

マイクロウェーブ分解装置を用いた魚中の総水銀分析の妥当性評価

Validation of Analytical Method for Total Mercury in Fish with the Microwave Digestion System

並河 幹夫*

Mikio NAMIKAWA

Abstract

We conducted a validation of fish total mercury analysis method using Microwave Digestion System. Evaluation was carried out according to "Guidelines for Evaluating the Effectiveness of Test Methods for Metals in Food" presented by the Ministry of Health, Labor and Welfare. Samples used were the certified standards and mercury added fish samples. As a result, it was judged that the total mercury analysis method in the fish currently used conforms to the judgment of the adequacy of the provisional regulation value of the Food Sanitation Law.

Key Words

total mercury/総水銀, fish/魚, Microwave Digestion System/マイクロウェーブ分解装置

1 はじめに

魚介類中の水銀については昭和48年7月23日付け環乳第99号通知「魚介類の水銀の暫定的規制値について」により、一部の魚種を除き、魚介類の暫定的規制値を総水銀0.4ppm、メチル水銀0.3ppmと定めている。この通知の中で示された分析方法は、湿式分解還元気化法による原子吸光光度法であるが、この方法は有機物の分解に時間と労力を要する。

試料中の有機物の分解法として、湿式分解の他にマイクロウェーブ（以下、「MW」という。）分解法がある。MW分解は、密閉系で、揮発性の高い水銀分析においても、高圧、高温で迅速な前処理が可能である。また一度に多くの試料の分解処理が可能であり、分析に要する労力を大幅に削減することができる。しかし、MW分解ではサンプルサイズに制限があるため、測定試料、測定対象金属及び測定感度に応じて分解条件を工夫する必要がある。当所では魚介類中の水銀について分解条件を検討し、MW分解後、還元気化原子吸光光度法で測定する方法を、通知された公定法の前段階のスクリーニング分析法として採用してきた。今回、当所で行っているMW分解装置を用いた分析法について食品中の金属に関する試験法の妥当性確認ガイドライン¹⁾（以下、「ガイドライン」という。）による枝分かれ試験により、選択性、真度、併行精度及び室内精度を確認し、性能評価を行ったので報告する。

2 方法

(1) 試料

平成27年12月に京都市内で収去されたイワシ、サワラ及びタラ魚肉粉末認証標準物質NMIJ CRM 7402-a（国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センターより入手）を試料とした。

(2) 試薬

標準原液：水銀分析用水銀標準液（関東化学製、50mg/L）

硝酸：有害金属測定用（関東化学製）

過酸化水素：原子吸光分析用（関東化学製）

硫酸（1+1）：水銀分析用（関東化学製）

塩化スズⅡ：水銀分析用（関東化学製）

(3) 装置

MW分解装置：マイルストーン®ネラル ETHOS PLUS

水銀分析装置：平沼産業製 HG-450

超純水装置：ヤマト科学 オートピュア WR700

(4) 試験溶液の調製（図1）

試料1.0gをテフロン製容器に正確に採取し、硝酸7mL、過酸化水素1mLを加え、表1の分解プログラムによりMW分解を実施した。空試験として、試料を入れないテフロン製容器を用意し、同様に試薬を加え、同プログラムによりMW分解を実施した。

分解後の試験溶液をテフロン製容器からメスフラスコに超純水で洗いこみながら移し、50mLに定容した。

*生活衛生部門

表1 マイクロウェーブ分解プログラム

step	time/min	power /w	temperature/°C
1	2	1000	50
2	3	1000	30
3	23	1000	190
4	1	1000	160
5	4	1000	190
6	15	1000	190

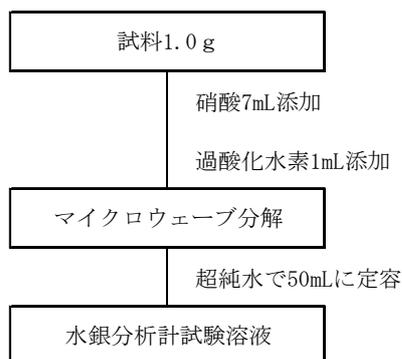


図1 試験溶液の調製フローチャート

(5) 測定

調製した試験溶液 2mL (試料 0.04g 相当) を採取し表 2 の測定条件で水銀分析装置により測定し、試料中の総水銀量を無機水銀として求めた。

表2 水銀分析装置測定条件

検液量	20mL
Air流量	1.0L/min
硫酸(1+1)	1.0mL
塩化スズII	1.0mL

(6) 検量線

50ng/L 標準原液 1mL を超純水で 100mL とし、500ng/mL を作成し、添加回収用標準液とした。この添加回収用標準液 8mL を採り、硫酸(1+1) 2.5mL を加え超純水で 50mL とし、80ng/mL を作成した。さらに 80ng/mL を 5mL 採り、0.001%L-システイン溶液(0.2%硝酸)で 50mL とし、8ng/mL を作成した。

20mL 用反応容器に 8ng/mL を 0.1mL 及び 0.5 mL, 80ng/mL を 0.1mL, 0.2mL 及び 0.4mL 正確に量り入れ、それぞれ超純水を加えて 20mL とし、無機水銀としての絶対量 0, 0.8, 4, 8, 16 及び 32ng の検量線を作成した。検出下限値は 0.02 μ g/g とした。

(7) 妥当性評価

標準品を添加した試料及び認証標準物質について、分析者 1 名が 1 日 2 併行で 5 日間分析する方法で、計 10 回実施した。試料への水銀添加濃度は試料 1.0g に対し 500ng/mL を 0.4mL (暫定的規制値の 2 分の 1) とした。試

料の総水銀量から、あらかじめ測定しておいた試料由来の総水銀量を差し引いて、回収率より真度、併行精度及び室内精度を算出した。認証標準物質については 0.213g~0.246g (認証値 0.61 μ g/g, 乾燥質量換算含水率約 9.0%) を採取し、評価を行った。

3 結果及び考察

ガイドラインに従い、選択性、真度、併行精度及び室内精度の確認を行った。還元気化原子吸光光度法による水銀分析装置は水銀に対する選択性が高く、試料中の他金属による妨害を受けない。これにより、選択性については、ガイドラインの基準を満たすと確認できる。魚介類については、ほとんどが微量の水銀を検出するため、予め水銀量が低いことを確認した試料を、ブランク試料として用いた。試料由来の水銀量を差し引いて計算した添加回収の結果と、認証標準物質の認証値に対する結果を表 3 に示した。この結果、全てがガイドラインの目標値を満たしており、本分析法は魚介類中の総水銀濃度測定に用いる試験法として適用できると考えられる。

表3 妥当性評価結果

試料名	真度 (%)	精度 (RSD%)	
		併行精度	室内精度
イワシ	94.1	3.0	3.8
サワラ	95.6	2.9	3.5
認証標準	91.8	3.0	5.5
目標値	80~110	10>	15>

当所で過去 15 年間に、魚介類中の総水銀が暫定基準を超えた事例が 7 件 (1017 検体中) あったことから²⁾、今後とも注意深い監視が必要であると考えられる。この分析法を生かして、迅速性及び精度の向上につながる運用を行っていききたい。

