

ヒト血清からの PFAS の抽出および分析

Kari L. Organtini, Kenneth J. Rosnack, Mary E. Lame, Lisa J. Calton

Waters Corporation

要約

ペルフルオロおよびポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) は生体内に蓄積するため、ヒト体液中濃度をモニターすることで、曝露レベルおよび経路を理解するのに役立ちます。PFAS は、迅速に代謝されたり体内から除去されたりしないため、血清含有量を調べることで、その曝露レベルを理解することができます。本研究では、Oasis WAX μ Elution 96 ウェルプレートを使用して、ヒト血清から PFAS を抽出するための最適化した固相抽出 (SPE) 法を開発しました。分析は、Xevo TQ-S micro および PFAS キットのコンポーネントを取り付けた ACQUITY UPLC I-Class で実施しました。ACQUITY HSS T3 カラムにより、PFAS の血清ステロイド硫酸干渉物からの重要な分離を行うことができました。6 つの別々にプールしたヒト血清ロットを用いて、分析法の検証を行いました。さらに、NIST (SRM 1957) の標準レファレンス物質を使用して最適化した抽出法を検証した結果、一貫して正確な結果が得られました。最終的な分析法は、一般的な PFAS ケミストリーの様々なクラスから選んだ 30 種の PFAS の抽出および分析において、正確かつ頑健であることが証明されました。

アプリケーションのメリット

- PFAS 化合物のヒトに対する曝露レベルを調査して理解するために最適化した分析法
- PFAS キットを LC に取り付けることで、システムおよび溶媒の汚染物質を分離した場合の結果の信頼性を向上
- Xevo TQ-S micro を使用してヒト血清中の PFAS を正確に分析するための頑健な分析法
- PFAS の抽出に最適なケミストリーである Oasis WAX 96 ウェルプレートを使用する効率的なサンプルクリーンアップ

はじめに

ペルフルオロおよびポリフルオロアルキル化合物（PFAS）は、製造プロセス、消費材、泡消火剤などに数十年間にわたって使用されています。これらの化合物が広範に使用されているために、汚染物質となった製品が絶えず環境に放出される結果となっています。その結果、消費材の使用、汚染した飲料水や食品の消費、大気汚染により、ヒトが継続的に PFAS に曝露されることとなります。数千種の PFAS が存在することが知られていますが、その毒性に関する情報は限定的です。ペルフルオロオクタン酸（PFOA）とペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）に関する研究により、この種類の化合物は、免疫、生殖、発育に関わる各経路、および肝臓や腎臓の損傷など、ヒトの健康に対して大きな影響を及ぼすことが示唆されています^{1,2}。PFOA は、腎臓がんおよび精巣がんとの関連性が疑われることから、発がん性物質に指定されています^{3,4}。PFAS は、その炭素-フッ素結合により、優れたコーティング剤になり、代謝に対して高い耐性を示します。そのため、これらの物質がヒトの体内に蓄積する可能性が高くなります。多くのバイオモニタリング研究は、ほとんどのヒト血中に、さまざまな PFAS 化合物が検出可能な量で含まれると結論付けています⁵。そのため、労働安全衛生モニタリング、環境曝露モニタリング、毒物学研究などの目的で、ヒトにおける PFAS の負荷を継続的に理解するための信頼性の高い正確な方法が必要になります。

血清は作業が複雑なマトリックスであるため、再現性よく正確に PFAS を検出するには、マトリックス化合物の除去が不可欠です。PFOA や PFOS のみの研究から、より広範な化合物へと焦点が移行するにつれ、研究が PFAS のより大きなパネルを含むように拡大を続けている現在、この点は一層重要になります。タンパク質の沈殿や希釈のみでは、サンプル前処理の方法として不十分です。固相抽出（SPE）は、サンプル前処理のためのより実用的なソリューションです。タンデム四重極型質量分析（LC-MS/MS）と液体クロマトグラフィーの組み合わせは、最も高感度で選択性の高い分析オプションです。以下の研究では、Oasis WAX 96 ウェル μ Elution プレートおよび Xevo TQ-S micro での分析を使用したヒト血清から PFAS を抽出するための完全な SPE 法の概要を説明します。

実験方法

サンプル前処理

ヒト血清サンプルの抽出には、1 ウェルあたり 2 mg の吸着剤を含む Oasis WAX 96 ウェル μ Elution プレートを使用する固相抽出を行いました。PFAS を含まない適切なマトリックス代替品として、検量線のマトリックスとしてウシ胎児血清（FBS）の抽出を行いました。固相抽出の完全なプロトコルを図 1 に示します。サンプル前処理を確実に成功させるため、NIST 標準レファレンス物質（SRM）1957（非強化ヒト血清）を、サンプルのロットごとに抽出しました。カルボン酸類、スルホン酸類、スルホンアミド類、スルホンアミド酢酸類、スルホンアミド酢酸類、フルオロテロマー、スルホン酸類、およびパーフルオロエーテル類など、広範な PFAS 群を代表する 30 種の PFAS 化合物を本研究に使用しました。入手可能な場合、各化合物の同位体標識内部標準を使用しました。



