

# Development of a Rapid, Simple, and Highly Sensitive Multi-Component Simultaneous Analysis Method Combining Liquid-Liquid Extraction and Solid-Phase Extraction for PFAS in Food and Serum

Ryoichi Sasano<sup>1</sup>, Heesoo Eun<sup>2</sup> (1 AiSTI SCIENCE Co., Ltd., 2 National Agriculture and Food Research Organization (NARO))

✉ E-mail: sasano@aisti.co.jp

## Summary

In the analysis of PFAS in food and serum, a large number of matrix components complicate sample preparation, requiring significant time and effort. Moreover, as the number of analytes increases, pretreatment becomes even more challenging. In this study, highly polar ionic matrix components were first removed by liquid-liquid extraction (LLE) to reduce the load on the solid phase. Subsequently, PFAS were retained and concentrated using anion-exchange solid-phase extraction (SPE), which simultaneously eliminated nonionic matrix components to improve both sensitivity and purification. Furthermore, an online SPE-LC/MS system was employed to automate the process from solid-phase extraction to LC/MS measurement, enabling rapid, simple, and highly sensitive multi-component analysis.

## Experimental Methods

A PFAS mixed standard solution containing 35 compounds (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) was used. Samples included mackerel (fish), milk, and human serum. The pretreatment flow is shown in Figure 1. Each sample was extracted and deproteinized with acetonitrile (ACN), followed by liquid-liquid partitioning with a hydrophobic solvent. The organic extract was then introduced into an online SPE-LC/MS system composed of an SPL-W100 online SPE unit (AiSTI Science) coupled with an LCMS-8045 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation). A WAXs cartridge (Flash-SPE WAXs, 3 mg) packed with anion-exchange resin was used as the solid-phase column.

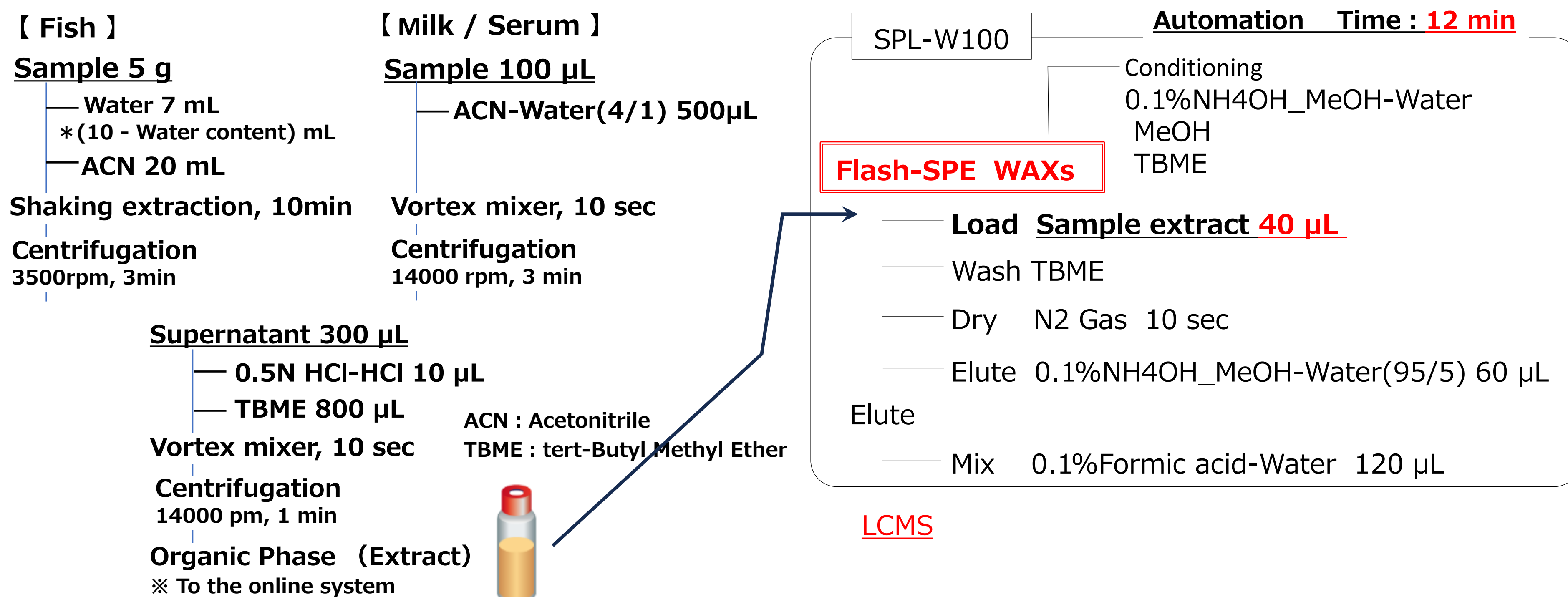


Figure 1. Pretreatment flow for PFAS analysis using liquid-liquid extraction and online solid-phase extraction.

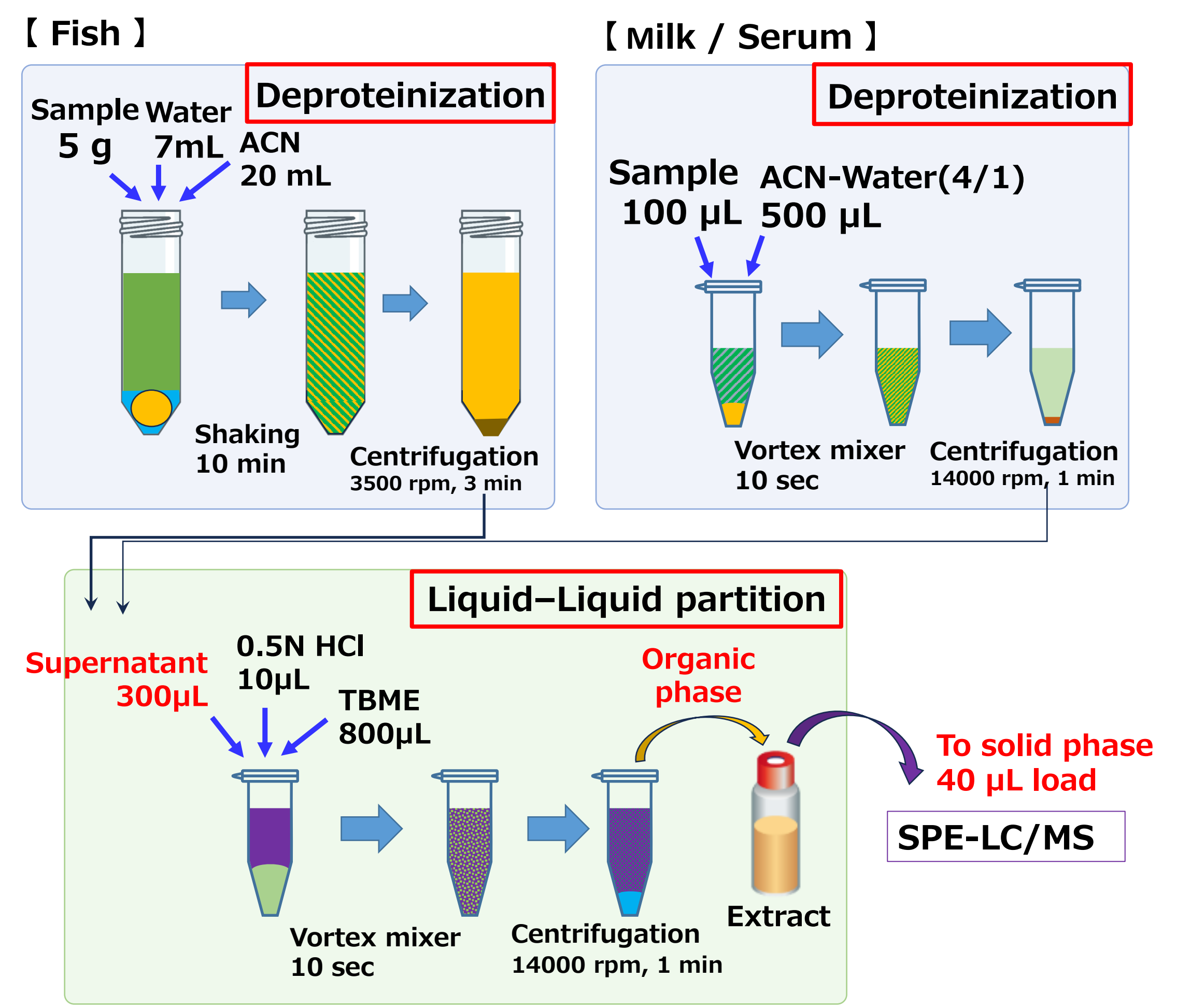
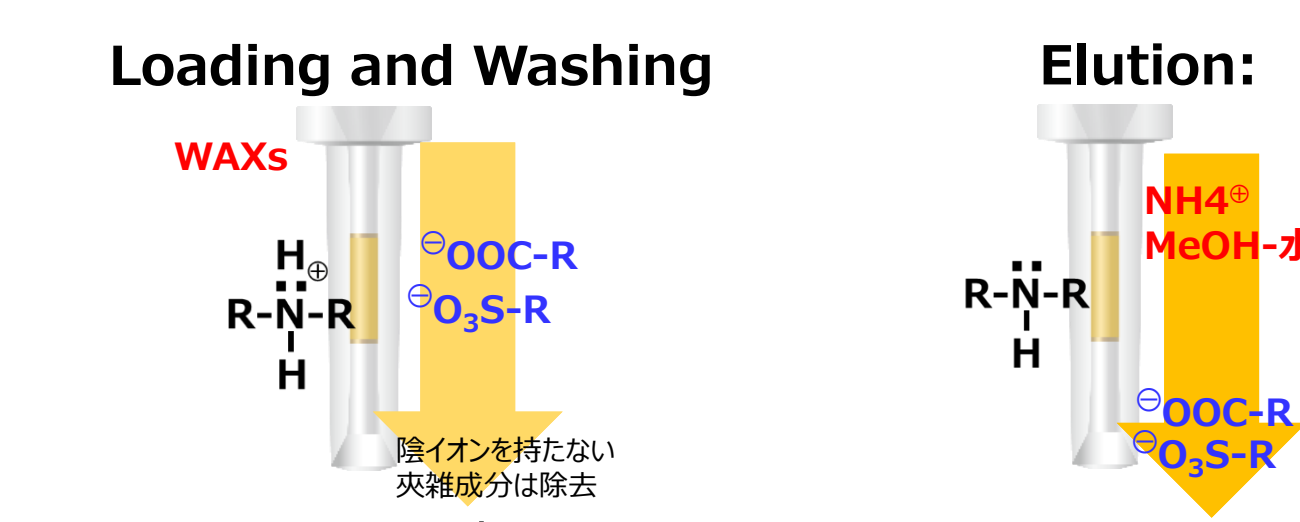