本報告は、平成 28 年 11 月 17 日~18 日に青森市で開催された日本食品衛生学会の示説発表したものに加筆したものである。

4 文献

- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第 0926003 号：食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて、平成 20 年 9 月 26 日
- 中尾好絵・並河幹夫他：魚介類中の PCB・水銀含有量実態調査、第 55 回近畿公衆衛生学会口演・示説要旨集、130、2016。

魚介類中のメチル水銀試験法について

Measurement Method of Methyl Mercury in Fish and Shellfish

伴 埜 行 則*, 並 河 幹 夫**

Yukinori BANNO, Mikio NAMIKAWA

Abstract

Mercury analysis method in fish and shellfish analyzes methyl mercury only when it exceeds provisional reference value after total mercury measurement, so there is almost no opportunity to examine methyl mercury. Also, the methyl mercury analysis method of the Ministry of Health, Labor and Welfare has operational problems of generating a strong emulsion. We investigated the cause of the emulsion generation and investigated countermeasures. Reduction in fat concentration in the sample is effective for suppressing emulsion formation. Therefore, it is the simplest and effective method to adjust the amount of sample in consideration of total mercury concentration to be performed in advance and methyl mercury sensitivity in ECD-GC measurement.

Key Words

methyl mercury/メチル水銀, fish and shellfish/魚介類, emulsion/乳化, gelation/ゲル化

1 はじめに

魚介類中の水銀濃度規制は、昭和48年厚生省環境衛生局長通知（当時）¹⁾で暫定規制値として総水銀0.4ppmと定められた。総水銀0.4ppmを超えた場合は、メチル水銀の検査を実施し、0.3ppm（水銀として）を超えた場合に暫定基準を超えたものと判定する。近年、総水銀0.4ppmを超える事例が少なく²⁾、³⁾メチル水銀の検査を実施する機会がほとんどなくなっている。また、通知¹⁾で示されたメチル水銀試験法は、メチル水銀の抽出効率が75%程度で、総水銀0.4ppmに対しメチル水銀0.3ppmとしている根拠とされている⁴⁾、⁵⁾。メチル水銀の低い抽出効率は、システイン・アセテート溶液（以下システイン溶液）で逆抽出する際に魚種により強固なエマルジョンを生成することが要因の一つと考えられる⁵⁾、⁶⁾。そこで、このエマルジョン対策を中心に魚介類中のメチル水銀試験法について検討した。

2 方法

(1) 試料

京都市中央卸売市場第1市場流通品のアジ、アマダイ、スズキ、カレイ、カマス及び認証標準試料（タラ魚肉粉末、メチル水銀の認証値0.58ppm；GC-ICP/MS法）

(2) 通知¹⁾による抽出方法

ミンチ状にした試料を塩酸酸性下ベンゼンで抽出後、ベンゼン層を分取しシステイン溶液で逆抽出、水層を分取後塩酸酸性にしてベンゼンで再抽出して調製した試験溶液をECD-GCで測定する。

当所では、発がん性があり廃液処理の問題を抱えるベンゼンの使用量を抑える観点から、通知の半量の試料について、すべての試薬を半量にスケールダウンして試験溶液を調製した（以下改通知法）。

(3) 衛生試験法注解の抽出方法

衛生試験法注解の方法（以下注解法）は、通知法の一部を改変したもので、一連の操作を通じて強固なエマルジョンの生成を防止するとされている⁶⁾。

*管理課 **生活衛生部門

改通知法	注解法
試料 5g	試料 (1~5g)
+精製水 20ml	+9 モル/L 塩酸 5ml
ウルトラタラックス (1分)	+ベンゼン 35ml
+精製水 10ml で洗い込み	
+濃塩酸 7ml	
+食塩 5g を加え混合	
+ベンゼン 35ml	
振とう抽出 (5分)	振とう抽出 (10分)
遠心分離 (1500rpm, 10分)	遠心分離 (1800rpm, 10分)
上層 25ml	上層 20ml
+システイン溶液 3ml	+システイン溶液 10ml
振とう抽出 (2分)	振とう抽出 (5分)
遠心分離 (1500rpm, 10分)	遠心分離 (1800rpm, 10分)
下層 2ml	下層 3ml
+6N 塩酸 1.2ml	+9 モル/L 塩酸 0.5ml
+ベンゼン 4ml	+ベンゼン 4ml
振とう抽出 (2分)	振とう抽出 (10分)
上層 試験溶液	上層 試験溶液

図1 試験溶液調製法の概略

(4) 試薬

改通知法と注解法で用いる試薬の主な相違点は、下表のとおりである。

表1 改通知法と注解法の主な相違点

	改通知法	注解法
塩酸濃度	濃塩酸 7ml	9 モル/L 塩酸 5ml
システイン	L-システイン塩酸塩水	L-システイン塩酸塩
溶液の組成	和物 1g, 無水酢酸ナトリウム 0.775g, 無水硫酸ナトリウム 12.5g を水に溶かして 100ml とする。	水和物 0.1g, 無水酢酸ナトリウム 0.1g, 無水硫酸ナトリウム 13g を水に溶かして 100ml とする。
食塩	5g	無し

(5) 標準溶液

- ・塩化メチル水銀
- ・塩化メチル水銀標準原液：塩化メチル水銀 0.12726g をベンゼンに溶解し 100ml とする。
- ・塩化メチル水銀標準溶液：塩化メチル水銀標準原

液をベンゼンで4回10倍希釈する。

(6) 測定条件

- ・装置：島津 GC-2010 Plus
- ・カラム：ULBON HR-Thermon-HG (内径 0.53mm, 長さ 15m)
- ・カラム温度：150℃
- ・注入口温度：Direct Inject 230℃, 注入量 1 μL
- ・検出器温度：230℃ (ECD)
- ・キャリアガス：窒素 30ml/分
- ・メイクアップガス：窒素 50ml/分

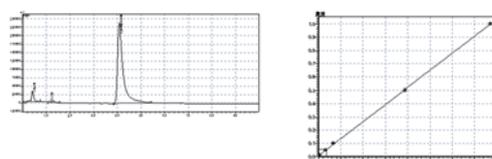


図2 塩化メチル水銀のクロマトグラムと検量線

3 結果

(1) 改通知法

アジ, アマダイ, スズキ, カレイ及びカマスについてベンゼン抽出液をシステイン溶液で抽出した際、スズキ及びカレイは2層に完全分離したが、アジ, アマダイ及びカマスのシステイン抽出液は白濁しエマルジョンを生成した (表2参照)。

表2 システイン抽出液のエマルジョン生成と分離時間

魚種	アジ	アマダイ	スズキ	カレイ	カマス
直後の画像					
分離時間	一昼夜以上	3時間	直後	直後	1時間
脂肪濃度	2.4%	1.0%	0.5%	1.3%	0.1%

最も強固なエマルジョンを生成したのはアジで、一昼夜放置しても分離しなかった。他の魚種は全て白身魚であるのに対し、アジは赤身魚で脂肪濃度が他の魚種に比べて高かった。そのことが強固なエマ

ルジョンを生成した一因と考えられる。そこで、アジ試料の採取量を 0.5g~5.0g 間で4段階採取し、各々前処理した際に生じるシステイン溶液のエマルジョンを観察した。

