１．直接注入－液体クロマトグラフ質量分析法による有機フッ素化合物の測定における前処理方法の検討

鶴田　朋子
板倉　愛実
今中　壮一

１．はじめに

ペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）及びペルフルオロオクタン酸（PFOA）を代表とする有機フッ素化合物（PFCs）は、耐水性・耐油性・耐熱性・耐薬品性等の性質を有することから、これまで広範な工業用品の製造に使用されてきたが、難分解性や高い生物蓄積性を有し、近年環境水や野生生物中に広範囲に存在していることが報告されており、国内外で製造、使用及び輸出入に関する規制が強化される方向にある。

日本の水道水質基準制度においては、平成21年４月にPFOSとPFOAが要検討項目に位置付けられた[1)]。さらに、令和２年４月には、PFOSとPFOAを水質管理目標設定項目に格上げするとともに、目標値をPFOS及びPFOAの合算値で50ng/L以下(暫定値)に設定した[2)]。また、令和３年３月26日の通知において、ペルフルオロヘキサンスルホン酸（PFHxS）が要検討項目に追加されている[3)]。

本市では、平成17年度からPFCsに関する調査に取り組み、水道水源である淀川水系における存在実態及び浄水処理性を明らかにしてきた[4)～7)]。製造・使用に関する規制が強化されてきたにもかかわらず、現在でも水道水源及び水道水中に一定の濃度レベルで存在すること[8)]、新規に使用開始した粒状活性炭以外では除去が期待できないこと[4)]及び国内外での規制強化の流れを鑑みると、PFOS・PFOA・PFHxS並びにこれらの類縁化合物の水源や浄水処理工程における存在実態を監視し、水道水の安全性を確認する必要性は今後ますます高まると考えられる。

一方、PFCsの分析法については、厚生労働省の通知法ではPFOS・PFOA・PFHxSを対象として、固相抽出―液体クロマトグラフ質量分析法が示されている[9)]が、前処理工程が多く、測定に時間を要するため、PFCsの監視強化を図る上で、より迅速に測定可能な手法の確立が望まれる。そこで、固相抽出操作を必要としない直接注入―液体クロマトグラフ質量分析法によるPFCsの分析方法の確立を目的として検討を行った。

表-1　調査対象物質とサロゲート物質

化合物名	略号	炭素数
ペルフルオロアルキルスルホン酸	PFBS	4
	PFPeS	5
	PFHxS	6
	PFHpS	7
	PFOS	8
	PFNS	9
	PFDS	10
	PFDoS	12
ペルフルオロアルキルカルボン酸	PFBA	4
	PFPeA	5
	PFHxA	6
	PFHpA	7
	PFOA	8
	PFNA	9
	PFDA	10
	PFUdA	11
	PFDoA	12
	PFTrDA	13
	PFTeDA	14
	PFHxDA	16
	PFODA	18
サロゲート物質（ペルフルオロアルキルスルホン酸）	$^{13}C_3$-PFBS	4
	$^{13}C_3$-PFHxS	6
	$^{13}C_8$-PFOS	8
サロゲート物質（ペルフルオロアルキルカルボン酸）	$^{13}C_4$-PFBA	4
	$^{13}C_5$-PFPeA	5
	$^{13}C_5$-PFHxA	6
	$^{13}C_4$-PFHpA	7
	$^{13}C_8$-PFOA	8
	$^{13}C_9$-PFNA	9
	$^{13}C_6$-PFDA	10
	$^{13}C_7$-PFUdA	11
	$^{13}C_2$-PFDoA	12
	$^{13}C_2$-PFTeDA	14

２．調査方法

２．１　調査対象物質及び試薬

調査対象物質を**表-1**に示す。**表-1**には調査対象物質の定量に用いるサロゲート物質についても併記した。

PFCsの混合標準原液と混合サロゲート標準原液は、それぞれPFAC-MXC及びMPFAC-C-ES（共にWellington Laboratories Ins.製）を使用した。メタノール、アセトニトリル及び酢酸アンモニウムはLC/MS用を用いた。精製水はMilli-Q超純水製造装置（Milli-Q Integral 10、メルク㈱製）で製造したものを使用した。

