

マイクロプレートリーダーを使用した繊維製品中のホルムアルデヒドの迅速スクリーニング分析

中川和子**, 並河幹夫*, 三輪真理子*, 伴創一郎*, 折戸太一***, 瀬村俊亮*, 川上雅弘****

Determination of acetyl acetone derivative of formaldehyde in textile goods by micro plate reader.

Kazuko NAKAGAWA, Mikio NAMIKAWA, Mariko MIWA, Souichiro BAN,
Taichi ORITO, Shunsuke SEMURA, Masahiro KAWAKAMI

Abstract

A rapid analytical method for the determination of formaldehyde in textile goods was developed by micro plate reader.

Formaldehyde in textile goods was extracted with distilled water and it was derivatized with acetyl acetone, 340μl of acetyl acetone derivative were placed into 96 well plate and analysed by micro plate reader (detection wavelength 415nm). Quantitative values by this method indicated approximately some values as those by official method, and it can be sufficiently used for screening.

Key words

ホルムアルデヒド formaldehyde, マイクロプレートリーダー micro plate reader, 吸光度 absorbance, ホルムアルデヒドアセチルアセトン誘導体 acetyl acetone derivative of formaldehyde

1 はじめに

ホルムアルデヒドは、衣類の防しわ・防縮加工剤及び接着剤の防腐剤として使用されているが、アレルギー性接触皮膚炎を引き起こす危険性があることから「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」¹⁾ (1973年10月12日) (以下 家庭用品規制法) により規制されている。当所は、京都市内の量販店等にて1ヶ月につき60検体、年間600件の対象繊維製品及び接着剤を試買し、検査を行っているが、年平均0~3件の頻度で違反がある。ホルムアルデヒドの試験法として採用されているアセチルアセトン法は、試料から抽出した遊離ホルムアルデヒドをアセチルアセトンと反応させ、生成したアセチルアセトン誘導体化合物 (図1) の吸光度を分光光度計で測定することでホルムアルデヒドを定量する。そして、ホルムアルデヒド濃度が規制値を超えた場合は、ジメドン法または高速液体クロマトグラフで確認する。この公定法による試験方法は、多検体を一度に行うと分光光度計の測定操作に時間を要し、検査結果の判定に影響を及ぼすおそれがある^{2) 3)}。

そこで、分光光度計による測定に替えて所要時間が短く、多検体を同時に測定可能なマイクロプレートリーダーによるス

クリーニング測定方法の検討を行ったので報告する。

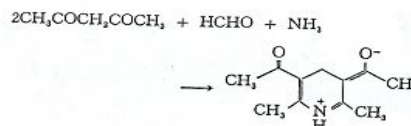


図1 遊離ホルムアルデヒドとアセチルアセトンの反応式

2 実験方法

(1) 試料

分析法検討に用いる試料として過去にホルムアルデヒドが検出された試買品又は取去品を使用した。

- ア 高濃度に樹脂加工された生地を使用した浴衣 (外衣)
- イ 高濃度に樹脂加工された生地を使用したパジャマ (寝衣)
- ウ 移染したおしめ (低濃度)

(2) 試薬及び標準品

ア ホルムアルデヒド標準品: 丸石製薬 (株) 製 ホルムアルデヒドを、公定法に従って標定し10000 μg/ml 標準原液としたものを標準原液とし、適宜精製水で希釈して標準溶液として用いた。

イ アセチルアセトン試薬: アセチルアセトン (ナカライテスク (株) 製 試薬特級品) 400 μl を酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 200ml に溶かしたものを用いた。

* 京都市衛生環境研究所 生活衛生部門

** 京都市衛生環境研究所 環境部門

*** 環境政策局 南部環境共生センター

**** 山科区役所 保健部 衛生課

ウ 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液：酢酸アンモニウム（和光純薬工業（株）製試薬特級）150 gに精製水を適量加えて溶かし、氷酢酸（ナカライ（株）製試薬特級）3ml 加えさらに精製水で1Lにした。