表3 アジの試料量とエマルジョン生成の有無

試料量	0.5g	1.0g	3.0g	5.0g
エマルジョン	無	無	有	有

表3に示すように、試料量を1g以下にした場合、エマルジョンの生成は見られない結果となった。

また、表2に示すとおり強固なエマルジョンでも一昼夜以上放置することで2層に分離させることができたが、システイン逆抽出液中の水銀は不安定で、時間の経過と共に濃度が減少するという報告がある⁷⁾。

検証のためエマルジョン生成の無かったスズキ、カレイ、カマス及び認証標準試料について、直ちにベンゼン抽出し測定した場合と、システイン抽出液の状態で24時間放置後ベンゼン抽出し測定した場合を比較した。表4のとおりメチル水銀濃度は、24時間放置後2割程度減少することを確認した。

表4 システイン溶液中のメチル水銀の安定性(n=2)

魚種	スズキ	カレイ	カマス	認証標準
直後	0.25	0.08	0.08	0.60
24時間後	0.20	0.07	0.06	0.47
比率(%)	80%	88%	75%	78%

(2) 注解法

改通知法と同じ試料について衛生試験法注解の方法で前処理を行った。9モル/L塩酸添加後ベンゼンで振とう抽出する際に一部の試料は、団子状で上下したが、衛生試験法注解にはアルキル水銀の抽出率に支障をきたすことがないと記述されている⁶⁾。また、システイン溶液逆抽出の工程において、全ての試料でエマルジョンの生成は見られなかった。

ただ、カレイ及び認証標準試料は、ベンゼン抽出

液がゲル化してしまった(図3)。



カレイの抽出液

認証試料の抽出液

図3 ゲル化した試料抽出液

ゲル化した抽出液は、超音波洗浄装置に5分間浸漬させた後1800rpmで5分間遠心分離した。カレイは完全分離したが、認証標準試料は一部ゲルが残った。そこで、認証標準試料のみ分離したベンゼン層を規定の半量分取し、以下の操作に用いる試料をすべて半量にして試験溶液を調製した。

表5に改通知法と注解法の回収率を比較した。実試料については改通知法に比べて注解法が低い回収率となった。しかし、認証標準試料は、注解法の回収率が高い値となった。

表5 改通知法と注解法の回収率比較(n=2)

魚種	アジ	アマダイ	スズキ	カレイ	カマス	認証標準
改通知法	—	—	0.25	0.08	0.08	0.60
注解法	0.06	0.21	0.19	0.06	0.06	0.75
比率(%)	—	—	76%	79%	72%	125%
総水銀	0.09	0.35	0.24	0.07	0.07	—

4 考察

メチル水銀の試験法は、システイン溶液による逆抽出の際に、魚種により強固なエマルジョンを生成し試験に支障をきたすという課題を抱えている。

このエマルジョンは、数時間~一夜放置で分離することが多いが、システイン溶液中でメチル水銀濃度が徐々に減少するため、長時間の静置は好ましくない。一般にメチル水銀の希薄溶液は、酵素の共存で容易に CH_3Hg^+ から Hg^{2+} へ分解する。 Hg^{2+} は、保存容器等に吸着を起しやすく濃度が減少する現象がしばしば観察される⁸⁾。

脂肪量が多く赤身魚であるアジの試料量を段階的に処理した際に、量を減らす程エマルジョンの生成が抑制されたことから、試料量を一定以下にして操作を行うと支障なく試験溶液を調製できる可能性がある。その際に、「試料に精製水を加え均一にした後一定量を採取する」といったサンプリング誤差を抑制するための方法が必要になる。

また、注解法は、改通知法のエマルジョン生成という問題点を解決したが、ベンゼン抽出時に魚種により抽出液がゲル化するという新たな問題を発生させた。

タンパク質と塩、有機溶媒及び高分子と共存させた環境では、pH・イオン強度・濃度を少し変えるだけで溶解と凝集の正反対の効果を生むことが知られている⁹⁾。また、このベンゼン抽出液のゲル化は、分析精度に影響する可能性があり、実際に標準認証試料の測定値において、改通知法で103%に対しゲル化した注解法で130%の値を示した。ゲル化は、結晶化と同様水素結合やファンデルワールス力等の非共有結合的相互作用による現象で、ベンゼンがゲル化すると液状のまま残ったベンゼン中のメチル水銀濃度は相対的に濃縮されることになる。

また、抽出に用いるベンゼンは、発がん性があり大変厳しい排水基準が設定されている。抽出溶媒の変更を試みた報告例もあり、今後の課題としてあらゆる魚種に対応でき、より安全に作業が出来るメチル水銀試験法を確立していく必要がある。

5 まとめ

厚生労働省の魚介類中のメチル水銀試験法は、強固なエマルジョンを生成するという操作上の問題を抱えている。今回そのエマルジョン生成の要因を探り、対応策を検討した。

注解法は、改通知法で見られたエマルジョン生成が無く、有効な対応策であった。しかし、ベンゼン抽出液が魚種によりゲル化するという新たな問題が生じた。

サンプリング誤差に留意しながら試料量を抑制し、改

通知法で抽出することが最も簡便で実際的な方法といえる。

6 文献

- (1) 環乳第 99 号通知：魚介類の水銀の暫定的規制値について、昭和 48 年 7 月 23 日
- (2) 中尾好絵・並河幹夫他：魚介類中の PCB・水銀含有量実態調査、第 55 回近畿公衆衛生学会口演・示説要旨集、130、2016。
- (3) 柿本幸子他：国産・輸入魚介類中の総水銀実態調査（平成 20 年-平成 26 年）、大阪府立公衛研所報、53、31-35、2015。
- (4) 松木司他：魚介類中のメチル水銀及び総水銀分析法の検証、広島市衛研年報、35、39-44、2016。
- (5) 板野一臣：海産魚介類等に含まれる水銀とそのリスク評価、生活衛生、51(2)、57-65、2007。
- (6) 日本薬学会：衛生試験法注解 2015、501-503、2015。
- (7) 米谷民雄：メチル水銀試験法の改良と魚肉中水銀分布調査への応用、厚労科研分担研究、31-36、2006。
- (8) 吉村悦郎他：生物試料を中心とした水銀測定技術、地球環境、13(2)、219-225、2008。
- (9) 吉澤俊祐：タンパク質の凝集剤としての塩・有機溶媒・高分子、生物工学会誌、93(5)、260-263、2015。

液体クロマトグラフィーによる繊維製品中のホルムアルデヒドDNPH誘導体化分析法の検討
Analytical Method for the Determination of 2,4-dinitrophenylhydrazine Derivative of
Formaldehyde in Textile Products by Liquid Chromatography

伴 創一郎*, 橋本 健司**, 藪下 小雪**

Soichiro BAN, Kenji HASHIMOTO, Koyuki YABUSHITA

Abstract

We have developed the analytical method for the determination of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of formaldehyde in textile products by liquid chromatography.

Formaldehyde in textile products was extracted with distilled water and derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine in acidic condition(pH3). 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of formaldehyde was analysed by liquid chromatography ultraviolet adsorption detector(LC/UV) and tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

The validation of the analytical method was conducted with textile products. The accuracy repeatability obtained by the recovery tests satisfied the criteria in the guideline by the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. The data proved that the analytical method developed in this study is valid for the analysis of formaldehyde in textile products.

