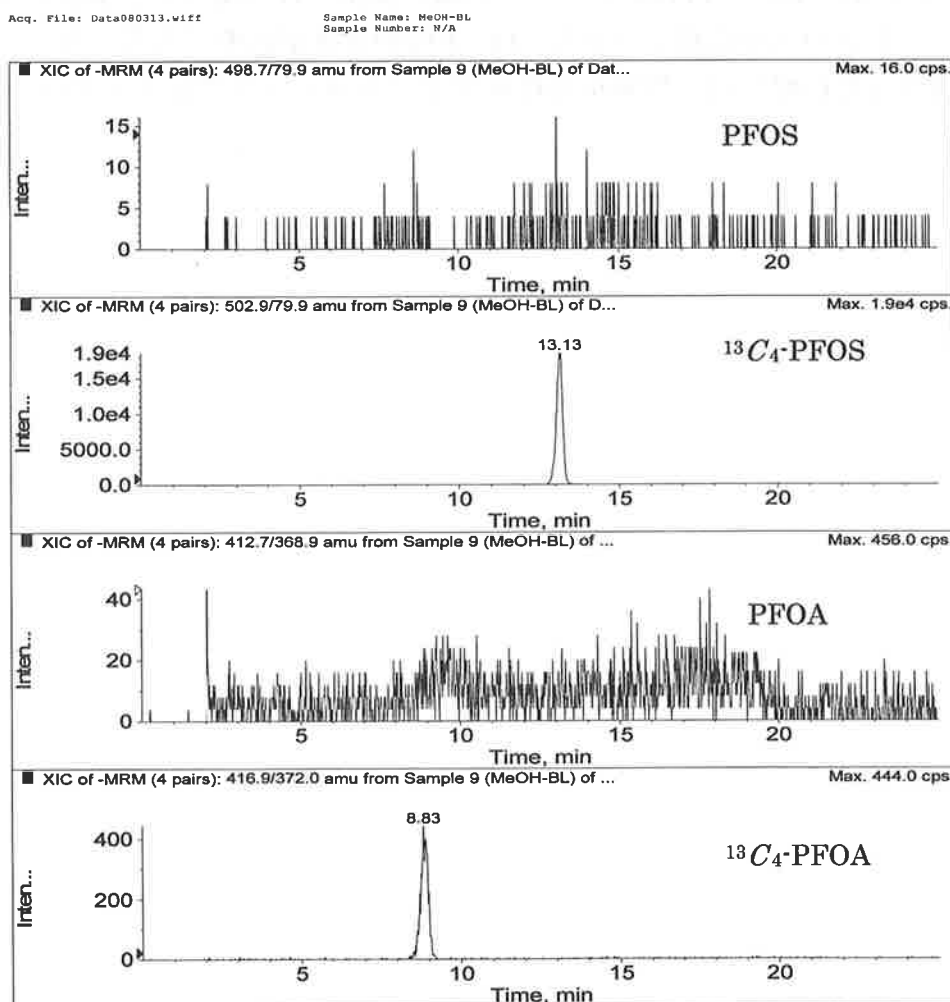
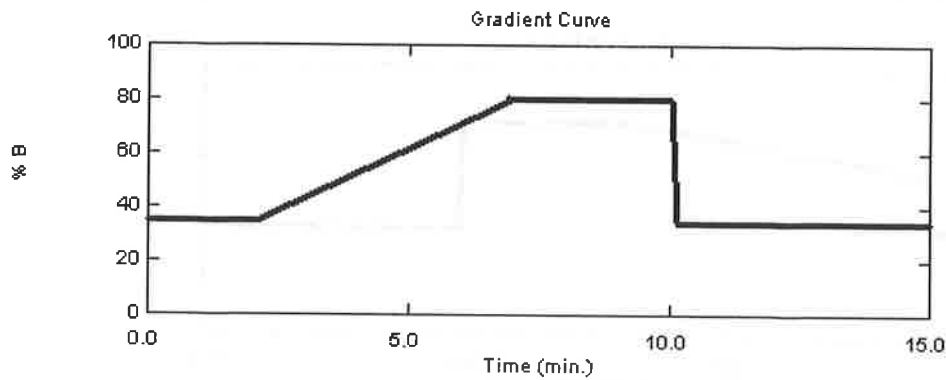


