

厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発に関する研究
（H28-食品-指定-010）
平成30年度研究分担報告書

研究分担課題：有害物質（有機フッ素化合物）摂取量推定に不可欠な分析法開発

研究分担者 井之上 浩一

要旨 本研究では、有機フッ素化合物（PFCs）を対象として、国際的および国内の情報をもとに、食品からのヒト曝露調査に関する調査研究を進めている。2018年度は、ストックホルム条約残留性有機汚染物質検討委員会第14回会合およびEuropean Food Safety AuthorityからPFCsに関連する報告がなされた。それらの報告を参考に、本研究で進めていたPFCsのトータルダイエツトスタディに基づく、その摂取量推定を再検討することとした。分析法には、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）を採用し、分析対象を15種類に絞り込んだ。また、目標とする定量値をCommission Recommendation 2010/161/ECの1 µg/kg以下が望ましいとの報告と本分析結果に基づくバックグラウンド値から試料量10 gから再溶解を0.5 mLとして、定量範囲を0.05～5 µg/kgとした。今後、本条件を基盤として、日本独自のトータルダイエツトスタディを進めることとする。

A. 研究目的

昨年度から継続している有機フッ素化合物（Perfluorocompounds: PFCs）に関する調査研究において、本報告書で国際的及び国内の食品ばく露を含めた現状を議論してきた。その一方で、具体的な国際的かつ国内の法的処置も進んでおり、現在では、ペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）とその塩は、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（POPs条約）において、第4回締約国会議で当該条約の製造・使用を制限する措置を取るべき物質（附属書B）に追加することが決定され、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律施行令の改正により平成21年10月に新たに第一種特定化学物質に指定されたPFOSについて、海外における基準値設定例等に関する追加情報を整理及び基準策定方針が行われた。一方、平成30年9月のストックホルム条約残留性有機汚染物質検討委員会第14回会

合（POPRC14）では、ペルフルオロオクタ酸（PFOA）とその塩及びPFOA関連物質について、条約上の廃絶対象物質（製造・使用・輸出入を禁止する措置を取るべき物質：附属書A）への追加が決定され、国内でも化審法において、今後、条約の義務を担保するための各種措置がとられると考えられる。また、ペルフルオロヘキサンスルホン酸（PFHxS）とその塩及びPFHxS関連物質について、リスク管理に関する評価を検討する段階に進めることが決定された。今回のPOPRC14において、PFHxSが議論され、そのリスクプロファイルは残留性、濃縮性、長距離移動性及び毒性などから、高次捕食動物への生態影響に重大な悪影響をもたらす恐れがあるとの結論になった。2019年の会合において、さらにPFHxSの議論が進み、今後の規制対象となるため、本研究対象としても注目すべき化合物と考えられる。

食品からのヒト曝露評価については、European Food Safety Authority (EFSA)より2018年3月に報告がなされた¹⁾。本報告では、主に PFOS 及び PFOA であり、最終的な分析結果 (PFOS n=10,191; PFOA n=9,828) に基づき (しかしながら分析結果に大きなバラツキもあり分析法としても不十分, insufficient sensitivity と示してある), 魚介類, 肉類, 卵類で PFOS 曝露要因, 牛乳, 飲料水, 魚で PFOA 曝露要因と示している。また, ヒトにおける半減期は, PFOS で約5年, PFOA で約2~4年であり, 血清コレステロール値などへ影響が懸念される。これら, 血液中 PFOS 及び PFOA レベルをもとに, 本報告では Tolerable weekly intake (TWI) を PFOS で 13 ng/kg body weight (bw)/week, PFOA で 6 ng/kg bw/week とした。両化合物に対して, 集団のかなりの割合が提案された TWI を超過していると報告された。今後, この TWI について, 議論されるものと思われる。いずれにおいても, 本研究プロジェクトについて, 国内でも食品ばく露評価を示す必要があると考えられる。よって, 本バックグラウンドをもとに PFCs の食品ばく露評価に基づく, 国内基盤を構築する。

B. 研究方法

標準品: 今回, 分析対象とした PFCs の略名, 構造式, 分子量, 入手試薬メーカーおよび純度を表 1 に示す。また, 構造式は図 1 に示す。

試薬: 本実験に用いた試薬は, アセトニトリル (和光純薬社製), メタノール (和光純薬社製), *n*-ヘキサン (和光純薬社製), ギ酸 (和光純薬社製), アンモニア水 (和光純薬社製), 酢酸アンモニウム (和光純薬社製) である。

標準溶液の調製方法: 本標準品はメタノールを用いて, 1000 µg/mL (ppm) の標準原液に調製した。検量線用標準溶液は, 各標

準原液からメタノールで希釈し, 100 ng/mL (ppb) の混合液を調整した。その後, 本溶液を段階的に希釈し, 検量線用標準溶液を調製した。

遠心分離機: 日立社製 CF15RN
ホモジナイザー: SPEC 社製 2010 Geno/Grinder
固相抽出カラム: 和光純薬社製 Presep[®] PFC-II (60 mg/3 mL)
LC 装置: Waters 社製 Acquity H Class
MS 装置: Waters 社製 Xevo TQD

移動相には, 20 mM 酢酸アンモニウム水溶液(A)/メタノール(B)を使用し, 本条件を表 2 に示す。

カラム: GL サイエンス社製 Inertsil C8-4HP (2.1×100 mm, 粒子径 3µm,)
カラム温度: 40°C
流速: 0.2 mL/min
注入量: 10 µL

MS 装置: 測定条件は, エレクトロスプレーイオン化法 (ESI: ネガティブモード) で行った。

Capillary voltage: 2.0 kV
Extractor voltage: 3 V
RF lens voltage: 2.5 V
Source temperature: 150°C
Desolvation temperature: 400°C
Cone/desolvation gas flows: 50/800 L/hr
MS/daughter scan ranges: *m/z* 50 to 1200
Cone voltage: 15-50 V
Collision energy: 15-50 eV

