

### 3-2. 第二講演

## 有機フッ素化合物の分析法 — LC/MS/MSを用いた分析及び前処理—

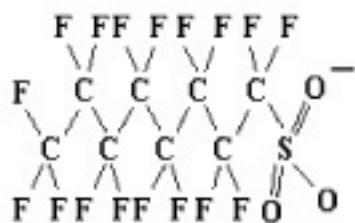
アジレントテクノロジー 株式会社

LC/MS営業本部

今野 靖



### Structures of PFOS and PFOA



Perfluorooctane sulfonate  
(PFOS)

$\text{C}_8\text{F}_{17}\text{SO}_3^-$ , FW: 499



Perfluorooctanoate  
(PFOA)

$\text{C}_7\text{F}_{15}\text{COO}^-$ , FW: 413

## 特 性

- 人工的に製造
- 撥水性・撥油性あり
- 不揮発性
- 環境・生体中で分解しない
- 日用品から工業的に世界中で幅広く使用
- ヒトや野生生物に蓄積
- ヒトへの毒性あり(膀胱癌、前立腺癌)

## 用 途

クリーナー、光沢剤、潤滑剤、さび抑制剤、シャンプー、化粧品、紙および織物の製品、ペイント剤、スコッチ・ガード、消火液、殺虫剤、接着剤、グリース、室内装飾品、敷物類、テフロン調理器具など

PFOA 及び PFOS は、環境中で分解し難く安定なために永遠に地球上を循環する!?

## Global PFCs Production

### PFOS (3M, 2003 AR-226)

(2000) 3,545 T/yr  
(2001) (~95% drop) 175 T/yr  
Still produced in Japan, Italy, Germany, Asia

### PFOA (3M, 2003 AR-226)

Estimated >500 T/yr

### Telomers (TRP Update, 2002 AR-226)

(2000-2002) 5,000-6,500 T/yr  
80% polymeric application

## Serum Half-time in Humans and LD50

PFOS 8.70 years

PFOA 4.37 years

Burnis et al., 2002 US EPA ARS 228-1086

### LD<sub>50</sub>

PFOS 251 mg/kg (Rats, Oral)

PFOA 189 mg/kg (Rats, Oral)

## PFOA・PFOSの毒性

### PFOS

動物実験: 肝臓がん (Seacat, 2002)

甲状腺濾胞状細胞腫瘍 (Thomford, 2002)

疫学研究: 膀胱がん死亡 (Alexander, 2003)

### PFOA

動物実験: 甲状腺ホルモン異常 (Butenhoff, 2002)

疫学研究: 前立腺がん死亡 (Gilliland, 1993)

## 背景

- ・1950 年代から製造
- ・3M 社が PFOS の製造中止を発表 (2000)
- ・ワシントン・ワークス工場の地域住民がデュボン社へ集団訴訟 (2001)
- ・U.S.EPA がデュボン社へ3億ドルの制裁金 (2003)
- ・デュボン社が集団訴訟の和解に合意 (2004)
- ・欧州委員会が PFOS 規制を提案 (2005)
- ・スウェーデンが PFOS を POPs 議定書への追加提案 (2005)
- ・欧州議会は PFOS (含PFOA) 規制案を採択し、本会議へ送付 (2006)
- ・U.S.EPA が PFOA 管理責任プログラムを提起 (2006)
- ・2008.6 から EU 市場への持ち込み禁止 (PFOSのみ)
- ・2009.4 第4回 POPs 条約締約国会議

## ヒトと野生生物への蓄積性

ヒト	性	組織	PFOA (ppb)	PFOS (ppb)
職業人 (オルセンら,1999,米国)	男性 (n=178)	血清	-	2190 (Max: 12830)
一般人 (ハンセンら,2001,米国)	男・女 (n=75)	血清	6.4	28.4
一般人 (オルセンら,2003,米国)	男性 (n=332)	血清	4.6	34.9
	女性 (n=313)		4.9	37.8

野生生物	場所	組織	PFOA (ppb)	PFOS (ppb)
ホッキョクグマ	アラスカ, 米国	肝臓	-	180-680
バンドウイルカ	アドリア海	血液	3.1	143
トウゾクカモメ	南極	血清	-	1.4