図 11 LC 条件違いによる PFOS/PFOA のブランク確認-1

<LC 分析条件-2>



移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウム溶液 B：アセトニトリル

標準品濃度 0 ng/mL のクロマトグラム

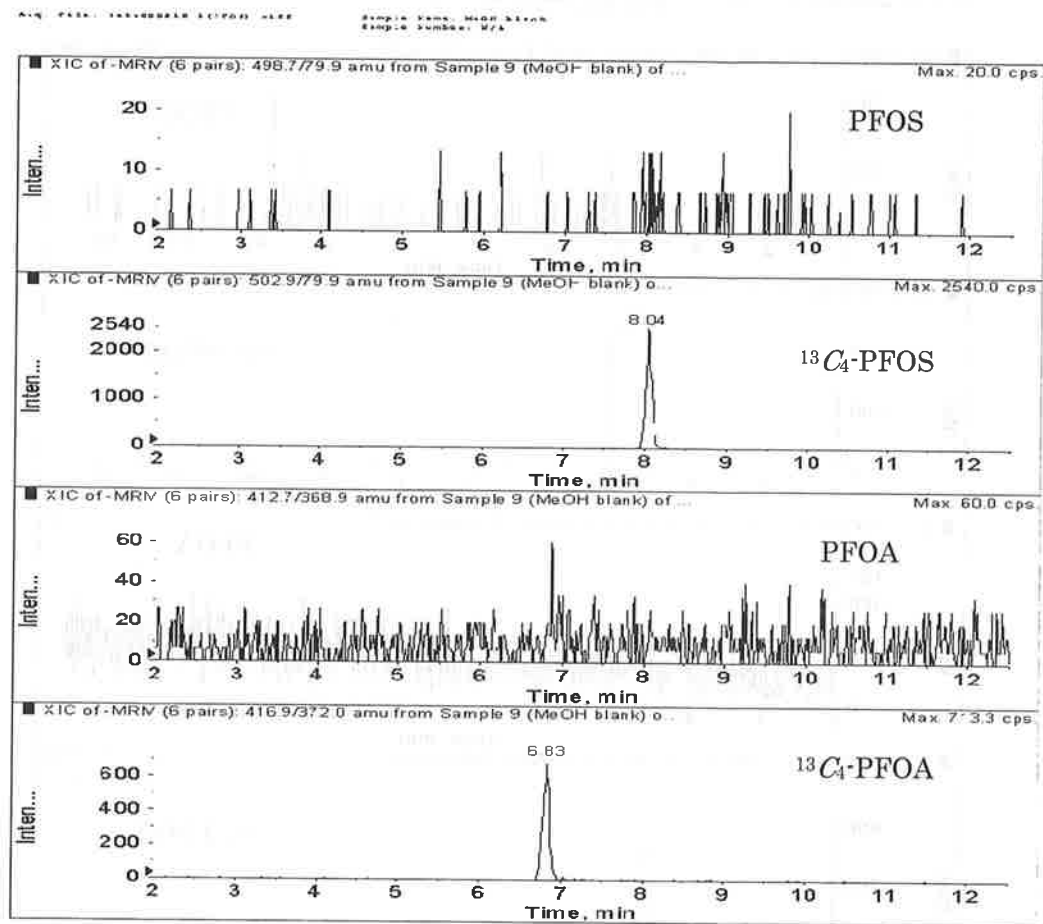
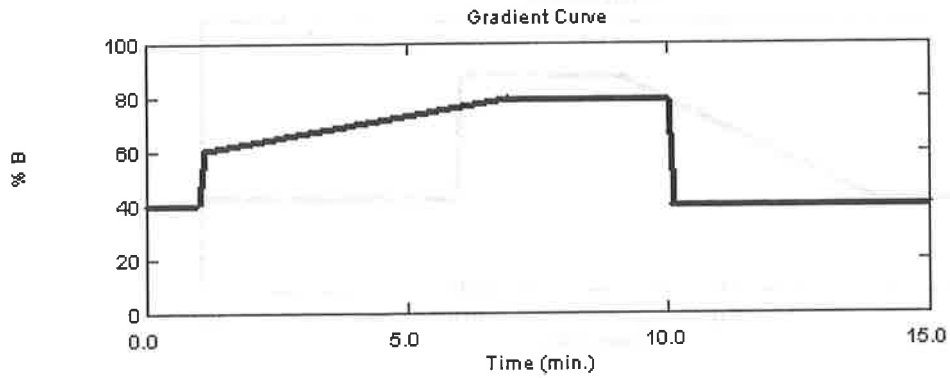