エ 精製水：YAMATO 製蒸留装置で製造した蒸留水をミリポア製超純水製造装置で精製した超純水。

(3) 分析装置

ア 分光光度計：（株）島津製作所製UV-1600（フローセル付き）

イ マイクロプレートリーダー：モデル550（株）パイオラド製

ウ マイクロプレート：（株）パイオラド社製推奨 96 ウェルマイクロプレート

エ マイクロピペット（100-1000）とそのチップ：（株）LMS 製

オ シェイキングウォーターバス：THOMAS 製

(4) 試験溶液の調製法

試料からのホルムアルデヒドの抽出及び抽出液、ホルムアルデヒド標準液、精製水のアセチルアセトン誘導体化処理をして吸光度の測定は図2に示す作業工程で行った。

(5) 分光光度計によるホルムアルデヒド濃度測定法

層長1 cmのセルを用い、415nmの波長で図2に従って調製した各試験液の吸光度を測定した。

なお家庭用品規制法¹⁾によれば図2のA0はサンプル抽出液に5mlの精製水を加えたものとしているが、岩間ら⁴⁾は濁りの影響を除去するためサンプル抽出液に酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液を加えたものを用いそれに対する対照は、精製水に酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液を加えたもの[A0(B)]としており、当所もそれに従った。

(6) マイクロプレートリーダーによるホルムアルデヒド濃度の測定方法

図2に示す方法で調製した標準液及び試験溶液とその対照液をそれぞれ340μlずつマイクロピペットで採取し（1検体につきn=3）、96ウェルプレートへ分取後、マイクロプレートリーダーで415nmフィルターを用いて測定を行った。

なお、検体数が多く1枚のプレート上に全て分取できない場合、2枚目以降のプレートにも、発色させた精製水+酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液、標準列を必ず分取することに