Key words

Formaldehyde/ホルムアルデヒド, textile products/繊維製品, derivatization/誘導体化
dinitrophenylhydrazine/ジニトロフェニルヒドラジン, LC/UV, LC/MS/MS

1 はじめに

ホルムアルデヒドは、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」¹⁾により規制されている。繊維製品のうち生後24か月以内の乳幼児用製品では所定の方法で吸光度差0.05以下又は溶出量16µg/g以下、乳幼児用以外及び接着剤では75µg/g以下という基準が設定されている。当研究所では、京都市内の量販店等にて年間600検体の対象繊維製品及び接着剤を試買し検査を行っている。

繊維製品のホルムアルデヒドの試験法として公定法では、試料から抽出したホルムアルデヒドをアセチルアセトンと反応させ、生成した誘導体化物の吸光度を分光光度計で測定して定量する方法が示されている。

現在、当研究所では公定法と同様に発色させ、多検体を同時に測定可能なマイクロプレートリーダーで測定する方法を採用しており、公定法と同等の結果が得られることを確認している²⁾。

アセチルアセトン法の問題点として発色の安定性が悪い点があり、多数の検体を処理した場合、測定の最初と最後では測定結果に違いがある場合がある。

一方2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(以下DNPHという)を用いてアルデヒド類を誘導体化し(図1)、HPLCで測定する

方法は室内環境測定や環境大気測定に用いられ、発色後の安定性が高いことが報告されている。また、繊維製品のホルムアルデヒドを精製水で抽出後、DNPHで誘導体化し、酢酸エチルで抽出後HPLCで分析する方法が千葉市から報告されている³⁾。

平成28年3月30日に水道水中のホルムアルデヒド試験法が厚生労働省から告示された(厚生労働省告示第百十五号「別表十九の二又は別表十九の三」)⁴⁾。本告示法では水中のホルムアルデヒドをリン酸酸性下でDNPH誘導体化した液を、直接HPLC/UVおよびLC/MS/MSで分析する方法が採用されている。

今回、繊維製品のホルムアルデヒド分析法として水道水中の試験法と同様の原理で抽出液中の遊離ホルムアルデヒドをDNPH誘導体化してHPLC/UV及びLC/MS/MSで測定する方法(以下「DNPH誘導体化法」という。)を検討し試験法の妥当性を評価したので報告する。



図1 アルデヒド類のDNPH誘導体化反応

*環境部門 **生活衛生部門

2 方法

(1) 試料

平成 28 年度に家庭用品試買検査の検体として試買した繊維製品を試料とした。

(2) 標準品及び試薬

ア ホルムアルデヒド標準品：ホルムアルデヒド液(ナカライテスク製試薬特級)を、公定法に従って標定し、40,000µg/mL 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 アセトニトリル：関東化学製 HPLC 用

ウ 0.2%DNPH 溶液：DNPH(和光純薬製 試薬特級)0.2g をアセトニトリルに溶かして 100mL としたものを。

エ 20%リン酸：リン酸 20mL(ナカライテスク製試薬特級)を精製水に溶かして 100mL としたものを。

(3) 試験溶液の調製法

試験溶液の調製は図 2 に示す方法で行った。繊維製品試料 2.5g を共栓三角フラスコに量りとり、公定法に従い、精製水 100mL を加えてよく攪拌後、40°C の温浴中で 1 時間加熱し、G2 ガラスフィルターで温時ろ過して試料抽出液とした。

試料抽出液を 10mL 分取し、20%リン酸 200µL 及び 0.2% DNPH 溶液 500µL を加えて混合した。室温で 20 分静置後 0.45µm のメンブレンフィルターでろ過し、試験溶液とした。

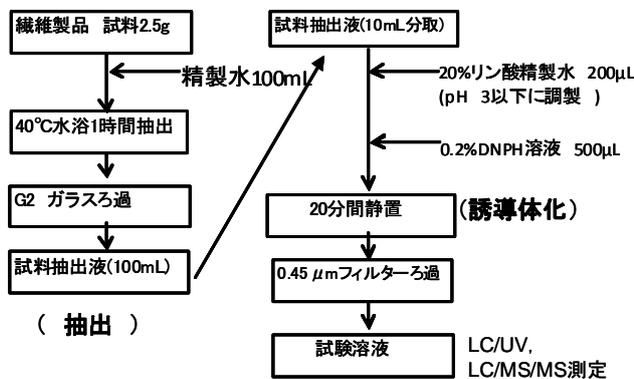


図 2 試験溶液の調整

(4) 検量線の作成

測定条件の検討の結果、LC/MS/MS 測定においては 0.2mg/L 以上の範囲の濃度では検量線の傾きが小さくなる傾向が見られた(図 3)。0.1mg/L 以下の範囲では相関係数 0.99 以上となり良好な直線性を示した。そのため、検量線の濃度範囲を、0.004mg/L-0.1mg/L とした。ホルムアルデヒド標準原液を精製水で希釈し、0.004, 0.01, 0.02, 0.04, 0.1mg/L を調製し検量線標準液とした。また精製水を分取し検量線標準液のブランクとした。調製した検量線標準液を各々 10mL

分取し、20%リン酸 200µL 及び 0.2%DNPH 溶液 500µL を加え「(3)試験溶液の調製」と同様の操作を行い検量線を作成した。

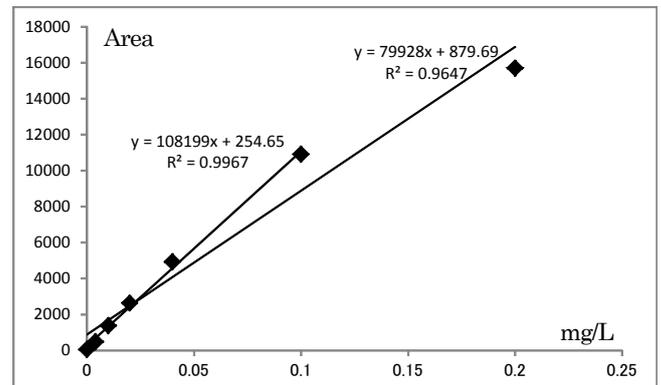


図 3 ホルムアルデヒド DNPH 検量線 (LC/MS/MS 測定)

(5) 測定条件

HPLC/UV と LC/MS/MS の測定条件を表 1, 表 2 に示す。

表 1 HPLC/UV 測定条件

Instrument	shimadzu LC10 (binary pump), shimadzu SPD-10A(detector)
Column	InertSustain C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm, GLscience)
Mobile phase	Water/Acetonitrile = 50/50
Injection volume	20µL
Column temp	40°C
Flow rate	1.0 mL/min
UV	360 nm

表 2 LC/MS/MS 測定条件

LC conditions	
Instrument	Waters 1525 µ (binary pump), 2777C(autosampler)
Column	Shim-Pak FC-ODS (2.0 × 150 mm, 3 µm, shimadzu)
Mobile phase	Water/Acetonitrile = 50/50
Injection volume	5µL
Column temp	40°C
Flow rate	0.2mL/min
MS conditions	
Instrument	Waters TQD
Ionization mode	ESI negative
Capillary voltage	3.00 kV
Cone voltage	20 V
Desolvation Temperature	350 °C
Desolvation gas	650 L/h
Cone gas	50 L/h
Column temp	40°C
MRM Target	Formaldehyde(m/z 208.8→163.0 ,Cone 20V ,CE 15 eV)
MRM Qualifier	Formaldehyde(m/z 208.8→151.0 ,Cone 20V ,CE 10 eV)