Figure 2. Pretreatment procedure for PFAS analysis



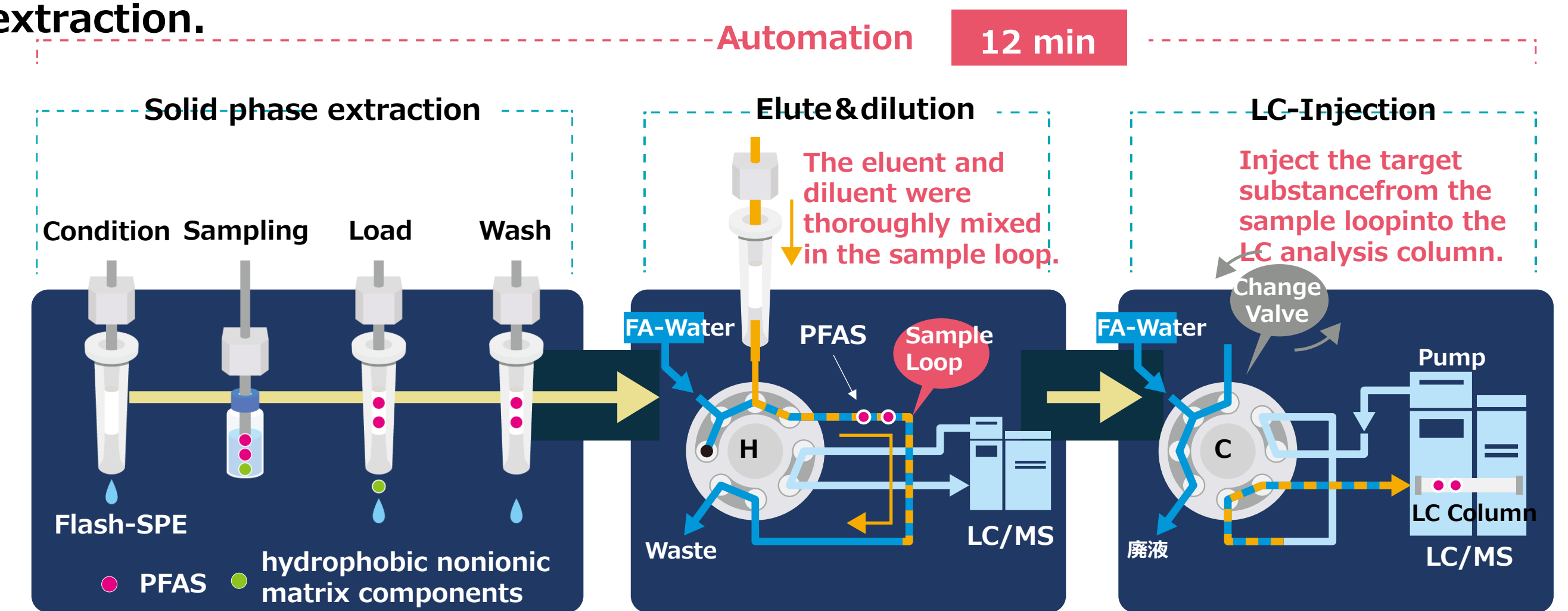
Online SPE-LC/MS System

### Ion-Exchange Solid-Phase Extraction.



Anionic PFAS in the ACN-TBME organic phase were retained on the positively charged WAXs solid-phase cartridge through ion-exchange interaction.

PFAS were eluted by alkaline 0.1% ammonia in methanol-water, which neutralized the WAXs functional groups and released the analytes.



The process of online SPE-LC/MS

## Results and Discussion

### Deproteinization

Since food and serum samples contain abundant proteins that can interfere with solid-phase performance, deproteinization was carried out in the initial extraction. Acetonitrile was selected as the solvent after comparing its compatibility with subsequent liquid-liquid partitioning. The acetonitrile-to-water ratio was set at 2:1.

### Liquid-Liquid Extraction

After deproteinization with acetonitrile, TBME and HCl were added to the supernatant to perform LLE. This transferred PFAS into the organic phase while removing polar matrix components in the aqueous layer. The addition of HCl promoted transfer of polar PFAS by reducing ionization.

### Solid-Phase Extraction

The hydrophobic organic extract was loaded onto the WAXs anion-exchange cartridge. Ionic PFAS were retained, while nonionic interferences were removed during washing. Although retention of target analytes can be affected by coexisting anions such as nitrate, preliminary removal of these species via LLE maintained strong retention. Increasing the sample loading volume further improved sensitivity.

### Online Automation

By introducing the entire eluate from the solid phase directly into the LC/MS system, sensitivity was significantly improved. This enhancement allowed for the use of smaller sample volumes while maintaining reliable quantification.

### Analysis Time

The entire process from solid-phase extraction to LC injection was fully automated, requiring only 12 minutes per operation. The LC/MS analytical cycle time was 15 minutes, enabling continuous and parallel operation to obtain measurement results every 15 minutes.

### Blank Control

To minimize contamination, all solvents used in the solid-phase extraction process were pre-filtered through an adsorbent material integrated into the pretreatment system. This setup effectively reduced background signals and ensured high analytical reliability.

### Recovery Test

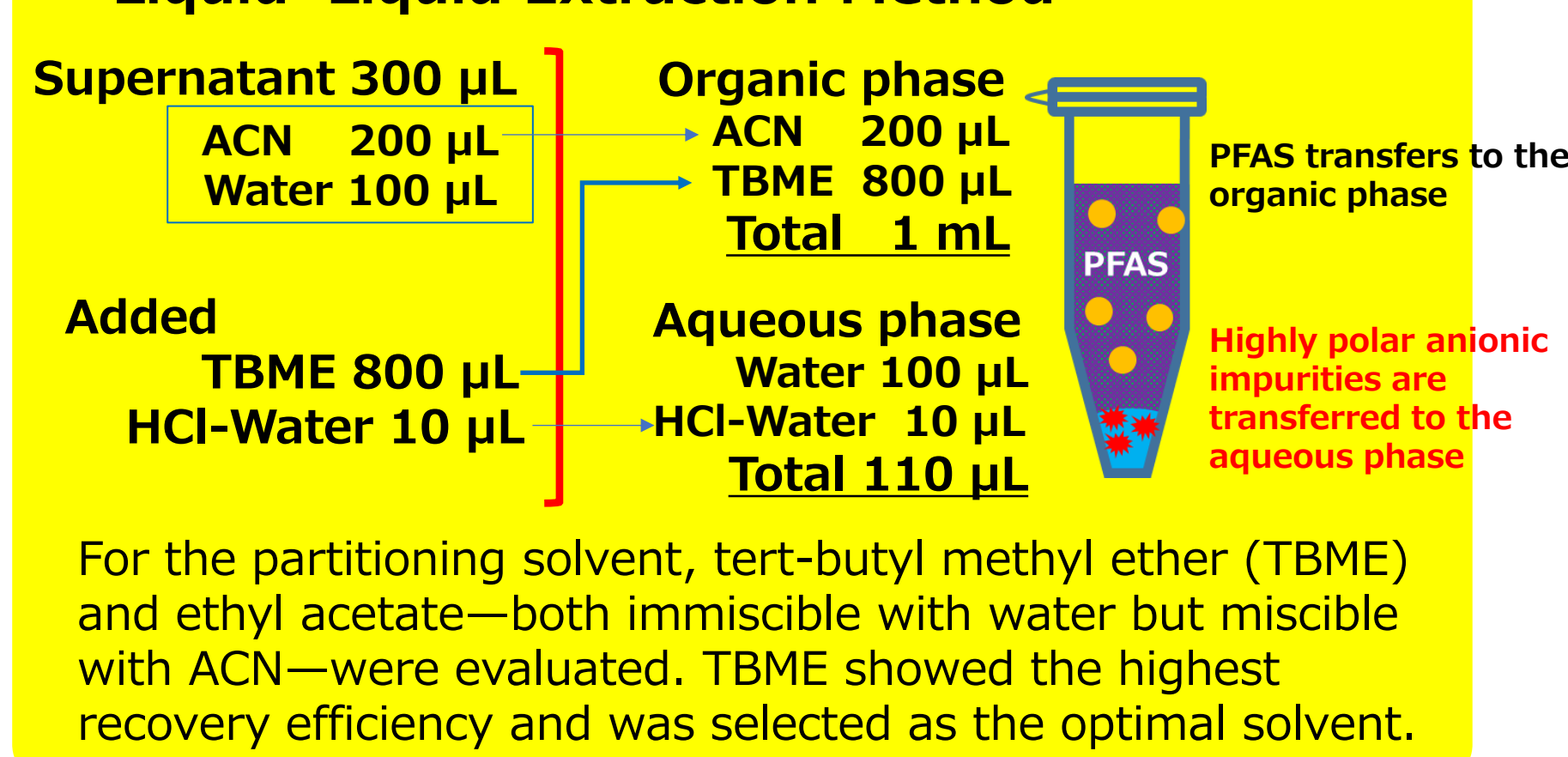
Recovery and reproducibility (n = 5) were evaluated by comparing absolute peak areas of samples spiked with PFAS standard mixtures, unspiked samples, and standard solutions measured with the online SPE-LC system (Table 1).

Hydrophobic and nonionic compounds such as FOSA, NMeFOSA, and NETFOSA were not recovered, likely because they were not retained on the solid phase and eluted with organic solvents during washing. Reproducibility was satisfactory, with relative standard deviations (RSD) below 10% for most analytes.

## Conclusion

By combining deproteinization, liquid-liquid partitioning, and anion-exchange solid-phase extraction, this study achieved rapid, simple, and highly sensitive multi-component PFAS analysis even for complex matrices such as food and serum.