図 12 LC 条件違いによる PFOS/PFOA のブランク確認-2

<LC 分析条件-3>



移動相 A : 10 mM 酢酸アンモニウム溶液 B : アセトニトリル

標準品濃度 0 ng/mL のクロマトグラム

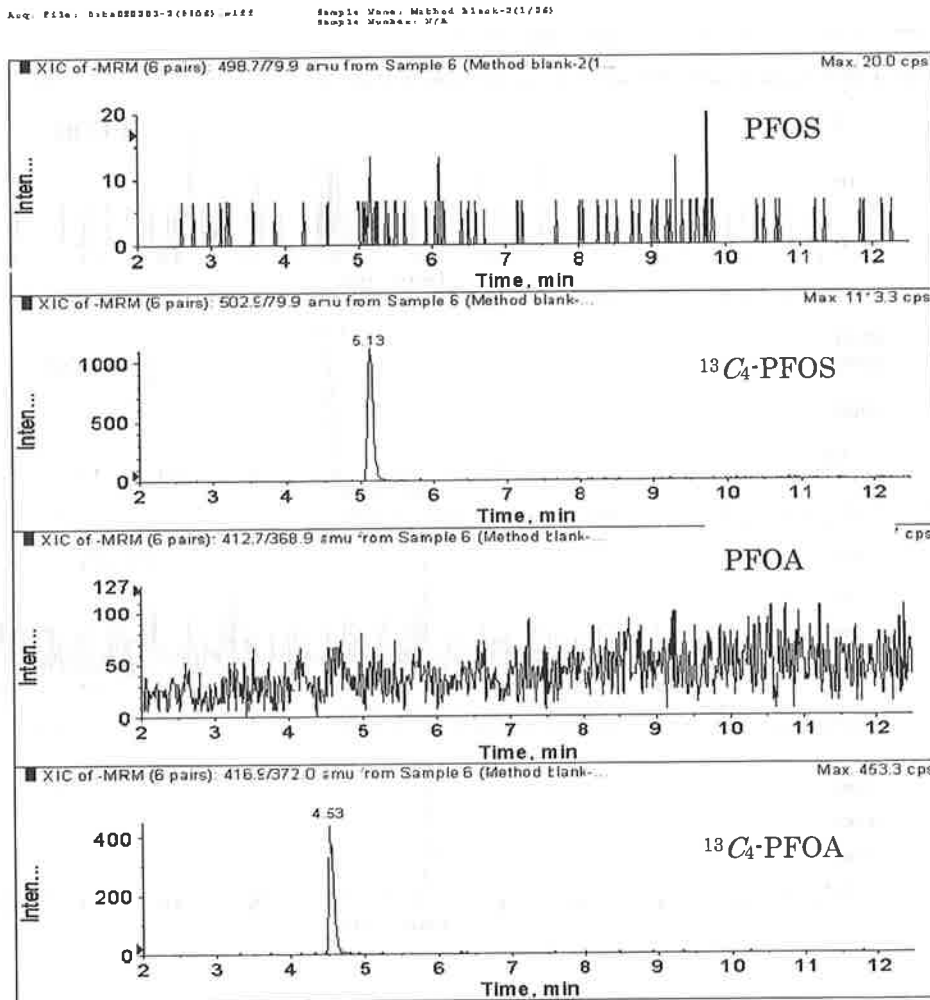
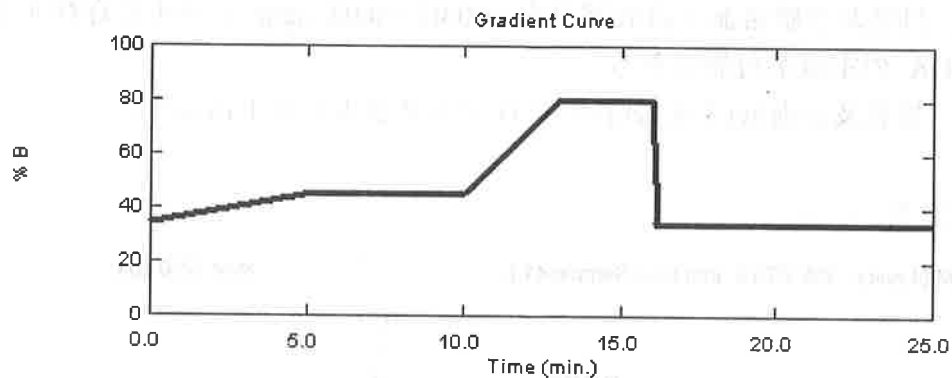