(6) 妥当性評価

繊維製品(おしめ)2.5g にホルムアルデヒド標準品を乳幼児用製品の基準値に相当する添加濃度 16µg/g となるように添加(添加量 40µg)して添加回収試験を実施した。試験溶液のホルムアルデヒド濃度が「(4)検量線の作成」で作成した検量線の範囲に入るように、試料抽出液を 10 倍希釈してから誘導体化反応を行った。分析者 1 名が 1 日に 2 回繰り返す実験(n=2)を 5 日間実施して得られたデータをもとに、真度、併行精度及び室内精度を算出して試験法の妥当性の評価を行った。

添加回収試験で得られた試験溶液を LC/UV および LC/MS/MS で測定したクロマトグラムを図4に示す。

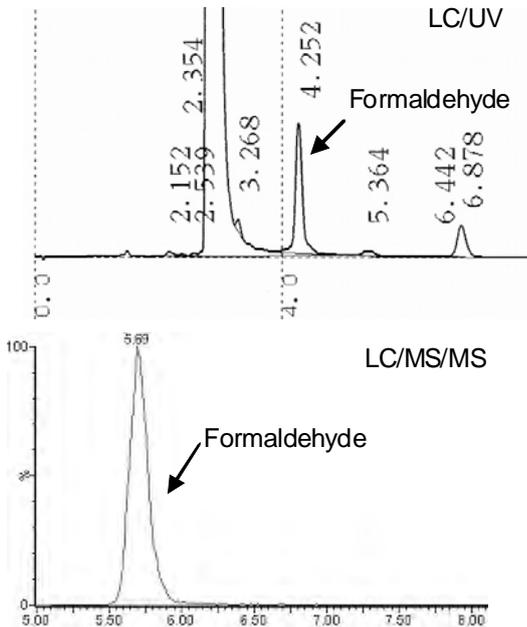


図4 繊維製品試験溶液のLC/UVおよびLC/MS/MSクロマトグラム

3 結果及び考察

(1) 妥当性評価の結果

妥当性評価試験の結果を表3に示す。結果の算出にあたっては各サンプルのピーク面積からブランク試験のピーク面積を差し引いた後「(4)検量線の作成」で得られた検量線を用いて試験試料中の濃度を求めた。LC/MS/MS 測定 LC/UV 測定ともに、真度 70%~120%, 併行精度 15%以下, 室内精度 20%以下であり妥当性評価ガイドライン⁵⁾の基準を満たしており, DNP_H 誘導体化法は, 繊維製品中のホルムアルデヒド分析法として妥当であると評価できる。

表3 妥当性評価結果(添加濃度 16 μg/g)

Formaldehyde	真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
LC/MS/MS測定	96.29	2.62	2.88
LC/UV測定	109.69	5.85	7.92

(2) 装置検出下限値(IDL)及び装置定量下限(IQL)の算出

環境省の化学物質環境実態調査実施の手引き(平成20年度版)⁶⁾を参考に装置検出下限値(IDL)及び装置定量下限(IQL)を算出した。ホルムアルデヒド DNP_H 標準溶液の検量線用標準溶液 4 ng/mL を繰り返し 7 回, LC/UV 及び LC/MS/MS で測定し, 得られた測定値の標準偏差から算出した。結果を表4に示す。LC/UV, LC/MS/MS いずれの IQL 試料換算値(μg/g)も, 乳幼児用製品の基準値(16μg/g)の 1/200 より小さい値となった。DNP_H 誘導体化法の検出感度は, 行政検査実施に必要な値を満たしており, 高感度分析が可能であった。

表4 IDL及びIQLの算出

Compounds	LC/UV	LC/MS/MS
	Formaldehyde	Formaldehyde
試料量(g)	2.5	2.5
試験液量 (mL)	100	100
注入濃度 (ng/mL)	4	4
装置注入量 (μL)	20	5
結果1 (ng/mL)	3.80	3.94
結果2 (ng/mL)	4.02	3.86
結果3 (ng/mL)	3.78	4.04
結果4 (ng/mL)	3.78	4.29
結果5 (ng/mL)	3.97	4.27
結果6 (ng/mL)	3.90	4.25
結果7 (ng/mL)	3.88	4.34
平均値 (ng/mL)	3.88	4.14
標準偏差	0.0951	0.190
IDL (ng/mL)	0.369	0.738
IDL 試料換算値 (μg/g)	0.0148	0.0295
IQL (ng/mL)	0.951	1.90
IQL 試料換算値 (μg/g)	0.0380	0.0759

※ IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$, IQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

(3) ホルムアルデヒド DNP_H 標準溶液の面積値の経時変化

DNP_H で誘導体化したホルムアルデヒド標準溶液の誘導体化反応当日のピーク面積と, 7 日間経過後のピーク面積を比較し, DNP_H 誘導体の安定性を評価した。(図5,図6) 7 日間経過後に LC/UV 測定では平均 5.9%, LC/MS/MS 測定では平均 4.4%, ピーク面積が減少していた。面積がゆるやかに減少する傾向が見られたため, 誘導体反応後はできるだけ速やかに測定することが望ましいと考えられる。

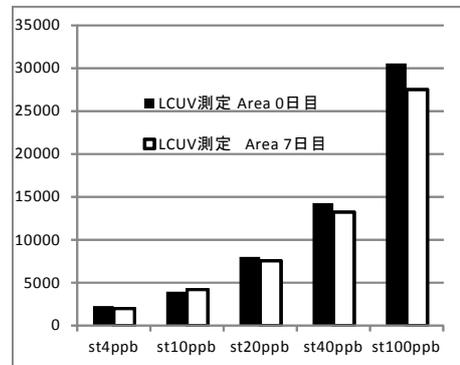


図5 LC/UV 測定における formaldehydeDNP 標準溶液の面積値の経時変化

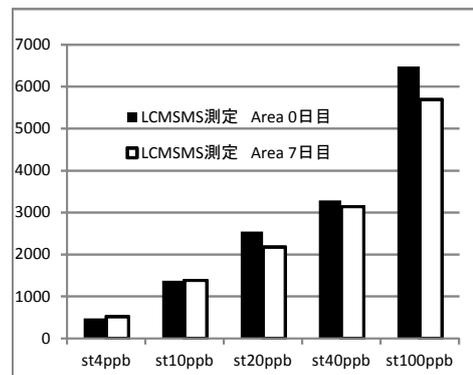


図6 LC/MS/MS 測定における formaldehydeDNP 標準溶液の面積値の経時変化

(4) 従来法(アセチルアセトン発色法)との結果比較

平成28年度に試買した12検体についてアセチルアセトンで発色させ、マイクロプレートリーダーで測定する当研究所の従来法で測定した結果と、今回検討したDNPH誘導体化法で前処理しLC/UV、LC/MS/MSで測定した結果を比較した。(図7,図8)

相関係数は0.9以上となり良好な相関を示した。測定値はLC/MS/MS測定,LC/UV測定ともにアセチルアセトン法に比べて約1.1倍となり、やや高めめの値となる傾向が見られた。