図 1. Oasis WAX 96 ウェル μElution プレートを使用したヒト血清中の PFAS の固相抽出プロトコル

LC 条件

LC システム:	PFAS キットを取り付けた ACQUITY UPLC I-Class PLUS
希釈プレート:	96 ウェルサンプルコレクションプレート、2 mL 角型ウェル
コレクションプレート:	96 ウェルサンプルウェルコレクションプレート、700 μL 丸型ウェル
カラム:	ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 mm × 100 mm、1.8 μm
カラム温度:	35 °C
サンプル温度:	4 °C
注入量:	5 μL
流速:	変化あり (グラジエントテーブルを参照)
移動相 A:	95: 5 水: メタノール + 2 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B:

メタノール + 2 mM 酢酸アンモニウム

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0	0.3	100	0	6
1	0.3	80	20	6
6	0.3	55	45	6
13	0.3	20	80	6
14	0.4	5	95	6
17	0.4	5	95	6
18	0.3	100	0	6
22	0.3	100	0	6

MS 条件

MS システム:

Xevo TQ-S micro

イオン化モード:

ESI-

キャピラリー電圧:

0.5 kV

脱溶媒温度:

300 °C

脱溶媒流量:	900 L/時間
コーンガス流量:	100 L/時間
コリジョンエネルギー:	化合物によって異なる (条件については付録表を参照)
コーン電圧:	化合物によって異なる (条件については付録表を参照)
廃液への切り替え:	0~3 分 および 16~22 分

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	MassLynx 4.2 SCN1001
MS ソフトウェア:	MassLynx 4.2 SCN1001
インフォマティクス:	TargetLynx XS

結果および考察

分析法最適化

Oasis 弱陰イオン交換 (WAX) は、水やその他の環境サンプルから PFAS を抽出するために広く使用されているため、抽出用の SPE ケミストリーとして選択しました。WAX は陰イオン交換と逆相保持のメカニズムを両方備えているため、広範な PFAS ケミストリーを保持することができます。そのため、水からの PFAS 抽出に使用されているプロトコルと同様の基本的な方法を血清に適用し、それに合わせてサンプル前処理とプレート洗浄ステップを調整しました。

血清サンプル中での PFAS とタンパク質の結合を阻害するためには、サンプル前処理が、最適化を必要とする最も重要なステップであることが分かりました。50% ギ酸での希釈を、除タンパクに続く 1% ギ酸による希釈を比較しました。試験した除タンパク比には、1: 1 (血清: 溶媒) アセトニトリル、1: 3 アセトニトリル、および 1: 1 メタノールを

含めました。PFAS を WAX ケミストリーに保持するには、除タンパク後の有機相の希釈が必要です。試験した各前処理オプションの効率を判定するため、処理済みサンプルを WAX プレートにロードし、保持されなかった廃液を回収して分析しました。保持されなかった廃液の中に PFAS が検出されたことから、サンプルロード時に PFAS が保持されず、血清マトリックス中のタンパク質またはその他の成分と結合している可能性が高いことが示されました。図 2 は、分析法において、PFAS ケミストリーの範囲にわたる保持されなかった廃液の分析のクロマトグラムの抜粋を示しています。この図から、ギ酸希釈血清ではサンプルロード時に大量の漏出が起きたため、除タンパクが必要であることは明らかです。試験した 3 種類の除タンパクステップのうち、1: 3 血清: アセトニトリル法では、ロード時の PFAS の漏出がほとんどありませんでした。