C. 研究結果

C.1. 食品からの PFCs 分析に関する方向性について

今回, EFSA からの報告を含め, 本研究方針を明確に示すこととする。EFSA からの Per-/Polyfluoroalkyl substances は, C4~C16

を PFOS 及び PFOA を含め、ひとつの定義としている。POPRC14 では、PFHxS (C6) に注目していることから、C4 以上を対象とすることで妥当と考えられる。また、昨年度までの報告において、炭素鎖が C11 以上となると、固相抽出カラムに吸着し、溶出が困難であった。また、C3 以下では、逆にカラムへの吸着が難しく、試料添加のときに溶出してしまうことが確認された。以上より、本研究では、C4~C10 を対象とすることとした。また、その他の化合物として、昨年度までに報告しているように今後注目される化合物を追加した。一部、標準品の入手が困難であったものを除外し、表 1 を最終的な目標と定めた。また、EFSA の報告書では、直鎖及び分岐鎖の PFOS や PFOA も生産され、環境やヒト曝露サンプルで検出されていることから注意が必要であると述べている。これについては、今後の検討とする。

C.3. LC-MS/MS による分析法の検討

EFSA の報告においても、LC-MS/MS が一般的に PFCs に利用されており、食品や生体サンプルに応用できることが述べられている。そこで、本研究でも昨年度より検討している LC-MS/MS を利用した PFCs の分析法を再評価することとした。Commission Recommendation 2010/161/EC において、定量限界 (LOQ) が $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下が望ましいと報告されている²⁾。つまり、食品試料を 10 g と設定した場合、 10 ng 絶対量として LOQ を求めることになる。今回、LC-MS/MS による分析法開発としては、最大の最終溶液に調製する体積量は 10 mL となる。しかし、更なる感度を求めるため、どの程度、濃縮できるのか、検討した。PFCs はオーバーブランクの問題や吸着なども考えられるため³⁾、濃縮倍率を検討した結果、表 3 に示した。これらより、再溶解量を 0.5 mL とした。以上より、食品の目標 LOQ ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下) を達するためには、 $20 \text{ ng}/\text{mL}$ (ppb) を定量範

囲内にする必要がある。

次に、感度を求めるために、イオン化の最適化と分離条件を再検討した。今回対象とする PFCs のマススペクトルを図 2 に示す。いずれも、昨年までの報告を基盤として、表 1 を最適とした。また、分離についても、昨年までの条件を修正した。クロマトグラムを図 3 に示す。次に、検量線を LOQ から 100 ppb の範囲で作成した結果を図 4 に示す。いずれも、対象とする PFCs は分析可能な条件を確定した。

C.2. 食品試料からの前処理の検討

昨年度の結果を踏まえ、和光純薬社製 Presep PFC-II を用いて、トータルダイエツトスタディに基づく、食品試料のバックグラウンドデータを検討した。その際のプロトコルを図 5 に示す。また、試料量から、今回は試料前処理としては $n=1$ 、繰り返し測定 $n=3$ として、その平均値を示した (図 6)。今回は、添加回収実験などを行っておらず、あくまでもバックグラウンドのデータとして求めた。その結果、数~数千 pg/g レベルでバックグラウンドが検出された。つまり、2010/161/EC²⁾ で推奨する検出レベルでは、その殆どが LOQ 以下となることが分かった。次に、LC-MS/MS の LOQ は、 $0.005 \sim 0.39 \text{ ng}/\text{mL}$ となり、十分に担保できると推定される。そこで、検量線の最低濃度を $1 \text{ ng}/\text{mL}$ ($\text{LOQ} \times 10$) として、 $100 \text{ ng}/\text{mL}$ まで作成した場合、その定量範囲は、 $0.05 \sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ となる。一部、PFOS で定量範囲を超える可能性が示唆されるが、殆どの化合物と食品群で定量範囲に入るものと思われる。また、食品群としては、4 群及び 7 群で多く検出されているが、今後の検討と考えられる。

D. 考察

昨年度に引き続き、PFCs のヒト曝露調査の結果、近年では EFSA を含めて、総合的な食品分析の結果に基づく、リスクアセス

メントが必要であることが判明した。そこで、本研究では、LC-MS/MS による PFCs の分析法に関して、再評価を行った。今回、主課題としたのは、EFSA などで問題としている定量値及び分析対象物質の算定を行った。昨年度の食品リスク評価および標準品の入手などの条件から 25 種類 PFCs を対象に分析法を検討していたが、分析結果に基づく信頼性や EFSA などでの対象物質なども考慮して、15 種類の PFCs に絞った。いずれも、PFOS, PFOA 及び PFHxS も含まれ、十分な検討項目と考えられる。しかしながら、今回は、直鎖のみを対象としており、分岐鎖は今後の検討とする。定量値においては、Commission Recommendation 2010/161/EC が、LOQ を 1 µg/kg 以下が望ましいと報告している²⁾。その一方で、分析条件の最適化やトータルダイエツトスタディに基づく、食品試料のバックグラウンドデータから、試料量 10 g に対して、定量範囲を 0.05~5 µg/kg と設定した。

E. 結論

本検討より、下記のことを結論とする。また、今後はさらなる高精度かつ有用な多種類へ対応できる前処理を構築することが望まれた。

- ・ LC-MS/MS により、15 種類の PFCs の一斉分析を提案する。
- ・ 試料量 10 g に対して、定量範囲を 0.05~5 µg/kg と設定する。
- ・ Presep PFC- II を用いる前処理法について、バリデーションが求められる。

これらの要点より、様々な食品に対応できる PFCs の前処理法の確立が重要なこととであり、今後、更なる改良と改善を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願、登録状況

特になし

H. 健康危機情報

特になし

I. 参考文献

- 1) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. *EFSA Journal*. 16, 5194. (2018).
- 2) COMMISSION RECOMMENDATION of 17 March 2010 on the monitoring of perfluoroalkylated substances in food. *2010/161/EU*;
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:068:0022:0023:EN:PDF>
- 3) Jahnke, A., Berger, U., Trace analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in various matrices—How do current methods perform? *J. Chromatogr. A* 1216, 410-421. (2009).