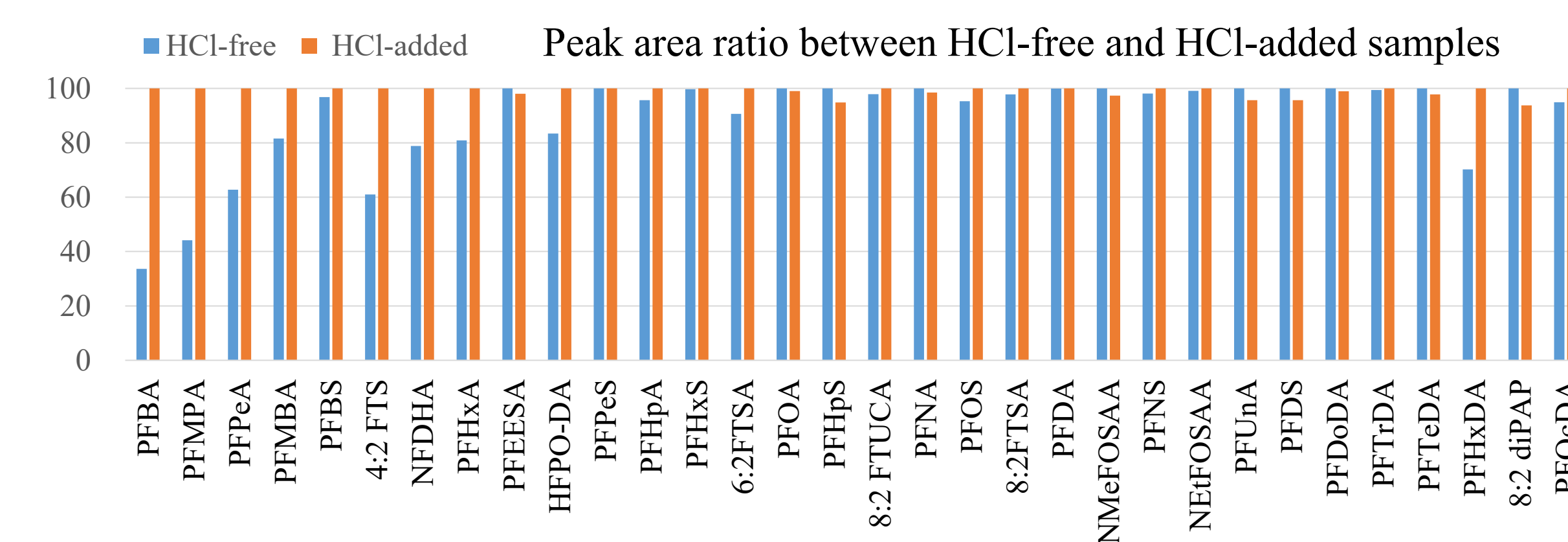
### Liquid-Liquid Extraction Method



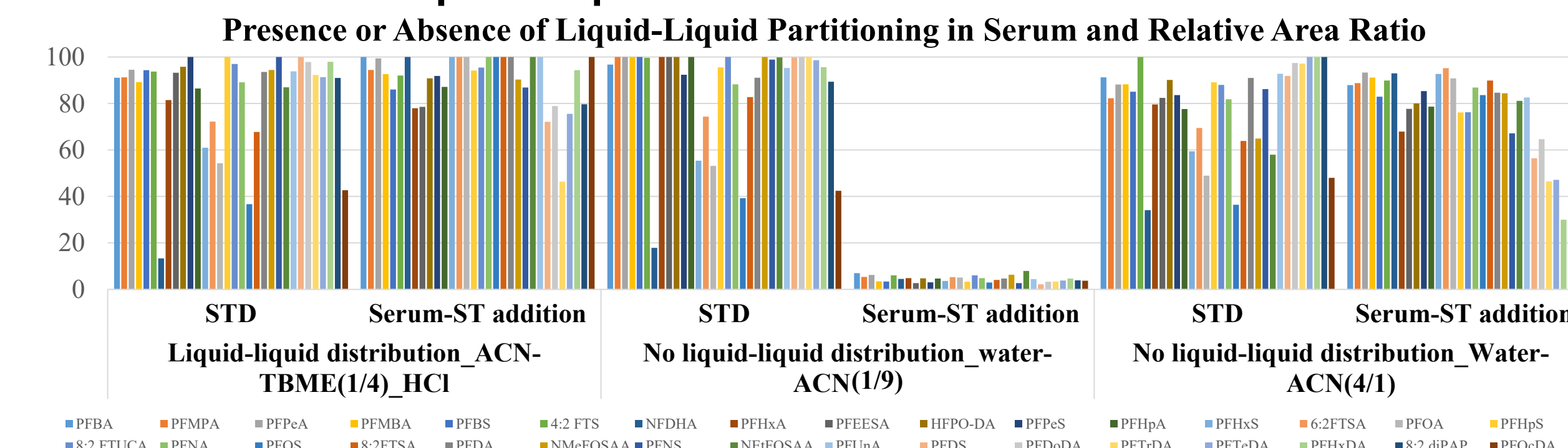
For the partitioning solvent, tert-butyl methyl ether (TBME) and ethyl acetate—both immiscible with water but miscible with ACN—were evaluated. TBME showed the highest recovery efficiency and was selected as the optimal solvent.

### Effect of HCl Addition

Addition of HCl improved the recovery of hydrophilic PFAS such as PFBA and PFMPA by suppressing carboxyl group dissociation, increasing hydrophobicity and facilitating transfer to the organic phase.

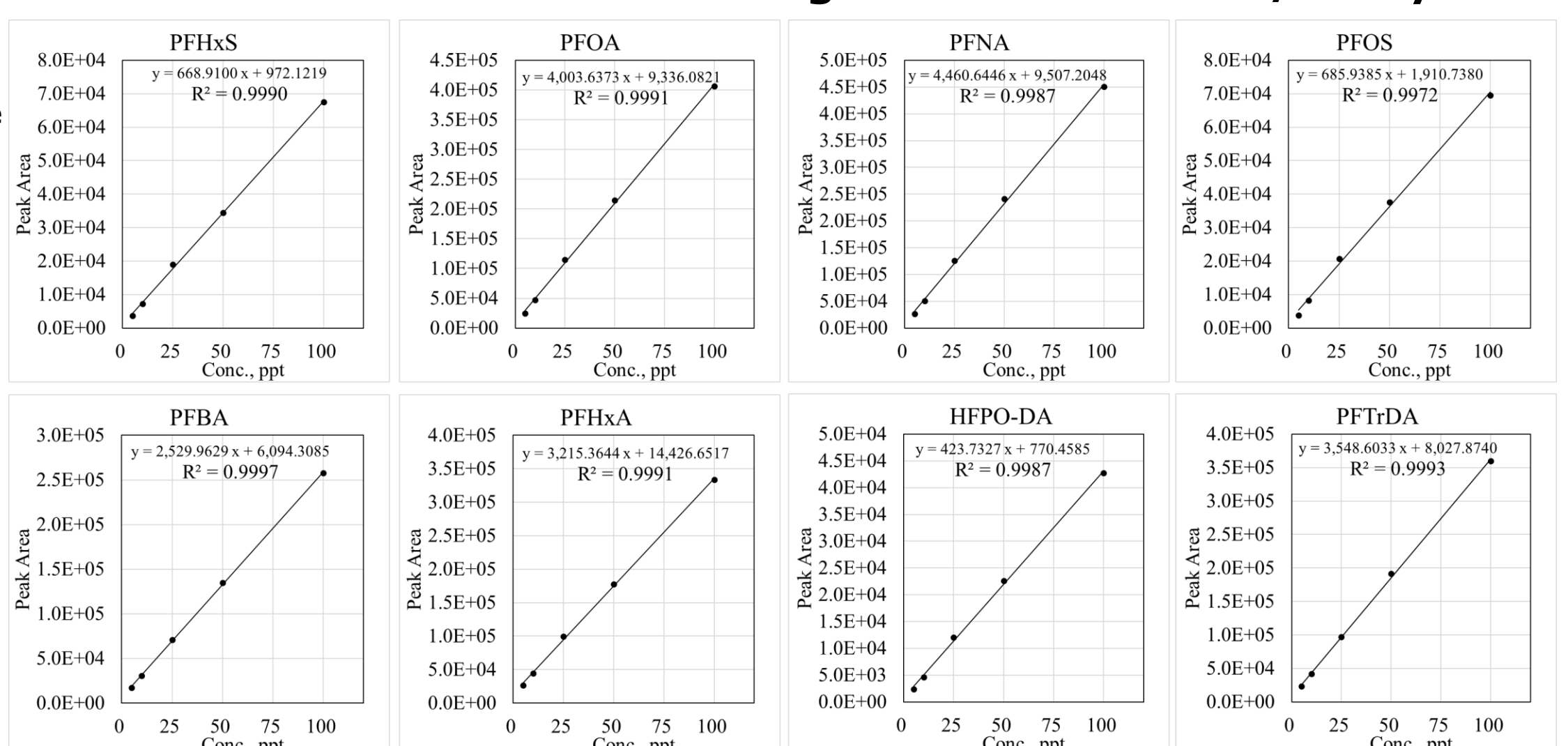


### Evaluation of Liquid-Liquid Extraction



In serum samples, comparison between samples with and without LLE revealed that when the aqueous phase (ACN-water ratio 1:9) was directly loaded onto the WAXs column, recoveries were very low, suggesting that matrix interference inhibited ion exchange. In contrast, a 4:1 ACN-water ratio allowed PFAS retention through hydrophobic interactions, although recovery of highly hydrophobic PFAS slightly decreased, which could be improved by optimizing solvent ratios.

### Absolute calibration curve using the online SPE-LC/MS system.



### Recovery and Reproducibility Test

No.	Compound	Mackerel 2 ppb		Milk 1 ppb		Human Serum 1 ppb	
		Rec. %	RSD n=5, %	Rec. %	RSD n=5, %	Rec. %	RSD n=5, %
1	PFBA	71	7.1	82	3.4	106	5.1
2	PFMPA	69	5.9	88	4.1	91	1.8
3	PFPeA	90	3.2	89	6.3	102	9.4
4	PFMBA	73	8.4	88	3.8	91	6.3
5	PFBS	107	2.4	79	6.5	108	11.1
6	4:2 FTS	94	8.1	60	6.0	121	8.0
7	NFDHA	147	4.3	94	4.9	185	7.3
8	PFHxA	93	3.5	84	4.2	94	6.4
9	PFEESA	90	4.0	89	2.1	105	5.7
10	HFPO-DA	87	4.5	85	6.3	91	8.8
11	PFPeS	107	4.1	84	7.2	106	9.2
12	PFHpA	94	3.8	85	3.6	95	5.7
13	PFHxA	106	4.3	92	8.6	107	6.1
14	6:2FTSA	130	4.7	81	6.3	192	5.1
15	PFOA	108	2.1	85	3.0	102	3.9
16	PFHpS	107	4.3	88	2.9	102	10.7
17	8:2 FTUCA	123	1.6	86	4.2	115	7.1
18	PFNA	101	1.6	88	4.3	102	4.7
19	FOSA	31	26.0	43	5.2	49	7.0
20	PFOS	96	3.7	80	3.8	82	5.1
21	8:2FTSA	142	8.1	80	8.1	133	10.7
22	PFDA	99	4.4	88	2.9	106	6.6
23	NMeFOSAA	113	5.1	97	4.1	135	8.2
24	PFNS	80	5.3	88	3.6	96	9.7
25	N-MeFOSA	-	-	-	-	-	-
26	NETFOSAA	51	4.9	87	7.5	93	7.4
27	PFUnA	49	3.2	85	2.6	84	4.7
28	PFDS	93	5.6	93	4.4	98	2.6
29	N-EtFOSA	-	-	-	-	-	-
30	PFDoDA	63	3.9	83	3.6	77	5.2
31	PFTrDA	74	2.6	80	5.0	87	7.5
32	PFTeDA	89	4.2	80	3.7	98	5.8
33	PFHxDA	74	6.0	86	3.3	98	5.8
34	8:2 diPAP	89	2.0	87	6.7	79	8.9
35	PFOcDA	113	2.6	94	3.4	138	5.3

✉ The recovery rate was calculated from the absolute peak area values (without using stable isotopes).

