

## 11 LC-MS/MSを用いた汚泥肥料中のPFOS及びPFOAの分析

白井裕治<sup>1</sup>, 沼寄佳奈子<sup>1</sup>

**キーワード** 有機ふっ素化合物, PFOS, PFOA, 汚泥肥料, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

### 1. はじめに

ペルフルオロオクタンスルホン酸(以下、「PFOS」という。Figure 1-1)はコーティング剤, 泡消火剤, 界面活性剤など<sup>1)</sup>に, また, ペルフルオロオクタン酸(以下、「PFOA」という。Figure 1-2)はふっ素樹脂の加工助剤, 塗料, 乳化剤など<sup>2)</sup>に使用されていた有機ふっ素化合物であり, 生分解をほとんど受けず環境中に長い間残存する<sup>3~5)</sup>。下水処理場における流入水中のPFOS及びPFOAはその工程において懸濁物や汚泥に移行することが報告<sup>6, 7)</sup>されている。

このことから, 汚泥を利用した肥料中の調査が必要と考えられるが, 多様な汚泥肥料に対応したPFOS及びPFOAの分析法が報告されていない。農林水産省消費・安全局農産安全管理課長より汚泥肥料中のPFOS及びPFOAの含有量を把握するための実態調査に用いる分析法の開発を要請(2消安第2033号令和2年7月31日付け)されたことを受け, この分析法の開発及び単一試験室における分析法の妥当性(SLV: Single Laboratory Validation)を確認したのでその概要を報告する。

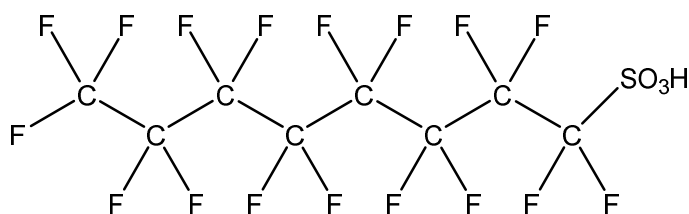


Figure 1-1 Structural formula of PFOS

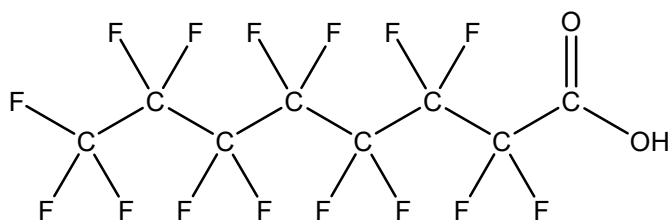


Figure 1-2 Structural formula of PFOA

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

## 2. 材料及び方法

### 1) 試料の収集及び調製

汚泥肥料 37 点(下水汚泥肥料 3 点, し尿汚泥肥料 6 点, 工業汚泥肥料 4 点, 焼成汚泥肥料 1 点及び汚泥発酵肥料 23 点)を試験品とし, それぞれ 40 °C で約 70 時間乾燥した後, それぞれ超遠心粉碎機(Retsch ZM 200)で 500 µm のスクリーンを通過するまで粉碎し, 混合して分析用試料を調製した. 分析用試料は, ポリエチレン製袋に入れて輪ゴムで密閉し, 直射日光を避け, 常温で保存した.

### 2) 装置及び器具

- (1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS): SHIMADZU LCMS-8045
- (2) 分離用カラム: GL-Sciences InertSustain C18(内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 µm)
- (3) ガードカラム: GL-Sciences Cartridge Guard Column E Inertsil ODS-SP(内径 3.0 mm, 長さ 10 mm, 粒径 3 µm)
- (4) ディレイカラム: GL-Sciences Delay Column for PFAS(内径 3.0 mm, 長さ 10 mm)
- (5) 超音波発生器: Yamato 8510
- (6) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (7) 超遠心分離機: AS ONE MCD-2000
- (8) 弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム: GL-Sciences InertSep MA-2 500 mg/6 mL, Waters Oasis WAX 6 cc(500 mg)
- (9) グラファイトカーボンカートリッジカラム: GL-Sciences InertSep Slim GC 400 mg
- (10) マニホールド: GL-Sciences, WATERS
- (11) 濃縮器具: GL-Sciences 窒素吹き付け分岐ユニット
- (12) 試験管ミキサー: AS ONE 試験管ミキサーTRIO TM-2N
- (13) 目盛り付き試験管: GL-Sciences GL-SPE 濃縮管 0.5 mL&1.0 mL メス/7 mL
- (14) 標準液保存用ねじ口容器: Labcon ポリプロピレン製遠沈管 15 mL メタルフリータイプ
- (15) LC 用バイアル: WATERS ポリプロピレン製バイアル(300 µL), セプタムレスポリエチレン製ねじ口キャップ
- (16) ポリプロピレン製ねじ口試験管: GL-Sciences DigiTUBEs 50 mL, GL-Sciences DigiTUBEs 15 mL
- (17) ポリプロピレン製共栓遠心沈殿管: トレフ 1.5 mL クリックキャップチューブ ナチュラル
- (18) パスツールピペット: CORNING ほうけい酸ガラス製パスツールピペット(146 mm), CORNING ほうけい酸ガラス製パスツールピペット(229 mm)

### 3) 試薬

- (1) 水: 超純水製造装置(MILLIPORE 製 Milli-Q Integral 5)を用いて精製した超純水(比抵抗値 18 MΩcm 以上)を使用した. JIS K 0557 に規定する A4 の水
- (2) メタノール: 残留農薬・PCB 試験用(5000 倍濃縮)(富士フイルム和光純薬)
- (3) メタノール(器具洗浄用): JIS K 8891 特級試薬(富士フイルム和光純薬)
- (4) アセトニトリル(溶離液用): LC-MS 用試薬(富士フイルム和光純薬)
- (5) アンモニア水: JIS K 8085 特級試薬(濃度(NH<sub>3</sub>)質量分率 28 %)(富士フイルム和光純薬)

- (6) ぎ酸: JIS K 8264 特級試薬(濃度(HCOOH)質量分率 98 %以上)(関東化学)
- (7) 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L): 高速液体クロマトグラフ用試薬(富士フイルム和光純薬)
- (8) 酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L): 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L)を水で 100 倍に希釈した。
- (9) PFOS 標準液(50 µg/mL): L-PFOS (Sodium perfluoro-1-octanesulfonate 1.2 mL)

(WELLINGTON)

