

EU 飲料水指令 2020/2184 の要件を満たすための UPLC-MS/MS を使用したダイレクト注入による飲料水中のペルフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物（PFAS）のルーチン測定

Hannah Willmer, Kari L. Organtini, Stuart Adams

Waters Corporation

要約

この研究の目的は、2020年に改訂されたEU飲料水指令のパラメトリックレベルの要件に対応する、飲料水中のPFAS化合物を測定するためのダイレクト注入を用いたUPLC-MS/MS分析法を実証することです¹。この分析法のパフォーマンス試験を、ACQUITY Premier BEH Shield RP₁₈カラムを使用し、Xevo TQ-XSとUniSprayイオン源の組み合わせを搭載したACQUITY UPLC I-Class PLUSシステムで実施しました。サンプルは、内部標準を含む酸性有機溶液で直接希釈し、オートサンプラーバイアルに入れて調製しました。

既知の軟水区域と硬水区域からの水道水、およびボトル入りミネラルウォーターの3種の一般的な飲料水マトリックスに対して、分析法のバリデーション試験を実施しました。この分析法のパフォーマンスを、すべての分析種について2、10、100 ng/L（バイアル中濃度1.2、6、60 ng/L）の3種のスパイクレベルを使用し、各濃度につき7回の繰り返し測定で評価しました。12種の分析種は内部標準を使用して補正しましたが、PFPS、PFHpS、PFNS、PFTrDA、PFDS、PFUnDS、PFDoDS、およびPFTrDSには適した内部標準がありませんでした。真度に関する分析法のパフォーマンスの平均値は、すべてのマトリックスにわたって89～112%でした。RSDはすべて14%以下でした。

すべてのキャリブレーショングラフの残差が20%以下で、線形回帰近似でのR²値は0.99以上でした。すべての分析種について、分析法バリデーション試験のすべてのバッチにわたる保持時間の安定性はRSD 3.2%未満でした。

アプリケーションのメリット

- 時間のかかるクリーンアップや濃縮ステップを必要とせず、飲料水中の 1 ng/L 以下の低濃度の残留物を測定できる高感度分析
- Waters PFAS キットと分離カラムを LC に取り付けてシステムおよび溶媒の汚染物質を低減および分離することで、結果の信頼性が向上
- 2020 EU 飲料水指令の要件を大幅に上回る 1 化合物あたりの LOQ 1 ng/L で、20 種の PFAS すべてを検出および定量するのに適したダイレクト注入を用いた UPLC-MS/MS 分析法を用いたトータルソリューションを提供

はじめに

ペルフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物（PFAS）は、そのユニークな特性、多様な官能基、安定性により、極めて有用であり、業界で広く使用されています。その結果、残留性および生物蓄積性のある汚染物質が、さまざまな消費財や工業プロセスの副生成物に広く見られ、非粘着性コーティングの製造から泡消火剤における使用まで、さまざまなソースを通じて環境に導入されています。

これらの化合物の化学的性質は望ましい商品作りに寄与している一方で、これらの化合物には生分解性がなく、さまざまな環境区画内で容易に移動し、環境や身体に対して強い残留性を示します。研究により、これらの化合物は、免疫系や発達系に与える影響や発癌性物質の可能性など、人体への悪影響に関連付けられています。

EU は現在、更新された欧州飲用水指令 2020/2184 に含まれる 20 種類の一連の PFAS 化合物を規制対象にしています¹。この指令では、PFAS 化合物の高い汚染可能性を認め、人による消費を目的とする水に存在する懸念があると考えられる 20 種の個別の指定 PFAS 化合物の合計に対して 0.1 µg/L という限度を課しています。このアプリケーションノートでは、3 種の飲料水マトリックス（軟水道水、硬水道水、ミネラルウォーター）に対する Xevo TQ-XS と組み合わせた ACQUITY UPLC I-Class の性能について説明します。これらのサンプルを酸性有機溶液（内部標準を含む）で希釈し、更なる濃縮やクリーンアップを行わずに LC-MS/MS にダイレクト注入しました。