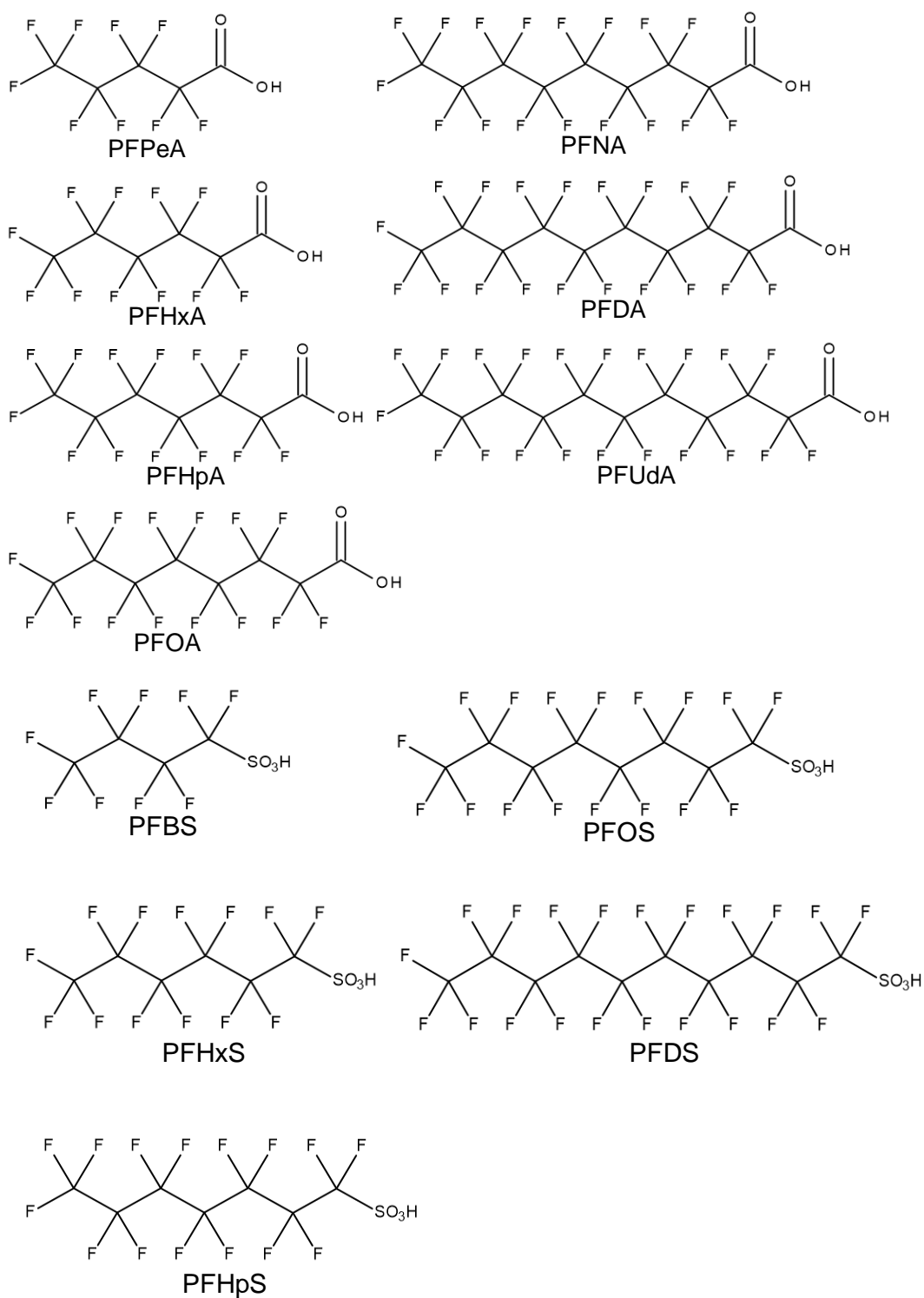


図 1. 分析対象の PFCs の構造式 (1)

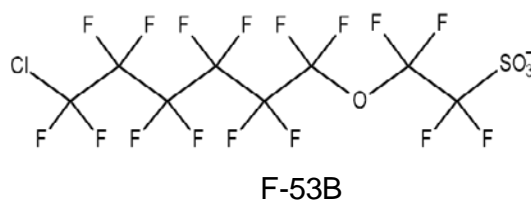
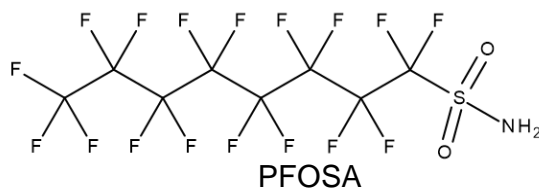
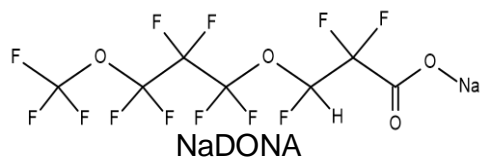


図 1. 分析対象の PFCs の構造式 (2)