２．２　分析装置

PFCs の分析には、液体クロマトグラフータンデム質量分析計（LC-MS/MS）（LC：Nexera X2、MS/MS：LCMS-8060（共に㈱島津製作所製））を用いた。分析条件を**表-2** に示す。なお、LC システム由来の PFCs と試料中の PFCs を分離するため、ミキサーとオートサンプラーの間にリテンションギャップカラムを接続し、分析を行った。

２．３　試料調製

２．３．１　標準液の調製

２．１に示した混合標準原液及び混合サロゲート標準原液をそれぞれメタノールで希釈し、100μg/L の混合標準液及び混合サロゲート標準液とした。これらの標準液を２．３．２以降の試料調製に用いた。

２．３．２　最適な検液溶媒の検討

混合標準液と混合サロゲート標準液を混合し、メタノールで希釈した混合標準・サロゲート溶液を調製した（各５μg/L）。この溶液を精製水とメタノールで水：メタノール比率がそれぞれ設定した比率となるよう希釈し、LC-MS/MS 分析に供した（各 100ng/L）。なお、希釈の際には混合標準・サロゲート溶液によるメタノールの添加量（メタノール濃度２%相当）を考慮し、試料を調製した。

２．３．３　精製水・浄水試料の添加回収試験

混合標準液及び混合サロゲート標準液をメタノールで希釈した後、精製水とメタノールで段階的に希釈し、検量線用標準試料を調製した（検量点：１、２、５、７、10、20、50ng/L）。

精製水及び本市柴島浄水場浄水に上記の混合標準液、混合サロゲート標準液及びメタノールを添加し、添加回収試験用試料とした。調査対象物質は、水試料中に含まれる濃度が１、２、５、７ng/L となるよう添加した。試料は添加試料・無添加試料共に５本ずつ調製した。なお、本市では高度浄水処理を採用しており、凝集沈澱処理後に中オゾン処理と急速砂ろ過処理を行った後、オゾン処理と粒状活性炭処理を行っている。

全ての試料に対し、水：メタノール比率 90：10 試料及び水：メタノール比率 45：55 試料の両方を調製し、各サロゲート物質の添加濃度は 50ng/L とした。なお、検量点の濃度は、水試料中に含まれる

表-2　LC-MS/MS 分析条件

LC条件			
リテンションギャップカラム	Acquity UPLC BEH C18 1.7μm 3.0×50mm（日本ウォーターズ㈱製）		
分析カラム	Acquity PREMIER BEH C18 1.7μm VanGuard FIT 3.0×50mm（日本ウォーターズ㈱製）		
移動相	A：アセトニトリル B：10mM酢酸アンモニウム		
グラジエント条件	時間（分）	A（%）	B（%）
	0	10	90
	0.5	10	90
	12.0	98	2
	13.8	98	2
	14.0	10	90
	19	10	90
オーブン温度	40℃		
注入量	50μL		
流速	0.3mL/min		

MS条件	
イオン化法	ESI（−）
Probe Voltage	−0.3kV
Mode	MRM
Nebulizing gas flow	2.5mL/min
Drying gas flow	5mL/min
Heating gas flow	15mL/min
DL temp.	200℃
Heat Block Temp.	300℃
Interface Temp.	300℃