20 種の個々の PFAS 化合物の検出要件は、ng/L または一兆分の一（ppt）の範囲であり、高感度の分析法が必要です。PFAS は、ネガティブエレクトロスプレーイオン化（ESI⁻）を使用して十分反応するので、これが望ましい分析方法となっています。このイオン化手法はよく機能するものの、検出の要件がますます厳しくなると、UniSpray のような手法によって得られる可能性があるレスポンスの向上が有用になる可能性があります。

UniSpray は、1 回の注入で極性分析種と非極性分析種の両方をマルチモードでイオン化できる、新しい大気圧イオン化手法です。カラムの溶出液は、接地され、加熱されたプローブから出るときに霧状になります。このスプレーは、高電圧で保持されているステンレス製ピンに向けられます。これにより、エレクトロスプレーと同様の液滴が生じ、イオンの脱溶媒化が高まります。霧のフローは、コアンダ効果により、インパクターピンの表面を周ってサンプルコーンの中に向かって曲がります。このメカニズムにより、イオン化とサンプリングの効率が向上します²⁻³。

感度を更に向上させるための追加の調査として、従来の ACQUITY UPLC カラムと同等のケミストリーの ACQUITY Premier カラムを比較試験として評価しました。MaxPeak High Performance Surfaces (HPS) テクノロジーを採用した ACQUITY Premier カラムは、分析種の損失やクロマトグラフィー性能の低下につながる分析種/流路間の相互作用を最小限に抑えることで、分離性能と再現性が最大限に高まるように設計されています。

実験方法

サンプルの説明

1 リットルの水を、英国の既知の軟水および硬水の水源から採取し、分析まで 50 mL の遠心チューブ中で室温で保管しました。ミネラルウォーターは英国の小売店から購入し、使用するまで元の容器中で室温で保管しました。

PFAS は広く使用されているため、必要な検出限界は ng/L 単位で非常に低い範囲となり、サンプル採取、前処理、分析に関わる固有の課題に対処する必要があります。汚染の可能性があるためにラボで避けるべきアイテムとして、付箋、特定の使い捨てピペット、テフロンシール付きバイアルキャップ、LDPE コンテナなどが挙げられます。実現可能であれば、サンプル分析の前に、消耗品や試薬を PFAS の有無についてスクリーニングすることが推奨されます。

クロマトグラフィーシステムおよび溶媒からの汚染は避けることができません。したがって、これらの汚染原因を最小限に抑えるための対策を講じる必要があります。そのため、従来のテフロンコーティング溶媒ラインなどのアイテムを PEEK チューブに置き換えた PFAS フリーのコンポーネントで構成された PFAS キットを取り付けました。分析ピークとの共溶出による残留バックグラウンド干渉を遅らせるために、分離カラムも取り付けました。キットとカラムの取り付けは簡単であり、短時間で完了できます⁴。

分析条件

300 μ L の水サンプルをオートサンプラーバイアルに直接分注し、10 ng/L の内部標準を含む 200 μ L の酸性有機試薬で希釈した後、シールして UPLC-MS/MS によるダイレクト注入に用いました。サンプル前処理のワークフローについては、図 1 を参照してください。最終サンプル中の成分の比率は、60: 29.9: 10: 0.1 v/v/v/v 水サンプル: アセトニトリル: メタノール: ギ酸と同等にしました。