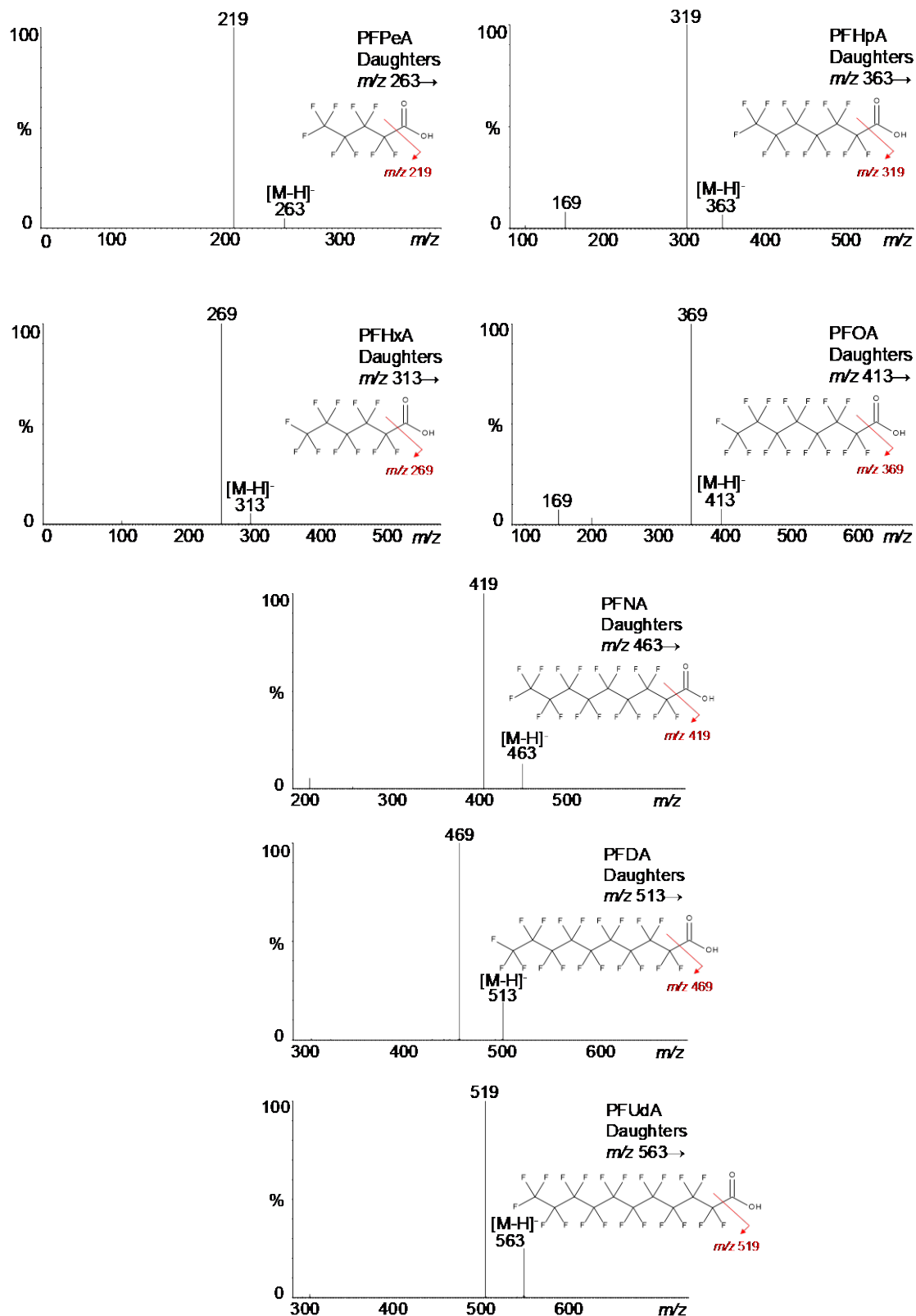


図 2. 分析対象 PFCs のマススペクトル (1)

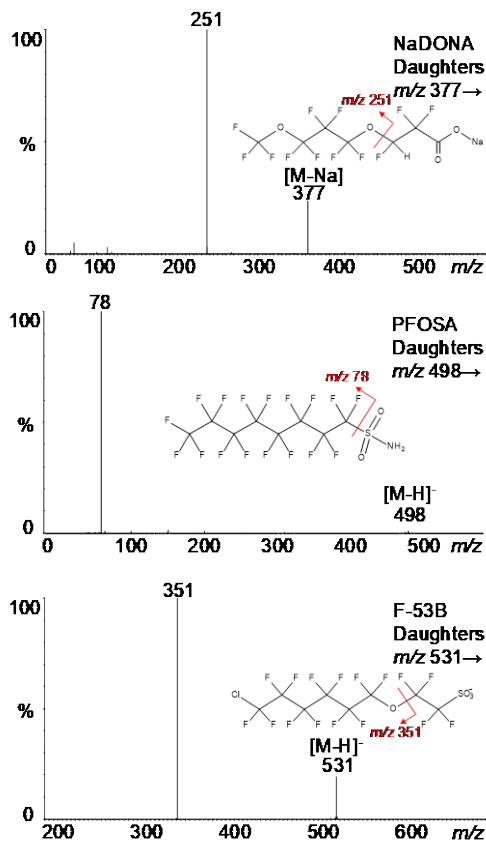
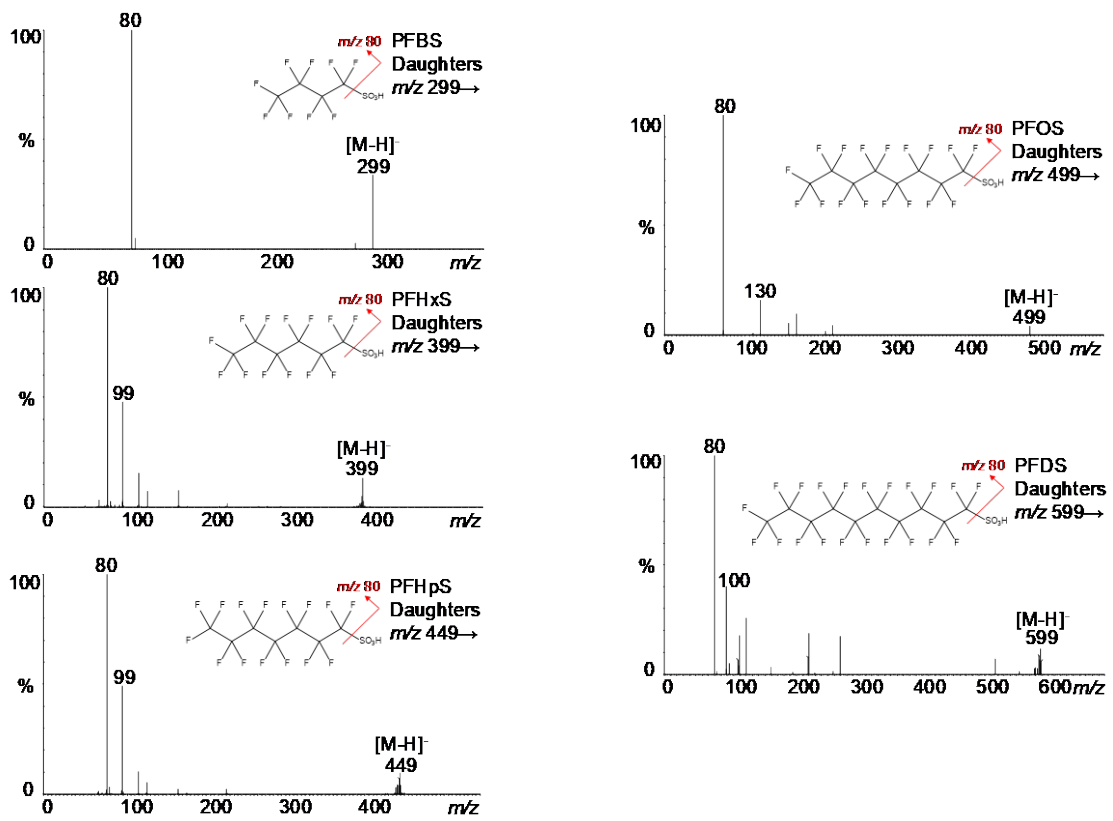