- (10) PFOA 標準液(50 µg/mL): PFOA (Perfluoro-n-octanoic acid 1.2 mL) (WELLINGTON)
- (11) PFOS 標準液(1 µg/mL)及び PFOA 標準液(1 µg/mL): PFOS 標準液(50 µg/mL) 1 mL 及び PFOA 標準液(50 µg/mL) 1 mL をそれぞれ全量フラスコ 50 mL にとり, 標線までメタノールを加えて PFOS 標準液(1 µg/mL)及び PFOA 標準液(1 µg/mL)を調製した。
- (12) 混合標準液(100 ng/mL), (10 ng/mL)及び(1 ng/mL): PFOS 標準液(1 µg/mL) 5 mL 及び PFOA 標準液(1 µg/mL) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり混合し, 標線までメタノール-水(1+1)を加えて混合標準液(100 ng/mL)を調製した。混合標準液(100 ng/mL) 1 mL を全量フラスコ 10 mL にとり, 標線までメタノール-水(1+1)を加えて混合標準液(10 ng/mL)を調製した。混合標準液(10 ng/mL) 1 mL を全量フラスコ 10 mL にとり, 標線までメタノール-水(1+1)を加えて混合標準液(1 ng/mL)を調製した。
- (13) <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS 内標準液(50 µg/mL): MPFOS (Sodium perfluoro-1-[1,2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-octanesulfonate 1.2 mL) (WELLINGTON)
- (14) <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOS 内標準液(50 µg/mL): M8PFOS (Sodium perfluoro-1-[<sup>13</sup>C<sub>8</sub>]-octanesulfonate 1.2 mL) (WELLINGTON)
- (15) <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA 内標準液(50 µg/mL): MPFOA (Perfluoro-n-[1,2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-octanoic acid 1.2 mL) (WELLINGTON)
- (16) <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOA 内標準液(50 µg/mL): M8PFOA (Perfluoro-n-[<sup>13</sup>C<sub>8</sub>]-octanoic acid 1.2 mL) (WELLINGTON)
- (17) <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS 内標準液(1 µg/mL), <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOS 内標準液(1 µg/mL), <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA 内標準液(1 µg/mL)及び <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOA 内標準液(1 µg/mL): <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS 内標準液(50 µg/mL) 1 mL, <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOS 内標準液(50 µg/mL) 1 mL, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA 内標準液(50 µg/mL) 1 mL 及び <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOA 内標準液(50 µg/mL) 1 mL をそれぞれ全量フラスコ 50 mL にとり, 標線までメタノールを加えて <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS 内標準液(1 µg/mL), <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOS 内標準液(1 µg/mL), <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA 内標準液(1 µg/mL)及び <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOA 内標準液(1 µg/mL)を調製した。
- (18) <sup>13</sup>C-混合内標準液(200 ng/mL): <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS 内標準液(1 µg/mL) 10 mL, <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOS 内標準液(1 µg/mL) 10 mL, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA 標準液(1 µg/mL) 10 mL 及び <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOA 内標準液(1 µg/mL) 10 mL を全量フラスコ 50 mL にとり混合し, 標線までメタノールを加えて <sup>13</sup>C-混合内標準液(200 ng/mL)を調製した。
- (19) <sup>13</sup>C-混合内標準液(20 ng/mL): <sup>13</sup>C-混合内標準液(200 ng/mL) 2.5 mL を全量フラスコ 25 mL にとり, 標線までメタノール-水(1+1)を加えて混合内標準液(20 ng/mL)を調製した。
- (20) 検量線用混合標準液(0.1 ng/mL~50 ng/mL): 混合標準液(100 ng/mL)の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を全量フラスコ 10 mL に段階的にとり, <sup>13</sup>C-混合内標準液(20 ng/mL) 1 mL をそれぞれ加え, 標線までメタノール-水(1+1)を加えた。混合標準液(10 ng/mL)の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を全量フラスコ 10 mL に段階的にとり, <sup>13</sup>C-混合内標準液(20 ng/mL) 1 mL を加え, 標線までメタノール-水(1+1)をそれぞれ加えた。混合標準液(1 ng/mL)の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を全量フラスコ 10 mL に段階的にとり, <sup>13</sup>C-混合内標準液(20 ng/mL) 1 mL をそれぞれ加え, 標線までメタノール-水(1+1)を加えた。
- (21) 分析試料添加用 <sup>13</sup>C-混合内標準液(20 ng/mL): <sup>13</sup>C-混合内標準液(200 ng/mL) 10 mL を全量

フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノールを加えて混合内標準液(20 ng/mL)を調製した。

(22) 精製操作検討用  $^{13}\text{C}$ -混合内標準液(2 ng/mL)：分析試料添加用  $^{13}\text{C}$ -混合内標準液(20 ng/mL) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり、標線までメタノールを加えて混合内標準液(2 ng/mL)を調製した。

(23) 真度等確認用混合標準液(400 ng/mL), (40 ng/mL), (4 ng/mL)及び(1 ng/mL)：PFOS 標準液(1  $\mu\text{g/mL}$ )4 mL 及び PFOA 標準液(1  $\mu\text{g/mL}$ )4 mL を全量フラスコ 10 mL にとり混合し、標線までメタノールを加えて真度等確認用混合標準液(400 ng/mL)を調製した。混合標準液(100 ng/mL)10 mL を全量フラスコ 25 mL にとり、標線までメタノールを加えて真度等確認用混合標準液(40 ng/mL)を調製した。真度等確認用混合標準液(40 ng/mL)2 mL を全量フラスコ 20 mL にとり、標線までメタノールを加えて真度等確認用混合標準液(4 ng/mL)を調製した。真度等確認用混合標準液(4 ng/mL)5 mL を全量フラスコ 20 mL にとり、標線までメタノールを加えて真度等確認用混合標準液(1 ng/mL)を調製した。

#### 4) 分析操作

##### (1) 抽出

分析試料 2.00 g をはかりとってねじ口試験管(A) 50 mL に入れ、分析試料添加用  $^{13}\text{C}$ -混合内標準液(20 ng/mL)1 mL を加えた。更に、メタノール 15 mL 及びぎ酸 0.1 mL を加え、超音波発生器を用いて 20 分間超音波処理し、遠心力約  $1700\times g$  で約 5 分間遠心分離し、上澄み液をねじ口試験管(B) 50 mL に移した。さらに、この操作を 2 回繰返し、上澄み液をねじ口試験管(B)に加えた。ねじ口試験管(B) 50 mL の目盛までメタノールを加え、抽出液とした。

##### (2) クリーンアップ

弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムを予めアンモニア水-メタノール(1+100)約 5 mL、メタノール約 5 mL 及びメタノール-水(1+1)約 5 mL で順次洗浄した。また、グラファイトカーボンカートリッジカラムを予めメタノール約 5 mL で洗浄した。

抽出液 5 mL をねじ口試験管(C) 15 mL にとり、水 5 mL を加えて振り混ぜ、弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに負荷し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。ねじ口試験管(C)をメタノール-水(1+1)約 5 mL で洗浄し、洗液を同じカラムに負荷し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更にメタノール約 5 mL を 2 回弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。グラファイトカーボンカートリッジカラムを弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムの下に連結し、アンモニア水-メタノール(1+100)2 mL を加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。目盛付き試験管(D)をカートリッジカラムの下に置き、アンモニア水-メタノール(1+100)4 mL をカートリッジカラムに加えて PFOS、PFOA 及びそれらの内標準物質を溶出させた。

窒素ガスを溶出液に穏やかに吹き付け、0.5 mL の目盛まで濃縮し、水約 0.4 mL を加え、試験管ミキサーで振り混ぜ、更に 1 mL の目盛まで水を加え、試験管ミキサーで振り混ぜ、共栓遠心沈殿管(E) 1.5 mL に入れた。遠心力  $8000\times g$  で約 5 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とした。

##### (3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

各検量線用混合標準液及び試料溶液を LC-MS/MS に注入し、Table 1-1 及び Table 1-2 の測定条件に従って各イオンの選択反応検出(MRM)クロマトグラムを記録し、それぞれのピーク面積を求めた。各成分とそれらの内標準物質の定量用イオンのピーク面積比を算出した。各検量線用混合標準液の各成分の濃度と求めたピーク面積比の検量線を作成し、試料溶液中の各成分の濃度を求め、分析試料中の各成