MRM条件

No.	化合物名	プリカーサーイオン（m/z）	プロダクトイオン（m/z） 定量イオン	CE（eV）	確認イオン	CE（eV）	対応するサロゲート物質No.
1	PFBS	299.1	99.1	28	80.1	31	22
2	PFPeS	349.1	99.0	34	80.1	36	
3	PFHxS	399.1	99.1	39	80.1	44	23
4	PFHpS	449.1	99.1	39	80.1	48	
5	PFOS	499.3	99.0	41	80.1	52	24
6	PFNS	549.3	99.1	49	80.1	52	
7	PFDS	599.2	99.1	49	80.1	54	
8	PFDoS	699.2	99.0	72	80.1	72	
9	PFBA	213.2	169.3	9	-	-	25
10	PFPeA	263.1	219.3	8	-	-	26
11	PFHxA	313.2	269.3	8	119.2	21	27
12	PFHpA	363.1	319.2	9	119.2	20	28
13	PFOA	412.9	169.1	16	369.1	9	29
14	PFNA	463.1	419.2	12	219.1	15	30
15	PFDA	513.1	469.1	10	269.2	16	31
16	PFUdA	563.1	519.2	11	319.2	17	32
17	PFDoA	613.1	569.1	12	369.2	17	33
18	PFTrDA	663.2	619.2	12	419.2	18	
19	PFTeDA	713.2	669.2	12	469.0	20	34
20	PFHxDA	813.2	769.1	40	569.3	26	
21	PFODA	913.2	869.1	17	668.9	18	
22	$^{13}C_3$-PFBS	302.2	99.0	30	-	-	−
23	$^{13}C_3$-PFHxS	402.1	99.0	38	-	-	
24	$^{13}C_8$-PFOS	507.1	99.1	46	-	-	
25	$^{13}C_4$-PFBA	217.1	172.3	7	-	-	
26	$^{13}C_5$-PFPeA	268.1	223.3	8	-	-	
27	$^{13}C_5$-PFHxA	318.1	273.2	8	-	-	
28	$^{13}C_4$-PFHpA	367.1	322.2	9	-	-	
29	$^{13}C_8$-PFOA	421.1	376.2	10	-	-	
30	$^{13}C_9$-PFNA	472.3	427.2	11	-	-	
31	$^{13}C_6$-PFDA	519.3	474.1	10	-	-	
32	$^{13}C_7$-PFUdA	570.2	525.2	12	-	-	
33	$^{13}C_2$-PFDoA	615.2	570.1	12	-	-	
34	$^{13}C_2$-PFTeDA	715.2	670.2	14	-	-	

PFCs の濃度として設定している。

３．結果と考察

３．１　最適な検液溶媒の検討

逆相クロマトグラフィーによる分離では、グラジエント分析の場合、初期の移動相組成を溶媒比率の低い条件とし、測定対象物質を分析カラムに保持させた後、徐々に溶媒比率を上昇させ、溶出する手法が一般的である。そのため、試料を初期移動相より溶解性の高い溶媒に溶かして注入すると、カラム内で濃縮されずに拡散してしまい、クロマトグラフの再現性に影響するため、試料の検液溶媒は初期移動相に近い組成とすることが望ましいとされている[10]。しかし、調査対象の PFCs は、炭素数が C4～C18 と多岐に亘っているため、オクタノール－水分配係数（$\log K_{ow}$）（1.82～11.54）や水溶解度（4.7×10^{-10}～1.4×10^{3}）等の化学的性質が広範に及んでおり[11]、溶媒に対する溶解度が物質によって大きく異なる。このため、最適な検液溶媒の組成を検討するため、比較的高濃度、すなわち十分な装置感度を有し、容器吸着の影響を無視できる濃度の試料を繰り返し測定し、再現性を確認した。

表-2 に示した LC 条件の初期移動相と同じ溶媒比率（水：メタノール比率 90:10）とした時の各物質の面積値の変動係数（CV%）を**図-1** に示す（n=５）。