図 2. 分析対象 PFCs のマススペクトル (2)

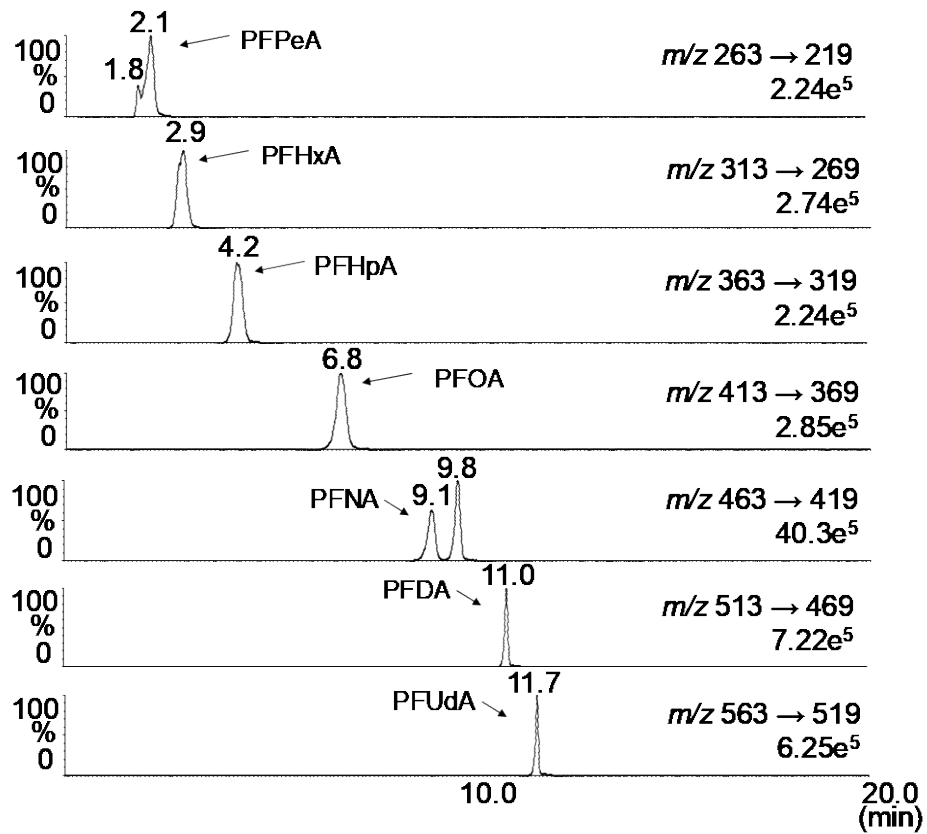


図 3. LC-MS/MS クロマトグラム (1)