## Global distribution of PFOS in wildlife



PFOS や PFOA で 大気  
 人や野生生物が汚染されている


↓ 水

汚染経路は何？ 食事


2001~2003

Agilent Technologies

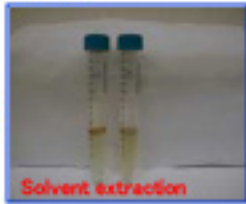
### Analysis of PFCs Concentrations in serum



Addition of reagents




Shaking




Solvent extraction


[1,2-<sup>13</sup>C]-perfluorooctanoic acid, 0.5M tetrabutylammonium hydrogen sulfate (pH 10), 0.25M sodium carbonate, tert-methyl butyl ether (MTBE)



Organic layer



Nitrogen Purge



LC/MS analysis

References

- G.W. Olson, J.M. Burns, J.H. Mendel, and L.R. Zobel: "Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry test in fluorochemical production employees", *J.OEM*, 41, 799-805 (1999).
- K. Hansen, L.A. Glenn, M.R. Ebbeson, and H.O. Johnson: "Compound-specific, quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices", *Environ. Sci. Technol.*, 35, 769-770 (2001).
- J.P. Giesy and K. Kannan: "Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wild fish", *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1339-1345 (2001).

Agilent Technologies

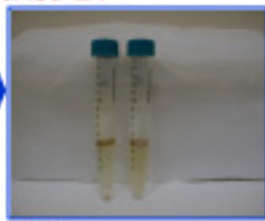
## 血清の分析法（オルセンらが開発）



溶媒添加



振とう



抽出



溶媒を分取



空白バージ



LC/MS 分析

## 水の分析法



ろ過



固相カートリッジの洗浄



コンセンレーターにセット



濃縮



メタノールで溶出



LC/MS 分析

## Water Sample preparations for PFCs analysis



これは、岩手県環境保健研究センター齊藤先生らが開発した、河川水や飲料水中 PFOS 及び PFOA 分析法を示したものです。  
 1 $\mu$ m のろ紙でろ過。  
 固相カートリッジをメタノール洗浄し、コンセントレーターにセット。  
 毎分 10mL/min. の速度で 1L のサンプルを通過させ、PFOS や PFOA をカートリッジに吸着させる。吸着したものを 2mL のメタノールで溶出し、窒素をバージして 1mL まで濃縮。  
 これを、GC/MS で測定。

## 大気浮遊粉塵の分析法



高速溶媒抽出	
装置	ダイオキソス器 ASE-200
試液体積	11 mL
オープン温度	100 °C
圧力	1,500 psi (= 10.5 MPa)
循環時間	10 min
洗浄液	メタノール
抽出回数	2 回





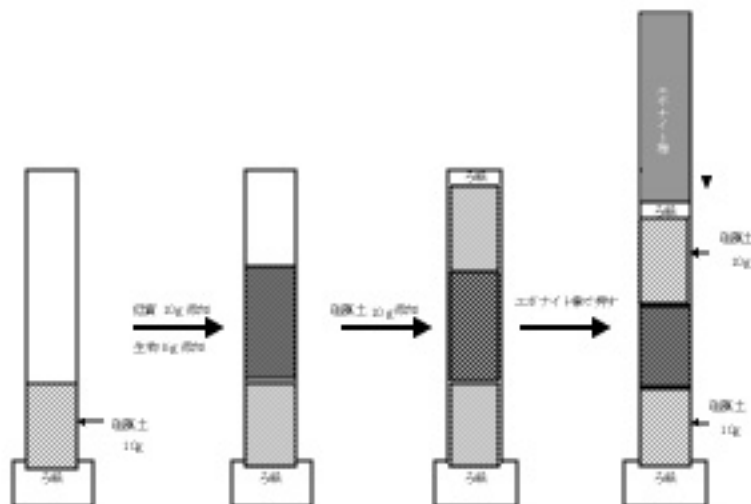
## Analysis of PFCs Concentrations in Air Particulates



Table Accelerated solvent extractor for PFO5	
instrument	DIDMEX ASE-200
cell size	11 mL
oven temperature	100 °C
pressure	1,500 psi (=10.5MPa)
static time	10 min
flush volume	120 % of extraction cell volume
solvent	methanol 10% solution
nitrogen purge	150 psi (=1MPa) for 120sec.
extraction cycle	twice