# 食品および血清中PFASにおける液液抽出と固相抽出法を組み合わせた迅速かつ簡便で高感度な多成分一斉分析法の開発

○佐々野僚一<sup>1</sup>, 殷熙洙<sup>2</sup> (1 株式会社アイスティサイエンス, 2 国立研究開発法人 農研機構)

※ E-mail: sasano@aisti.co.jp

## 【はじめに】

食品および血清中のPFAS分析では、夾雑成分が多く、前処理に多大な時間と労力を要する。また、分析対象成分の増加に伴い、前処理の複雑さはさらに増している。本研究では、まず高濃度の極性の高いイオン性夾雑物を液液抽出により除去することで、固相への負荷を軽減した。次に、陰イオン交換による固相抽出によりPFASを保持・濃縮しつつ、非イオン性の夾雑成分を除去することで感度と精製度を向上させた。さらに、固相抽出からLC/MS測定までを自動化したオンラインSPE-LC/MSシステムを用いることで、迅速かつ簡便で高感度な多成分一斉分析法を開発したので報告する。

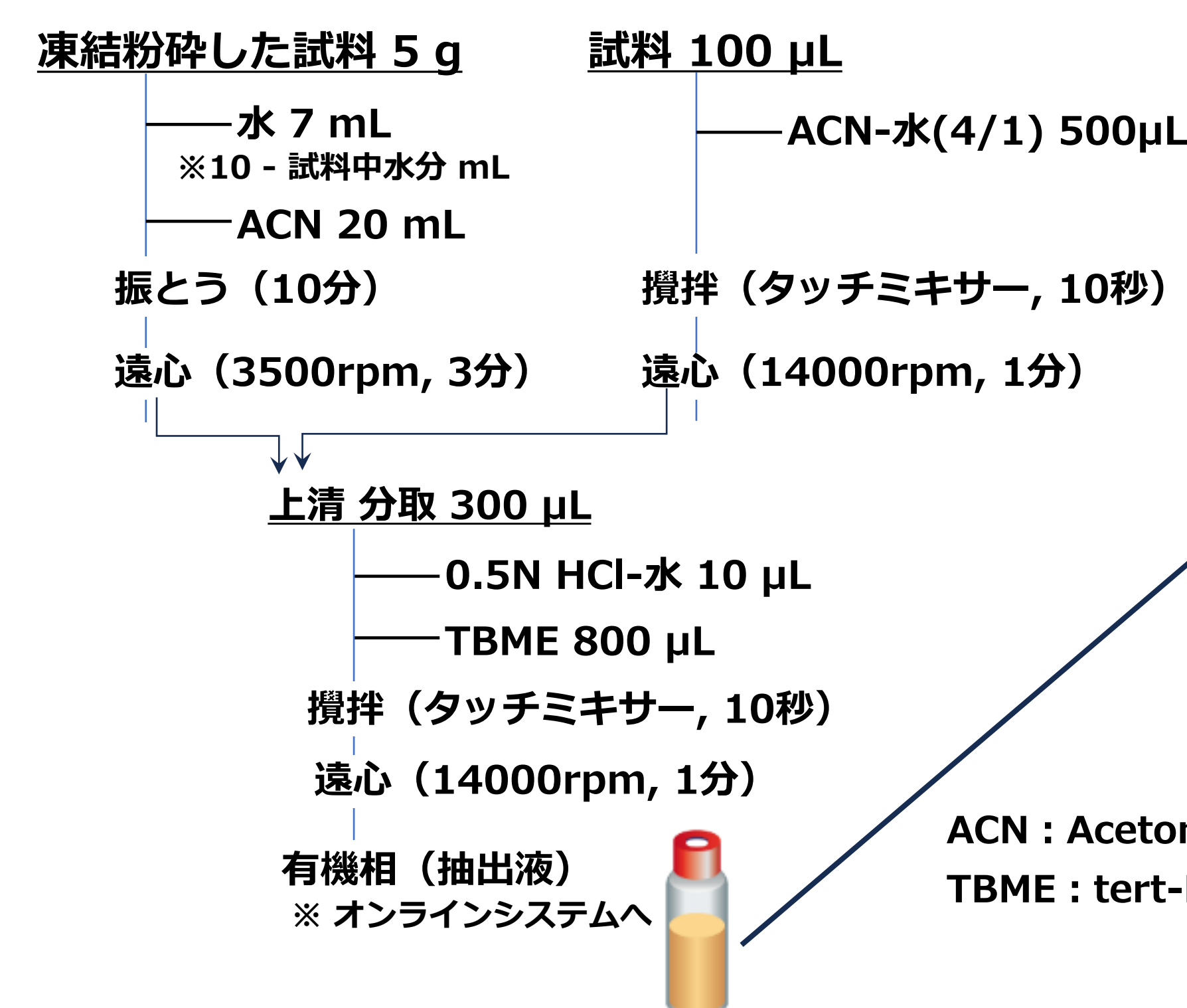
## 【実験方法】

PFAS混合標準溶液は35成分(富士フィルム和光純薬工業)を使用した。

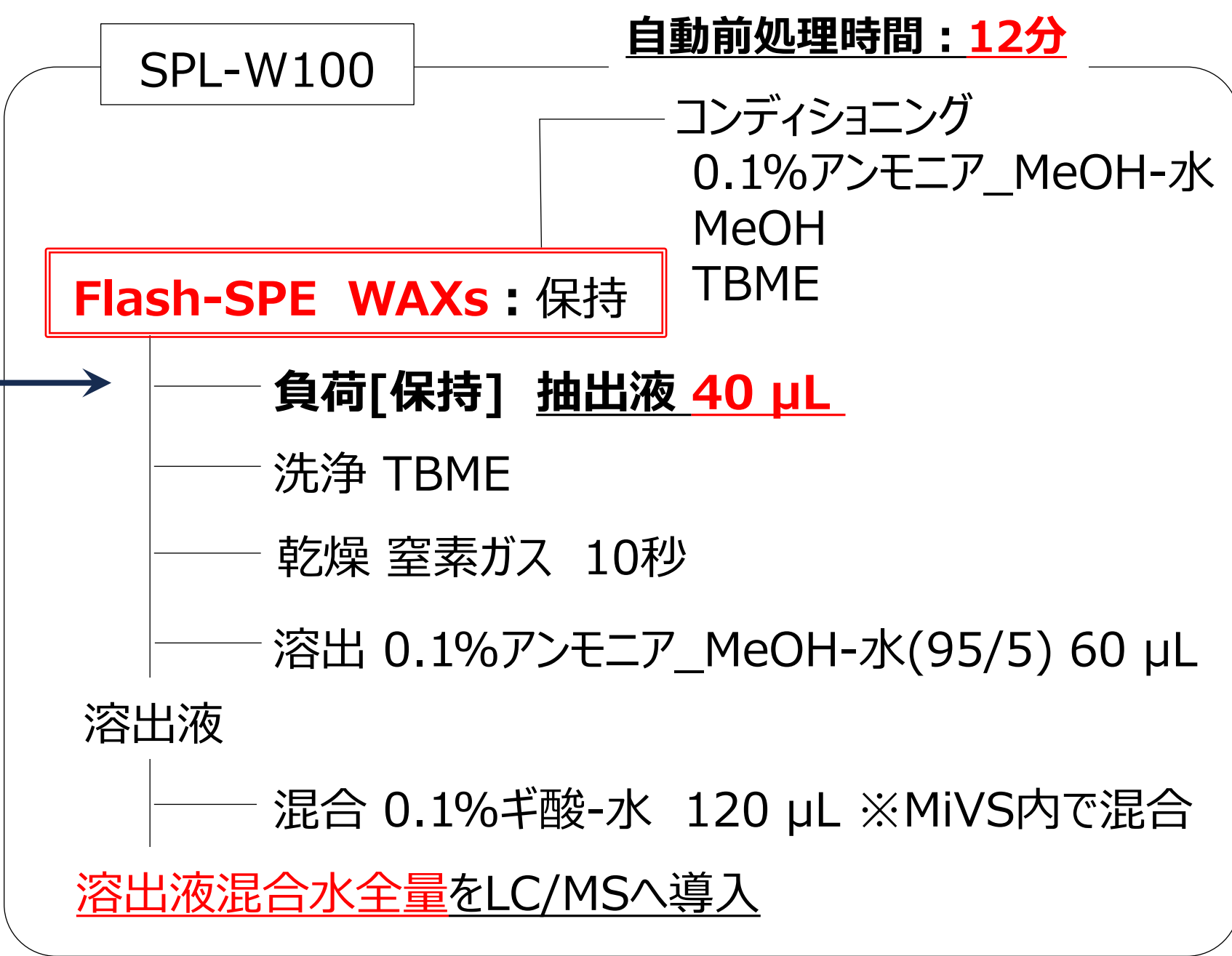
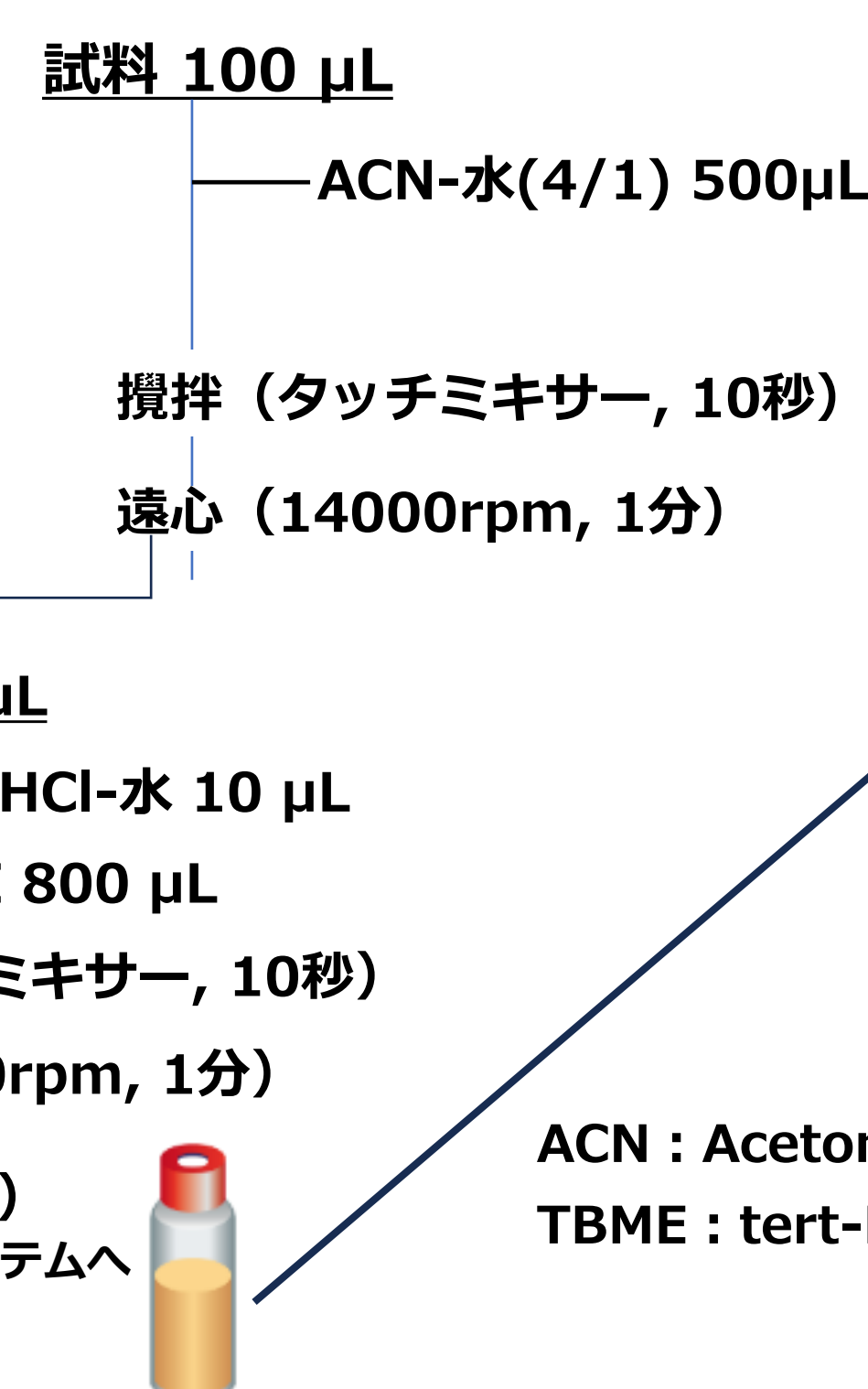
試料はアジと牛乳とヒト血清を用いた。