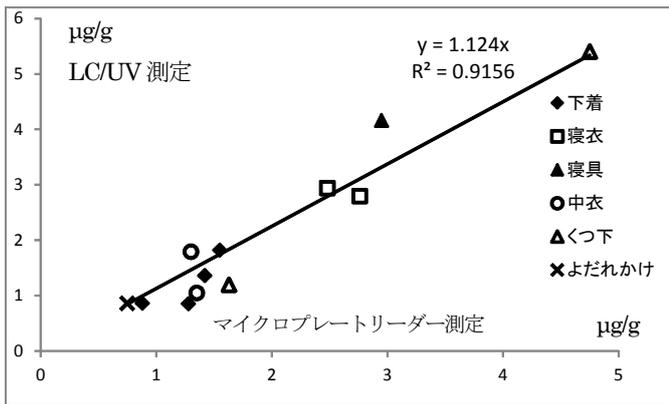


図7 従来法(アセチルアセトン発色法)との測定結果比較 (LC/UV測定)

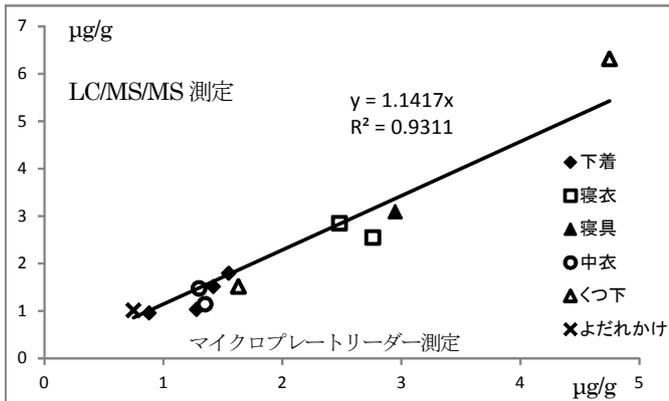


図8 従来法(アセチルアセトン発色法)との測定結果比較 (LC/MS/MS測定)

4 まとめ

繊維製品中のホルムアルデヒドをDNPHで誘導体化して、LC/UV、LC/MS/MSで測定する分析法を検討し妥当性評価を行った。結果は、真度、併行精度、室内精度ともにガイドラインの目標に適合し、分析法として使用可能と考えられた。

検討したDNPH誘導体化法は、検出感度や選択性も良好であるため、基準違反時の確認試験としても使用可能であると考えられた。

5 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), 昭和48年10月12日
- 2) 中川和子他: 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, 京都市衛生環境研究所年報, 78, 92-98, 2012.
- 3) 山口玲子他: 繊維製品でのホルムアルデヒド分析法の検討(DNPH誘導体化法について), 千葉市環境保健研究所年報, 18, 63-65, 2011.
- 4) 平成15年厚生労働省告示第261号: 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法, 別表19の2及び別表19の3
- 5) 食安発第115001号: 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン, 平成19年11月15日
- 6) 環境省環境保健部環境安全課: 平成20年度版 化学物質環境実態調査実施の手引き, 111-125, 平成21年3月

環境大気中のホルムアルデヒド、アセトアルデヒドのLC/MS/MSによる分析条件の検討

Development of Analytical Method for the Determination of Formaldehyde and Acetaldehyde in Ambient Air by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

伴 創一郎*

Soichiro BAN

Abstract

We have developed the analytical method for the determination of formaldehyde and acetaldehyde in ambient air by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

The MRM condition of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of formaldehyde and acetaldehyde were optimized. The recovery study was conducted with DNPH cartridges. The average recovery rates of formaldehyde and acetaldehyde was 113.8% ,116.1% respectively. The RSD of formaldehyde and acetaldehyde was 2.8%,2.6% respectively.

The IDL of formaldehyde and acetaldehyde was 0.0281 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,0.0363 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. The IQL of formaldehyde and acetaldehyde was 0.0724 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 0.0933 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectively. The MDL of formaldehyde and acetaldehyde was 0.0400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 0.0438 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. The MQL of formaldehyde and acetaldehyde was 0.103 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,0.113 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectively.

Quantitative values by LC/MS/MS were approximately 1.1 times higher than those by LC/UV.

The data proved that the analytical method developed in this study is valid for the analysis of formaldehyde and acetaldehyde in ambient air.

Key words

Formaldehyde/ホルムアルデヒド, acetaldehyde/アセトアルデヒド, ambient air/環境大気
dinitrophenylhydrazine/ジニトロフェニルヒドラジン, LC/MS/MS

1 はじめに

ホルムアルデヒドは接着剤, 塗料, 防腐剤等の成分であり, アセトアルデヒドは, 合成樹脂, 合成ゴム等の化学製品の合成原料として広く用いられている。大気中のアルデヒド類の濃度は自動車等の一次発生源に加えて, 光化学反応による二次生成が寄与している。ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドは毒性が強いいため, 大気汚染防止法により有害大気汚染物質の優先取組物質に指定されている。

京都市では, ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドについて毎月1回市内3か所(北区役所, 自排大宮局, 自排山科局)で「有害大気汚染物質測定方法マニュアル」¹⁾に従い, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)捕集カートリッジを用いて大気中のアルデヒド類を誘導体化(図1)してLC/UVで分析を行っている。

今回, 大気中のホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドについて当研究所で導入されているLC/MS/MSのMRMモードで分析する方法を検討した。「測定マニュアル」にはSIMモード(MS)の分析条件は記載されているがMRMモード(MS/MS)

の分析条件は記載されていない。MRMはSIMに比べて選択性が高く高感度分析が期待できることから, 今回, ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドDNPH誘導体のMRM分析条件(プリカーサーイオン, Cone電圧, プロダクトイオン, CollisionEnergy)の最適な条件の検討を行った。

作成したMRM分析条件を用いて, 24時間大気を捕集する添加回収試験を実施し分析法の妥当性を評価した。また, 検量線の最低濃度の繰り返し測定を行い, 装置の検出下限(IDL), 装置の定量下限(IQL)を算出した。また, 操作ブランク試料の前処理を繰り返し実施し, 測定値の標準偏差より分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)を算出した。

また, 有害大気汚染物質モニタリングで毎月LC/UVで測定しているサンプルを, MRM分析条件で測定し, LC/UVによる測定結果と比較したので報告する。



図1 アルデヒド類のDNPH誘導体化反応

*環境部門

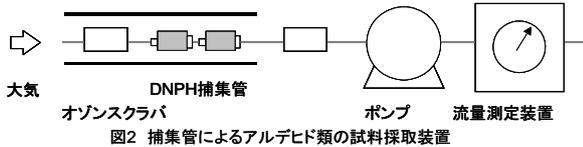
2 方法

(1) 試料

- ア ホルムアルデヒド-2,4-DNPH 誘導体標準品
東京化成 F0323
- イ アセトアルデヒド-2,4-DNPH 誘導体標準品
東京化成 A1271
- ウ ホルムアルデヒド標準品：ナカライテスク製試薬特級を、
家庭用品公定法に従って標定したものを標準原液とした。
- エ アセトアルデヒド標準品：SigmaAldrich 110078
- オ DNPH カートリッジ：InertSepminiAeroDNPH300mg
GLサイエンス
- カ オゾンスクラパー：InertSepminiAeroOzoneScrubber
1.5g GLサイエンス