図 13 LC 条件違いによる PFOS/PFOA のブランク確認-3

<LC 分析条件-4>



移動相 A : 10 mM 酢酸アンモニウム溶液 B : アセトニトリル

標準品濃度 0 ng/mL のクロマトグラム

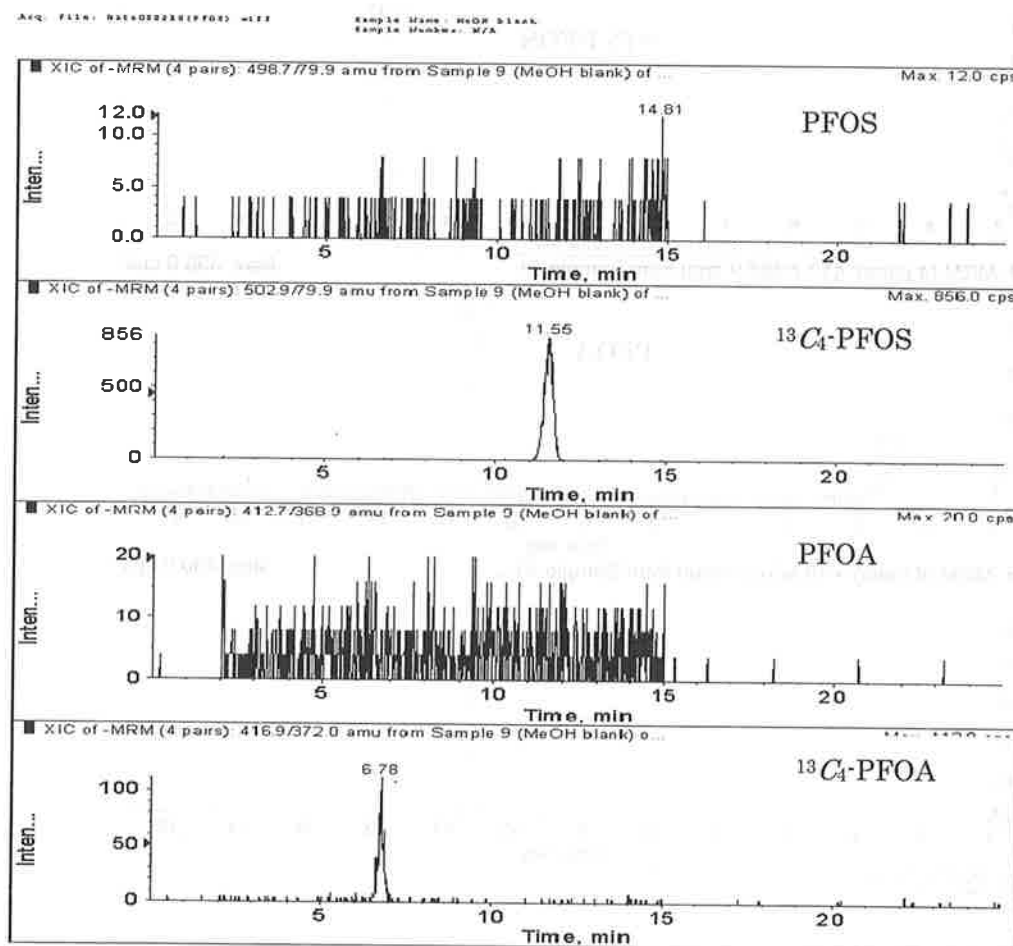


図 14 LC 条件違いによる PFOS/PFOA のブランク確認-4

【評価】

本法により、母乳及び臍帯血・血液試料中の 0.01~0.02 ng/g レベルに存在する PFOS 及び PFOA の定量が可能である。

参考までに、母乳及び血液(全血)試料のクロマトグラムを以下に示す。

Printing Time: 11:04:38 AM
Printing Date: Tuesday, August 19, 2008

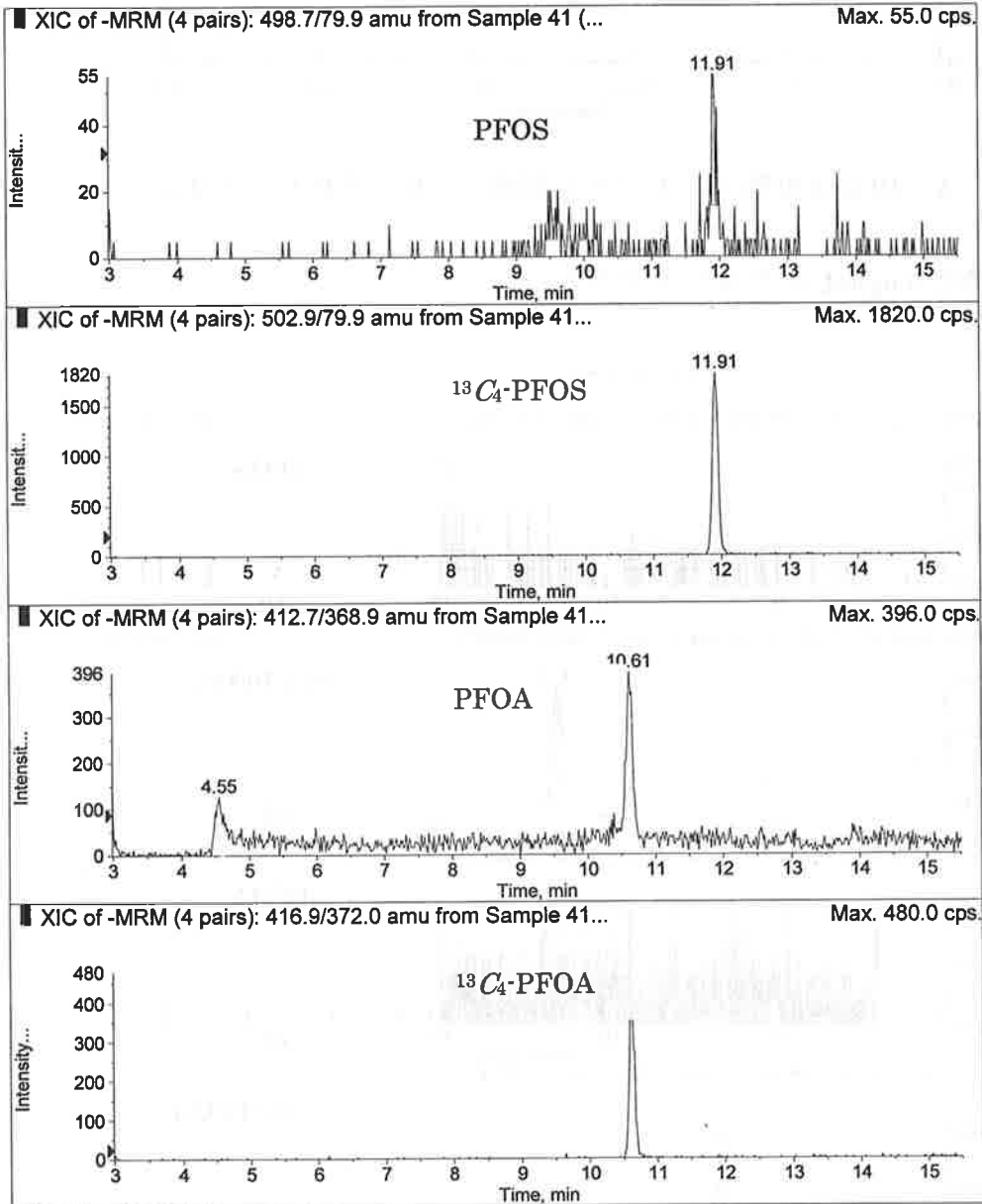


図 15 母乳試料の PFOS/PFOA のクロマトグラム

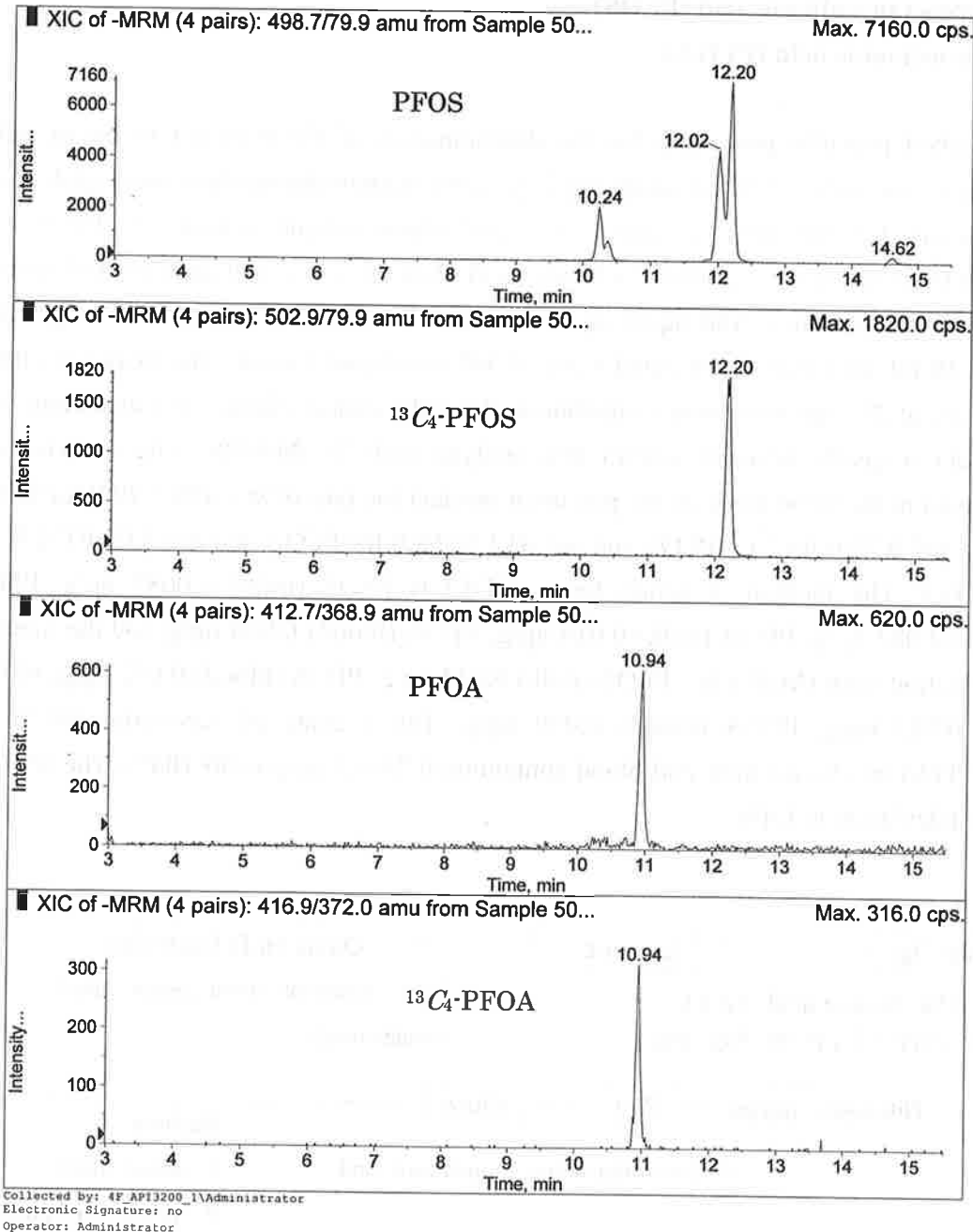


図 16 血液（全血）試料の PFOS/PFOA のクロマトグラム

【担当者氏名・連絡先】

担当 株式会社島津テクノリサーチ

住所 〒604-8436 京都市中京区西ノ京三条坊町 2-13

TEL : 075-811-3182 FAX : 075-811-3278

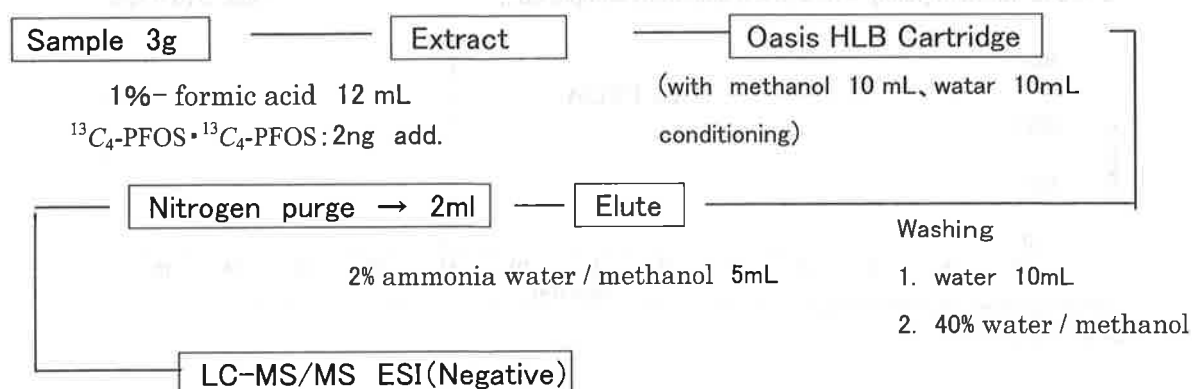
担当者 青野さや香 s_aono00@shimadzu-techno.co.jp