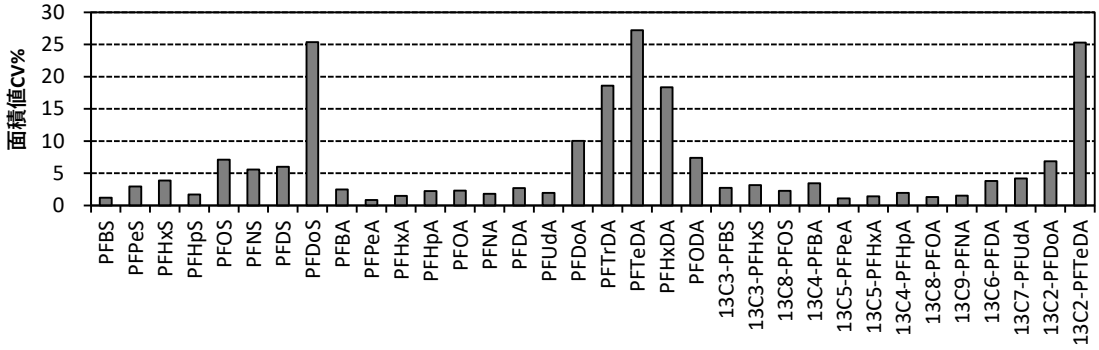

図-1　検液溶媒の水：メタノール比率を 90:10 とした時の面積値の CV%

調査の結果、炭素鎖が比較的短い物質については、５回測定の面積値のばらつきは小さく、良好な再現性が確認されたが、炭素鎖が長くなるほど、面積値の CV%が大きくなる傾向が見られた。特に PFDoS、PFDoA～PFODA 及び $^{13}C_2$-PFTeDA は高い値を示しており、定量再現性に影響する可能性が示唆された。この現象は、調査対象物質が検液溶媒へ均一に溶解していないことに起因していると推察され、炭素鎖の長い物質に対しては、溶媒比率を上げて溶解度を上げる必要があると考えた。そこで、検液溶媒のメタノール比率を 20%、50%、70%、90%に上げて比較検討を行った（n=３）。

水：メタノール比率 80：20 の面積値平均に対する各溶媒比率での面積値平均の比を**図-2**、水：メタノール比率 10：90 を除く各比率での面積値の CV%を**図-3** に示す。なお、検液溶媒の水：メタノール比率が 10：90 の場合の各物質の面積値の CV%は、いずれも 13%以上であった。