(2) 試験溶液の調製

図2のようにオゾンスクラパー、DNPH 捕集管 2本、ポンプ、ガスメータを接続し、100mL/minの流量で大気を24時間採取した。採取終了後のDNPH 捕集管にアセトニトリル5mLを入れたシリンジを接続し1mL/minの流速で5mLメスフラスコに溶出し、5mLにメスアップしたものを試験溶液とした。



3 結果及び考察

(1) LC/MS/MS 分析条件(MRM モード)の検討

ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの DNPH 誘導体の標準溶液を用いて MRM 分析条件の検討を行った。プリカーサーイオンと Cone 電圧を決定するために MS1scan を行った結果、ESI 負イオンモードで正モードより多くのイオンが検出された。プリカーサーイオンとしてホルムアルデヒド DNPH は 208.8(m/z)、アセトアルデヒド DNPH は 222.9(m/z) を選択した。Cone 電圧は 20V でイオン強度が強かった。次に DaughterScan を行い、プロダクトイオンと CollisionEnergy (CE) を決定した。プリカーサーイオン 208.8(m/z)のプロダクトイオンとして 46,163,151,181(m/z)、222.9(m/z)のプロダクトイオンとして 46,163,151,122(m/z) のイオン強度が強かった。それぞれのプロダクトイオンについて最大となる CE を選択し MRM 分析条件を作成した。未反応の DNPH がイオン源を汚染するのを防止するために、DNPH ピークが溶出する時間(~5分)はイオン源に移動相が導入されないように LC のスイッチングバルブを設定した。表 1 に、LC 条件、今回作成した MRM 分析条件、図 3 に MRM による標準溶液のクロマトグラムを示す。表 2 に現在、

有害大気汚染物質モニタリングで使用している LC/UV の分析条件を示す。

表 1 LC/MS/MS 測定条件

LC conditions	
Instrument	Waters 1525 μ (binary pump), 2777C(autosampler)
Column	Shim-Pak FC-ODS(2.0 × 150 mm, 3 μm, shimadzu)
Mobile phase	Water/Acetonitrile=50/50
Injection volume	5μL
Column temp	40°C
Flow rate	0.2mL/min
MS conditions	
Instrument	Waters TQD
Ionization mode	ESI negative
Capillary voltage	3.00 kV
Cone voltage	20 V
Desolvation Temperature	350 °C
Desolvation gas	650 L/h
Cone gas	50 L/h
Column temp	40°C
MRM Target	FormaldehydeDNPH (m/z 208.8→163.0 ,Cone 20V ,CE 15 eV)
MRM Qualifier	FormaldehydeDNPH (m/z 208.8→151.0 ,Cone 20V ,CE 10 eV)
MRM Target	AcetaldehydeDNPH (m/z 222.9→163.0 ,Cone 20V ,CE 25 eV)
MRM Qualifier	AcetaldehydeDNPH (m/z 222.9→151.0 ,Cone 20V ,CE 10 eV)

表 2 LC/UV 測定条件

LC/UV conditions	
Instrument	shimadzu LC10 (binary pump), shimadzu SPD-10A(detector)
Column	InertSustain C18(4.6 × 150 mm, 5 μm, GLscience)
Mobile phase	Water/Acetonitrile=50/50
Injection volume	20μL
Column temp	40°C
Flow rate	1.0 mL/min
UV	360 nm

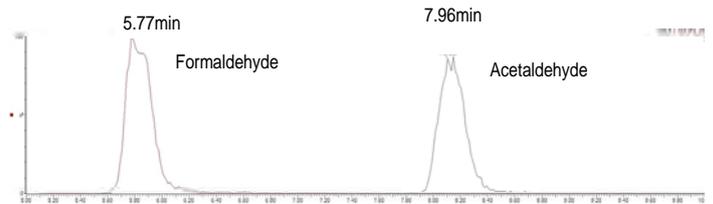


図3 LC/MS/MSによるFormaldehydeおよびAcetaldehydeDNPH誘導体クロマトグラム

(2) 検量線の作成

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの DNPH 誘導体の混合標準溶液を(0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1,0.2mg/L)の濃度範囲で作成し、LC/MS/MS で測定して検量線を作成した。図 4 にホルムアルデヒド DNPH の検量線を、図 5 にアセトアルデヒド DNPH の検量線を示す。ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド共に 0.2mg/L 以上の範囲の濃度では検量線の傾きが小さくなる傾向が見られた。0.1mg/L 以下の範囲では相関係数 0.99 以上となり良好な直線性を示した。そのため LC/MS/MS 測定で未知試料の定量にあたっては 0.1mg/L 以下の濃度範囲に入るように試料を希釈して測定することとした。

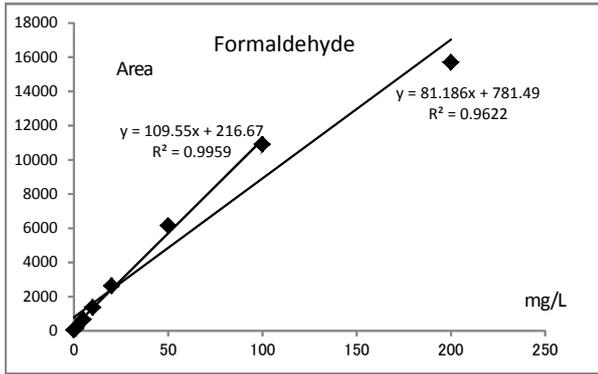


図4 ホルムアルデヒド DNP-H 検量線(LC/MS/MS測定)

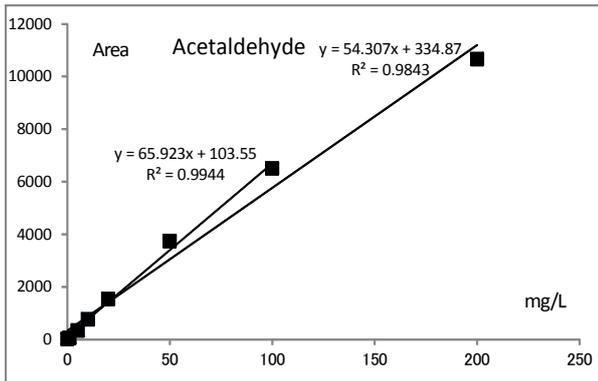


図5 アセトアルデヒド DNP-H 検量線(LC/MS/MS測定)

(3) 添加回収試験

誘導体化されていないホルムアルデヒド、アセトアルデヒド混合標準溶液を作成し、混合標準溶液 40 μ g/mL を 50 μ L DNP-H 捕集管に添加して「(2)試験溶液の調製法」に従って 24 時間環境大気を吸引し分析を行った。環境大気中に含まれるアルデヒド類の影響を除去するため、オゾンスクラバーの上流に別の DNP-H 捕集管を取り付け通気して捕集を行った。(n=4x2 回)分析値と添加量から添加回収率と併行精度を求めた結果を表 3 に示す。回収率は 70~120% の範囲内、併行精度は 15% 以下となる結果が得られた。