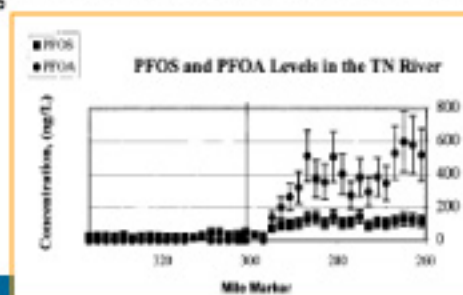


## ASE 充填方法 (低質・生物)



## 環境水の測定例(米国)

- 1) Moody CA, Martin JW, Kwan WC, Muir DCG, Mabury SA : Monitoring perfluorinated surfactants in biota and surface water samples following an accidental release of fire-fighting foam into Etobicoke Creek, Environ. Sci. Technol 2002, 36, 545-551
- 2) Moody CA, Hebert GN, Strauss SH, Field JA : Occurrence and persistence of perfluorooctanesulfonate and other perfluorinated surfactants in groundwater at a fire-training area at Wurtsmith Air Force Base, Michigan, USA, J. Environ. Monit. 2003, 5, 341-345
- 3) Hansen KJ, Johnson HO, Eldridge JS, Butenhoff JL, Dick LA : Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River, Environ. Sci. Technol 2002, 36, 1681-1685

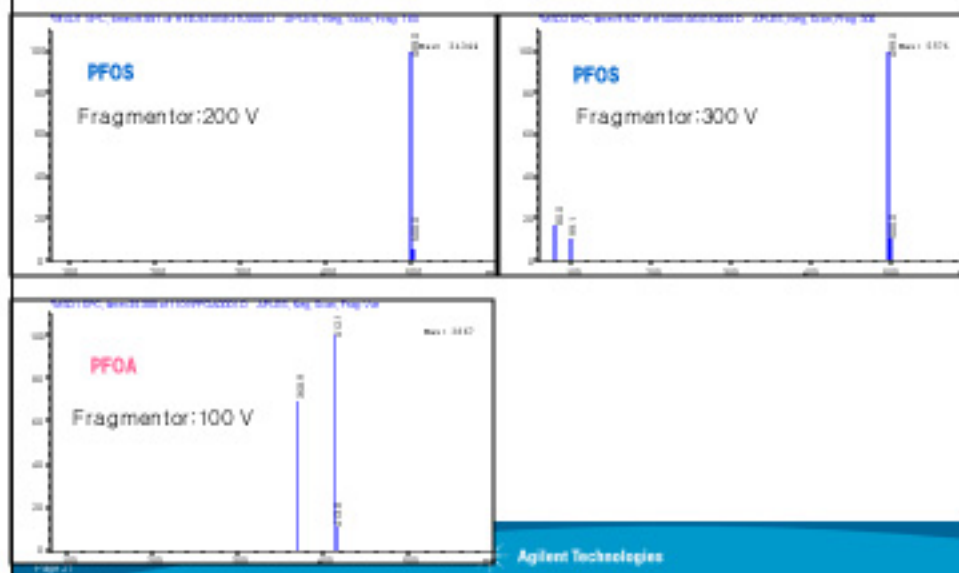


## Optimized analytical method for PFOS and PFOA using LC/MS

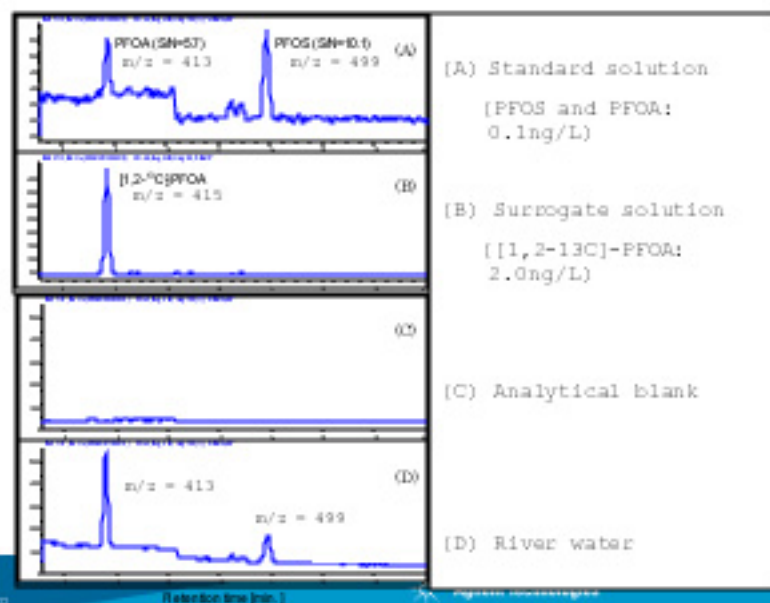
HPLC		MS	
Instrument	: Agilent 1100	Instrument	: Agilent 1100MSD SL
Column	: Zorbax XDBC-18(3.5µm, 2.1x150mm)	Ionization	: ESI
Mobile phase <sup>1)</sup>	: A : CH <sub>3</sub> CN B : 10mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O	Nebulizer	: N <sub>2</sub> (50 psi)
Flow rate	: 0.2 mL/min.	Drying gas	: N <sub>2</sub> (10.0L/min, 350°C)
Oven temp	: 40°C	Polarity	: Negative
Injection volume	: 10.0 µL	Fragmentor	: 100V(PFOA), 200V(PFOS)
		Vcap	: 4000V
		SIM(m/z)	: Q <sub>1</sub> :499, Q <sub>2</sub> :300, Q <sub>3</sub> :99 (PFOS)
			: Q <sub>1</sub> :413, Q <sub>2</sub> :369 (PFOA)