分の濃度を算出した。

各検量線用混合標準液及び試料溶液の各成分とそれらの内標準物質の定量用イオンと確認用イオンのピーク面積比を算出して比較した。

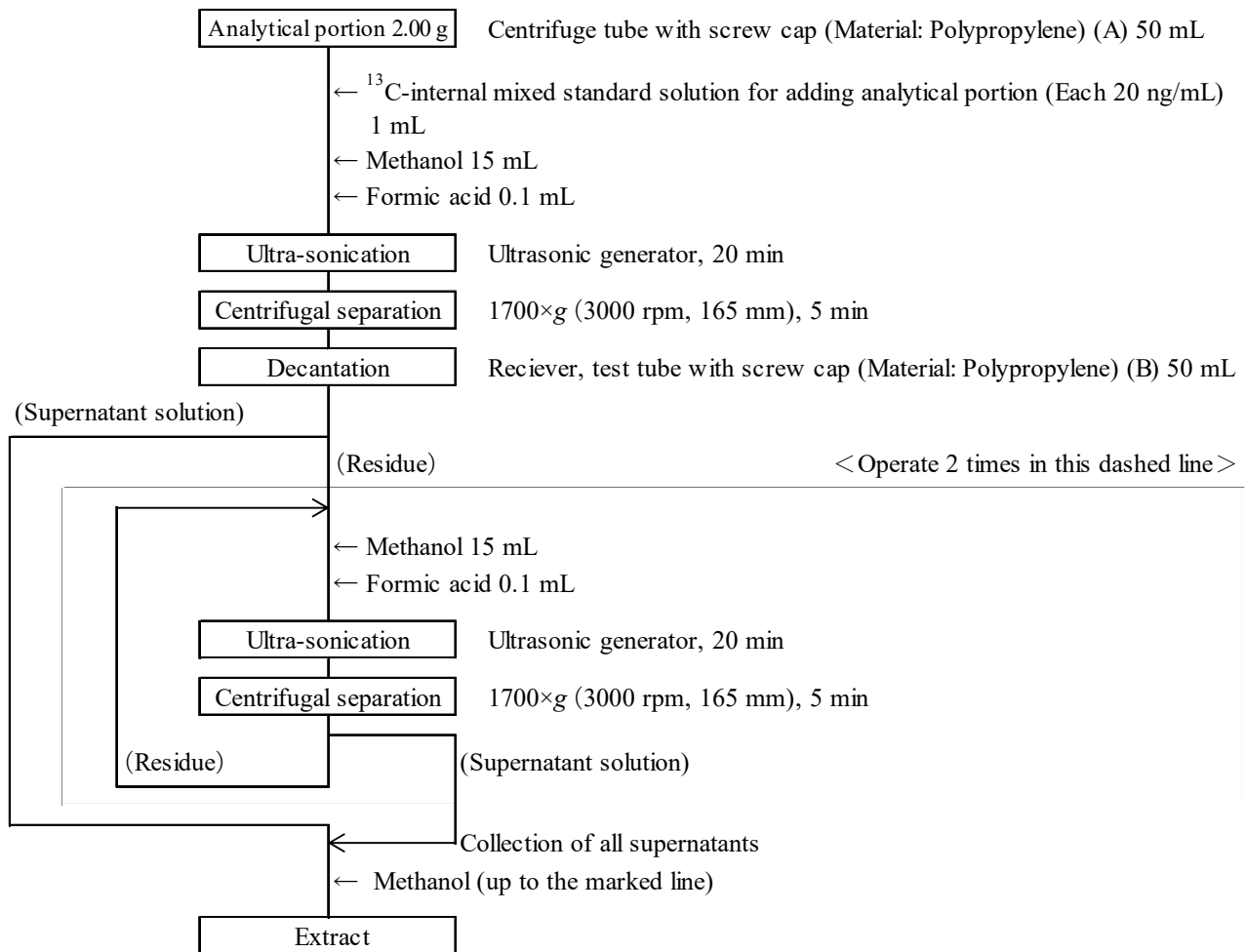
なお、参考のため分析法の概要を Scheme 1-1 及び Scheme 1-2 に示した。

Table 1-1 Operating conditions of LC-MS/MS

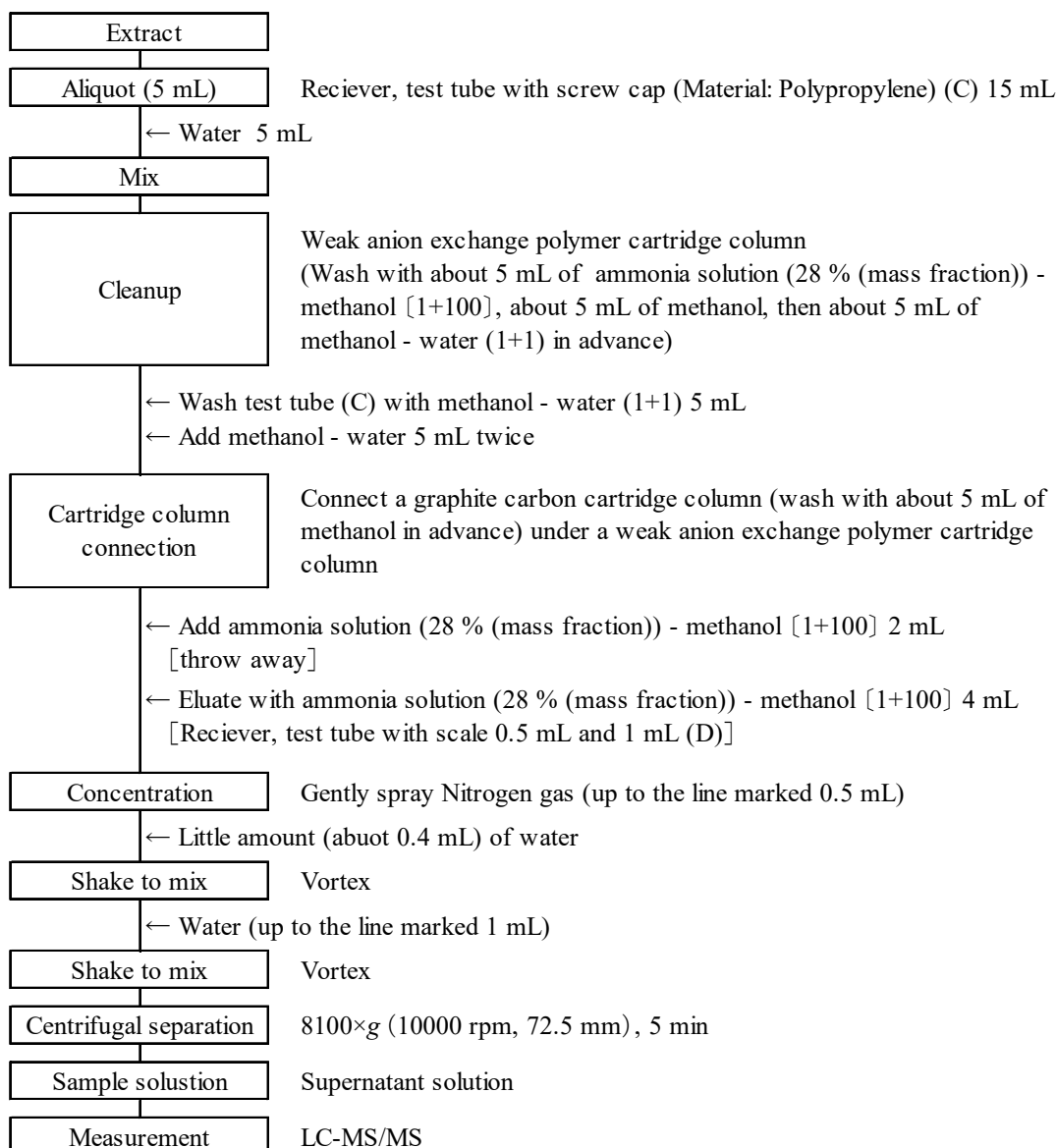
[LC conditions] SHIMADZU Nexera Series	
Delay column:	Delay Column for PFAS (3.0 mm I.D., 10 mm L)
Guard column:	Cartridge Guard Column E Inertsil (3.0 mm I.D., 10 mm L, 3 µm)
Column:	InertSustain C18 (2.1 mm I.D., 150 mm L, 3 µm)
Mobile phase (A):	A: 10 mmol/L ammonium acetate solution B: Acetonitrile
Gradient program:	0 min (40 %B)→1.5min (40 %B)→10 min (100 %B)→ 12 min (100 %B)→12.2 min (40 %B)→16 min (40 %B)
Flow rate:	0.2 mL/min
Column temperature:	40 °C
Injection volume:	5 µL
[MS conditions] SHIMADZU LCMS-8045	
Ionization:	Electrospray ionization (ESI)
Mode:	Positive
Probe voltage:	-1 kV
DL temperature:	200 °C
Heat block temperature:	300 °C
Interface temperature:	300 °C
Nebulizing gas flow:	3 L/min
Drying gas flow:	5 L/min
Heating gas flow:	15 L/min