表3 DNP-H捕集管への添加回収試験結果(LC/MS/MS測定)

Compounds	真度(%)	RSD(%)
Formaldehyde	113.83	2.82
Acetaldehyde	116.13	2.60

(4) 装置検出下限値(IDL)及び装置定量下限(IQL)の算出

環境省の化学物質環境実態調査実施の手引き(平成 20 年度版)²⁾を参考に装置検出下限値(IDL)及び装置定量下限(IQL)を算出した。

ホルムアルデヒド DNP-H 標準溶液、アセトアルデヒド DNP-H 標準溶液の検量線用標準溶液 5 ng/mL を繰り返し 7 回 LC/MS/MS で測定し、得られた測定値の標準偏差から算出した。結果を表 4 に示す。

表4 IDL 及び IQL の算出 (LC/MS/MS 測定)

Compounds	Formaldehyde	Acetaldehyde
捕集量 (L)	144	144
試験液量 (mL)	5	5
注入濃度 (ng/mL)	5	5
装置注入量 (μ L)	5	5
結果1 (ng/mL)	5.37	5.90
結果2 (ng/mL)	5.84	5.43
結果3 (ng/mL)	5.51	5.23
結果4 (ng/mL)	5.61	5.13
結果5 (ng/mL)	5.76	5.66
結果6 (ng/mL)	5.25	5.63
結果7 (ng/mL)	5.62	5.60
平均値 (ng/mL)	5.57	5.51
標準偏差	0.209	0.269
IDL (ng/mL)	0.810	1.044
IDL 試料換算値 (μ g/m ³)	0.0281	0.0363
IQL (ng/mL)	2.09	2.69
IQL 試料換算値 (μ g/m ³)	0.0724	0.0933

※ IDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$, IQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

(5) 分析法の検出下限値(MDL)及び装置定量下限(MQL)の算出
環境省の化学物質環境実態調査実施の手引き(平成 20 年度版)²⁾を参考に分析法の検出下限値(MDL)及び定量下限(MQL)を算出した。

試料捕集をしていない DNP-H 捕集管を用いて、試料の前処理を行う操作ブランク試験を 7 回繰り返し実施し、LC/MS/MS で測定し、得られた測定値の標準偏差から算出した。結果を表 5 に示す。LC/UV とほぼ同程度の値となった。DNP-H 捕集管に操作ブランク値が存在しており MDL, MQL はブランク値に依存するため検出器による差は出にくいと考えられる。

表5 MDL 及び MQL の算出 (LC/MS/MS 測定)

Compounds	Formaldehyde	Acetaldehyde
試験液量 (mL)	5	5
装置注入量 (μ L)	5	5
操作ブランク1 (μ g/m ³)	0.138	0.0926
操作ブランク2 (μ g/m ³)	0.151	0.0909
操作ブランク3 (μ g/m ³)	0.143	0.104
操作ブランク4 (μ g/m ³)	0.130	0.0972
操作ブランク5 (μ g/m ³)	0.136	0.106
操作ブランク6 (μ g/m ³)	0.156	0.105
操作ブランク7 (μ g/m ³)	0.129	0.124
平均値 (ng/mL)	0.140	0.103
標準偏差	0.0103	0.0113
MDL (μ g/m ³)	0.0400	0.0438
MQL (μ g/m ³)	0.103	0.113

※ MDL = $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$, MQL = $\sigma_{n-1} \times 10$

(6) モニタリング分析試料の LC/UV 分析との結果の比較

有害大気汚染物質モニタリングで市内 3 か所(北区役所, 自排大官局, 自排山科局)毎月 LC/UV で測定しているサンプル(2016 年 10 月測定~2017 年 7 月測定)を LC/MS/MS

で分析し、大気濃度($\mu\text{g}/\text{m}^3$)を算出した。(n=40)

LC/MS/MS による測定結果と LC/UV による測定結果との比較を行った。図6にホルムアルデヒドの測定結果、図7にアセトアルデヒドの測定結果を示す。

相関係数はホルムアルデヒド 0.97、アセトアルデヒド 0.95 となり良好な相関が得られた。測定値は LC/MS/MS 測定のほうが 1.1 倍～1.2 倍程度でやや高め値となる傾向が見られた。

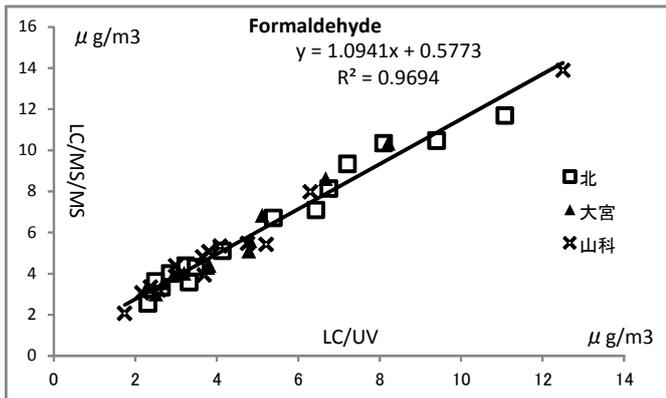


図6 有害汚染物質モニタリング試料の測定結果比較(ホルムアルデヒド)

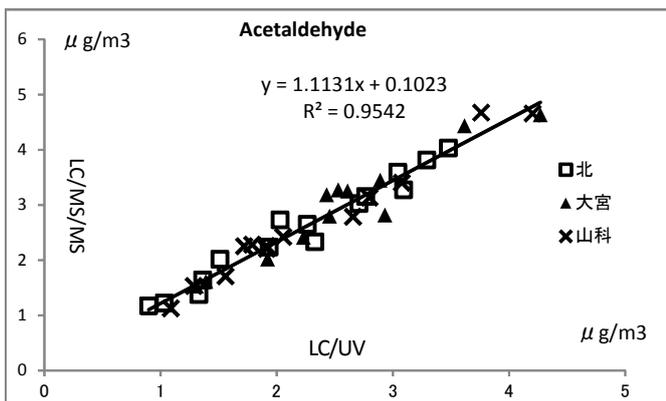


図7 有害汚染物質モニタリング試料の測定結果比較(アセトアルデヒド)

4 まとめ

大気中のホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドについて当研究所で導入されている LC/MS/MS の MRM モードで分析する方法を検討した。ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド DNPH 誘導体について、LC/MS/MS の MRM モードの分析条件を検討し最適化を行った。作成した分析条件で、検量線を作成した結果、標準溶液が $0.2\text{mg}/\text{L}$ 以上の高濃度になると検量線の傾きが小さくなり直線性が悪くなる傾向がみられた。 $0.1\text{mg}/\text{L}$ 以下の範囲であれば良好な直線性を示したため、未知試料の定量にあたってはこの範囲に試料を希釈することとした。作成した MRM による分析条件で、DNPH 捕集管への添加回収試験、IDL、IQL、MDL、MQL の算出、有害大気汚染物質モニタリング試料の LC/UV 測定結果との比較を行った結果、良好な結果が得られた。

5 文献

- 1) 環境省：有害大気汚染物質測定方法マニュアル 平成 23 年 3 月改訂版
- 2) 環境省環境保健部環境安全課：平成 20 年度版 化学物質環境実態調査実施の手引き、111-125、平成 21 年 3 月