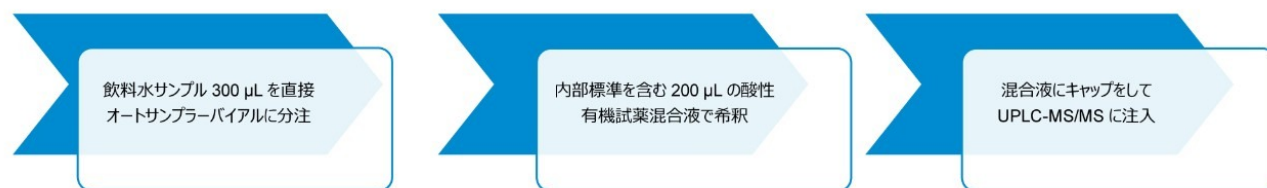


図 1. 飲料水サンプルの前処理ワークフロー

2020 EU 飲料水指令に記載されている 20 種の PFAS すべてについて、3 種類のマトリックスすべてに対し、各濃度 (2

ng/L、10 ng/L、100 ng/L) につき 7 回の繰り返しで、回収率を調べるためのスパイクを行いました。マトリックスマッチド標準試料をそれぞれのブランク抽出物中に調製しました。すべての分析種について、キャリブレーション範囲は 1 ~ 200 ng/L でした。スパイクサンプルの定量は、可能な場合は内部標準を使用したマトリックスマッチドブラケットキャリブレーションによって行いました。適切な内部標準がすべての PFAS 分析種について利用可能ではなかったため、詳細については付録 A を参照してください。このアプリケーションでは、残留物の定量と確認に、付録 A に示す MRM を使用しました。

LC 条件

LC システム:	Waters PFAS キット (製品番号: 205000588) および分離カラム (製品番号: 186004476) を取り付けた固定ループサンプルマネージャを搭載した ACQUITY UPLC I-Class PLUS
検出:	Xevo TQ-XS
バイアル:	TruView LCMS 認定透明ガラス 12 × 32mm スクリューネックマキシマムリカバリーバイアル、キャップおよび PTFE/シリコンセプタム付き、1.5 mL (製品番号: 186005668CV)
カラム:	ACQUITY Premier BEH Shield RP ₁₈ 、1.7 μm、2.1 mm × 100 mm (製品番号: 186009498)
カラム温度:	45 °C
サンプル温度:	15 °C
注入量:	50 μL
流速:	0.350 mL/分
移動相 A:	2 mM 酢酸アンモニウム含有水: メタノール 95: 5 (v/v)
移動相 B:	2 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液

MS 条件

MS システム:	Xevo TQ-XS
イオン化モード:	UniSpray ネガティブ
取り込み範囲:	MRM
インパクター電圧:	0.9 kV
脱溶媒温度:	400 °C
脱溶媒ガス流量:	1000 L/時間
コーンガス流量:	150 L/時間
イオン源温度:	110 °C

MRM トランジション

各化合物の MRM パラメーターは付録 A に記載されています。

データ管理

インフォマティクス:	MassLynx v4.2
------------	---------------

結果および考察

サンプル組成がピーク形状に与える影響

短鎖と長鎖の PFAS 化合物を同時に分析する場合は、すべての分析種の性能を最大限に引き出すために、最終的なサンプル組成のバランスを慎重に取る必要があります。その後、水溶性の低い長鎖 PFAS 化合物は、水性組成での希釈度が高くなるに従って感度が低下することが確認されました。水含量を減らして長鎖 PFAS の溶解性に対処した結果、最終的なサンプル組成が最初の LC 開始条件よりも有機物含量が多くなり、早く溶出する短鎖化合物のピーク幅が広がりました。特に注入量が多い場合は、LC 開始条件に関連して最終的なサンプル組成を慎重に検討しました。

有機溶媒に対する水系サンプルのさまざまな組成比について試験しました。メタノールとアセトニトリルをそれぞれ個別に調査し、両者の混合液も希釈溶媒の有機成分として調査しました。アセトニトリルとメタノールの混合液が、分析に含まれる PFAS 鎖のすべての範囲にわたって、化合物を最適化するための水性サンプルに最適な希釈溶媒であることが分かりました。この例を図 2 に示します。サンプルを酸性化して感度を高めるために、最初は酢酸を使用していましたが、この試薬には微量の PFAS が含まれていたため、ギ酸に代えました。バイアル内で直接サンプルを希釈することで、化合物の損失を軽減できました。