Table 1-2 Parameters of MS/MS

Compound	Purpose	MRM transition		Collision energy (eV)
		Precursor ion	Product ion	
PFOS	for determination	<i>m/z</i> 498.8	<i>m/z</i> 80.0	54.0
	for validation	<i>m/z</i> 498.8	<i>m/z</i> 98.9	44.0
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOS	for determination	<i>m/z</i> 502.8	<i>m/z</i> 80.0	52.0
	for validation	<i>m/z</i> 502.8	<i>m/z</i> 98.9	45.0
<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOS	for determination	<i>m/z</i> 506.8	<i>m/z</i> 80.0	54.0
	for validation	<i>m/z</i> 506.8	<i>m/z</i> 99.0	46.0
PFOA	for determination	<i>m/z</i> 412.8	<i>m/z</i> 169.0	18.0
	for validation	<i>m/z</i> 412.8	<i>m/z</i> 369.0	10.0
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOA	for determination	<i>m/z</i> 416.8	<i>m/z</i> 162.0	18.0
	for validation	<i>m/z</i> 416.8	<i>m/z</i> 372.0	9.0
<sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOA	for determination	<i>m/z</i> 421.1	<i>m/z</i> 172.0	19.0
	for validation	<i>m/z</i> 421.1	<i>m/z</i> 376.0	9.0



Scheme 1-1 Flow sheet for PFOS and PFOA in sludge fertilizers (Extraction procedure)



Scheme 1-2 Flow sheet for PFOS and PFOA in sludge fertilizers (Cleanup and measurement procedure)

### 3. 結果及び考察

#### 1) LC-MS/MS の測定条件の検討

PFOA は、乳化剤として使用されたポリテトラフルオロエチレン(テフロン)製品から溶出することがあり、LC の溶離液の調製及び LC の溶離液の流路から混入する恐れがある。これらの影響を取り除くため活性炭を充てんしたディレイカラムを用いた LC の条件<sup>8)</sup>を設定した。

また、MS/MS 基本条件のイオン化法、イオン化モード及びモニターイオンについては JIS K 0450-70-10<sup>9)</sup>及び水質管理目標設定項目の検査方法<sup>10)</sup>を参考に設定し、その他の項目は使用した装置に適した条件<sup>11)</sup>を設定した。更に、PFOS 標準液(1 µg/mL)、PFOA 標準液(1 µg/mL)、<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS 内標準液(1 µg/mL)、<sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOS 内標準液(1 µg/mL)、<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA 内標準液(1 µg/mL)及び <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOA 内標準液(1 µg/mL)を用いて、それぞれの化合物の最適化を実施して測定条件を Table 1-1 及び Table 1-2 のとおり作成した。

検量線用混合標準液(20 ng/mL)及び試料溶液(汚泥発酵肥料)について 2. 4) (3)に従って測定して得られたクロマトグラムを Figure 2-1 及び Figure 2-2 に示した. PFOS のピークの保持時間は約 9.4 分で, 試料溶液に含まれていた PFOS の側鎖(分岐鎖)体のピークを分離できた. PFOA のピークの保持時間は約 7.1 分で, 試料溶液に含まれていた PFOA の側鎖(分岐鎖)体のピークを分離できた.

各検量線用混合標準液(PFOS 及び PFOA として 0 ng/mL~50 ng/mL 含有,  $^{13}\text{C}_4$ -PFOS,  $^{13}\text{C}_8$ -PFOS,  $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 及び  $^{13}\text{C}_8$ -PFOA として各 2 ng/mL 含有)について 2 回測定し, 各内標準に対するピーク面積比の検量線を作成し, その回帰式の係数及び決定係数を Table 2 に示した. その結果, いずれの検量線のパラメータも肥料等試験法(2020)<sup>12)</sup>に示されている切片の推奨基準及び決定係数の許容基準を満たしていた. なお, 参考のため, PFOS 及び PFOA 標準液濃度-内標準ピーク面積比を Figure 3-1 及び Figure 3-2 に示した.