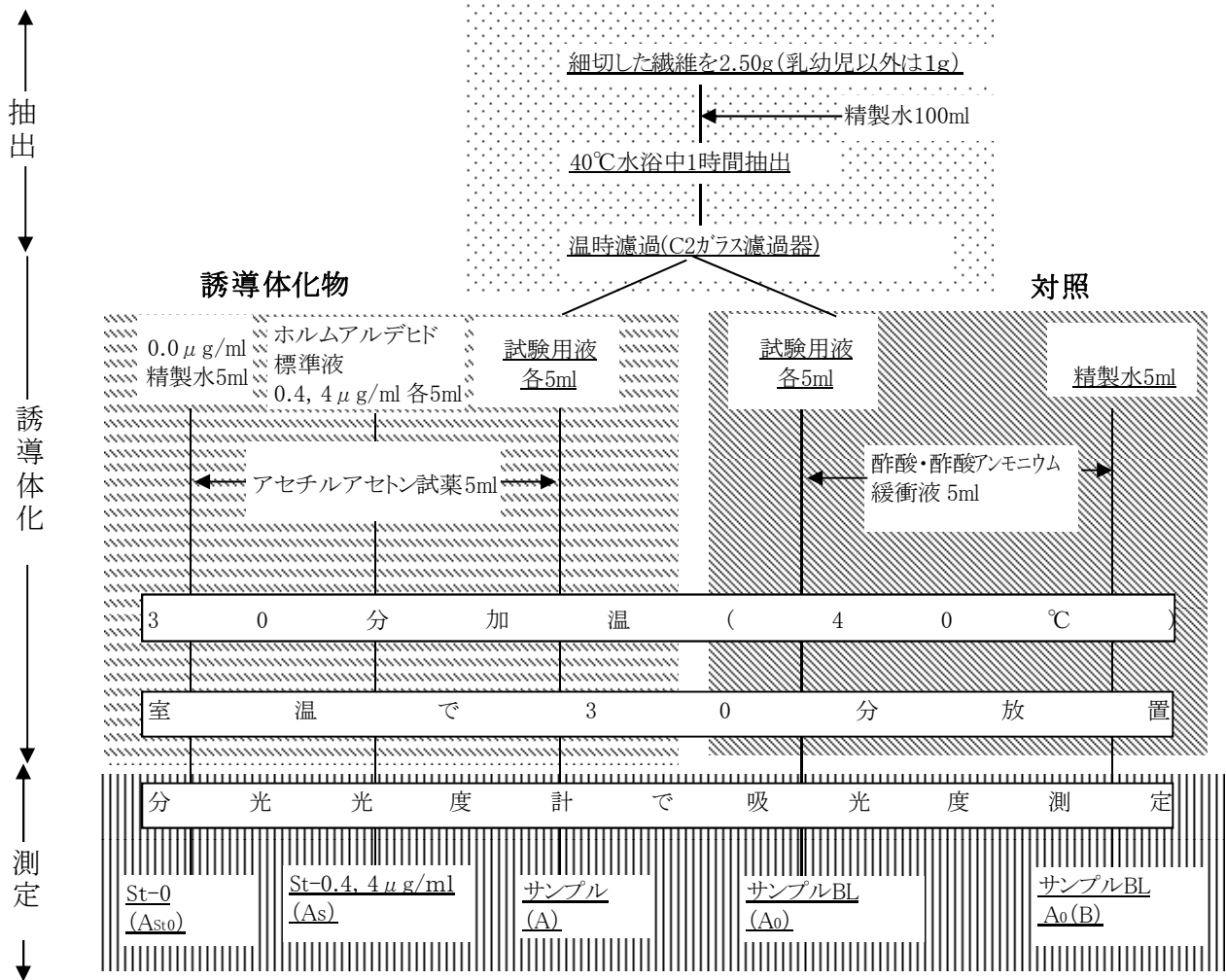


図2 公定法に準じた繊維製品中のホルムアルデヒドの分析方法

した。ホルムアルデヒドの各標準列 (0 μg/ml, 0.2 μg/ml, 0.4 μg/ml, 2.0 μg/ml, 4.0 μg/ml) と、それらの溶液の吸

光度から検量線を作成し、傾き (a) と切片 (b) を求め、次式によりホルムアルデヒド濃度を算出する。

$$\text{計算式：ホルムアルデヒド濃度 (}\mu\text{g/g)} = \frac{(A - A_{St0}) - (A_0 - A_0(B)) - b}{a} \times 100 \times \frac{1}{w(\text{g})} \text{注}$$

- 注
- W=2.5 乳幼児用採取量 (g)
 - W=1 乳幼児以外 (g)
 - A 誘導体化したサンプルの吸光度
 - A_{s t0} 0 μg/ml の吸光度
 - A₀ サンプル抽出液+緩衝液の吸光度
 - A₀ (B) サンプル抽出液+精製水吸光度

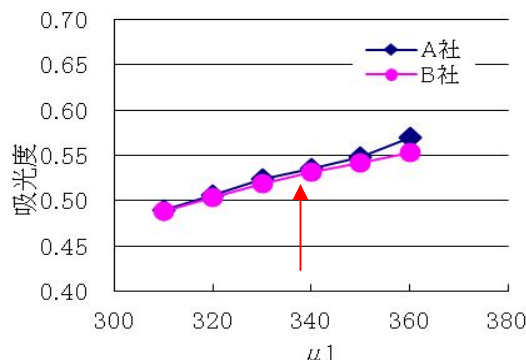


図3 415nmで測定したアセチルアセトン誘導体化物の吸光度とウェル採取量の関係

3 結果と考察

(1) 波長と吸光度の関係

家庭用品規制法1)では4.0 μg/ml濃度の標準液で、その吸光度が0.53以上ある標準試薬を使用し、かつその412nm~415nmにおける吸収極大波長を用いて試験溶液を測定している。そこで、その範囲の各波長でアセチルアセトン誘導体化したホルムアルデヒド標準液4.0 μg/mlの吸光度を測定した。その結果、各波長の吸光度値はほぼ同じであり、測定波長を415nmとしても支障が無いことを確認した(表1)。

表1 各波長における0.0から4.0 μg/ホルムアルデヒド誘導体化物の吸光度

| 濃度(μg/ml) | 吸光度 | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|
| | 415nm | 414nm | 413nm | 412nm |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.2 | 0.026 | 0.026 | 0.026 | 0.026 |
| 0.4 | 0.053 | 0.053 | 0.053 | 0.053 |
| 2.0 | 0.269 | 0.269 | 0.269 | 0.269 |
| 4.0 | 0.540 | 0.541 | 0.541 | 0.541 |