<sup>1)</sup> gradient A: 35%-45% (2%/min, 5min), 45%(15min), 45%-90%(9%/min, 5min), 90%(5min), 90%-35%(11%/min, 5min), 35%(5min)

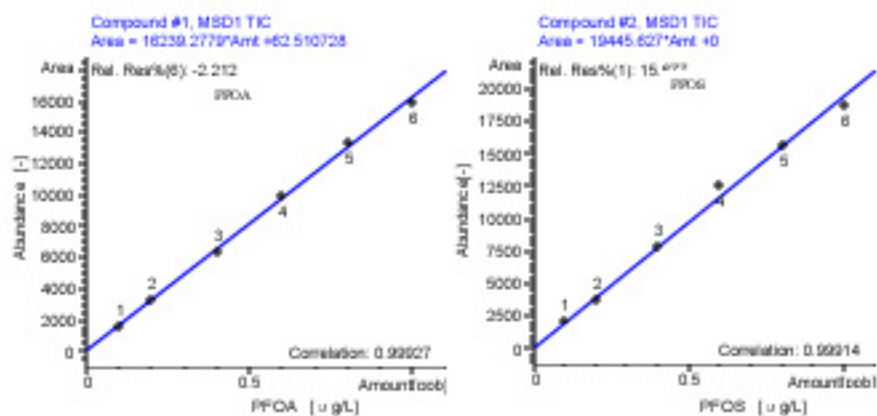
## LC/MS スペクトル



## LC/MS chromatogram for PFOS and PFOA



## PFOS・PFOA の検量線



## 検出下限

試料名	試料量	PFOS	PFOA
血清	1.0 mL	0.05 (μg/L)	0.04 (μg/L)
水	1,000 mL	0.05 (ng/L)	0.04 (ng/L)
生物	5.0 g	88 (ng/kg)	92 (ng/kg)
低質	10 g	22 (ng/kg)	16 (ng/kg)
大気粉塵	504 m <sup>3</sup>	0.09 (pg/m <sup>3</sup> )	0.14 (pg/m <sup>3</sup> )

## 繰り返し添加回収実験（河川水）

	河川水					
	PFOS			PFOA		
	濃度 (ng/L)	回収量 <sup>1)</sup> (ng/L)	回収率 <sup>2)</sup> (%)	濃度 (ng/L)	回収量 <sup>1)</sup> (ng/L)	回収率 <sup>2)</sup> (%)
	0.45	1.46	100.0	0.51	1.44	87.2
	0.45	1.48	102.0	0.57	1.47	90.2
	0.48	1.53	107.0	0.46	1.54	97.2
	0.46	1.54	108.0	0.56	1.55	98.2
	0.44	1.52	106.0	0.49	1.48	91.2
	0.45	1.54	108.0	0.57	1.53	96.2
	0.47	1.56	110.0	0.61	1.60	103.2
mean	0.457	1.519	105.9	0.539	1.516	94.8
$\sigma_{n-1}$	0.014	0.036		0.053	0.055	
C.V.(%)	3.0	2.4		9.9	3.6	