大井悦雅 e_ohi00@shimadzu-techno.co.jp

Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)

Perfluorooctanoic acid (PFOA)

This method provides procedure for the determination of PFOS/PFOA in breast milk, maternal blood and cord blood sample by liquid chromatography/tandem quadrupole mass spectrometry (LC/MS/MS). A breast milk and blood sample spiked $^{13}\text{C}_4$ -PFOS and $^{13}\text{C}_4$ -PFOA as surrogate is added 1% formic acid. And then, it is extracted with ultrasonic extraction for 5 minutes. And liquid layer is passed through an Oasis HLB cartridge. It is washed 10 mL of water, and washed 5 mL of 40% methanol / water. The extract is eluted with 5 mL of 2% ammonia water / methanol. After the eluted solution is concentrate to 2 mL under a gentle nitrogen stream and analyze with LC/MS/MS. The analytes are determined in the SRM mode as the precursor/product ion pair of m/z 498.7/79.9 for PFOS and m/z 502.9/79.9 for $^{13}\text{C}_4$ -PFOS and m/z 412.7/368.8 for PFOA and m/z 416.9/372.0 for $^{13}\text{C}_4$ -PFOA. The method detection limit (MDL) is PFOS (milk) 0.0087 ng/g, PFOS (blood) 0.0082 ng/g, PFOA (milk) 0.014 ng/g, PFOA (blood) 0.010 ng/g, and the method quantification limit (MQL) is PFOS (milk) 0.034 ng/g, PFOS (blood) 0.032 ng/g, PFOA (milk) 0.053 ng/g, PFOA (blood) 0.039 ng/g. The average of recoveries (N=5) of PFOS/PFOA in a breast milk and blood containing 0.33-0.5 ng/g is 80-104%. The relative standard deviation is 1.4%.



物質名	分析法フローチャート	備考
Perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) Perfluorooctanoic acid (PFOA)	<p>試料 3g</p> <p>超音波抽出 5分間</p> <p>1%-ギ酸 12mL サロゲート:2ng 添加 1%ギ酸水溶液 12 mL</p> <p>Oasis HLB カートリッジ</p> <p>ミリQ水 10 mL 前捨て 40%メタノール 5 mL 前捨て 2%アンモニア水/メタノール 5 mL で溶出</p> <p>ページ</p> <p>LC-MS/MS</p> <p>2 mL まで ESI (Negative)</p>	装置 : API-3200 LC/MS/MS ESI 負イオン <PFOS> Q1/Q3→ 498.7/79.9 ¹³ C ₄ - surrogate Q1/Q3→ 502.9-79.9 <PFOA> Q1/Q3→ 412.7/368.8 ¹³ C ₄ - surrogate Q1/Q3→ 416.9/372.0 カラム Inertsil ODS-SP 2.1×150 mm (5 μm) 検出下限(MDL) PFOS 0.0082 ~ 0.0087 ng/g PFOA 0.010~0.014 ng/g