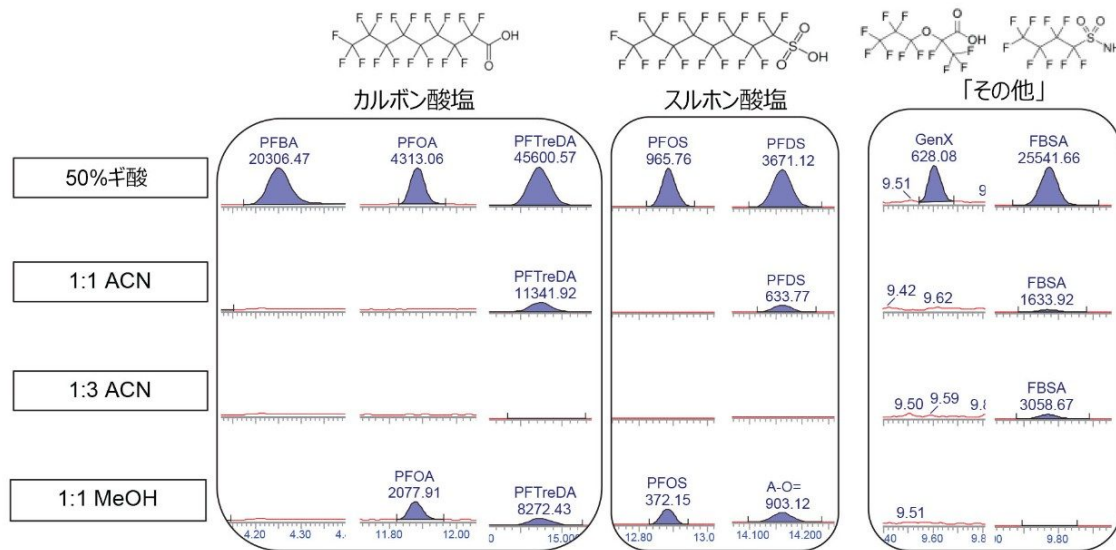


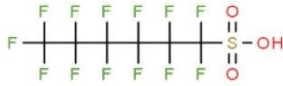
図 2. 各サンプル前処理条件を試験した後、サンプルロード時に回収された廃液

また、固相抽出では効果的に除去できない血清特異的の干渉物が存在するため、カラムの最適化も実施する必要があります。ステロイド前駆体の代謝物および分解産物であるさまざまなステロイド硫酸塩が、PFOS や PFHxS などの PFAS と共溶出することが知られています^{6,7}。当初は、従来の PFAS アプリケーションとの整合性を保つために ACQUITY BEH C₁₈ カラムを使用していましたが、その結果、干渉物の共溶出が発生しました。

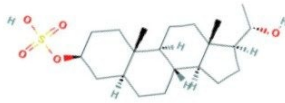
図 3 には、BEH C₁₈ および HSS T3 カラムで得られた PFHxS のクロマトグラムを比較して、この問題について示しています。BEH C₁₈ カラムを使用すると、マトリックス干渉物が見落とされたり、分岐した PFHxS の異性体の 1 つと間違われたりする可能性があります。また、通常の自動データ解析手順でピークをスムージングすると、この干渉物がスムージングされ、直鎖 PFHxS のピークと一体化する可能性が非常に高くなります。これにより、サンプル中の PFHxS の濃度が過大評価されます。HSS T3 カラムを使用することで、マトリックス干渉物のピークの分離を達成し、より正

確で信頼性の高い結果を得ることができました。そのため、すべての血清サンプルの分析に ACQUITY HSS T3 カラムを使用しました。

ペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS)
分子量：400.1 g/mol



プレグナンジオール硫酸
分子量：400.6 g/mol



イソプレグナロン硫酸
分子量：398.6 g/mol

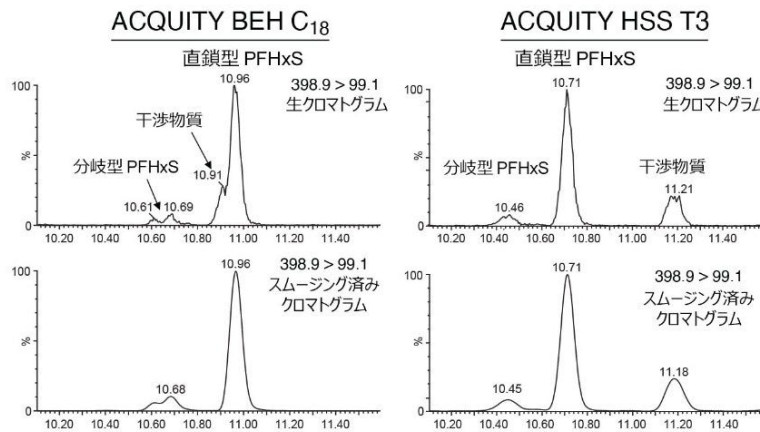
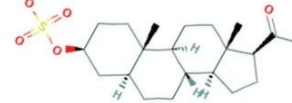


図 3. (上段) LC-MS/MS を用いる際の潜在的な干渉物と判定されたペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS) および 2 種のヒト血清ステロイド硫酸化合物。(下段) PFHxS のヒト血清特異的干渉化合物からのクロマトグラフィー分離についての BEH C₁₈ と HSS T3 カラムの比較。