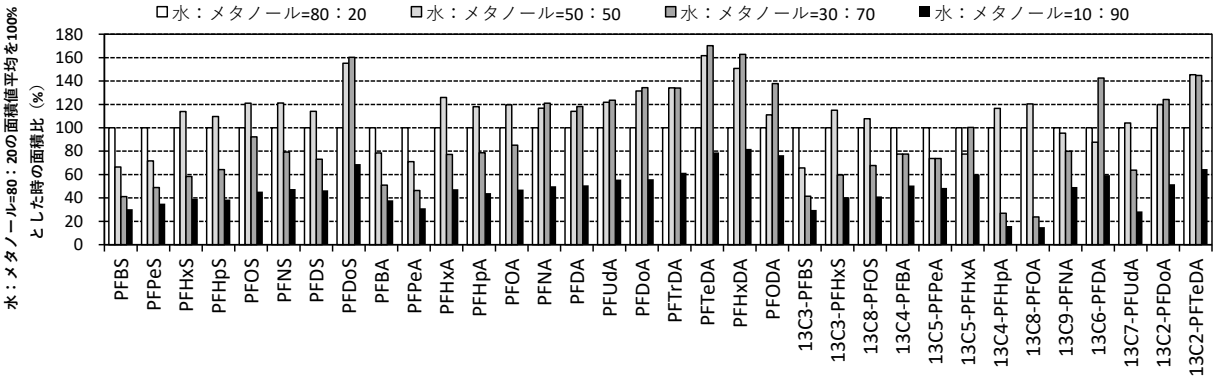

図-2　検液溶媒の水：メタノール比率と面積比

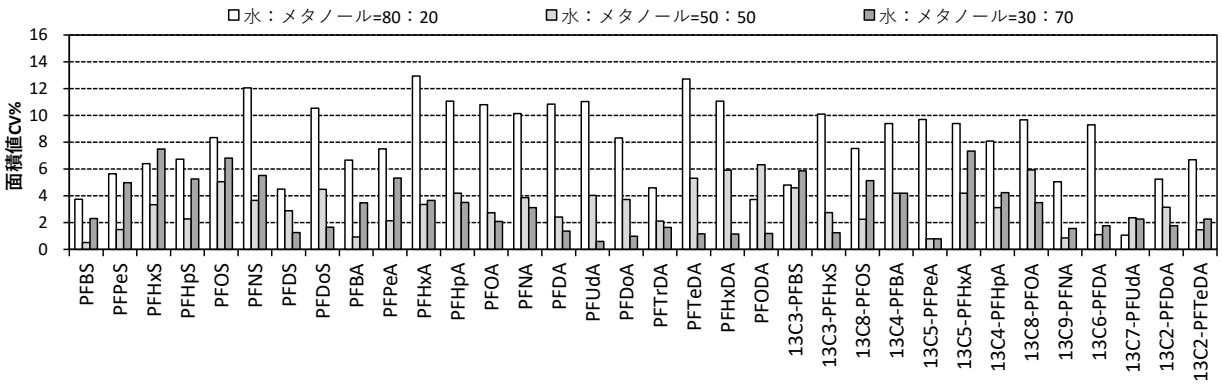

図-3　検液溶媒の水：メタノール比率と面積値のCV%

図-2 から、PFBS、PFPeS、PFBA、PFPeA 及びこれらに対応するサロゲート物質については、メタノール比率を上げるほど面積値平均は小さくなり、カラムへの保持が弱まっていると推察された。また、PFBA については、水：メタノール比率が 80：20 の場合においてもピークのリーディングが確認され、クロマトグラムの再現性に悪影響を及ぼすと考えられた。一方、これら以外の物質では、メタノール比率を 50 あるいは 70%とした時の面積値が最大となり、メタノール比率を 90%まで上げると面積値が低下する傾向を示した。また、**図-3** に示した面積値の CV%についても、水：メタノール比率を 50 あるいは 70%とすると、20%の場合よりも小さい傾向を示していることから、メタノール濃度を高めることにより調査対象物質の検液溶媒への溶解量のばらつきが小さくなっていると推察された。以上の結果から、C6 以上の PFCs に対する最適な検液溶媒の組成は、メタノール比率が 50～70%の間であると推定された。そこで、メタノール比率 50～70%の範囲内でメタノール濃度を５%ずつ変化させて５回の繰り返し測定を行い、面積値、CV%及びピーク形状の変化を確認した。これらの結果と実試料の測定への適用を想定した場合の作業工程（できる限り溶媒比率の種類を少なくする）等を総合的に考慮した上で、各物質に対する最適な検液の水：メタノール比率を**表-3** の通り決定し、測定対象物質により水：メタノール比率 90：10 と 45：55 の二種類の検液溶媒を使い分けることとした。

表-3　各物質に対する検液の水：メタノール比率

化合物名	PFBS	PFPeS	PFHxS	PFHpS	PFOS	PFNS	PFDS	PFDoS		
水：メタノール比率	90：10	90：10	90：10	45：55	45：55	45：55	45：55	45：55		
化合物名	PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA						
水：メタノール比率	90：10	90：10	90：10	90：10						
化合物名	PFOA	PFNA	PFDA	PFUdA	PFDoA	PFTrDA	PFTeDA	PFHxDA	PFODA	
水：メタノール比率	45：55	45：55	45：55	45：55	45：55	45：55	45：55	45：55	45：55	
化合物名	$^{13}C_3$-PFBS	$^{13}C_3$-PFHxS	$^{13}C_8$-PFOS							
水：メタノール比率	90：10	90：10	45：55							
化合物名	$^{13}C_4$-PFBA	$^{13}C_5$-PFPeA	$^{13}C_5$-PFHxA	$^{13}C_4$-PFHpA	$^{13}C_8$-PFOA	$^{13}C_9$-PFNA	$^{13}C_6$-PFDA	$^{13}C_7$-PFUdA	$^{13}C_2$-PFDoA	$^{13}C_2$-PFTeDA
水：メタノール比率	90：10	90：10	90：10	90：10	45：55	45：55	45：55	45：55	45：55	45：55

３．２　添加回収試験

表-2 に示した分析条件において、３．１の検討結果に基づき測定試料を調製した場合の各 PFCs の定量下限値を調査し、精製水・浄水を対象に添加回収試験結果を行った。結果を**表-4** に示す。