早く溶出する化合物のピーク形状を更に改善するため、インジェクターバルブと分析カラムの間に拡張ループアセンブリー（50 μ L、製品番号：[430002012 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/service-parts--kits/430002012-assembly-extension-loop-50--l.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/service-parts--kits/430002012-assembly-extension-loop-50--l.html)）と ACQUITY カラムインラインフィルターキット（製品番号：[205000343 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/service-parts--kits/205000343-kit-acquity-column-in-line-filter.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/service-parts--kits/205000343-kit-acquity-column-in-line-filter.html)）を取り付けました。これにより、サンプルをカラムにロードする前に余分なボイドボリュームが得られ、サンプル/移動相の混合が更によくなって、分析種を LC カラムに集中させることができました。

長鎖 PFAS に ACQUITY Premier カラムを使用する利点

最初の分析法開発では、ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈ カラムを使用して適切なピーク形状と分離を得ることができました。分析を更に改善できるかどうかを調べるため、ACQUITY Premier BEH Shield RP₁₈ カラムについて更なる調査を行いました。短鎖～中鎖化合物の場合、ACQUITY Premier カラムを使用しても、ACQUITY UPLC カラムと比較して感度に大きな変化はありませんでした。一方、長鎖化合物（ $\geq C_{10}$ ）では感度が顕著に向上し、試験した PFAS のうちで鎖長が最長の PFTrDS では、面積とシグナル/ノイズ比が最大 20 倍になりました。必要な最終サンプル組成を考慮すると、感度の点で長鎖 PFAS はかなり困難であったため、ACQUITY Premier BEH Shield RP₁₈ カラムで向上が確認されたことで、このアプリケーションにこのカラムを選択した理由が説明できました。図 3 に、ACQUITY UPLC カラムおよび ACQUITY Premier カラムを使用して短鎖、中鎖、長鎖の PFAS を比較したクロマトグラムの例を示します。

UniSpray イオン源の使用による検出および感度の向上

エレクトロスプレーイオン化と UniSpray イオン化による直接比較を、それぞれのイオン源の種類で、硬水および LCMS グレード水のサンプルを含むバリデーションバッチを繰り返すことにより行いました。ピーク面積、ピーク高さ、シグナル/ノイズ比を比較して測定したところ、UniSpray イオン源では、すべての化合物について感度が一貫して向上していました。クロマトグラムの比較を図 4 に示します。ピーク面積が平均 18 倍、シグナル/ノイズ比が 5 倍増加していることが分かりました。長鎖 PFAS の検出感度が向上したことで、注入量を適切な量に調整でき、早く溶出する短鎖 PFAS のクロマトグラフィーを改善することができます。最終注入量 50 μ L で、適切なピーク形状で十分な感度が得られると判断しました。

分析法のバリデーション試験の結果

マトリックスマッチド検量線を分析法のバリデーション試験を通して使用しました。検量線の例を図 5 に示します。すべての分析種について、バリデーション試験の各検量線グラフは、1/X 線形回帰近似を用いて決定係数 0.990 以上を示

し、残差はすべて 20% 未満でした。図 5 には、1 ng/L 濃度の水溶液として注入した化合物のクロマトグラムも示します。

全体として、分析法のパフォーマンスは、図 6 に示した回収率の値としてまとめられます。3 種類のバリデーションバッチで評価することで、軟水、硬水、ミネラルウォーターの特性範囲の代表的な種類の飲料水をカバーしています。これらのバッチにはそれぞれ、3 濃度（2、10、100 ng/L）での 7 回の添加回収が含まれていました。すべての独立の PFAS 化合物、濃度およびマトリックスで、化合物ごとに 80 ~ 120% の平均回収率を示しています（図 6 を参照）。この方法の再現性を、回収率を調べるためのサンプルで評価したところ、すべての PFAS の RSD が 13% 未満でした。ただし、例外として、最も長鎖のスルホン酸塩である PFTTrDS は軟水中で 23.5% でした。%RSD の値は、図 6 のエラーバーによって示されています。