分析法の性能

マトリックスとして FBS を用いて作成した検量線の直線性と正確度を評価し、PFAS ケミストリーの範囲全体にわたる結果を図 4 に示します。一般に、FBS は、このアプリケーションにおいて PFAS を含まないマトリックスの代替として十分であり、分析種の回収率とレスポンスに関してヒト血清と同様の挙動をすることが分かりました。検量線は 0.05 ~ 20 ng/mL の試験範囲で直線的であり、すべての化合物が R² 値 ≥ 0.996 を示しました。唯一の例外は 6:2 FTS で、R² 値が 0.992 でした。また、キャリブレーション範囲全体にわたる各化合物の残差値も、正確度と再現性を示していると評価されました。残差率は、標準品の計算濃度の、キャリブレーションデータから予測される理論的なレスポンスからの差の割合の目安になります。残差が小さいほど、データの正確度と再現性が高くなります。ネイティブ PFAS の残差は、定量限界 (LOQ) において ≤15%、曲線のそれ以外の部分で ≤10% でした。また、同位体標識標準品については、残差は ≤10% でした。また、サンプル分析時にさまざまな濃度の QC サンプルも注入したところ、QC の正確度は、LOQ 付近で 20% 以内、その他のすべての濃度で 15% 以内でした。

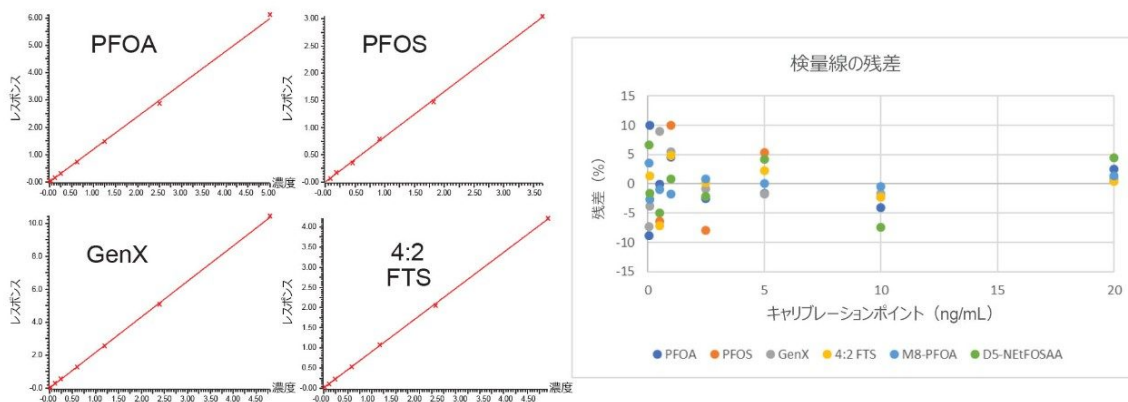


図 4. 4 種の PFAS 化合物の代表的な検量線（左）および代表的なネイティブ標準品および同位体標識標準品の残差の割合（右）

ヒト血清マトリックスからの 30 種の PFAS の回収率を内部標準を使用して評価し、マトリックス効果を補正しました。図 5 に、0.1 ~ 10 ng/mL の範囲にわたって強化した 6 つの異なるプールしたヒト血清ロットからの各化合物の回収率を示します。

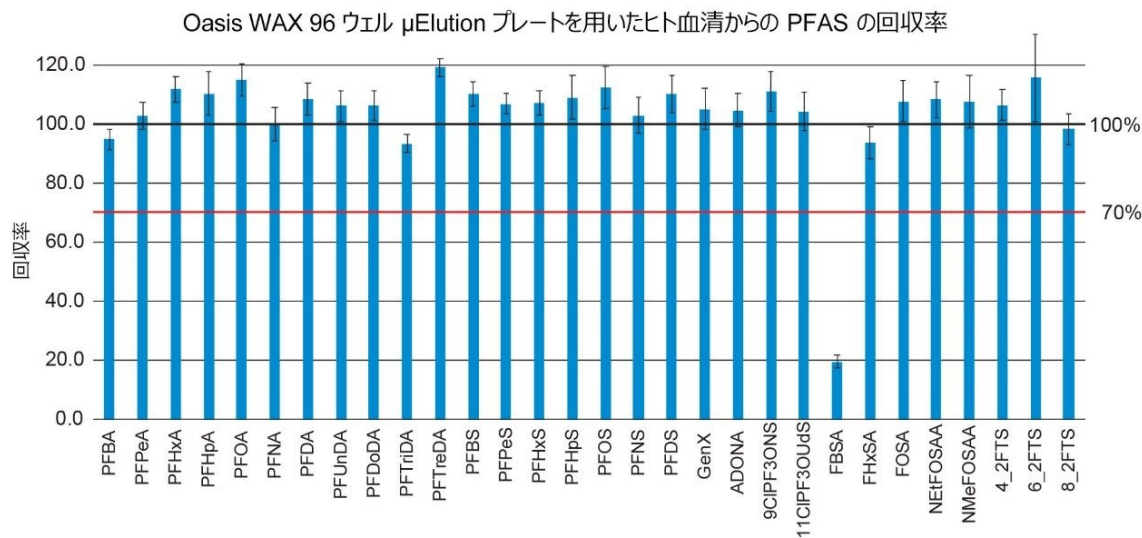


図 5. 0.1 ~ 10 ng/mL の範囲にわたって強化した 6 つの異なるプールしたヒト血清ロットから抽出した分析法に含めた 30 種の PFAS の平均回収率。エラーバーは、これら 18 のデータポイントにわたる各化合物の %RSD を表します。