1) PFOS及びPFOAをそれぞれ1 (ng/L) 添加して7回繰り返しの回収実験を行った

2) 濃度の平均値に対する回収率

## 繰り返し添加回収実験（血清）

	PFOA			PFOS		
	濃度 <sup>1)</sup> (ng/g)	回収量 <sup>2)</sup> (ng/g)	回収率 <sup>3)</sup> (%)	濃度 <sup>1)</sup> (ng/g)	回収量 <sup>2)</sup> (ng/g)	回収率 <sup>3)</sup> (%)
		3.78	14.06	102.4	7.88	18.06
	3.96	14.56	107.4	8.30	17.18	91.7
	3.82	14.86	110.4	7.84	17.78	97.7
	4.08	14.52	107.0	8.18	17.32	93.1
	3.68	15.02	112.0	7.38	17.86	98.5
	3.86	15.00	111.8	8.34	18.04	100.3
	3.74	14.22	104.0	8.12	17.10	90.9
mean	3.817	14.606	107.9	8.006	17.620	96.1
$\sigma_{n-1}$	0.161	0.376	3.759	0.336	0.410	4.097
C.V.(%)	4.2	2.6	3.5	4.2	2.3	4.3

1) 0.5mlの血清を分析

2) 標準10ng/mlを添加して回収した量

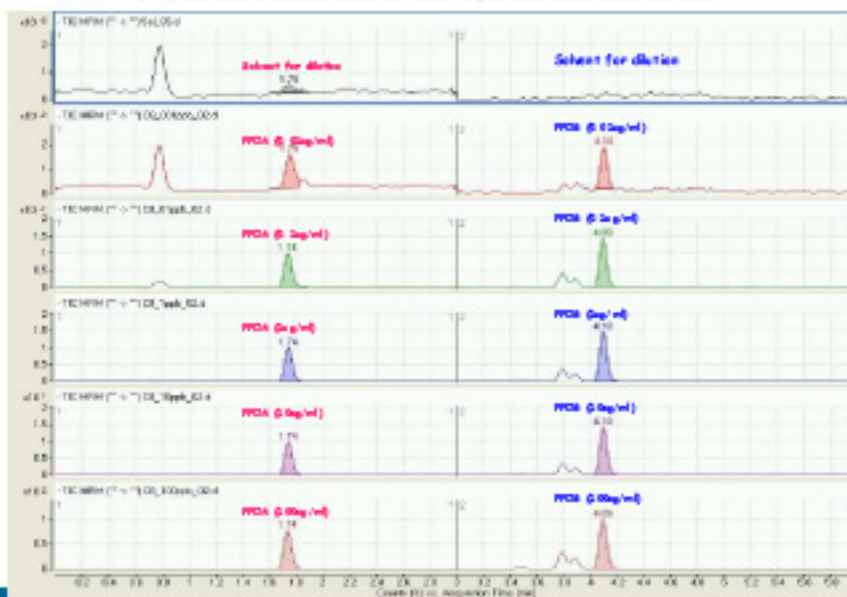
3) 回収率 = (回収量-濃度)/0.5 × 100

## Optimized analytical method for PFOS and PFOA using LC/MS/MS

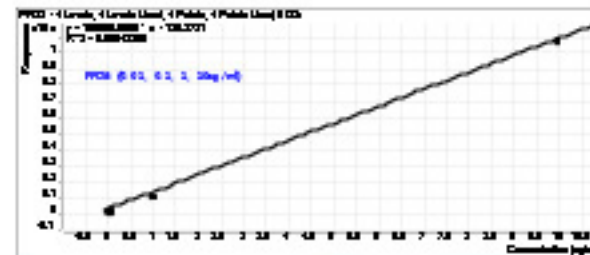
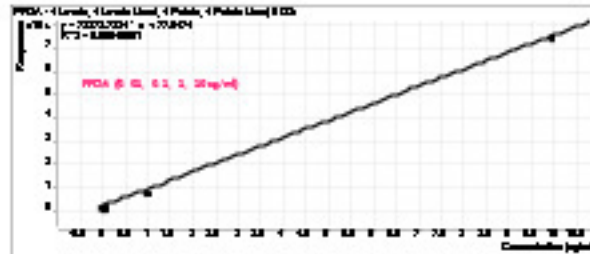
Table 1. HPLC and MS analytical conditions for PFOA and PFOS