(2) ウェルへの採取量と吸光度の関係

マイクロプレートリーダーによる測定において試験液の分取量は、分光光度計の吸光度値(4.0 μg/mlで0.53以上)と近似する吸光度を与える採取量が最適であると考えられる。そこで415nmでのウェルへの分取量を検討した。2社のプレートを用意し、0.0 μg/mlと4.0 μg/mlを各310~360 μlずつマイクロピペットで各社プレートのウェル(プレート上にある試験溶液をいれる穴)へ分取し、マイクロプレートリーダーで415nmにおける吸光度を(n=3)測定した。吸光度値が0.53以上となるためには、330 μl以上の採取量が必

要であることが確認できた(図3)。

実際、2社のプレートの推奨量は340 μlまでと規定されており、ウェルへの採取量は340 μlに決定した。

(3) ホルムアルデヒドアセチルアセトン誘導体化物の吸光度の経時変化

神山らによれば標準液及び試験溶液中のホルムアルデヒドアセチルアセトン誘導体化物は時間と共に減少すると報告している2)。また、五十嵐らによればホルムアルデヒドアセチルアセトン誘導体化物は時間と共に増加すると報告している3)。そこで、ホルムアルデヒドアセチルアセトン誘導体化物の吸光度の経時変化を以下の方法で確認した。

公定法では、アセチルアセトン試薬を加え40℃で30分、次いで室温で30分放置後に測定するよう規定されている。そこで、その測定時を0分とし、30分、60分及び120分後の試験溶液を分光光度計とマイクロプレートリーダーを用いて測定した

ア 分光光度計による吸光度経時変化

ホルムアルデヒド標準液(0.0 μg/ml, 0.4 μg/ml, 4.0 μg/ml)及び試験溶液の吸光度は、標準液(図4-a)・試験溶液(図4-b)に示すとおり、2時間後までほぼ変化しなかった。

イ マイクロプレートリーダーによる吸光度変化

0.0 μg/mlの吸光度が増加し0.4 μg/ml, 4.0 μg/mlの吸光度の変動は少なかった(図5-a)。サンプルについては、低濃度検出サンプル(移染おしめ 定量値0.4 μg/g)の吸光度値は増加、高濃度検出サンプル吸光度は減少した(図5-b)。0.0 μg/mlで公定法通りに補正を行うと、低濃度検出サンプルの吸光度値が小さくなり測定値は減少に転じた(図5-c)。