C4 スルホンアミド (FBSA) 以外の回収率は、85 ~ 120% の許容範囲内でした。FBSA の回収率は約 20% でした。これは、この化合物が、多成分一斉分析法に適さない可能性がある低分子量の中性 PFAS 化合物であるためです。また、この化合物には、同位体希釈の補正に用いることができる適切な内部標準がありませんでした。FBSA の回収率は低いものの、サンプル中に存在する場合は同定が可能でした。この化合物の回収率を高めることが重要である場合は、固相抽出手順を若干変更することで対応できました。例えば、1: 3 アセトニトリル: 水を使用する 2 回目の固相抽出プレート洗浄を行わないことで、FBSA の回収率を高めることができました。あるいは、中性化合物が唯一の対象 PFAS である場合、WAX の代わりに Oasis HLB などの逆相ケミストリーを用いることもできました。ただし、その場合はイオン性 PFAS 化合物に対するパフォーマンスと回収率に影響が及びます。

回収に加え、NIST の標準レファレンス物質 (SRM) を使用してメソッドの性能を継続的に評価しました。一貫した正確な結果が得られるように、すべてのサンプルロットで、非強化ヒト血清である NIST SRM 1957 を繰り返し抽出しました。このレファレンス物質には、プールしたヒト血清中に自然に存在する 7 種の PFAS が含まれており、認証濃度レベルは 0.172 ~ 21.1 µg/kg (または 0.043 ~ 5.27 ng/L) の範囲内でした。この SRM は、1 兆分の 1 (ppt) ~ 10 億分の 1 (ppb) の濃度範囲をカバーしているため、この手法に対する頑健な試験と言えます。この分析法の正確度と頑健性を図 6 に示します。棒グラフは、8 回の繰り返しの SRM 1957 の抽出および分析から実験的に計算した濃度を、認定 NIST 値と比較したものです。散布図は、認定範囲からの実験結果の差の割合を示しており、すべての測定値が認定値の ±10% の範囲内であることを示しています。PFOS のみが一貫してわずかに高い実験結果を示していますが、これは、データ解析時における分岐型異性体と直鎖型異性体の扱い方の違いが原因である可能性が高いと考えられます。さらに、8 回の繰り返しの %RSD はすべて 4% 未満であり、サンプルの抽出と分析が非常に頑健であることを示しています。