HPLC		MS	
Instrument	Agilent 1200 SL series Binary Pump Micro Degasser WELL Autosampler Column Oven ALS Thermo	Instrument	Agilent 6400
Column	Zorbax Eclipse Plus (2.1 x 200 mm, 1.8µm)	Mass range	50 – 300 (m/z)
Mobility phase	A: 50mM CH <sub>3</sub> COOH B: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Polarity	Positive
Gradient	(% B) 40 - 40 - 90 - 90 (min) 0 - 2 - 3 - 6	Programmer	PFOA: 8.0V, PFOS: 20.0V
Flow rate	0.2 mL/min	Ionization	ESI
Oven temp.	40 °C	Nebulizer	N <sub>2</sub> (50 psi)
Injection vol.	20µl	Drying gas	N <sub>2</sub> (20 L/min)
Sample	STD 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml	Drygas temp.	250 °C
		MRM	PFOA m/z 413 → 369, 5xV PFOS m/z 499 → 30, 50 xV

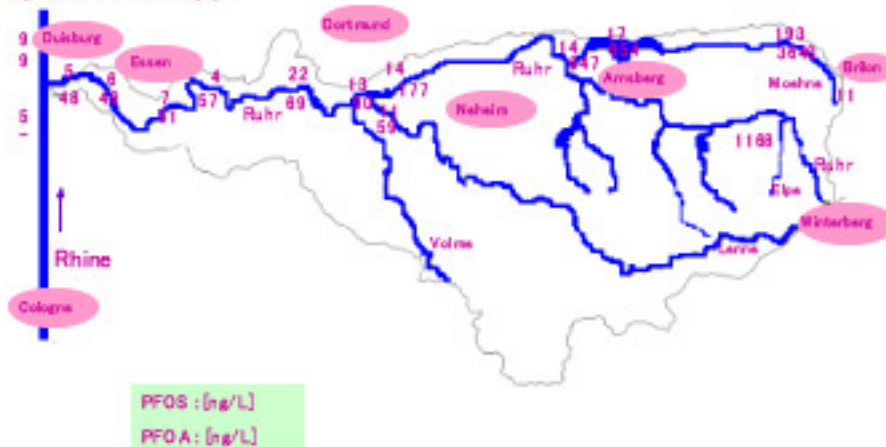
## Example of MRM chromatograms of STDs



## 検量線 (LC/MS/MS)

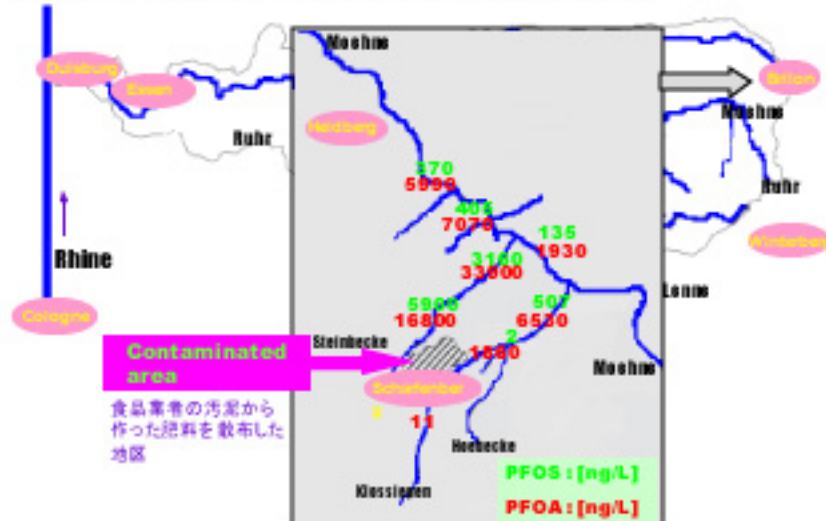


## Perfluorinated surfactants concentrations in surface water in the Ruhr area (Germany)



Skutlarek D, Exner M, Farber H: Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. Environ. Sci. Pollut. Res., 2006, 13(5): 299-307

## Perfluorinated surfactants concentrations in surface water near Brilon-Scharfenberg (Germany)



D. Skutlarek et al.: Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters, Environ. Sci. Pollut. Res., 2006, 13(5), 299-307

Page 11

Agilent Technologies

## Perfluorinated surfactants concentrations in drinking water in the Ruhr area (Germany)



No.	Sampling site (town)	PFOA [ng/L]	PFOS [ng/L]
1	Oberhausen	43	9
2	Muelheim	30	3
3	Velbert	38	-
4	Essen	56	7
5	Bochum	53	10
6	Witten	49	12
7	Hagen	34	22
8	Dortmund	152	11
9	Schwerte	145	13
10	Freudentberg	143	6
11	Menden	157	11
12	Wickede	208	-
13	Neheim	519	5
14	Amsberg	71	-
15	Meschede	22	-