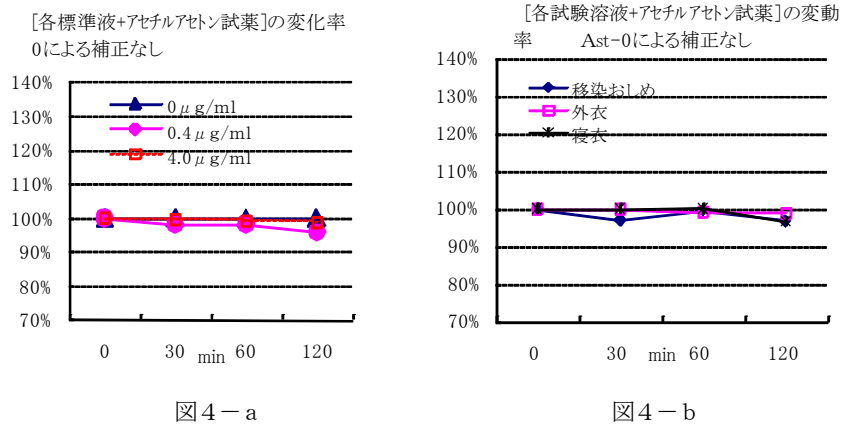


図4 分光光度計で測定した標準液と試験溶液のアセチルアセトン誘導体化物の経時的吸光度変化

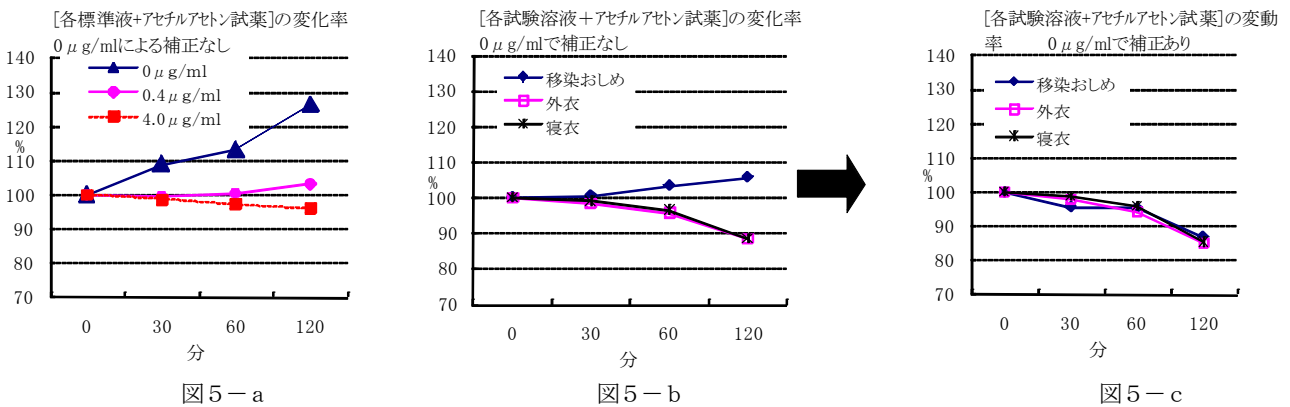


図5 マイクロプレートリーダーで測定した各標準液と試験溶液のアセチルアセトン誘導体化物の経時的吸光度変化

(4) マイクロプレートリーダーによる吸光度経時変化の原因

吸光度値の経事変化検討時にマイクロプレートリーダーで測定したときのみ 0.0 μg/ml の吸光度が増加した原因を以下に検討した。

ア 濁りによる吸光度の増加

プレート (2 社共に) の素材は、ポリスチレンで有機溶剤には適していない。アセチルアセトン、含有量としてはわずかである (試薬として酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液中に 0.2%) が、有機溶剤の一種であるため、ポリスチレンを侵し濁りの原因となっている可能性は否定できない。そこで、ポリスチレンチューブで保存した時の吸光度を測定したところ吸光度は下がっていく傾向だった (図 6)。このことより、微量のアセチルアセトンがポリスチレン容器を侵すことによる濁りは考えられないことを確認した。

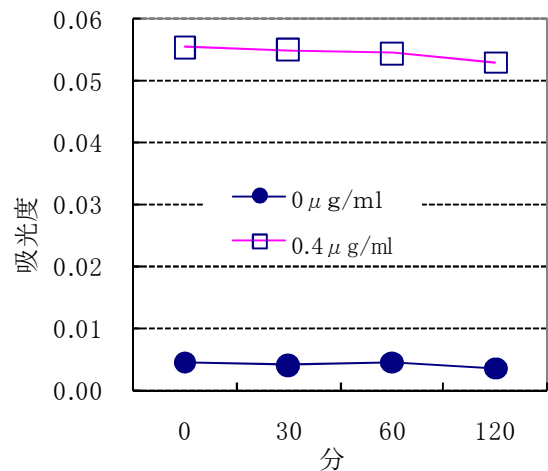


図6 ポリスチレン容器で保存したアセチルアセトン誘導体化物の経時的吸光度変化

イ アセチルアセトン試薬による吸光度の増加

標準液を3種 (①0.0 $\mu\text{g/ml}$, ②0.4 $\mu\text{g/ml}$, ③4.0 $\mu\text{g/ml}$), ④アセチルアセトン試薬, ⑤酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液, ⑥精製水, ⑦精製水+酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液の7種の試験溶液について検討した。各試験溶液3ウェルずつ採取しそれを1つのグループとして, 同一プレート上の2カ所に分取した。1カ所はシールで密閉し, もう1カ所は開放した状態で各時間放置後, 吸光度を測定した。

(図7-a~7-g)