前処理フローを図1に示す。いずれもアセトニトリルで抽出および除タンパクしたのち、疎水性溶媒で液液分配した。そして、オンライン用固相抽出装置 SPL-W100 (アイスティサイエンス) と液体クロマトグラフ-トリプル四重極質量分析計LCMS-8045 (島津製作所) を組み合わせたオンラインSPE-LC/MSシステムにその有機相の抽出液をセットして測定した。固相カラムは陰イオン交換樹脂を充填したオンライン専用固相カートリッジ (Flash-SPE WAXs 3mg) を使用した。

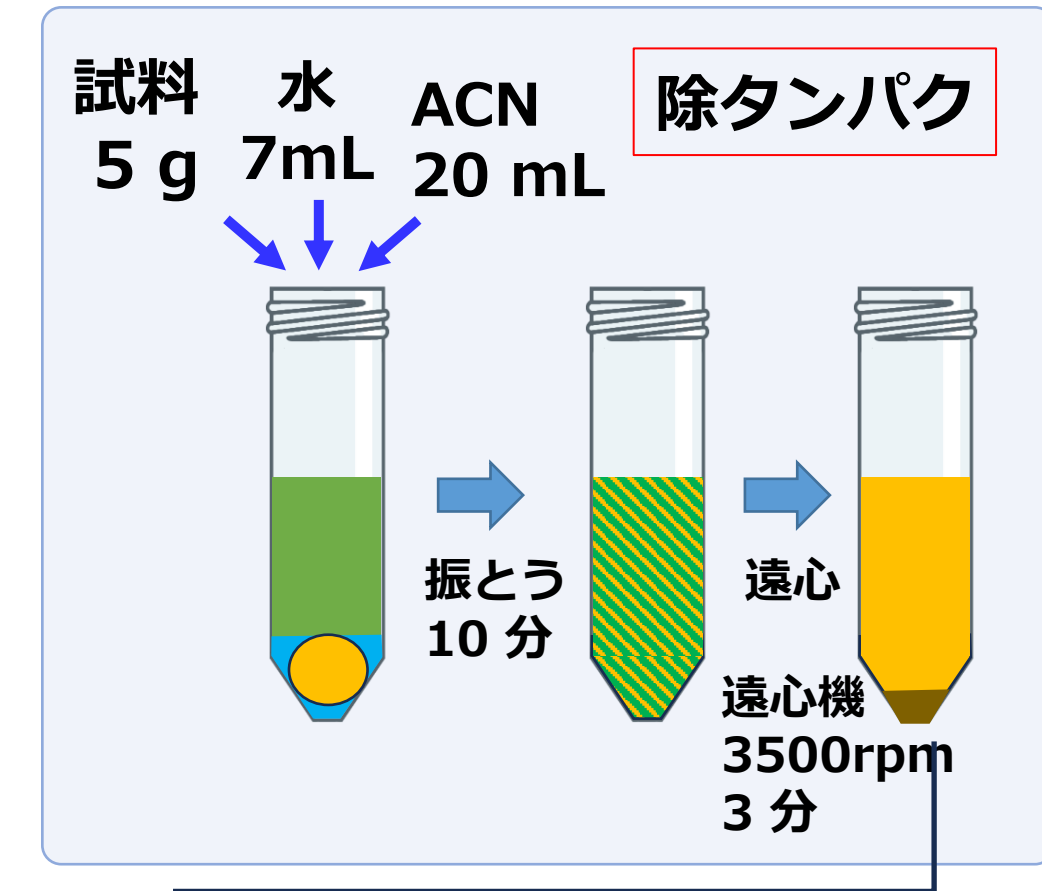
### 【アジの場合】



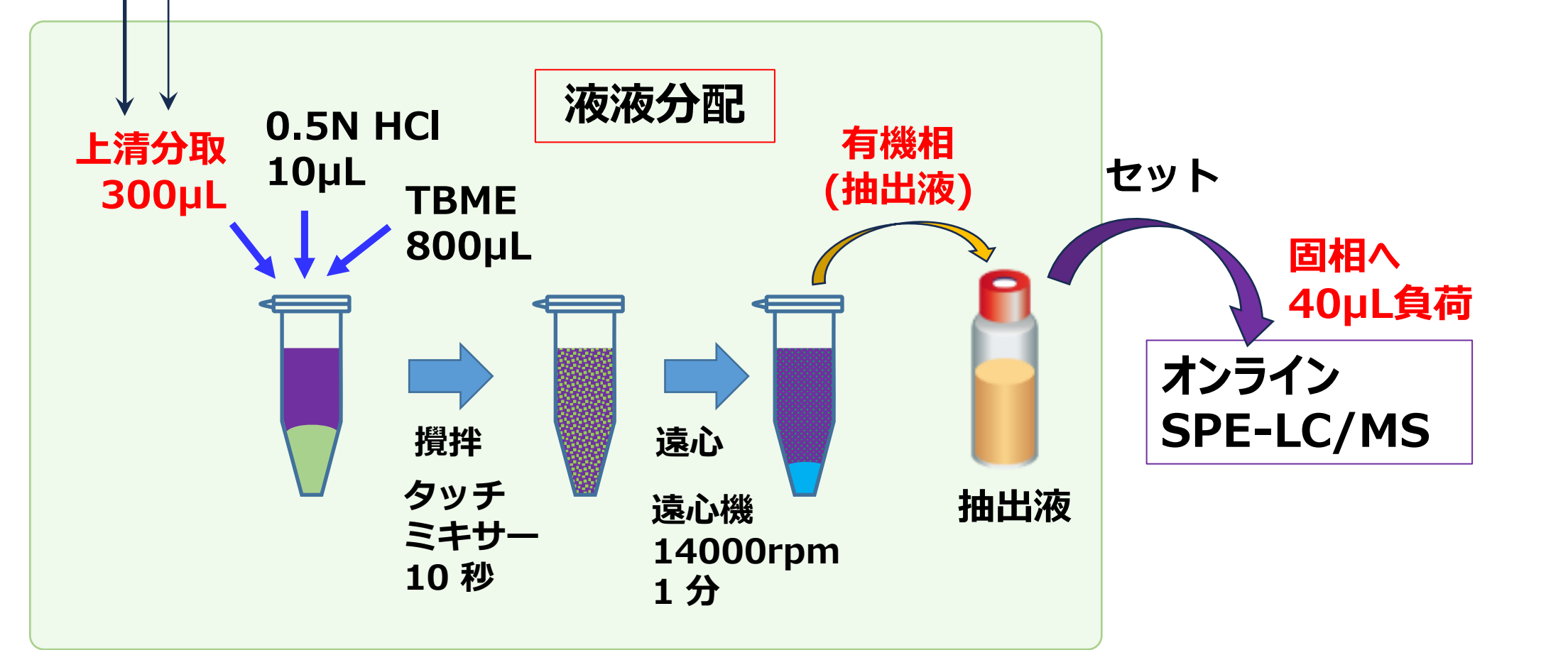
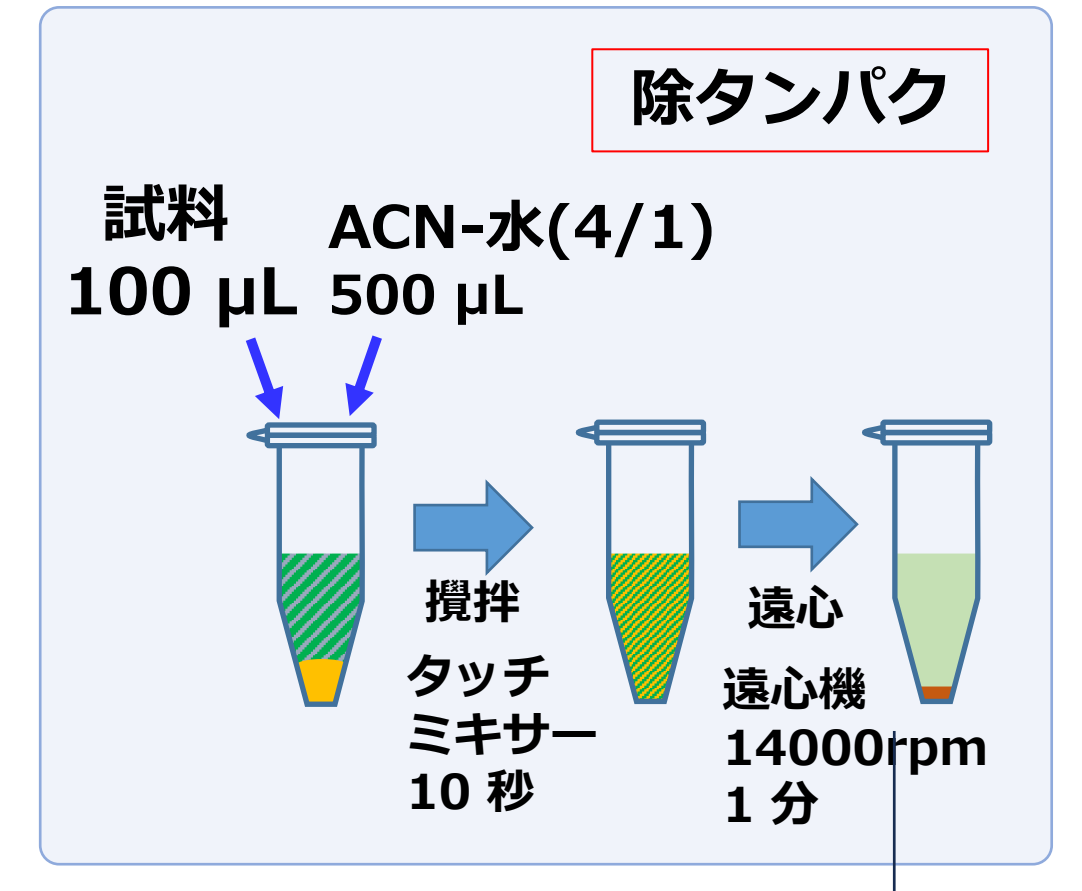
### 【牛乳 / 血清の場合】