Skutlarek D, Exner M, Farber H: Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters, Environ. Sci. Pollut. Res., 2006, 13(5), 299-307

Page 12

Agilent Technologies



## 合衆国における飲料水規制

・US EPA : 2006.11

PFOA: 500 ng/L (=0.50ppb) (排出事業者が飲料水の浄化、代替水源を確保)

・ノースカロライナ州: 水質管理局 (2006.2)

PFOA: 2 ppb (暫定的許容レベル)

・ミネソタ州: 健康局 (2007.1)

PFOA: 1 ppb,

PFOS: 0.6 ppb (健康ベースの勧告値)

・ニュー・ジャージー州: 環境保護局 (2007.2)

PFOA: 40ng/L (= 0.04ppb) (暫定的飲料水指針値)

## PFOS/PFOA の方向性

EU 使用廃止に向けた取り組み (2008.6.27 輸入禁止)

USEPA PFOA 低減プログラム (2015 にゼロにする)

日本 「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律(化審法)」による第二種監視化学物質 (旧指定化学物質) に指定(2002)

「第4回 POPs 条約締約国会議(2009.4)」

## 特性・用途

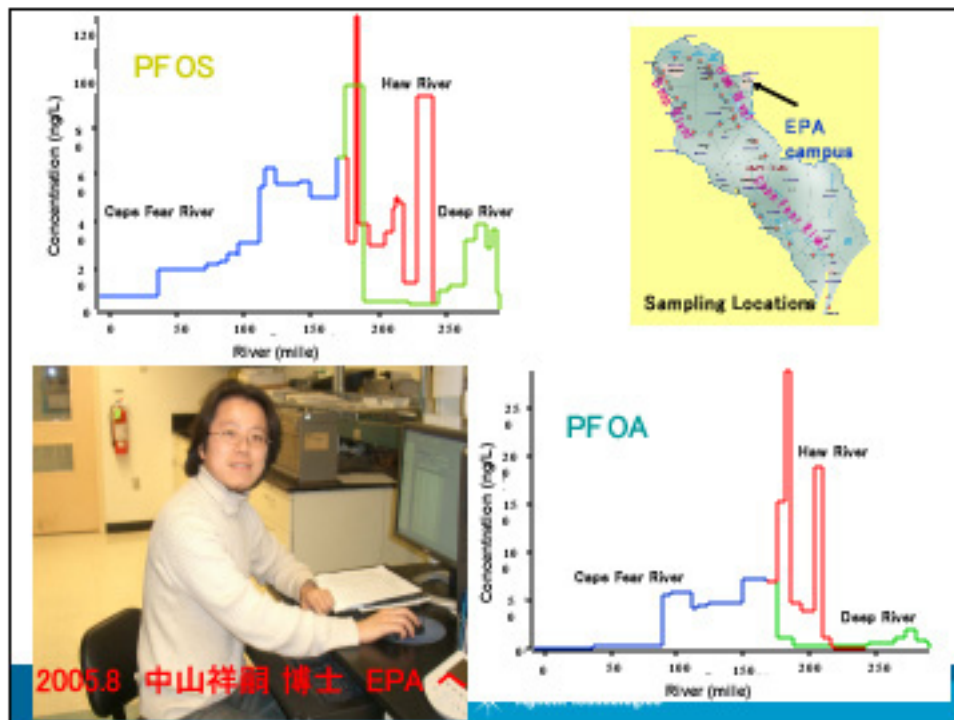
### 特性

1. 人工的に製造
2. 撥水性・撥油性あり
3. 不揮発性
4. 環境・生体中で分解しない
5. 日用品から工業的に使用
6. ヒトや野生生物に蓄積
7. ヒトへの毒性あり

### 用途

クリーナー、洗剤、潤滑剤、さび抑制剤、シャンプー、化粧品、紙および織物の製品、ペイント剤、スコッチ・ガード、消火液、殺虫剤接着剤、グリース、室内装飾品、敷物類、テフロン調理器具など

アメリカ・カナダ、EU が最も注目する POPs 化合物



## EPA の分析風景