閉鎖系は, いずれの試験溶液①~⑦では, ほぼ一定の値を示した。

一方開放系は① (図7-a) ② (図7-b) と④ (図7-d) の試験溶液の吸光度は上昇した。

③ (図7-c) は開放系のそれと同じ挙動を示した。

⑤ (図7-e), ⑥ (図7-f), ⑦ (図7-g) の3種の試験溶液は, 同じような挙動を示した。

このことから, 吸光度変化の原因は, この3つに共通して入っているアセチルアセトンであること, そして試験溶液が蒸発することにより濃度が変わったと考えられた。

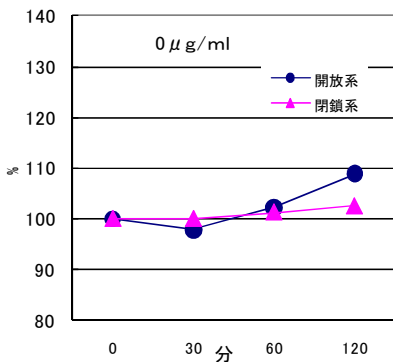


図7-a

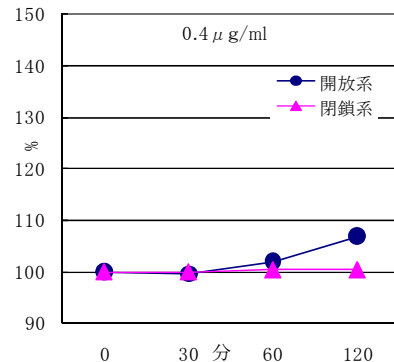


図7-b

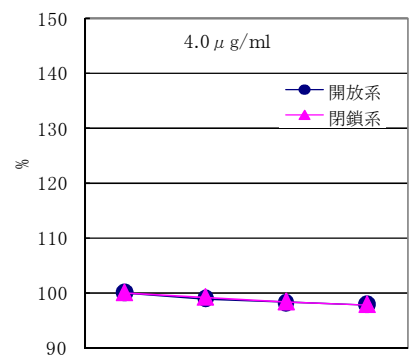


図7-c

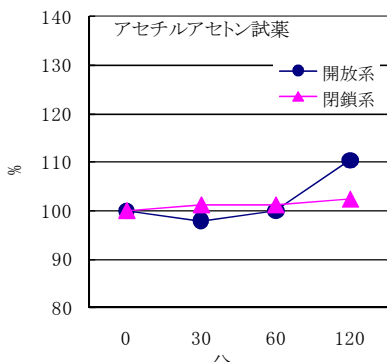


図7-d

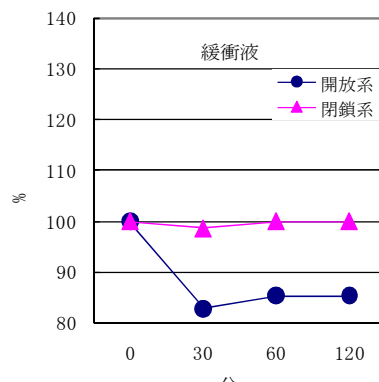


図7-e

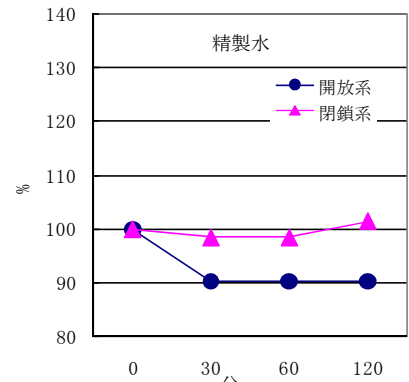


図7-f

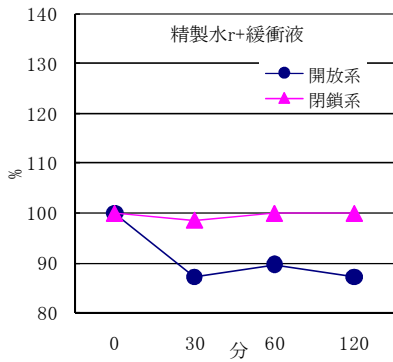


図7-g

図7 マイクロプレートリーダーによる各試験溶液での開放系及び閉鎖系における経時的吸光度変化

4 マイクロプレートリーダー及び分光光度計での定量

(1) 検量線

マイクロプレートリーダー法による検量線を図8に示した。0.2 $\mu\text{g/ml}$ から 4.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のホルムアルデヒドとそのアセチルアセトン誘導体化物の吸光度との間には良好な直線関係が得られた。(相関関数 $R^2=0.9999$)