### 【アジの場合】

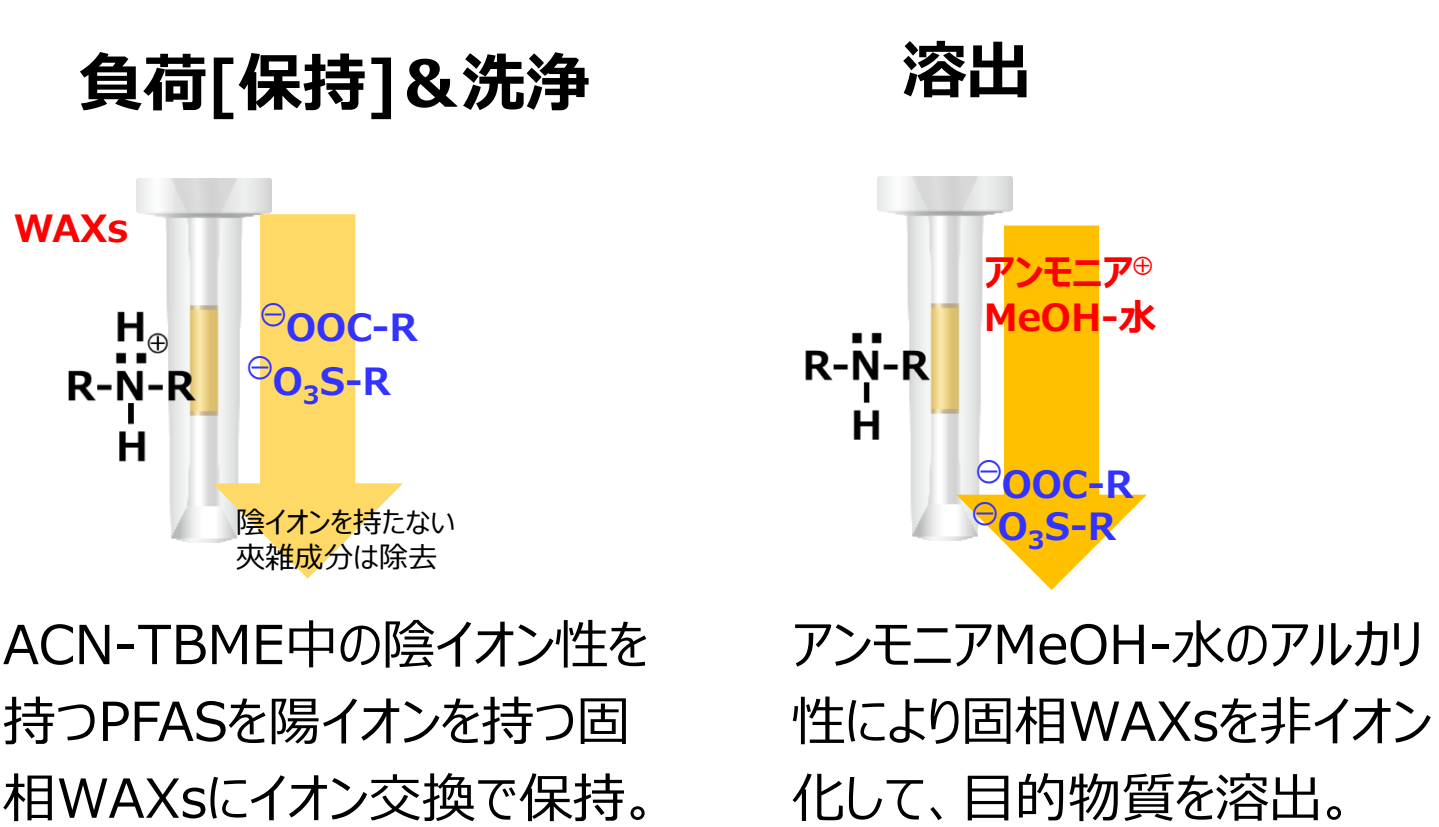


### 【牛乳 / 血清の場合】

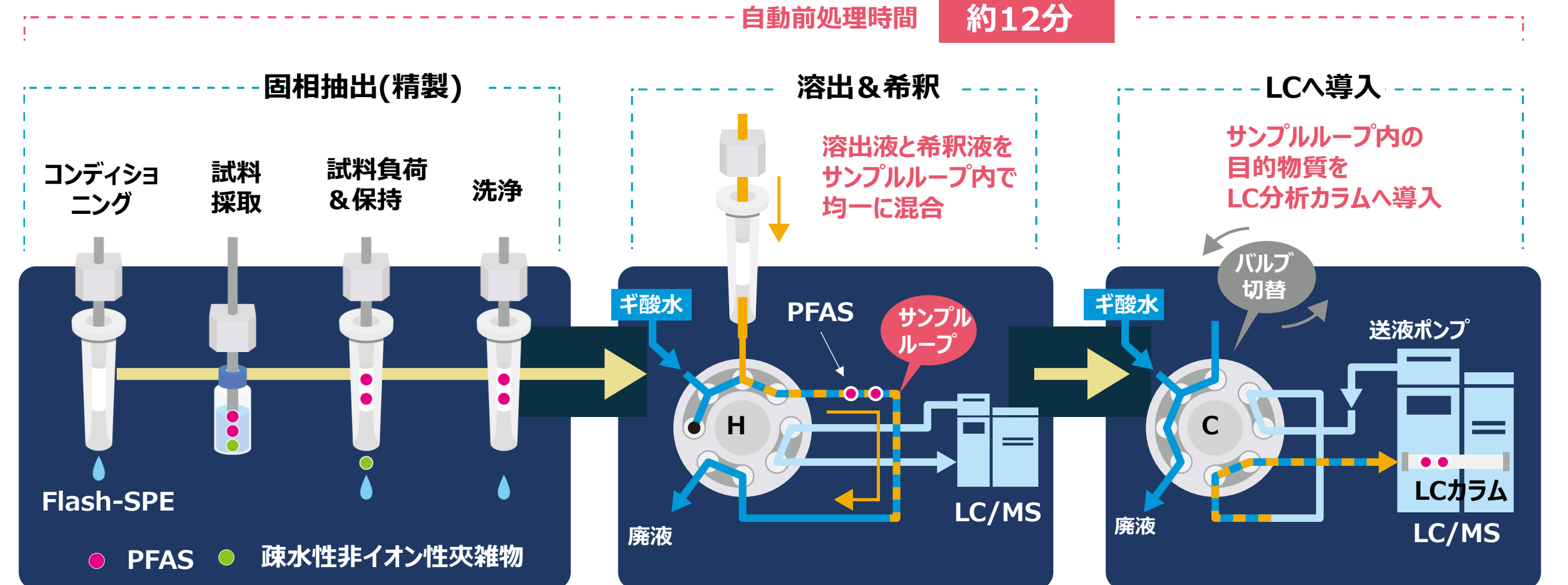


■ オンラインSPE-LC/MS

### ■ イオン交換による固相抽出



### ■ オンラインSPE-LC/MSの工程



## 【結果および考察】

**除タンパク:** 食品や血清はタンパク質を多く含み、それらが固相の機能を低下させるため、最初の抽出で除タンパクを行った。溶媒はその後の液液分配することを検討した結果、アセトニトリルを用いることにした。アセトニトリルと水の比率は2/1とした。

**液液抽出:** 試料をアセトニトリルで除タンパクした後、その上清の分取液に疎水性のTert-ブチルメチルエーテル (TBME) と塩酸を加え、液液分配を行った。これにより、目的物質のPFASが有機相に移行し、極性の夾雑成分を水相に分配して除去することができたと考えられる。また、塩酸添加により、極性のPFASの乖離を抑え、有機相への移行を促すことができた。

**固相抽出:** 分取した疎水性の有機相を陰イオン交換樹脂 (固相: WAXs) に負荷することで、有機相に含まれるイオン性のPFASを保持し、非イオン性の夾雑成分はそのまま流出させて除去した。陰イオン交換による吸着は硝酸イオンなどの陰イオン性夾雑成分の影響を受けて目的物質の保持量の減少が懸念されるが、本法では、予め液液分配により除去したため、保持力を損なわずに回収できたと考えられる。また、固相への負荷量を増加することでさらなる高感度化を成すことができた。