標準試料のクロマトグラムから、S/N 比が 10 となる濃度を算出して各物質の定量下限値を算出した結果、それぞれ１～7ng/L であった。合算での暫定目標値が設定された PFOS と PFOA の定量下限値は、暫定目標値 50ng/L に対し、それぞれ 1/10 及び 1/25 であった。また、２．３．３に示した検量点とサロゲート物質に対する調査対象物質の面積比の関係を直線回帰し、検量線を作成した結果、すべての物質の検量線の決定係数は、**表-4** に示した濃度範囲において 0.99 以上であった。

添加回収試験において、使用した浄水の無添加試料から定量下限値以上の濃度で検出された物質が存在したため、これらの物質については添加試料での定量値から無添加試料の定量値を差し引いて真度を算出した。調査の結果、真度は、精製水試料では 83.0～118%、浄水試料では 74.4～121%であり、併行精度は、精製水試料では 3.4～19%、浄水試料では 2.2～17%と、それぞれ妥当性評

表-4　添加回収試験結果

化合物名	検出下限値 (ng/L)	定量下限値 (ng/L)	添加濃度 (検量線下限値) (ng/L)	精製水試料		浄水試料			検量線	
				真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	無添加試料濃度 (ng/L)	濃度範囲 (ng/L)	決定係数 R^2
PFBS	0.5	1	1	83.0	19	108	14	<1	1-50	0.998
PFPeS	1	2	2	114	13	102	14	<2	2-50	0.997
PFHxS	1	2	2	99.2	3.9	94.8	9.4	<2	2-50	0.997
PFHpS	1	2	2	91.3	14	74.4	17	<2	2-50	0.998
PFOS	2	5	5	92.4	3.4	96.4	8.4	<5	5-50	0.996
PFNS	2	5	5	96.3	11	108	7.5	<5	5-50	0.997
PFDS	1	2	2	108	10	112	2.2	<2	2-50	0.997
PFDoS	2	5	5	99.1	7.8	96	8.3	<5	5-50	0.997
PFBA	1	2	2	84.5	12	118	4.7	3.5	2-50	0.999
PFPeA	0.5	1	1	103	9.9	102	4.2	2.6	1-50	0.999
PFHxA	1	2	2	92	8.0	121	4.5	3.6	2-50	0.997
PFHpA	1	2	2	103	10	109	7.5	2.7	2-50	0.999
PFOA	1	2	2	88.9	11	87.6	3.9	9.6	2-50	0.997
PFNA	1	2	2	102	7.9	83.4	6.4	<2	2-50	0.998
PFDA	2	5	5	113	7.0	116	3.0	<5	5-50	0.996
PFUdA	2	5	5	105	7.3	109	5.0	<5	5-50	0.994
PFDoA	2	5	5	114	6.7	94.2	5.2	<5	5-50	0.999
PFTrDA	2	5	5	95.0	9.5	91.8	7.6	<5	5-50	0.998
PFTeDA	2	5	5	118	12	109	6.6	<5	5-50	0.997
PFHxDA	3	7	7	100	5.2	101	3.8	<7	7-50	0.993
PFODA	2	5	5	100	12	102	12	<5	5-50	0.993

価ガイドラインの目標値（真度 70～130%、併行精度≦20%）[12] を満たしていた。

なお、本試験に使用した浄水試料から、PFBA、PFPeA、PFHxA、PFHpA 及び PFOA が定量下限値以上の濃度で検出された。これらの物質の検出濃度は、固相抽出－液体クロマトグラフ質量分析法にて分析した本市の実態調査結果[8] 及び本市と同様にオゾン－粒状活性炭処理を含む高度浄水処理が施された浄水からの検出濃度[13] と同程度であった。

以上の結果から、本法で検討した分析法は、水道水の PFCs のモニタリングに適用可能であると考えられた。

４．今後の課題

４．１　測定感度の向上

本分析法の測定感度を評価するため、実態調査での検出濃度と本分析法の定量下限値を比較した。令和２年度の実態調査において[8]、柴島浄水場下系浄水から検出された PFCs の物質名及び検出濃度と、本分析法の定量下限値を**表-5** に示す。

表中の灰色で塗りつぶした３物質の検出濃度は、本分析法での定量下限値を下回っていたことから、水道水源や水道水中の PFCs の存在実態をより的確に把握するためには、LC-MS/MS 分析条件の最適化等により、さらなる測定感度の向上が必要であると考えられた。