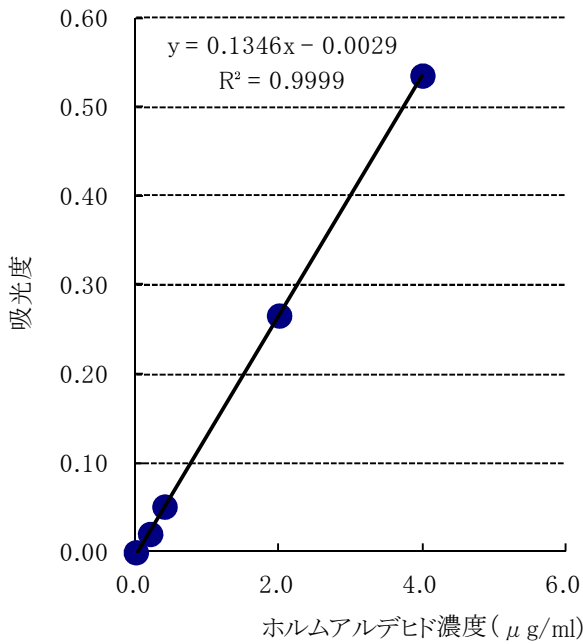


図8 ホルムアルデヒドアセチルアセトン誘導体化物の吸光度の検量線

(2) 実試料への適用

実試料を図2に従い前処理を行い、マイクロプレートリーダー及び分光光度計で測定したものを比較し図9に示した。検出されたホルムアルデヒドが低濃度サンプル～高濃度サンプルの測定値は、ほぼ近似した。このことから、スクリーニング的に定量値を知ることは可能であると考えられた。

(3) マイクロプレートリーダー使用による測定値の判定方法

家庭用品規制法¹⁾による試験値が、基準値[A-A0]0.05の±20% (0.04~0.06の範囲)にある場合、硫酸デシケータに24時間放置後再試験を行う規定となっている。そこで、スクリーニング判定は、吸光度値0.04(標準液では0.3 $\mu\text{g/ml}$ またはホルムアルデヒド溶出量が12 $\mu\text{g/g}$)以上のもに対して再試験を行うことにした。その判定フローチャートを図10に示す。