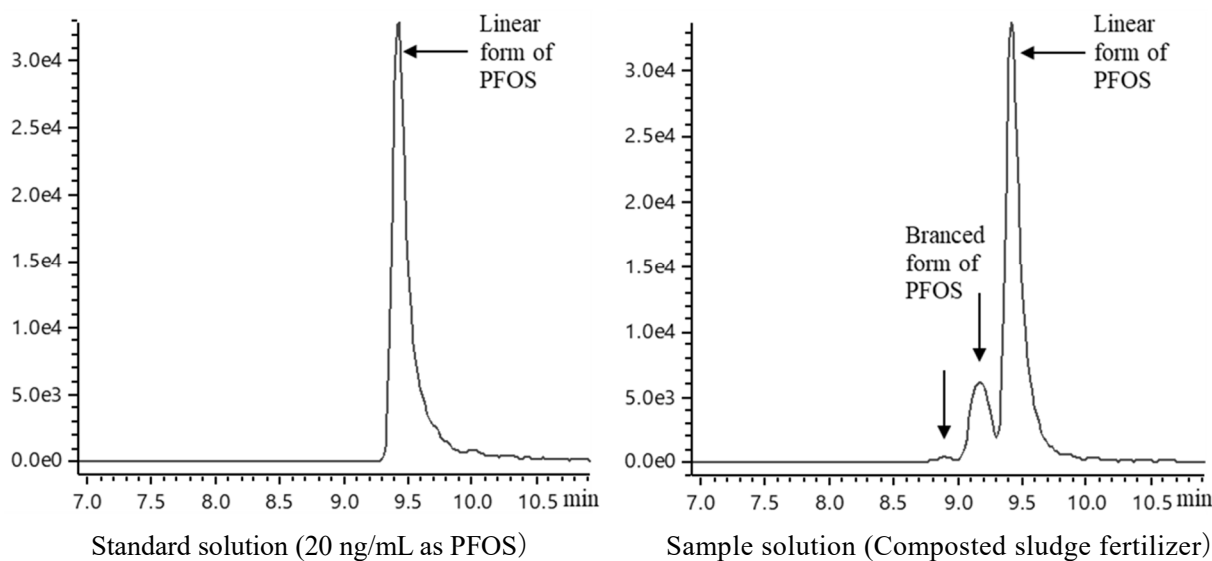


Figure 2-1 MRM chromatogram of PFOS

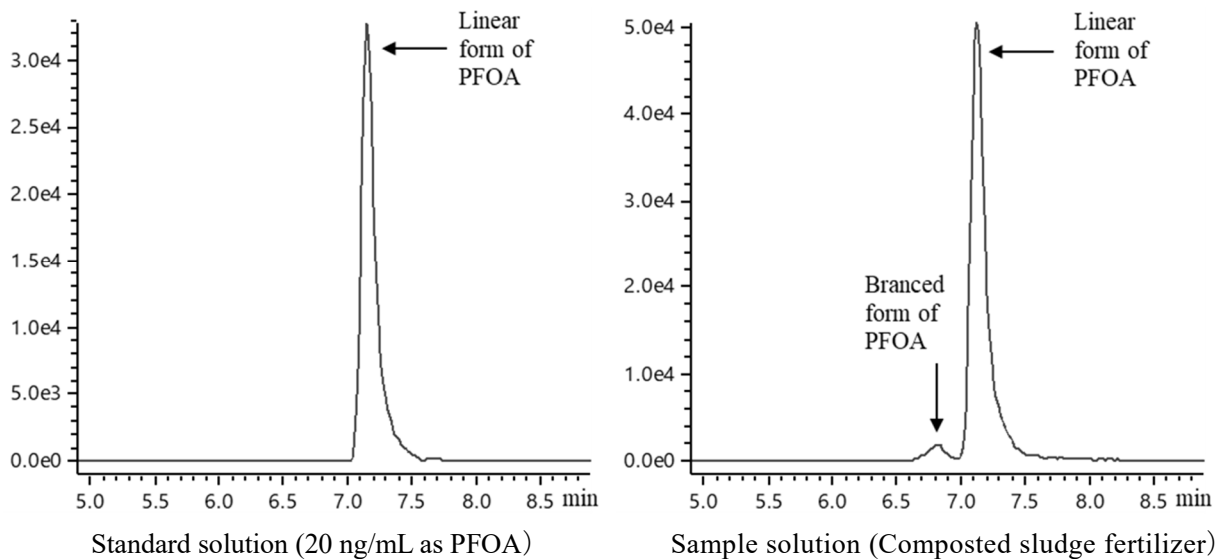


Figure 2-2 MRM chromatogram of PFOA

Conditions of LC-MS/MS shown in table 1-1 and table 1-2



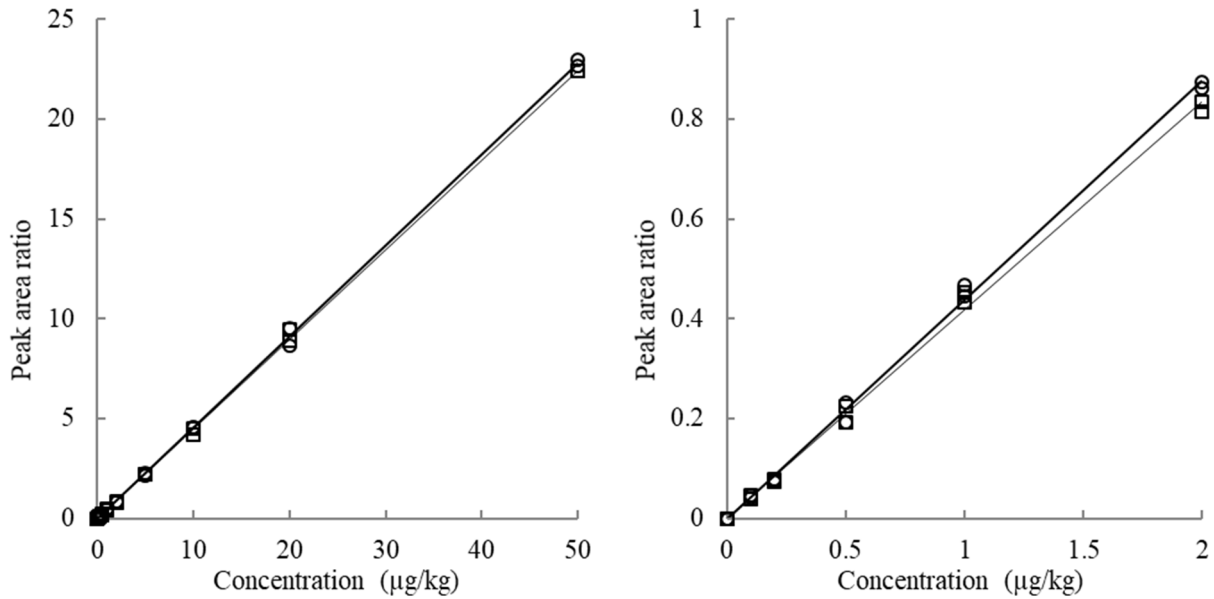


Figure 3-1 Calibration curve of PFOS

Left figure: PFOS concentration range from 0.1 ng/mL to 50 ng/mL

Right figure: PFOS concentration range from 0.1 ng/mL to 2 ng/mL

○: Plot of peak area ratio (Each PFOS /  $^{13}\text{C}_4$ -PFOS (2 ng/mL)) to PFOS concentration

□: Plot of peak area ratio (Each PFOS /  $^{13}\text{C}_8$ -PFOS (2 ng/mL)) to PFOS concentration

Solid and thin line: Regression line of the data shown in the plot (○) and the plot (□)

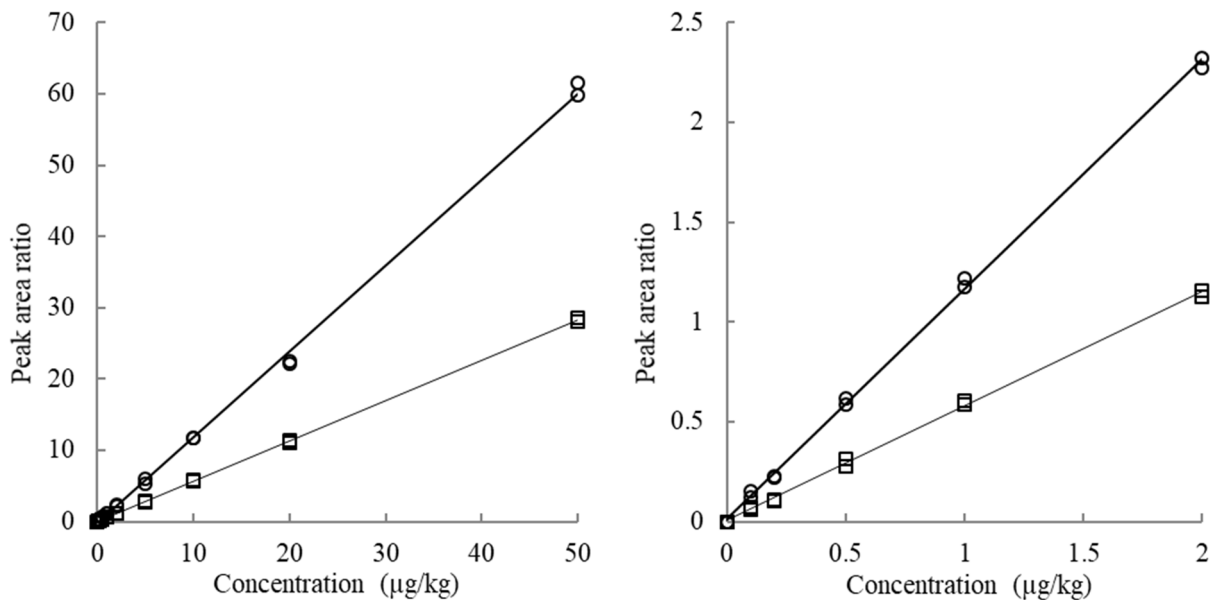


Figure 3-2 Calibration curve of PFOA

Left figure: PFOA concentration range from 0.1 ng/mL to 50 ng/mL

Right figure: PFOA concentration range from 0.1 ng/mL to 2 ng/mL

○: Plot of peak area ratio (Each PFOA /  $^{13}\text{C}_4$ -PFOA (2 ng/mL)) to PFOA concentration

□: Plot of peak area ratio (Each PFOA /  $^{13}\text{C}_8$ -PFOA (2 ng/mL)) to PFOA concentration

Solid and thin line: Regression line of the data shown in the plot (○) and the plot (□)

Table 2 Evaluation of calibration curve for PFOS and PFOA

Peak ratio Compound	Range of concentration (ng/mL)	Coefficient <sup>a)</sup>			Range of intercept ( <i>a</i> ) <sup>c,d)</sup>	
		Slope <i>b</i>	Intercept <i>a</i>	Determination <sup>b)</sup> <i>r</i> <sup>2</sup>	Lower limit	Upper limit
PFOS/ <sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOS	≤ 50	0.456	-0.021	1.000	-0.108	0.067
	≤ 2	0.439	-0.002	0.998	-0.016	0.012
PFOS/ <sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOS	≤ 50	0.450	-0.015	1.000	-0.088	0.057
	≤ 2	0.417	0.002	0.998	-0.012	0.015
PFOA/ <sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOA	≤ 50	1.205	-0.207	0.999	-0.577	0.163
	≤ 2	1.150	0.015	0.999	-0.010	0.039
PFOA/ <sup>13</sup> C <sub>8</sub> -PFOA	≤ 50	0.566	-0.002	1.000	-0.080	0.075
	≤ 2	0.574	0.004	0.999	-0.009	0.018

a) Regression equation:  $y=bx+a$

b) The tolerance criteria\* of coefficient of determination:  $r^2 \geq 0.99$

c) The 95 % confidence interval

d) The recommended criteria\* of coefficient of range of intercept:

The origin (0) is included in the intercept range.

\* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

## 2) 精製操作の検討

環境関連試料の分析方法<sup>13, 14)</sup>では弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム又はオクタデシル基を化学結合したシリカゲル(ODS)カートリッジカラムを用いて抽出液を精製している。しかしながら、汚泥発酵肥料に適用した場合、カートリッジカラムからの溶出液に着色があり、濃縮操作においては溶液中の析出物が溶けず、LC-MS/MSに注入できる状態ではなかった。三島ら<sup>15, 16)</sup>は、マイクロプラスチック中の有機ふっ素化合物を測定する際に、抽出液を弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムで精製した後、更にグラフアイトカーボンカートリッジカラムで溶液中の着色成分を除去していた。

筆者らは、この操作を簡便にするため、ルアーデバイス型のグラフアイトカーボンカートリッジカラム(InertSep Slim GC)を用いて、弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム(InertSep MA-2 又は Oasis WAX)の下に連結することとし、溶出溶媒(アンモニア水-メタノール(1+100))を加えた際にPFOS及びPFOAの溶出する画分を確認するため次の試験を実施した。PFOS及びPFOA濃度が各2 ng/mLのメタノール-水(1+1)溶液10 mLを2.4) (2)クリーンアップの操作に用いるInertSep MA-2及びOasis WAXにそれぞれ負荷し、以下同様に操作し、溶出溶媒を加えた流出画分に精製操作検討用<sup>13</sup>C-混合内標準液(2 ng/mL)を加えPFOS及びPFOAを測定した。その結果、Table 3のとおり、PFOS及びPFOAは流出画分0 mL~2 mLでは溶出せず、流出画分2 mL~6 mLでほとんど溶出した。流出画分6 mL以降においても微少なピークを検出したが、内標準物質を添加していることから、以後の検討では流出画分2 mL~6 mLを分取することとした。

2種類の弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムを用いた分析結果の整合性を確認するため、PFOS又はPFOAとして0.5 µg/kg以上検出した汚泥肥料を用いて次の検討を実施した。各汚泥肥料の抽出液を5 mLずつ2本分取し、それぞれInertSep MA-2を用いた精製操作又はOasis WAXを用いた精製操作によって試料溶液を調製してPFOS及びPFOAを測定し、前者の分析値に対する後者の分析値の関

係を Figure 4 にプロットし、回帰直線及びその予測区間を描いた。また、各回帰直線の回帰式及びそれらの回帰係数の 95 %信頼区間並びに相関係数を Table 4 に示した。その結果、いずれのパラメータも肥料等試験法<sup>12)</sup>に示されている推奨基準(傾き(*b*)の 95 %信頼区間に 1, 切片(*a*)の 95 %信頼区間に 0 が含まれ、相関係数(*r*)が 0.99 以上)を満たしていた。

Table 3 Elution pattern from weak anion exchange polymer cartridge column  
+ graphite carbon cartridge column

Fraction volume (mL)	PFOS <sup>a)</sup>		PFOA <sup>a)</sup>	
	InertSep MA-2 (ng)	Oasis WAX (ng)	InertSep MA-2 (ng)	Oasis WAX (ng)
0~1	N.D. <sup>b)</sup>	N.D. <sup>b)</sup>	N.D. <sup>b)</sup>	N.D. <sup>b)</sup>
1~2	N.D. <sup>b)</sup>	N.D. <sup>b)</sup>	N.D. <sup>b)</sup>	N.D. <sup>b)</sup>
2~3	12.5	15.8	14.4	16.9
3~4	5.3	2.4	4.1	1.9
4~5	0.2	0.1	0.2	Tr <sup>c)</sup>
5~6	0.1	Tr <sup>c)</sup>	0.1	Tr <sup>c)</sup>
6~7	Tr <sup>c)</sup>	Tr <sup>c)</sup>	Tr <sup>c)</sup>	Tr <sup>c)</sup>
7~8	Tr <sup>c)</sup>	Tr <sup>c)</sup>	Tr <sup>c)</sup>	Tr <sup>c)</sup>
Total <sup>d)</sup>	18.1	18.2	18.7	18.8
Recovery (%)	90.5	91.0	93.5	94.0

a) Each 20 ng for PFOS and PFOA

b) Not detected

c) Less than the lower limit (0.1 ng / mL) of calibration curve

d) Total amount of PFOS and PFOA eluted from 2 mL to 6 mL

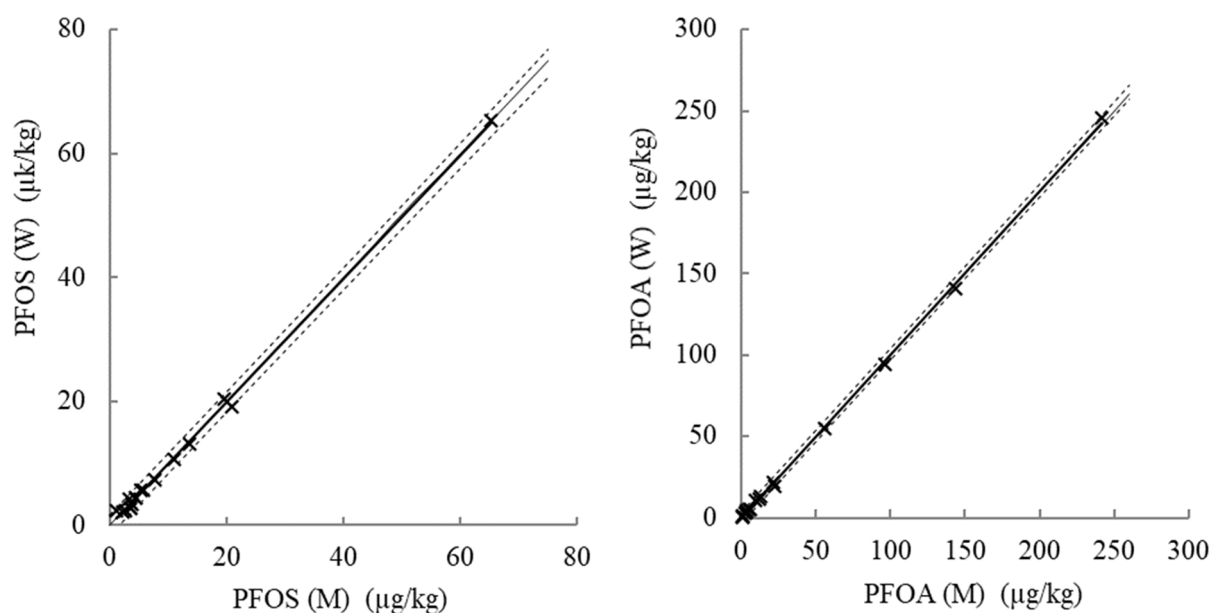


Figure 4 Comparison between analytical values purified with InertSep MA-2 and Oasis WAX

Left figure: Analytical values of PFOS, Right figure: Analytical values of PFOA

PFOS (M) and PFOA (M): Analytical values purified with InertSep MA-2

PFOS (W) and PFOA (W): Analytical values purified with Oasis WAX

Solid line: Regression line, Thin line:  $y=x$

Dotted lines: Upper and lower limit 95 % prediction intervals,

Table 4 Evaluation of regression line for comparison of PFOS and PFOA analysis values with two types of cartridges

		PFOS	PFOA
Coefficient <sup>a)</sup>	Slope ( $b$ )	0.137	-0.434
	Intercept ( $a$ )	0.968	1.009
	Correlation ( $r$ ) <sup>b)</sup>	0.994	1.000
Range of slope ( $b$ ) <sup>c)d)</sup>	Upper limit	1.025	1.020
	Lower limit	0.911	0.998
Range of intercept ( $a$ ) <sup>c)e)</sup>	Upper limit	0.634	0.315
	Lower limit	-0.361	-1.183

a) Regression equation:  $y=bx+a$

b) The recommended criteria\* of correlation coefficient:  $r \geq 0.99$

c) The 95 % confidence interval

d) The recommended criteria\* of coefficient of range of slope:

One is included in the intercept range.

e) The recommended criteria\* of coefficient of range of intercept:

The origin (0) is included in the intercept range.

\* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

### 3) 添加回収試験による真度の評価

真度を評価するため、下水汚泥肥料、工業汚泥肥料及び汚泥発酵肥料にそれぞれ 200 µg/kg, 20 µg/kg 及び 2 µg/kg 相当量を添加した試料について、3 点併行で添加回収試験を実施した結果を Table 5 に示した。

その結果、200 µg/kg, 20 µg/kg 及び 2 µg/kg の添加レベルでの PFOS の平均回収率はそれぞれ 96.5 % ~ 101.1 %, 93.8 % ~ 96.5 % 及び 83.3 % ~ 102.1 % であり、PFOA の平均回収率はそれぞれ 100.4 % ~ 107.3 %, 92.3 % ~ 95.0 % 及び 99.7 % ~ 102.7 % であった。いずれの平均回収率も肥料等試験法<sup>12)</sup>に示されている真度の目標範囲以内であった。

Table 5 Results of recovery test

Compound	Sample	Spiked level (µg/kg)	Mean <sup>a)</sup> (µg/kg)	Recovery rate (%)	Criteria <sup>b)</sup> (%)
PFOS	Sewage sludge fertilizer	200	202	101.1	70~120
		20	18.8	93.8	70~120
		2	1.81	90.4	60~125
	Industrial sludge fertilizer	200	199	99.4	70~120
		20	19.3	96.5	70~120
		2	1.67	83.3	60~125
	Composted sludge fertilizer	200	193	96.5	70~120
		20	19.3	96.3	70~120
		2	2.04	102.1	60~125
PFOA	Sewage sludge fertilizer	200	215	107.3	70~120
		20	19.0	95.0	70~120
		2	2.05	102.7	60~125
	Industrial sludge fertilizer	200	201	100.4	70~120
		20	18.5	92.5	70~120
		2	1.99	99.7	60~125
	Composted sludge fertilizer	200	201	100.6	70~120
		20	18.5	92.3	70~120
		2	2.04	101.8	60~125

a) Mean value ( $n = 3$ )

b) The tolerance criteria\* of the trueness

\* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

### 4) 中間精度及び併行精度の確認

併行精度及び中間精度を確認するため、PFOS 及び PFOA を含有しているし尿汚泥肥料及び汚泥発酵肥料について、2 点併行で日を変えて 5 回分析を実施して得られた結果を Table 6-1 に示し、一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 6-2 に示した。し尿汚泥肥料及び汚泥発酵肥料の PFOS の平均値は 4.46 µg/kg 及び 66.8 µg/kg で、併行精度 ( $RSD_r$ ) は 3.6 % 及び 3.0 % で、中間精度 ( $RSD_{I(T)}$ ) は 4.6 % 及び 3.3 % であった。PFOA の平均値は 2.08 µg/kg 及び 140 µg/kg で、併行精度 ( $RSD_r$ ) は 6.2 % 及び 1.4 % で、中間精度 ( $RSD_{I(T)}$ ) は 9.2 % 及び 2.6 % であった。

いずれの精度も肥料等試験法<sup>12)</sup>に示されている精度の許容範囲以内であった。

Table 6-1 Individual result of repeatability test on different days  
for precision confirmation (µg/kg)

Compound	Test days	Human-waste sludge fertilizer		Composted sludge fertilizer	
		PFOS	1	4.25	4.20
	2	4.24	4.50	69.3	66.9
	3	4.38	4.71	66.2	69.7
	4	4.77	4.65	66.1	69.7
	5	4.43	4.44	63.5	65.6
PFOA	1	2.34	2.00	143	143
	2	1.99	1.94	140	145
	3	1.92	2.09	138	137
	4	1.91	1.92	135	136
	5	2.40	2.25	141	138

Table 6-2 Statistical analysis of replicate test results for precision confirmation

Compound	Sample	Mean <sup>a)</sup>	Repeatability precision			Intermediate precision		
		<i>m</i> (µg/kg)	<i>s<sub>r</sub></i> <sup>b)</sup> (µg/kg)	<i>RSD<sub>r</sub></i> <sup>c)</sup> (%)	$2 \times CRSD_{r^{d)}}$ (%)	<i>s<sub>I(T)</sub></i> <sup>e)</sup> (µg/kg)	<i>RSD<sub>I(T)</sub></i> <sup>f)</sup> (%)	$2 \times CRSD_{I(T)^{g)}$ (%)
PFOS	Human-waste sludge fertilizer	4.46	0.16	3.6	22	0.21	4.6	36
	Composted sludge fertilizer	66.8	2.0	3.0	22	2.2	3.3	36
PFOA	Human-waste sludge fertilizer	2.08	0.13	6.2	22	0.19	9.2	36
	Composted sludge fertilizer	140	2	1.4	22	4	2.6	36

a) Total mean value (number of test days (5) × number of replication (2))

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

d) The tolerance criteria\* of the repeatability precision

e) Intermedicate standare deviation

f) Intermedicate relative standard deviation

g) The tolerance criteria\* of the intermediate precision

\* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

## 5) 定量下限等の推定

PFOS 及び PFOA の検量線用の標準液の最小濃度は 0.1 ng/mL (分析試料中各 0.5 µg/kg 相当量) であり、いずれの SN 比も 10 を超えていた。このことから、定量下限を推定するため、PFOS 及び PFOA の含有量の低い下水汚泥肥料に各 0.5 µg/kg 相当量を添加して 7 点併行で分析し、その平均値、標準偏差等

の結果を Table 7-1 に示した. この試験によって得られた PFOS 及び PFOA の併行分析の結果, 用いた検量線 (0.1 ng/mL~2 ng/mL) 及び試料溶液の SN 比を用い, それぞれ肥料等試験法<sup>12)</sup>別添 試験法の妥当性確認の手順に従って定量下限及び検出下限を Table 7-2 のとおり算出した.

その結果, PFOS 及び PFOA の定量下限はいずれも 0.5 µg/kg, 検出下限はいずれも 0.2 µg/kg 程度と推定された.

Table 7-1 Replicate test results for estimating the lower limit of quantification of PFOS and PFOA

Compound	Sample	Spiked level (µg/kg)	Number of replication	Mean value (µg/kg)	$s_r$ <sup>c)</sup> (µg/kg)	Recovery <sup>d)</sup> (%)
PFOS	Sewage sludge fertilizer <sup>a)</sup>	0.5	7	0.55	0.02	96.0
PFOA	Sewage sludge fertilizer <sup>b)</sup>	0.5	7	0.58	0.05	90.6

a) PFOS detection amount: 0.07 µg/kg

b) PFOA detection amount: 0.14 µg/kg

c) Repeatability standard deviation

d) Recovery rate including the amount of PFOS or PFOA detected in the sample

Table 7-2 Result of estimation of the lower limit of quantification of PFOS and PFOA

Compound	Procedure <sup>a)</sup> for estimating the $LOQ$ <sup>b)</sup> and $LOD$ <sup>c)</sup> (µg/kg)					
	Replicate test		Calibration curve		SN ratio	
	$LOQ$	$LOD$	$LOQ$	$LOD$	$LOQ$	$LOD$
PFOS	0.2	0.1	0.4	0.2	0.2	0.06
PFOA	0.5	0.2	0.4	0.2	0.3	0.09

a) The Procedure shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

b) Lower limit of quantitation

c) Lower limit of detection

#### 4. まとめ

LC-MS/MS を用いた PFOS 及び PFOA の分析法を開発し, 単一試験室における分析法の妥当性確認を実施したところ, 次のとおり分析法として十分な性能を有していることを確認した.