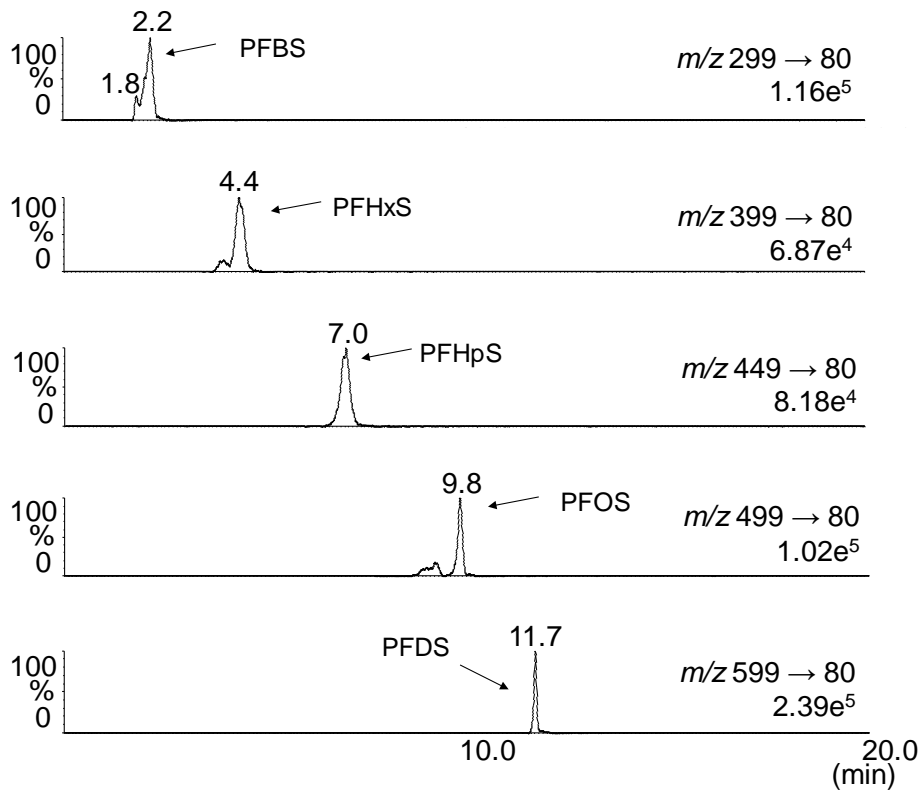


図 3. LC-MS/MS クロマトグラム (2)

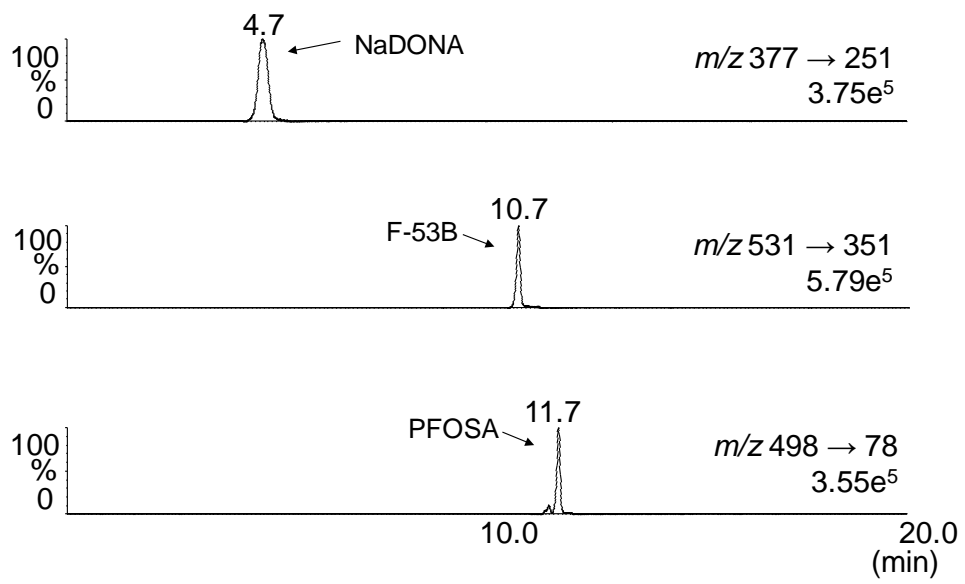


図 3. LC-MS/MS クロマトグラム (3)

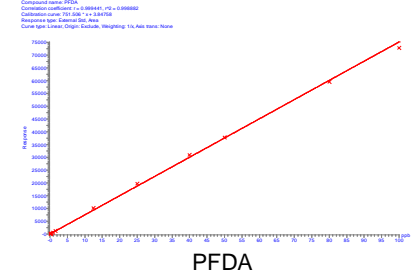
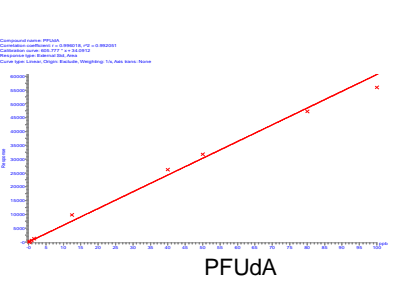
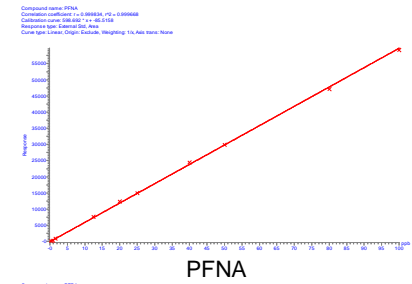
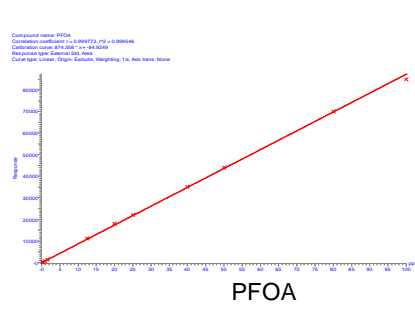
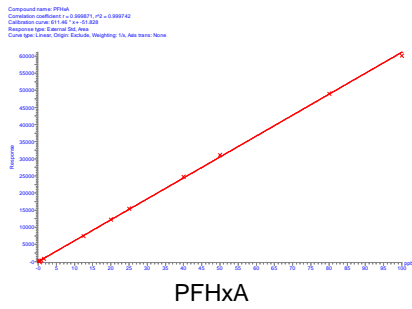
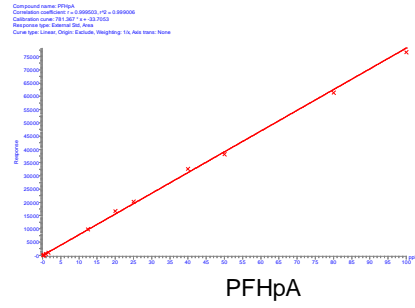
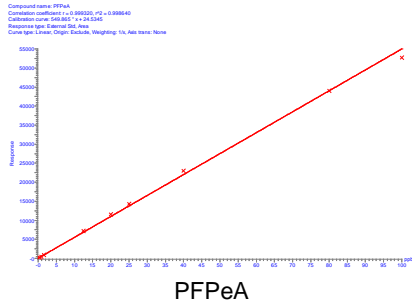
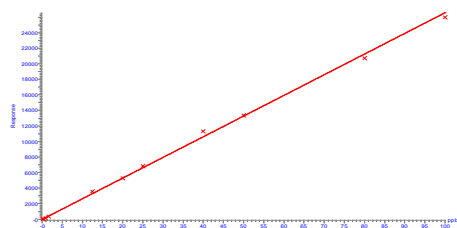