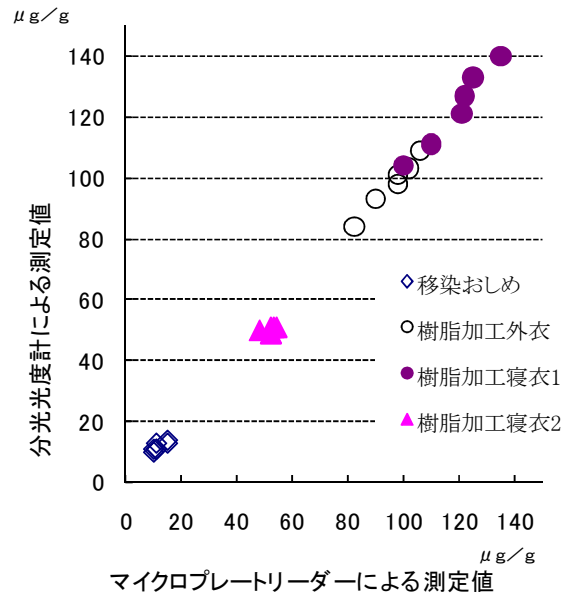


図9 マイクロプレートリーダーと分光光度計で実試料を測定した定量値の相関

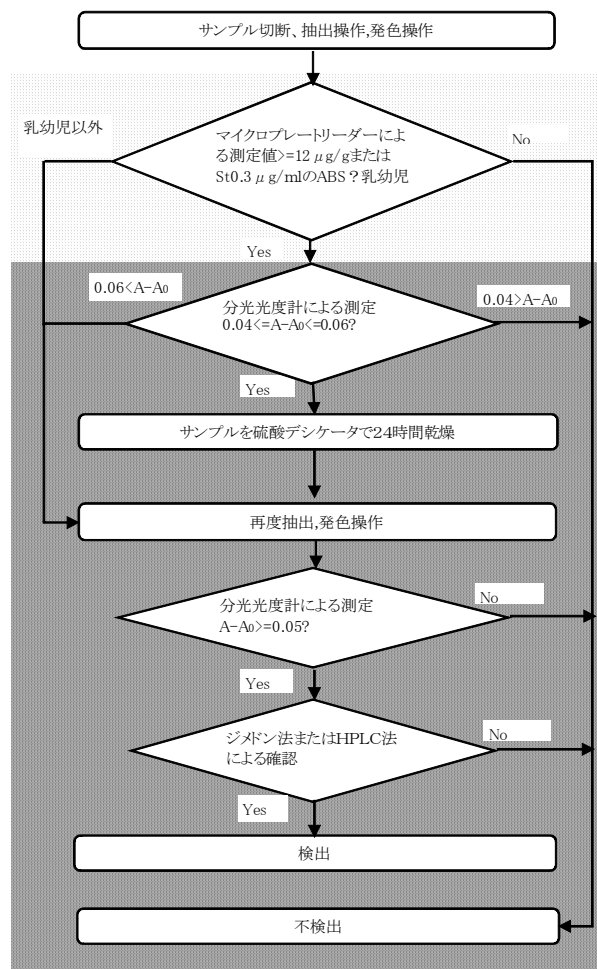


図10 マイクロプレートリーダーを使用した判定フロー

5 まとめ

アセチルアセトンで誘導体化したホルムアルデヒドをマイクロプレートリーダーによる測定方法について検討した。

- (1) 412~415 nmの各波長で4.0 μ g/mlのホルムアルデヒドを測定すると吸光度はどの波長でもほぼ同値であり測定波長は415nmとした。
- (2) ホルムアルデヒドアセチルアセトン誘導体化物溶液のウェルへの適切な分取量は340 μ lである。
- (3) マイクロプレートリーダーによる方法では標準液0.0 μ g/mlの吸光度の増加が大きく、そのため特に試料中の低濃度ホルムアルデヒド(乳幼児の規制値レベル)に対し吸光度値を小さくすることがわかった。
- (4) 0.0 μ g/mlの吸光度が増加する原因は、アセチルアセトン、そしてウェルへの採取量が微量であるため、試験溶液が蒸発・濃縮されることが考えられる。
- (5) 吸光度は時間と共に変化するが、マイクロプレートリーダーの測定時間が短い(10秒)ため留意する必要はないことがわかった。
- (6) マイクロプレートリーダーで測定した実試料中のホルムアルデヒド定量値は、分光光度計を用いる方法による定量値とほぼ同値である。

- (7) マイクロプレートリーダーを使用することで測定時間を短縮しかつ放置後の時間をそろえて測定が可能であり、ホルムアルデヒドのスクリーニング分析に十分使用することができる。現在、当部門ではこの方法で検査を行っている。

6 参考文献

- (1) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律(法律第122号1973年10月12日)。
- (2) 神山恵理奈, 堀川正勝, 南谷巨昭, 吉田勲, 羽賀新世, 出屋敷善宏, 多田裕之, 河村博アセチルアセトン法によるホルムアルデヒド測定における留意点についてアセチルアセトン誘導体の吸光度およびHPLC測定値の経時変化ー岐阜県保健環境所報第18号, 5-8。(2010)
- (3) 五十嵐良昭, 鹿庭正昭, 土屋利江, 有害物質含有家庭用品規制法のホルムアルデヒド試験方法の改訂にかかわる検討, 国立衛研報, (121), 16-24 (2003)。
- (4) 岩間雅彦, 鈴木昌子, 青山大器, 中島重人, 繊維製品のホルムアルデヒド試験法に関する検討, 名古屋市衛研報, (52), 1-5。(2006)

7 謝辞

マイクロプレートリーダーを快く貸して下さった微生物部門担当者の皆様に感謝いたします。