3 種類の分析法バリデーションバッチにわたるすべての分析種の全体的な保持時間は、3.2% RSD 以内であり、水の種類に関係なく、試験全体での保持時間が安定していました。ミネラルウォーターについては、保持時間の安定性試験を更に行いました。この試験では、オペレーターの操作なしで 10 ng/L のマトリックスキャリブレーション標準試料を 200 回注入しました。保持時間は安定しており、測定全体にわたるすべての化合物の保持時間の RSD は 0.6% RSD 以内で、ピーク形状に大きな変化は見られませんでした。詳細については、図 7 を参照してください。

結論

分析法バリデーション試験の結果からは、ペルフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物の定量に適した頑健な分析法であることが示されています。この分析法は、2020 EU 飲料水指令に含まれる 20 種類の PFAS 化合物すべてを測定するように最適化されています。個々の PFAS について 1 ng/L という低濃度が達成され、飲料水のモニタリングに必要な PFAS の限度である合計で 0.1 µg/L が補完されました。分析は、分離カラムおよび PFAS キットコンポーネントを取り付けた ACQUITY UPLC I-Class と Xevo TQ-XS との組み合わせで実施し、分離には ACQUITY Premier BEH Shield RP₁₈ カラムを使用して、正確で信頼性の高い結果を得ました。ACQUITY Premier カラムテクノロジーと独特の UniSpray イオン源を使用することで、追加のクリーンアップや濃縮ステップを必要とせずに、ダイレクト注入法でこのような低濃度レベルを達成できました。

この LC-MS/MS 分析法の真度と精度を、3 種類のマトリックス QC レベルでの 7 回の繰り返し注入で判定し、鎖長とは無関係にすべての化合物について合格範囲であることが分かりました。保持時間の安定性が試験全体にわたって証明され、すべての化合物について、分析法の性能バッチすべてにわたる RSD が 3.2% 未満でした。LOQ が 1 ng/mL であることで、この分析法は EU 飲料水指令 2020/2184 の要件を大幅に上回っています。

科学者は各自のラボの分析法をバリデーションし、その性能が目的に適合しており、また関連の分析コントロール保証システムのニーズを満たしていることを証明しなければなりません。

参考文献

1. Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the Quality of Water Intended for Human Consumption (Recast) [Online] <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj> <<https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj>>.
2. Lubin A; Bajic S; Cabooter D; Augustijns P; Cuyckens F. Atmospheric Pressure Ionization Using a High Voltage Target Compared to Electrospray Ionization, *J. Am.Soc.Mass Spectrom.*2016, 28.
3. Lubin A, De Vries R, Cabooter D, Augustijns P, Cuyckens F. An Atmospheric Pressure Ionization Source Using a High Voltage Target Compared to Electrospray Ionization for the LC-MS Analysis of Pharmaceutical Compounds.*J. Pharm.Biomed.Anal.*2017, 142.
4. Organtini K, Cleland G, Rosnack K. Large Volume Direct Injection Method for the Analysis of Perfluorinated Alkyl Substances (PFAS) in Environmental Water Samples in Accordance with ASTM 7979-17. Waters Application Note, [720006329EN](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720006329EN), 2018.
5. PFAS Analysis Kit for ACQUITY UPLC Systems. Waters User Guide [715006386 <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715006386v02.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715006386v02.pdf), Version 2, 2021.
6. Startup Guide for the Analysis of Perfluorinated Alkyl Substances (PFAS) in Environmental Samples. [720006787EN <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720006787en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720006787en.pdf), 2020.

ソリューション提供製品

- [ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)
- [Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計 <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)
- [MassLynx MS ソフトウェア <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

720007413JA、2021年10月



© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.