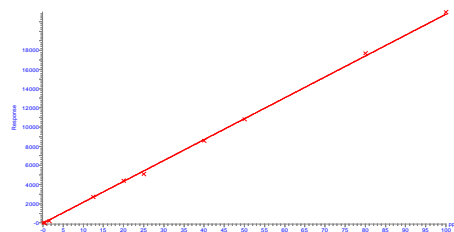
图 4. 検量線 (1)

Compound name: PFBS
 Correlation coefficient: 0.99917, R²: 0.99834
 Calibration curve: 262.025 * x + 21.3852
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis name: None



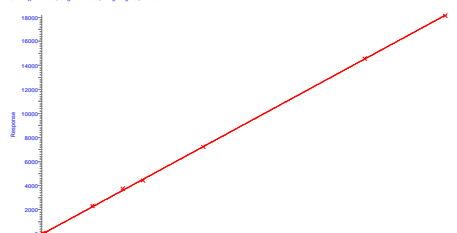
PFBS

Compound name: PFHxS
 Correlation coefficient: 0.99979, R²: 0.99957
 Calibration curve: 218 * x + 29.2258
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis name: None



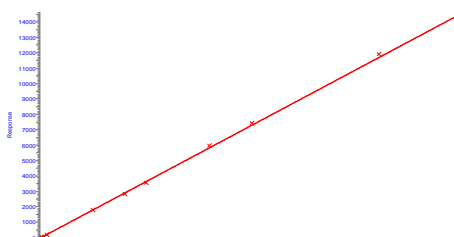
PFHxS

Compound name: PFHxS
 Correlation coefficient: 0.99917, R²: 0.99834
 Calibration curve: 182.018 * x + 20.8503
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis name: None



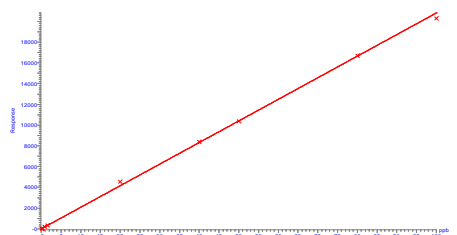
PFHxS

Compound name: PFOS
 Correlation coefficient: 0.999563, R²: 0.999125
 Calibration curve: 161.454 * x + 27.72975
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis name: None



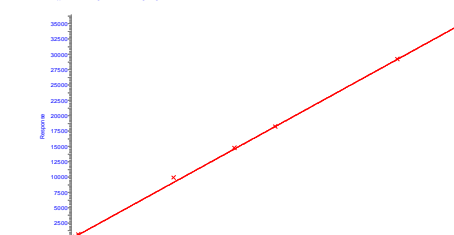
PFOS

Compound name: PFOS
 Correlation coefficient: 0.999439, R²: 0.99879
 Calibration curve: 209.232 * x + 8.17988
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis name: None



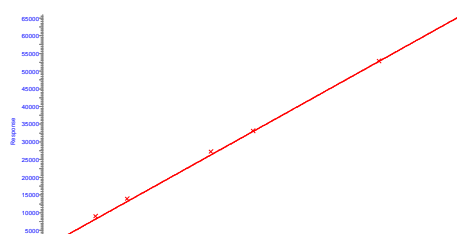
PFOS

Compound name: PFOSA
 Correlation coefficient: 0.999263, R²: 0.999007
 Calibration curve: 364.856 * x + 3.82661
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis name: None



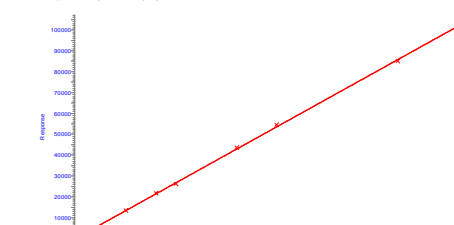
PFOSA

Compound name: F-53B
 Correlation coefficient: 0.999276, R²: 0.998552
 Calibration curve: 659.415 * x + 27.1372
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis name: None



F-53B

Compound name: NaDONA
 Correlation coefficient: 0.99976, R²: 0.999552
 Calibration curve: 1023.02 * x + 41.0213
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis name: None



NaDONA

図 4. 検量線 (2)