**オンライン化:** 固相からの溶出液の全量をLCMSに導入することによる感度向上により、試料量を少量化することができた。血清など貴重な試料に

**分析時間:** 固相抽出からLC注入まで全自動で行い、その操作時間は12分であった。LC/MSの測定サイクルタイムは15分で、並行して操作することで15分毎に測定結果を得ることができた。

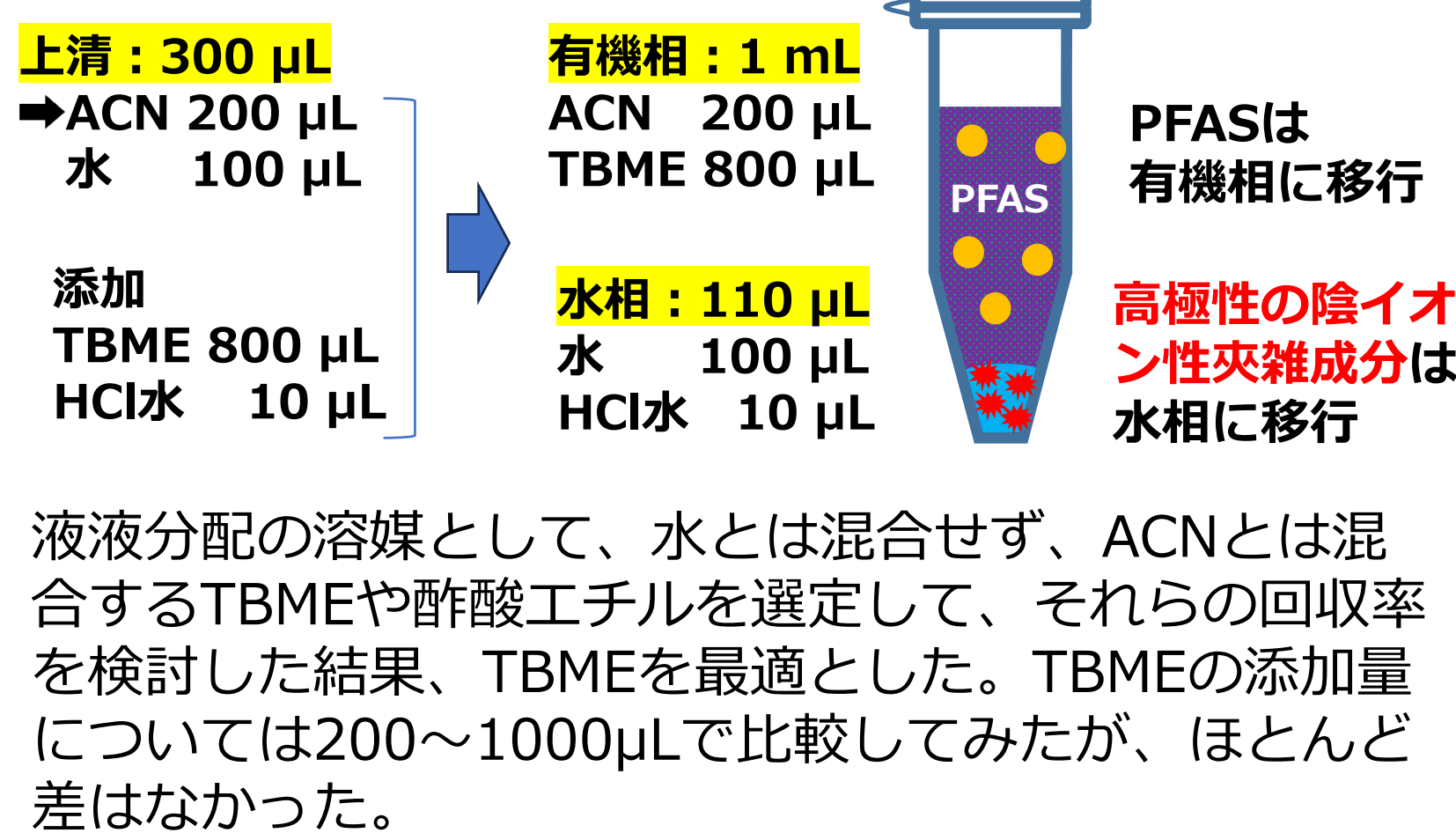
**ブランク対策:** 固相抽出で使用する溶媒は事前にフィルター (吸着材) を通るよう前処理装置に組み込むことで、コンタミネーションを抑えた。

**添加回収試験:** 各試料に混合標準溶液を添加して本法で得られたピーク面積値と、試料をそのまま本法で得られたピーク面積値 (基準) と、それらの面積値から得られた回収率と再現性 (n=5) を Table 1 に示した。尚、回収率は前処理の評価を行うため、絶対面積値で算出した。その結果、イオン性を持たない疎水性のFOSA, NMeFOSA, NEtFOSAが回収できていないことが分かった。本法では固相への負荷と洗浄に疎水性の有機溶媒を使用しているため、それらの成分が固相に保持せずに、溶媒と一緒に流出していると思われる。再現性については、RSDがほぼ10%以内の良好な結果を得られた。

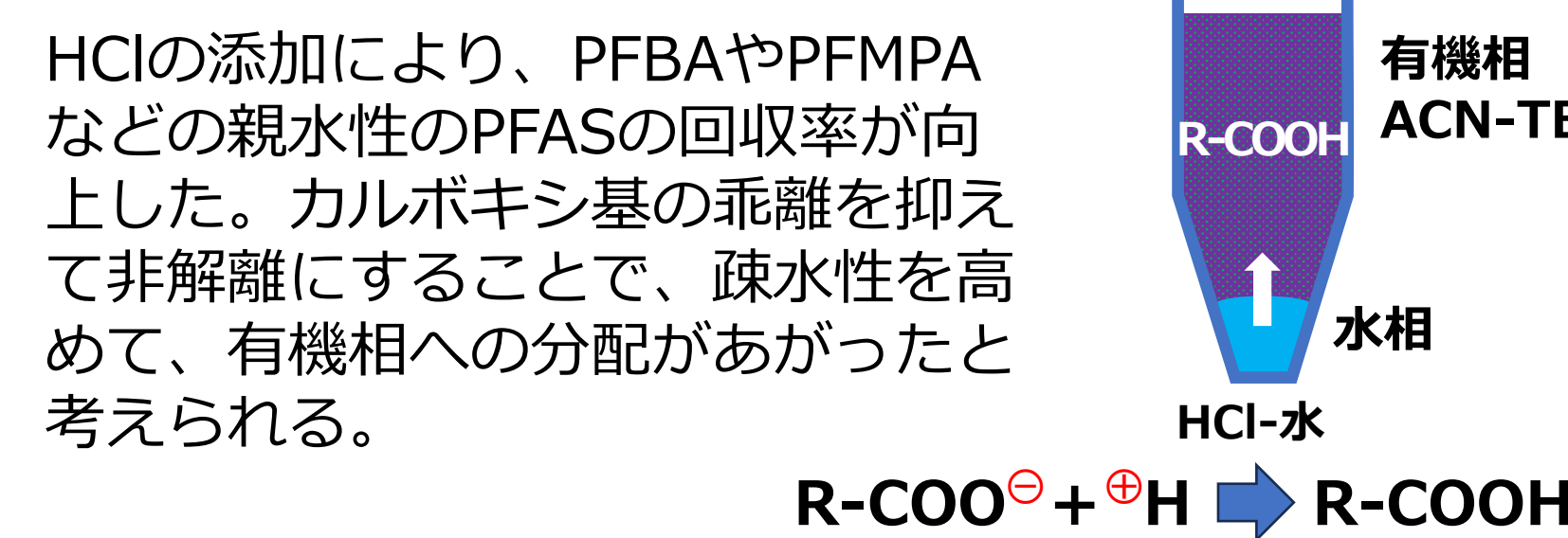
## 【結論】

本研究により、除タンパク後の液液分配と固相抽出を組み合わせることで、食品や血清などの夾雑成分の多い試料に対しても迅速かつ簡便で高感度なPFASの多成分一斉分析を達成した。