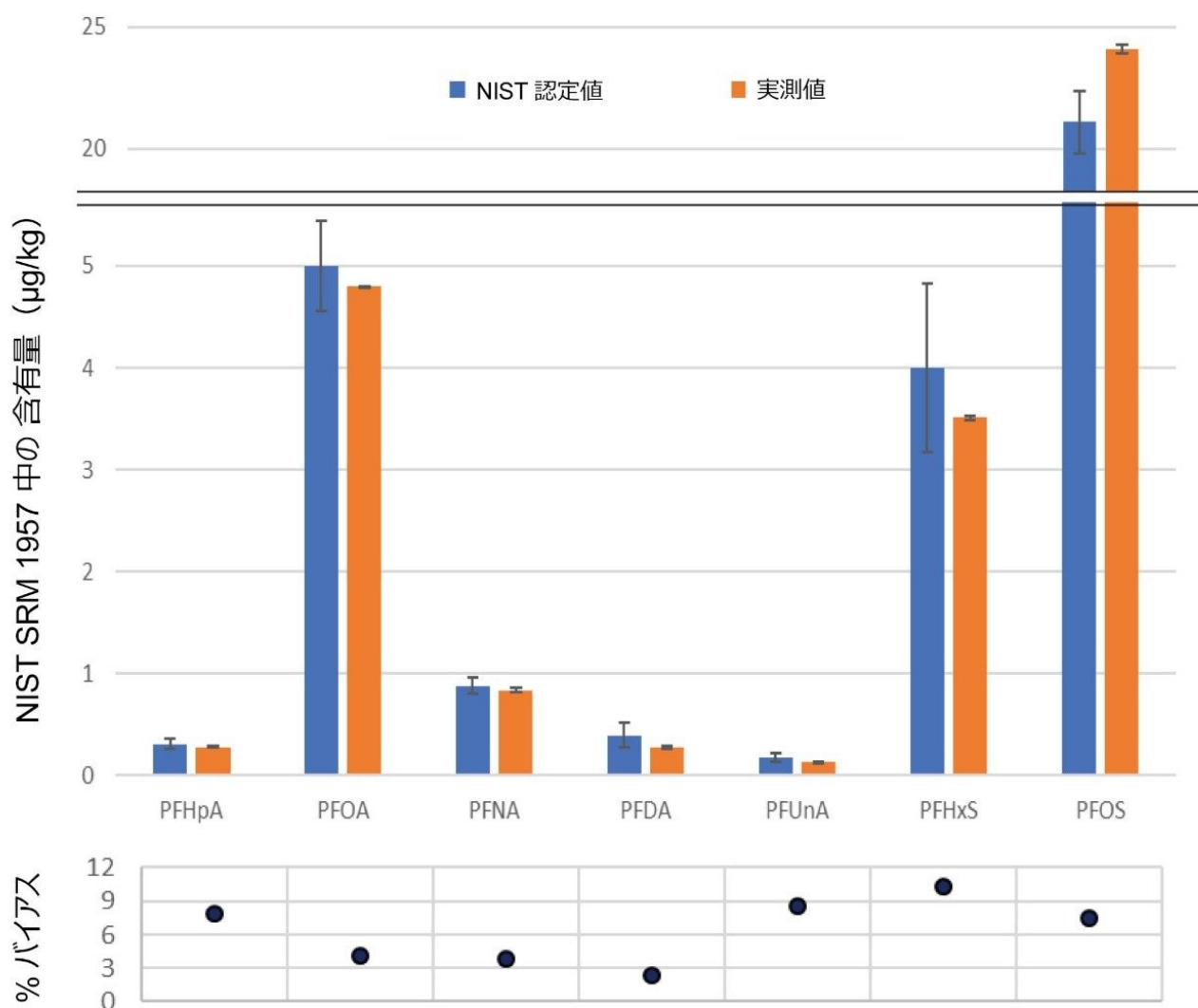


図 6. NIST 1957 標準レファレンス物質の 8 回の繰り返しの分析結果。(上段) SRM サンプルの濃度測定値。青色のバーは、SRM 中の各 PFAS の認定レベルを表します。オレンジ色のバーは、測定値または実験で得られた値を表します。(下段) NIST 認定値から計算した測定値の差の割合。

サンプル分析

上記に概説した方法を使用して、性別、年齢、民族が混在する、6つの異なるプールしたヒト血清ロットの PFAS レベルを測定しました。6 ロットすべてに同定可能なレベルの PFAS が含まれていました。図 7 に、試験した 6 ロットのうち 3 ロット中に同定された主要な PFAS の例を示します。ここでは、同定した個別の PFAS、合計 PFAS レベル、および合計 PFAS レベルを構成する個々の PFAS の比率を表しています。すべてのヒト血清ロット中に非常に類似した

PFAS が同定されましたが、濃度は大幅に異なっていました。また、総 PFAS に対する各 PFAS の比率は、ロットごとに異なっていました。更に、ヒトサンプル中に検出された分岐型異性体の直鎖型異性体に対する比率（図 8）は、分析標準試料中の存在比と大きく異なっていました。分岐型異性体と直鎖型異性体の比は、PFAS 合成のメカニズムを示している可能性があります。異性体比と個々の PFAS の同定を組み合わせることで、曝露経路や発生源の理解に役立つ可能性のある「PFAS フィンガープリント」を作成することができます。