(1) JIS K 0450-70-10 を参考に LC-MS/MS の測定条件設定したところ, 直鎖体の PFOS 及び PFOA と側鎖体の PFOS 及び PFOA を分離することができた.

(2) 検量線用混合標準液 (PFOS 及び PFOA として 0.5 ng/mL~50 ng/mL 含有, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS, <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOS, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA 及び <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-PFOA として各 2 ng/mL 含有) を 2 回測定し, 各 PFOS 及び PFOA の濃度と内標準に対するピーク面積比について一次回帰分析を用いて検量線を作成した. それらの回帰式の切片の 95%信頼区間に原点 (0) が含まれ, それらの決定係数は 0.992~1.000 であり, 検量線の直線性が確認された.

(3) 汚泥発酵肥料の抽出液を弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムのみで精製した場合, 着色成分

を除けず、析出物が残ることから、LC-MS/MS に注入できる状態ではなかったが、弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムにカーボングラファイトカートリッジカラムを連結することで溶液中の着色成分等が除去できた。

(4) 3 種類の汚泥肥料を用いて添加回収試験により真度の確認を行った結果、PFOS 及び PFOA 各 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の濃度範囲で平均回収率 83.3 %~107.3 %であり、いずれも肥料等試験法<sup>12)</sup>に示されている真度の目標範囲以内であった。

(5) 併行精度及び中間精度を確認するため、し尿汚泥肥料及び汚泥発酵肥料を用いて 2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った結果、PFOS 及び PFOA の併行精度 ( $RSD_r$ ) は 1.4 %~6.2 %で、中間精度 ( $RSD_{I(T)}$ ) は 2.6 %~9.2 %であった。肥料等試験法に示されている併行精度及び中間精度の許容範囲を満たしていた。

(6) 開発した分析法において PFOS 及び PFOA の定量下限は 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  程度と推定された。

## 文 献

- 1) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部：PFOS 含有廃棄物の処理に関する技術的留意事項，平成 23 年 3 月，p.1~2, p.23~39 (2011)  
< <https://www.env.go.jp/recycle/misc/pfos/tptc.pdf> >
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構，経済産業省製造産業局化学物質課，厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課化学物質安全対策室：製品含有化学物質のリスク評価，ペルフルオロオクタン酸，平成元年 9 月，p.7-9 (1989)  
< [https://www.nite.go.jp/chem/risk/products\\_risk-PFOA\\_jp\\_full.pdf](https://www.nite.go.jp/chem/risk/products_risk-PFOA_jp_full.pdf) >
- 3) 環境省環境保険部リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 6 巻，[18]ペルフルオロオクタン酸及びその塩，平成 20 年 5 月 (2008)  
< <https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/pdf/chpt1/1-2-2-18.pdf> >
- 4) 環境省環境保険部リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 6 巻，[19]ペルフルオロオクタンスルホン酸及びその塩，平成 20 年 5 月 (2008)  
< <https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/pdf/chpt1/1-2-2-19.pdf> >
- 5) 一般財団法人化学物質評価研究機構：平成 27 年度化学物質安全対策(残留性有機汚染物質等に関する調査)報告書，【添付資料 1】PFOA とその塩及び PFOA 関連物質の残留性，生物蓄積性等に関する情報，平成 28 年 3 月 (2010)  
< [https://www.meti.go.jp/meti\\_lib/report/2016fy/000052.pdf](https://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2016fy/000052.pdf) >
- 6) 野添宗裕，藤井滋穂，田中周平，田中宏明，山下尚之：残留性有機フッ素化合物 PFOS, PFOA の下水処理場における挙動調査，環境工学研究論文集，43, p.105-110 (2006)  
< [https://www.jstage.jst.go.jp/article/proes1992/43/0/43\\_0\\_105/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/proes1992/43/0/43_0_105/_pdf/-char/ja) >
- 7) 広瀬知直，尾崎博明，谷口省吾，菅野悦治，中平亨：下水処理過程における PFOS および PFOA の挙動について，土木学会第 63 回年次学術講演会要旨，p.3-4 (2008)  
< <http://library.jsce.or.jp/jsce/open/00035/2008/63-07/63-07-0002.pdf> >
- 8) GL Sciences：固相抽出ー液体クロマトグラフ質量分析計を用いた有機フッ素化合物(PFAS)の分析，LC Technical Note, LT181  
< <https://www.gls.co.jp/viewfile/?p=LT181> >
- 9) JIS K 045-70-10:2011：工業用水・工場排水中のペルフルオロオクタンスルホン酸及びペルフルオロ



- オクタン酸試験法 (2011)
- 10) 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並びに水道水質管理における留意事項について 別添 4 水質管理目標設定項目の検査方法, 平成 15 年 10 月 10 日, 厚生労働省健康局水道課長通知健水発第 1010001 号第 284 号, 最終改正令和 2 年 3 月 30 日, 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課長通知薬生水発 0330 第 1 号 (2020)  
< <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000615826.pdf> >  
< <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000055189.pdf> >
  - 11) SHIMADZU Excellence in Science: トリプル四重極型 LC/MS/MS による有機フッ素化合物 (PFAS) の直接注入分析, Application News, No.C225A
  - 12) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC): 肥料等試験法 (2020)  
< [http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho\\_2020.pdf](http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf) >
  - 13) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部: PFOS 含有廃棄物の処理に関する技術的留意事項, 平成 23 年 3 月, p.23~39 (2011)  
< <https://www.env.go.jp/recycle/misc/pfos/tptc.pdf> >
  - 14) 環境省水・大気環境局水環境課: 要調査項目等調査マニュアル(水質, 底質, 水生生物), 平成 20 年 3 月, p.58~66 (2010)  
< <https://www.env.go.jp/water/chosa/h20-03.pdf> >
  - 15) 三島聡子: マイクロプラスチックに吸着した有機フッ素化合物の分析, 神奈川県環境科学センター研究報告, **41**, 23-30 (2018)  
< <https://www.pref.kanagawa.jp/documents/3464/03.pdf> >
  - 16) 三島聡子, 小沢憲司, 中山駿一, 菊池宏海: 相模湾漂着マイクロプラスチックの有機フッ素化合物の吸着実態と流入河川の影響, 環境化学, **30**, 66-81 (2020)

## Determination of PFOS and PFOA in Sludge Fertilizer using Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)

SHIRAI Yuji<sup>1</sup> and NUMAZAKI Kanako<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fertilizer and Feed Inspection Department

We developed and validated the determination method of PFOS and PFOA in sludge fertilizers using liquid chromatograph/tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). After the analytical portion was added the internal standard solution (each 20 ng as PFOS and PFOA), PFOS and PFOA were extracted with methanol containing a small amount of formic acid. The extract was purified with weak anion exchange polymer cartridge column and graphite carbon cartridge column. PFOS and PFOA were measured by LC-MS/MS. As a result of 3 replicate analysis in 3 kinds of sludge fertilizer samples prepared to contain with PFOS and PFOA at 2 µg/kg, 20 µg/kg and 200 µg/kg, the mean recoveries were 88.6 % - 100.8 %, respectively. As a result of duplicate analysis on 5 days in human-waste sludge fertilizer and composted sludge fertilizer contaminated with PFOS and PFOA, the mean value, repeatability relative standard deviation ( $RSD_r$ ) and intermediate relative standard deviation ( $RSD_{I(T)}$ ) were 2.08 µg/kg - 140 µg/kg, 1.4 % - 6.2 % and 2.6 % - 9.2 %, respectively. Minimum limit of quantification of there were estimated 0.5 µg/kg. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of PFOS and PFOA in sludge fertilizers.

*Key words* PFCs, PFOS, PFOA, sludge fertilizer, LC-MS/MS

(Research Report of Fertilizer, **14**, 123-140, 2021)