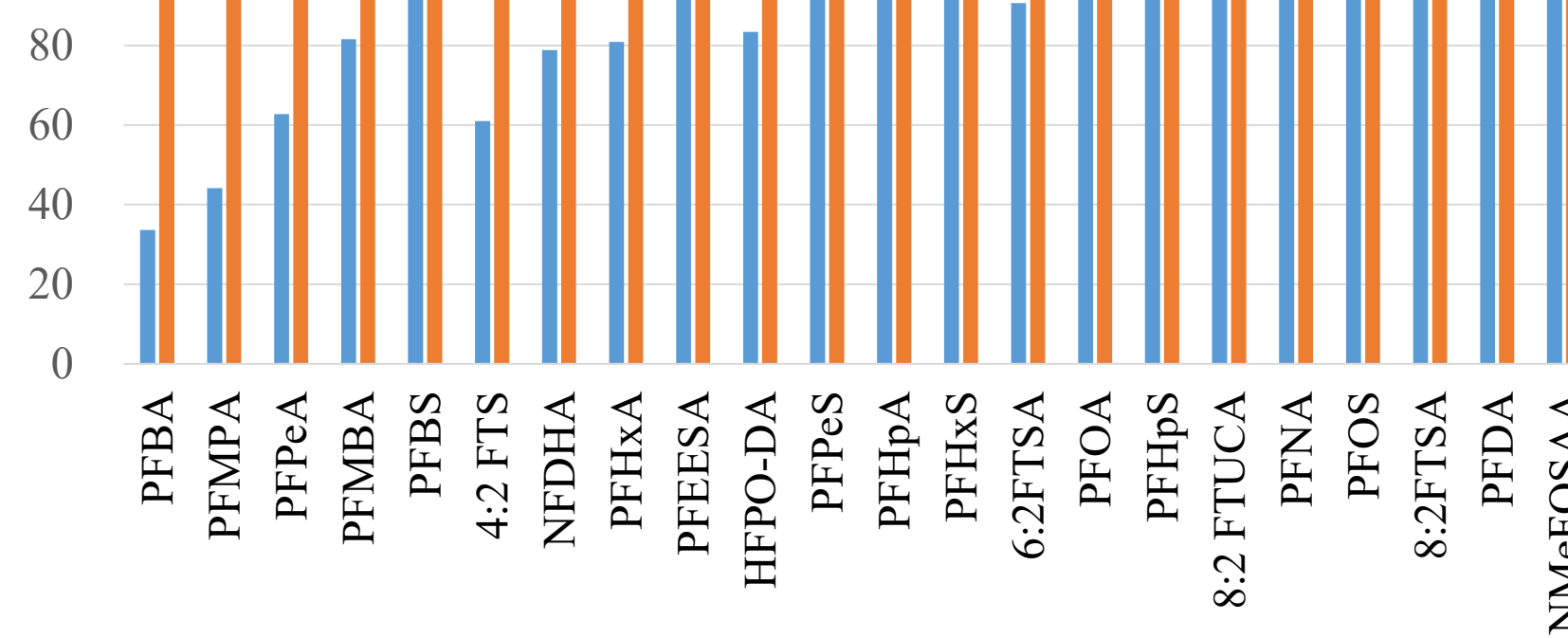
### ■ 液液分配の方法



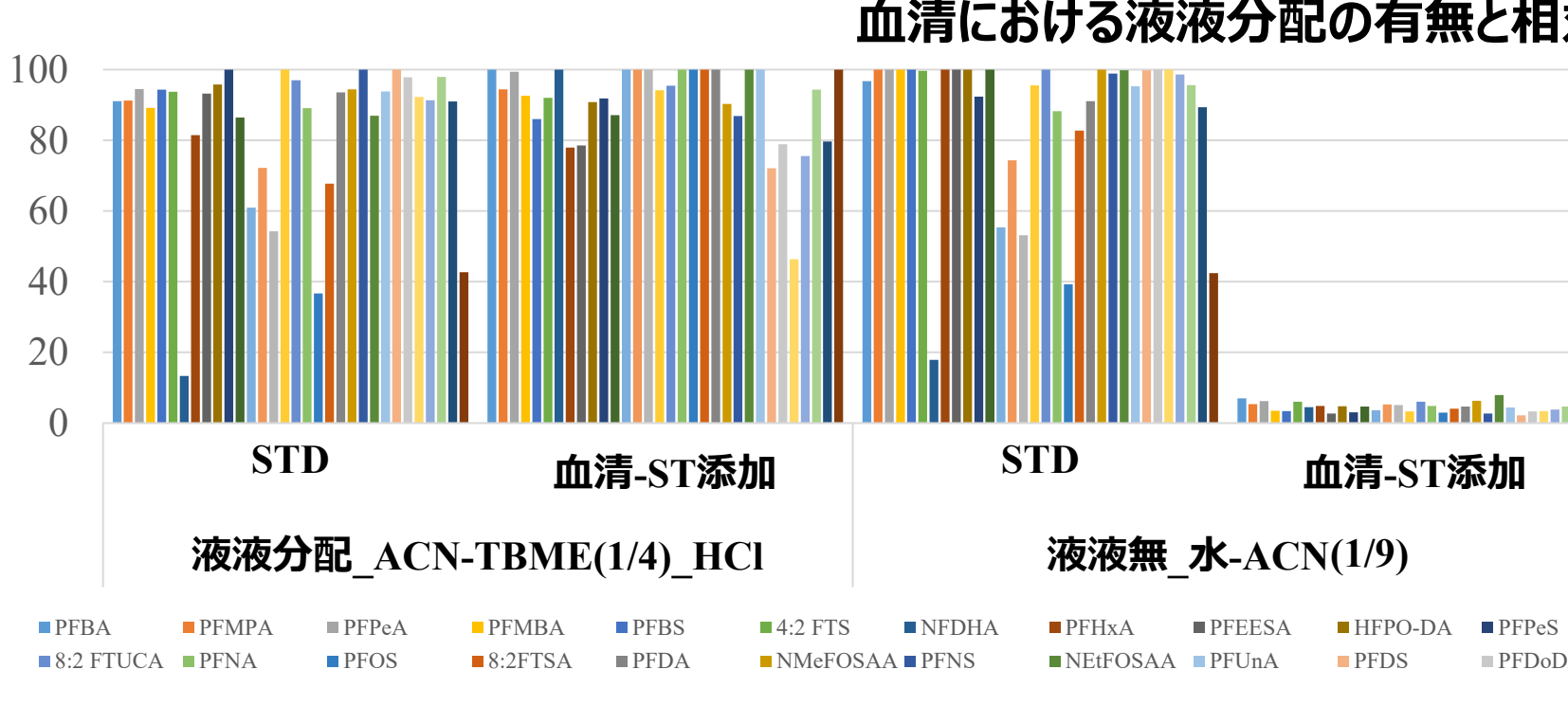
### ■ HCl添加の検討



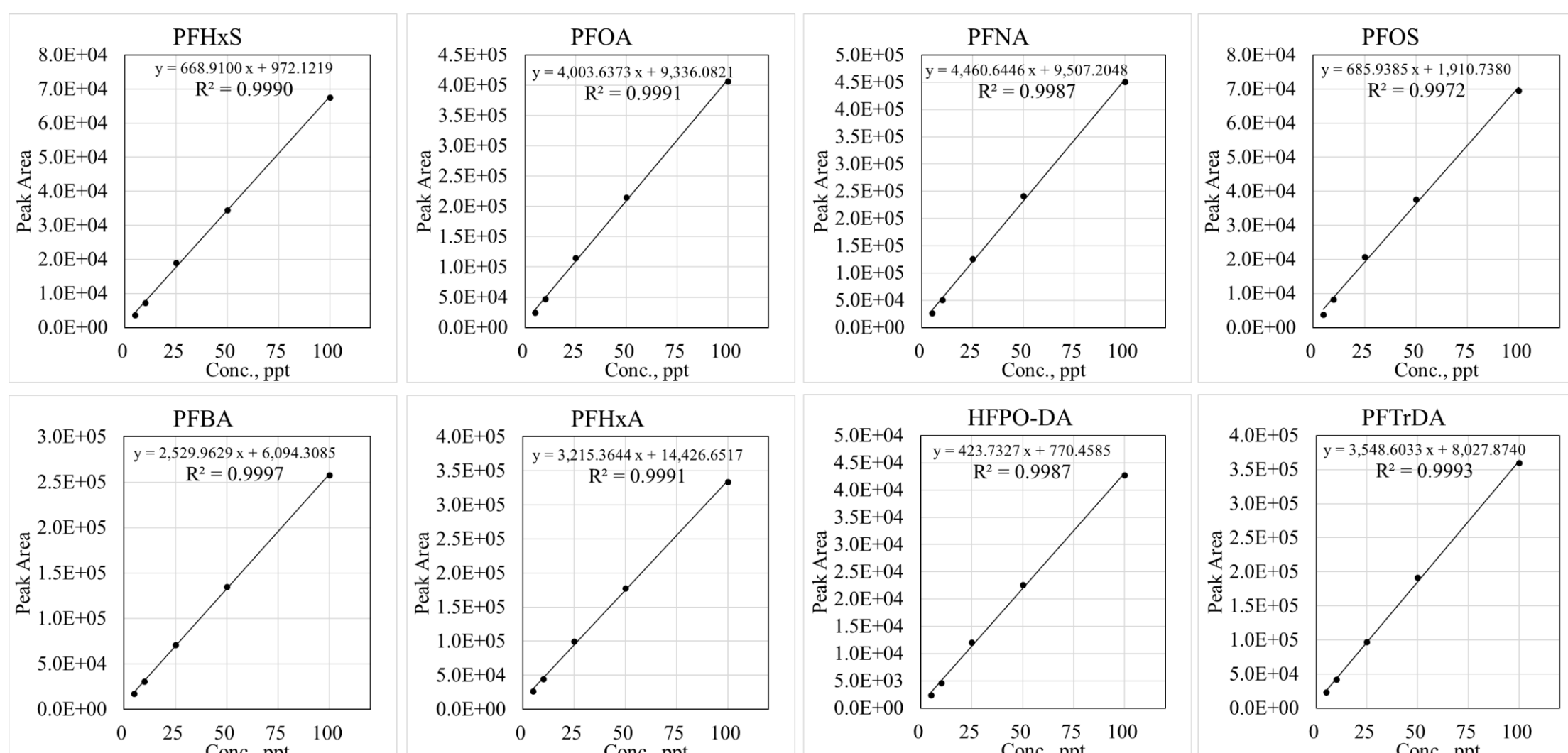
### ■ HCl未添加と添加のピーク面積相対比



### ■ 液液分配有無の検討



### ■ 本システムによる絶対検量線



### ■ 添加回収試験の結果 (回収率と再現性)

No.	成分名	アジ		牛乳		血清	
		2 ppb 添加	1 ppb 添加	1 ppb 添加	1 ppb 添加	1 ppb 添加	1 ppb 添加
		回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
		%	n=5, %	%	n=5, %	%	n=5, %
1	PFBA	96	7.1	82	3.4	106	5.1
2	PFMPA	94	5.9	88	4.1	91	1.8
3	PFPeA	99	3.2	89	6.3	102	9.4
4	PFMBA	81	8.4	88	3.8	91	6.3
5	PFBS	93	2.4	79	6.5	108	11.1
6	4:2 FTS	100	8.1	60	6.0	121	8.0
7	NFDHA	182	4.3	94	4.9	185	7.3
8	PFHxA	91	3.5	84	4.2	94	6.4
9	PFEESA	93	4.0	89	2.1	105	5.7
10	HFPO-DA	176	4.5	85	6.3	91	8.8
11	PFPeS	107	4.1	84	7.2	106	9.2
12	PFHpA	83	3.8	85	3.6	95	5.7
13	PFHxS	107	4.3	92	8.6	107	6.1
14	6:2FTSA	127	4.7	81	6.3	192	5.1
15	PFOA	104	2.1	85	3.0	102	3.9
16	PFHpS	108	4.3	88	2.9	102	10.7
17	8:2 FTUCA	102	1.6	86	4.2	115	7.1
18	PFNA	91	1.6	88	4.3	102	4.7
19	FOSA	-	-	-	-	-	-
20	PFOS	77	3.7	80	3.8	82	5.1
21	8:2FTSA	103	8.1	80	8.1	133	10.7
22	PFDA	78	4.4	88	2.9	106	6.6
23	NMeFOSA	74	5.1	97	4.1	135	8.2
24	PFNS	92	5.3	88	3.6	96	9.7
25	NMeFOSA	-	-	-	-	-	-
26	NEtFOSA	20	4.9	87	7.5	93	7.4
27	PFUnA	-	-	85	2.6	84	4.7
28	PFDS	68	5.6	93	4.4	98	2.6
29	N-EtFOSA	-	-	-	-	-	-
30	PFDoDA	46	3.9	83	3.6	77	5.2
31	PFTtDA	58	2.6	80	5.0	87	7.5
32	PFTeDA	96	4.2	80	3.7	98	5.8
33	PFHxDA	88	6.0	86	3.3	98	5.8
34	8:2 diPAP	100	2.0	87	6.7	79	8.9
35	PFODa	152	2.6	94	3.4	138	5.3

※回収率は絶対面積値より算出 (安定同位体を用いていません)

### ■ 血清における液液分配の有無と相対面積比