表-5　本分析法の定量下限値と
令和２年度柴島浄水場下系浄水の検出濃度の比較

単位：ng/L

物質名	定量下限値		固相抽出法での測定結果 柴島下系浄水			
	本分析法（直接注入法）	固相抽出法	4/8	7/1	10/7	1/6
PFBS	1	1	1	2	1	<1
PFHxS	2	1	<1	1	<1	<1
PFOS	5	1	2	4	2	<1
PFBA	2	1	1	1	<1	7
PFPeA	1	1	<1	2	2	3
PFHxA	2	2	2	3	4	5
PFHpA	2	2	<2	2	2	3
PFOA	2	2	5	7	7	11
PFNA	2	2	2	2	2	3

４．２　吸着対策の手法検討

今回の検討において、水道原水についても添加回収試験を試みたが、特に長炭素鎖の物質では良好な結果が得られなかった。その原因として、濁質除去工程（遠心操作）での容器への吸着が考えられたため、対策手段を検討することが必要不可欠である。

５．まとめ

１）直接注入－液体クロマトグラフ質量分析法による 21 種の PFCs の分析において、試料調製工程における最適な検液溶媒の組成を検討した結果、検液溶媒の水：メタノール比率を短炭素鎖 PFCs の測定では 90：10、中～長炭素鎖の PFCs の測定では 45：55 とすることにより、測定値のばらつきが改善された。

２）各物質の定量下限値は１～７ng/L であり、PFOS 及び PFOA については、それぞれ暫定目標値の 1/10 以下の定量下限値であった。検量線の直線性については、調査対象全ての PFCs の決定係数が 0.99 以上であった。添加回収試験の結果、精製水試料・浄水試料共に真度と併行精度は妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしていた。

３）今後の課題として、水道水源や水道水中の PFCs の存在実態をより的確に把握するための測定感度の向上と、長炭素鎖の物質を低濃度まで正確に測定するための吸着対策の手法の検討が必要である。

６．参考文献

１）厚生労働省、水質基準に関する省令の一部改正等における留意事項について、 健水発第 0306002 号（平成 21 年３月６日）

２）厚生労働省、水質基準に関する省令の一部改正等について（施行通知）、生 食 発 0330 第 1 号（令和２年３月 30 日）

３）厚生労働省、「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について」の 一部改正における留意事項について、薬 生 水 発 0326 第１号、令和３年３月 26 日

４）服部晋也ら、2008、PFOA・PFOS 等有機フッ素化合物の淀川水系での実態及び浄水処理性、水道協会雑誌、第 77 巻、第 3 号、pp. 2-11.

５）服部晋也ら、2011、淀川水系および高度浄水処理過程における PFOA および PFOS の実態調査、用水と廃水、第 53 巻、第 3 号、pp. 49-57.

６）稲田康志ら、2010、有機フッ素化合物の淀川水系における動向と浄水処理過程における挙動、日本水道協会関西地方支部第 54 回研究発表会概要集、pp. 79-82.

７）稲田康志ら、2012、淀川水系の有機フッ素化合物の濃度推移とその要因、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績、第 63 集、pp. 24-30.

８）大阪市水道局、2020、有機フッ素化合物の測定結果、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績、第 72 集、pp. 265.

９）厚生労働省医薬・生活衛生局 水道課、水質管理目標設定項目の検査方法(平成 15 年 10 月 10 日付健水発第 1010001 号）（最終改正 令和３年３月 26 日）

10）中村洋、2004、液クロ犬の巻、筑波出版社

11）EPISuite Kowwin v1.68

12）厚生労働省、水道水質検査法の妥当性評価ガイドライン（平成 24 年９月６日付健水発 0906 第１号別添）（最終改正：平成 29 年 10 月 18 日付薬生水発 1018 号第１号）

13）高木総吉ら、2021、水道水中におけるペルフルオロ及びポリフルオロアルキル化合物の分析法検討、水道協会雑誌、第 90 巻、第６号、pp. ２-15.