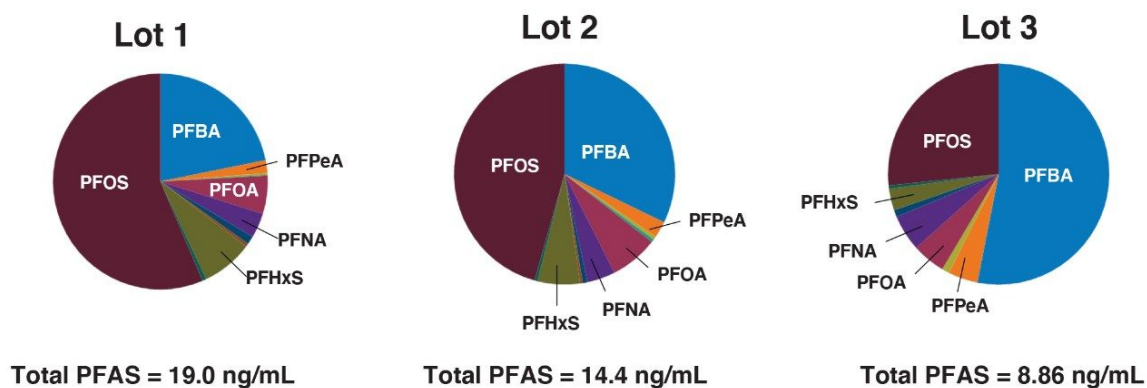


図 7. プールした 3 ロットのヒト血清中の PFAS の同定。合計 PFAS レベルの違いと、異なるサンプルにわたる PFAS の比の違いを示しています。

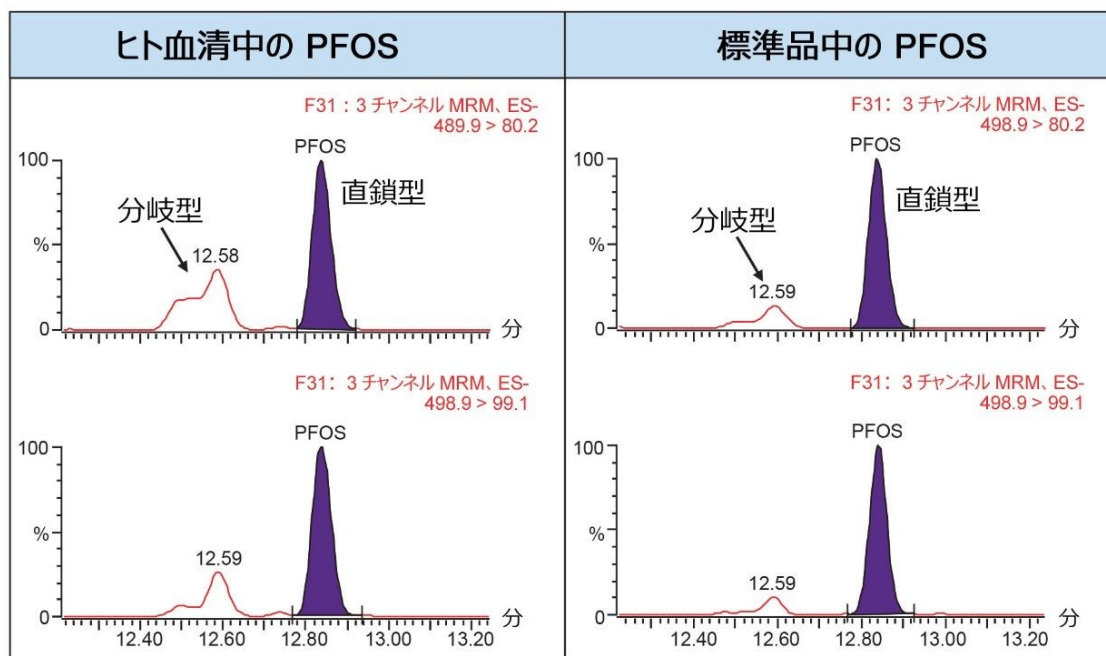


図 8. ヒト血清（左）および分析標準品（右）中の分岐型および直鎖型の PFOS 異性体の比率の比較。異性体の比率は、PFAS の生成に使用した合成プロトコルの種類を示している場合があります、PFAS 曝露源を示している可能性があります。

結論

Oasis WAX μ Elution 96 ウェル SPE プレートを使用して、ヒト血清中の PFAS のための頑健な抽出法を最適化しました。この方法は、さまざまな PFAS ケミストリー群を対象として、ヒトへの曝露に関連して選択した 30 種類の PFAS について最適化しています。分析は、正確で信頼性の高い結果を得るために、Xevo TQ-S micro および PFAS キットのコンポーネントを取り付けた ACQUITY UPLC I-Class を用いて実施しました。血清などの複雑なマトリックスに対するサンプル前処理を用いることで、対象の PFAS 分析種の検出が容易になるだけでなく、装置のメンテナンスが軽減され、装置の稼働時間が長くなります。NIST 標準リファレンス物質 1957 を使用して、分析法の性能を評価し、正確度が確認されました。この方法は、さまざまな種類のラボでの実施が可能であり、労働安全衛生モニタリング、ヒトに対する曝露レベルの理解、発生源のフィンガープリント、暴露経路、地域や疫学的差異に基づくヒトへの影響の理解などを目的として、血清サンプル中の PFAS のレベルと傾向を理解することができます。