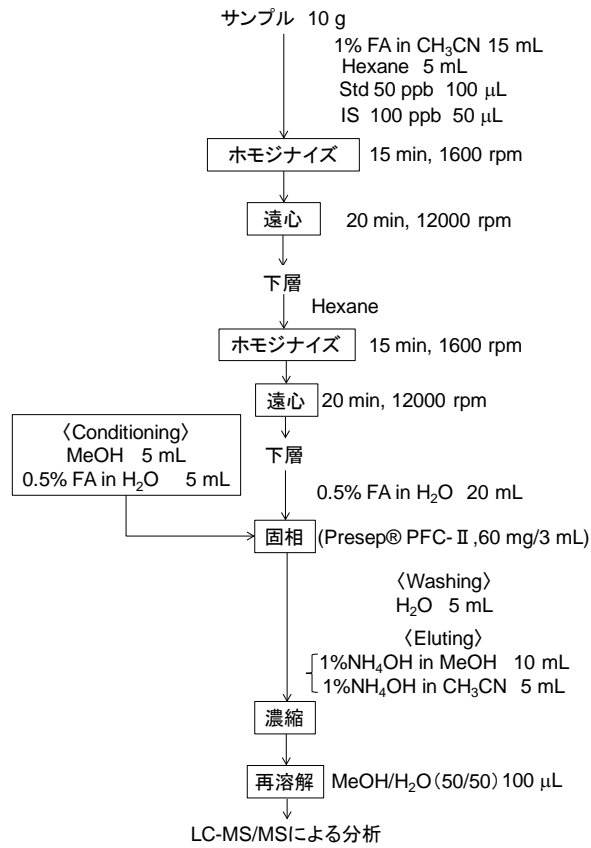


図 5. 前処理プロトコール

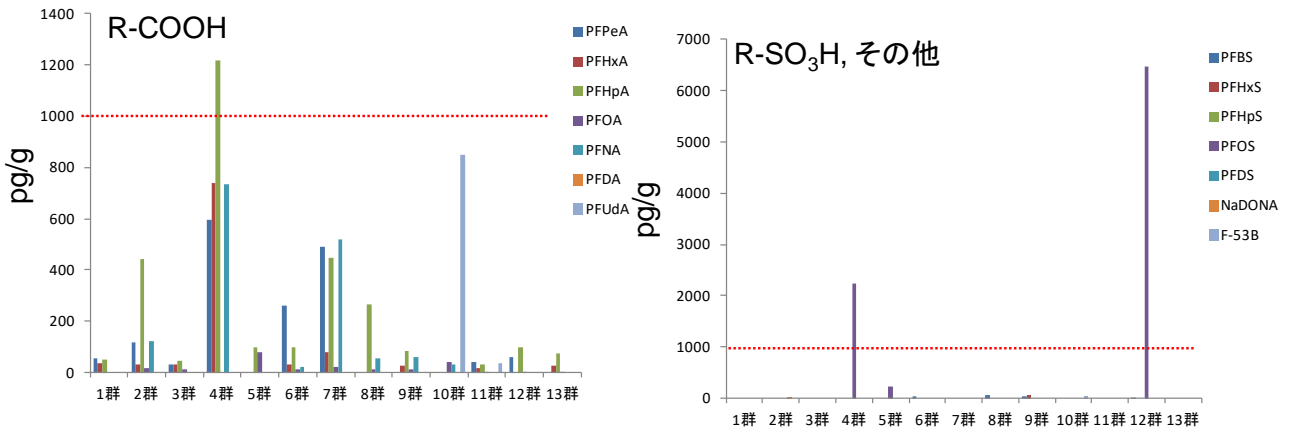


図 6. トータルダイエットスタディに基づく，食品試料のバックグラウンドデータ

表 1. 分析対象 PFCs とその条件

Analytes	M.W. (g/mol)	Precursor Quantitative		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	
		ion (m/z)	ion (m/z)					
-COOH	C ₄ PFPeA	264	263	219	20	10	0.2	0.39
	C ₅ PFHxA	314	313	269	20	10	0.1	0.2
	C ₆ PFHpA	364	363	319	20	10	0.1	0.2
	C ₇ PFOA	414	413	369	20	10	0.1	0.2
	C ₈ PFNA	464	463	419	25	10	0.1	0.39
	C ₉ PFDA	514	513	469	25	10	0.05	0.1
	C ₁₀ PFUdA	564	563	519	25	10	0.1	0.2
-SO ₃ H	C ₄ PFBS	300	299	80	55	30	0.1	0.2
	C ₆ PFHxS	400	399	80	60	40	0.2	0.39
	C ₇ PFHpS	450	449	80	65	45	0.2	0.39
	C ₈ PFOS	500	499	80	65	50	0.1	0.2
	C ₁₀ PFDS	600	599	80	65	50	0.05	0.1
その他	C ₆ NaDONA	400	377	251	25	10	0.025	0.05
	C ₈ PFOSA	499	498	78	60	35	0.025	0.05
	C ₈ F-53B	571	531	351	50	25	0.025	0.05

表 2. LC-MS/MS 分析条件

LC/MS装置	ACQUITY UPLC H-Class/Xevo TQD(Waters社製)
カラム	GLサイエンス社製 Inertsil C8-4HP (2.1×100 mm, 3 μm)
移動相 (グラジエント条件)	20 mM酢酸アンモニウム水溶液(A)/メタノール(B) (A/B: 45/55(0-3 min)→42/58(6 min)→10/90(11 min) →2/98(15-18 min)→45/55(18.1-20 min))
カラム温度	40°C
流速	0.2 mL/min
試料注入量	10 μL
分析モード	ESI ネガティブモード
キャピラリー電圧	2.0 kV
ソース温度	150°C
ディソルベーション温度	400°C

表 3. 再溶解における絶対回収率

平均絶対回収率 ± SD			
対象物質	1,000 μL	500 μL	100 μL
PFPeA	103.3±0.09	106.7±0.09	47.9±0.48
PFHxA	93.3±0.21	96.3±0.25	40.3±0.17
PFHpA	92±0	102±0.16	41.1±0.29
PFOA	93.3±0.09	100±0.37	39.3±0.17
PFNA	93.3±0.31	101±0.22	39.7±0.42
PFDA	101.3±0.05	101±0.14	36.5±0.25
PFUdA	130±0.37	117±0.29	38.2±0.14
PFBS	98±0	105.7±0.05	44.7±0.33
PFHxS	87.3±0.05	93.3±0.09	38.3±0.5
PFHpS	91.3±0.21	92.3±0.29	38.9±0.17
PFOS	84.7±0.12	94.7±0.6	38.1±0.66
PFDS	98±0.08	100.5±0.55	31.9±1.15
NaDONA	91.3±0.09	94.3±0.09	40.3±0.17
PFOSA	119.3±0.33	106.3±0.12	41.7±0.6
F-53B	102±0.14	102.3±0.12	28.5±8.54

n=3