参考文献

1. Post GB, Cohn PD, Cooper KR. Perfluorooctanoic Acid (PFOA), An Emerging Drinking Water Contaminant: A Critical Review of Recent Literature. *Environ Res.* 2012 Jul;116:93–117. doi: 10.1016/j.envres.2012.03.007.
2. Zeng Z, Song B, Xiao R, Zeng G, Gong J, Chen M, Xu P, Zhang P, Shen M, Yi H. Assessing the Human Health Risks of Perfluorooctane Sulfonate by *In Vivo* and *In Vitro* Studies. *Environment International.* 2019 126:598-610. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.002>.
3. United States Environmental Protection Agency. Health Effects Support Document for Perfluorooctane Sulfonate (PFOS). USEPA 2016; EPA 822-R-16-002.
4. States Environmental Protection Agency. Health Effects Support Document for Perfluorooctanoic Acid (PFOA). USEPA 2016; EPA 822-R-16-003.
5. Sunderland EM, Hu XC, Dassuncao C, Tokranov AK, Wagner CC, Allen JG. A Review of the Pathways of Human Exposure to Poly- and Perfluoroalkyl Substances (PFAS) and Present Understanding of Health Effects. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2019;29(2):131–147. doi:10.1038/s41370-018-0094-1.
6. Huber S, Brox J. An Automated High-Throughput SPE Micro-Elution Method for Perfluoroalkyl Substances in Human Serum. *Anal Bioanal Chem.* 2015 May;407(13):3751–61. doi: 10.1007/s00216-015-8601-x. Epub 2015 Mar 21. PMID: 25795026.
7. Chan E, Sandhu M, Benskin JP, Ralitsch M, Thibault N, Birkholz D, Martin JW. Endogenous high-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Interferences and the Case of Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) in Human Serum; Are We Overestimating Exposure? *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009 May;23(10):1405–10. doi: 10.1002/rcm.4012.

付録

化合物	親イオン	フラグメントイオン	CV	CE	化合物	親イオン	フラグメントイオン	CV	CE
PFBA	213.0	169.0	10	10	8:2 FTS	526.9	506.8	15	25
PFPeA	262.9	219.0	10	5			527.3	15	40
PFHxA	312.9	269.0	5	10	ADONA	376.9	251.0	10	10
		119.0	5	20			377.3	10	25
PFHpA	362.9	319.0	15	10	9Cl-PF3ONS	531.0	350.9	15	25
		169.0	15	15			83.0	15	25
PFOA	412.9	369.0	10	10	11Cl-PF3OUdS	631.0	450.8	30	30
		169.0	10	15			631.2	30	30
PFNA	462.9	418.9	10	10	GenX	285.0	169.0	5	7
		219.0	10	15			GenX	5	35
PFDA	512.9	468.9	15	10	¹³ C-PFBA	217	172.0	10	10
		219.0	15	15	¹³ C ₅ -PFPeA	268	223.0	10	5
PFUnDA	562.9	518.9	25	10	¹³ C ₅ -PFHxA	318	272.9	10	5
		269.0	25	20			119.9	10	20
PFDoDA	612.9	568.9	30	10	¹³ C ₄ -PFHpA	367	321.9	15	10
		169.0	30	25			172.0	15	15
PFTriDA	662.9	618.9	5	10	¹³ C ₈ -PFOA	421	375.9	5	10
		169.0	5	30			172.0	5	15
PFTreDA	712.9	668.9	10	15	¹³ C ₉ -PFNA	472	426.9	10	10
		169.0	10	25			223.0	10	15
PFBS	298.9	80.1	15	30	¹³ C ₆ -PFDA	519	473.9	5	10
		99.1	15	30			223.0	5	15
PFPeS	348.9	80.1	10	30	¹³ C ₇ -PFUnDA	569.9	524.9	5	10
		99.1	10	30			274.0	5	15
PFHxS	398.9	80.1	10	35	¹³ C-PFDoDA	615	569.9	10	10
		99.1	10	30			169.0	10	25
PFHpS	448.9	80.2	15	35	¹³ C ₂ -PFTreDA	715	669.9	25	10
		99.1	15	35			169.0	25	35
PFOS	498.9	80.2	15	40	¹³ C ₃ -PFBS	301.9	80.0	10	30
		99.1	15	40			99.0	10	25
PFNS	548.9	80.2	20	40	¹³ C ₃ -PFHxS	402	80.1	10	40
		99.2	20	40			99.1	10	35
PFDS	598.9	80.2	25	40	¹³ C ₈ -PFOS	507	80.1	15	40
		99.1	25	40			99.1	15	40
FBSA	297.9	78.0	25	25	¹³ C ₈ -FOSA	506	78.1	35	25
		118.9	25	15			418.9	35	20
FHxSA	398.0	78.1	30	25	D ₃ -N-MeFOSAA	573	482.7	35	15
		169.0	30	25	D ₅ -N-EtFOSAA	589	418.9	30	20
FOSA	498.0	77.9	40	30			¹³ C ₂ -4:2 FTS	329	308.9
		418.9	35	20	81.0	40			25
N-MeFOSAA	569.9	219.1	35	25	¹³ C ₂ -6:2 FTS	429	367.0	10	10
		418.8	15	20			408.8	10	20
N-EtFOSAA	584.0	525.9	15	20	¹³ C ₂ -8:2 FTS	529	508.9	10	20
		307.0	15	15			81.0	10	35
4:2 FTS	326.9	327.3	15	35	¹³ C ₃ -GenX	287	169	5	12
		407.0	15	20			119	5	12
6:2 FTS	427.0	427.3	15	35					

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>>

Xevo TQ-S micro タンデム四重極型質量分析計 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007114JA、2020 年 7 月 改訂

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)