

米中のカドミウム測定における簡易迅速分析法の妥当性評価

橋本 健司, 西村仁志

Validation of simplified and rapid analyzing Method for Cadmium in rice

Kenji HASHIMOTO, Hitoshi NISHIMURA

Abstract

We conducted a validation of simplified and rapid analyzing Method for Cadmium in rice. In this method, we extracted cadmium in rice with hydrochloric acid and analyzed the extract with an Atomic Absorption Spectrophotometer. Evaluation was carried out according to "Guidelines for a validation of Test Methods for harmful substances in Food" presented by the Ministry of Health, Labor and Welfare. Samples used were the certified standards and rice with cadmium added by the Hatano research institute, an organization that conducts proficiency testing of laboratories. As a result, it was judged that the test method conforms to the judgment of the adequacy of the regulation value of the Food Sanitation Law.

Key Words

カドミウム cadmium, 米 rice, 塩酸抽出 Hydrochloric Acid Extraction Procedure
原子吸光光度計 Atomic Absorption Spectrophotometer

[はじめに]

米中のカドミウムについては食品衛生法第11条第1項の規定に基づき、穀類及び豆類の成分規格のうち、米に含有されるカドミウム及びその化合物にあっては、「玄米及び精米中にCdとして0.4mg/kgを超えて含有するものであってはならない」とされている。京都市では京都市食品衛生監視指導計画に基づき、市内に流通する米中のカドミウム濃度の測定を毎年行っている。これまで当所では米中のカドミウム測定に、マイクロウェーブ分解装置を用いて試験溶液を調製し、ICP-AESで測定する方法（以下、従来法という。）を採用してきた。しかし、この方法は前処理に時間と労力を要するうえ、マイクロウェーブ分解装置は、同時に処理できる検体数に制限がある。さらに、硝酸を高温高压にして分解する際に、亜硝酸ガスが発生するため、検査者の労働環境と安全衛生面におけるリスクが憂慮される。

一方、米からカドミウムを抽出し、試験溶液を作成する方法として塩酸抽出法²⁻⁴⁾が報告されている。本法は、塩酸により振とう抽出した後、キレートカートリッジにより脱塩濃縮する方法で、簡

便かつ迅速な試料溶液の調製を行うことができる。今回、玄米及び精米中のカドミウムについて、塩酸抽出後にフレイム原子吸光光度法で測定する方法について検討した。また、報告されている方法の検討に加えて、分析時間の短縮を目的に振とう時間の検討を行った。ここで検討した方法について、食品中の有害物質等に関する分析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。）に従って妥当性評価を行ったので報告する。

[方法]

(1) 試料

当所が毎年実施している食品衛生外部精度管理の際に一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所から配布された玄米粉末試料（2018年度）及び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から入手した玄米粉末認証標準物質 NMIJ CRM 7531-a を試料とした。

(2) 試薬及び試験器具

標準原液：原子吸光分析用カドミウム標準液（関東化学，1000mg/L）

塩酸：有害金属測定用（ナカライテスク）

硝酸：有害金属測定用 1.38 (ナカライテスク)

酢酸アンモニウム：試薬特級 (純正化学)

ブロムフェノールブルー：特級 (ナカライテスク)

キレートカートリッジ：Inertsep mini ME-1 (280mg, ジーエルサイエンス)

(3) 装置

偏光ゼーマン原子吸光光度計 (フレーム機)：ZA-3300 (日立ハイテクサイエンス)

振とう機：小型シェーカー MW-S (宮本理研)

遠心分離機：H-9R (コクサン)

(4) 試験溶液の調製

試料 2.0g を PP 製 50mL 遠沈管に正確に採取し、1mol/L 塩酸 20mL を加え、振とう機を用いて室温で 15、30 及び 60 分間抽出した。得られた抽出液を残渣ごと桐山ロートを用いて吸引ろ過した。このろ液を酢酸アンモニウム緩衝液 (148g/100mL 水) で pH5.6 付近に調整し、全量をキレートカートリッジに負荷し、100mmol/L 酢酸アンモニウム及び水で洗浄した後、3mol/L 硝酸 5mL+5mL で溶出したものを試験溶液とした。(図 1)

(5) 原子吸光光度計の分析条件

調製した試験溶液を表 1 の分析条件でフレーム原子吸光光度計により測定し、試験溶液中のカドミウム濃度を求めた。

表 1 原子吸光光度計の分析条件

バックグラウンド補正：ゼーマン法
測定波長：228.8nm
スリット幅：1.3nm
原子化装置：標準バーナ
フレームの種類：空気-アセチレン
燃料ガス流量：1.8L/min
助燃ガス圧力：160kPa
助燃ガス流量：15.0L/min

(6) 検量線



図 1 試験溶液調整フローチャート

1000mg/L 標準原液を硝酸 (1+99) で段階的に希釈し、検量線を調製した。濃度はそれぞれ 0, 10, 20, 40, 80, 120, 160 $\mu\text{g/L}$ である。

(7) 振とう時間の検討

抽出工程における振とう時間を 15, 30 及び 60 分それぞれで実施し、真度、併行精度及び室内精度を比較検討した。

(8) 妥当性評価

2018 年度外部精度管理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。各試料のカドミウム濃度は、外部精度管理試料が 0.370 $\mu\text{g/g}$ (理論値)、認証標準物質が 0.308 $\mu\text{g/g}$ (認証値、乾燥質量換算含水率約 5.1%) である。それぞれの試料について、真度、併行精度及び室内精度を算出した。

[結果及び考察]

各試料の結果を表 2 に示した。この結果、全ての振とう時間において目標値を満たすことを確認した。しかし、振とう時間 15 分では認証標準物質において真度が 94.2% であり、併行精度・室内精度がともに 5% を超えており、振とう時間 30 分及び 60 分と比較し、精度の低下が見込まれるため、振とう時間 30 分で SOP 化した。また併行精度及び室内精度について、外部精度管理試料ではすべての振とう時間で良好であったが、認証標準物質では振とう時間が短くなるほど、併行精度及び室内精度が悪くなる傾向が見られた。この差は、認証標準物質では生育過程で吸収されたカドミウムを含んでいるのに対して、外部精度管理試料はカドミウムが添加された試料であるために抽出効率に差が生じた可能性が考えられた。今後実試料を用いて検討を加えていく予定である。

本分析法では、従来法と比較すると、同時に処理を行うことができる検体数が増え、抽出に要する時間が短縮された。この検査法を採用し、より

迅速に結果を得ることで、食の安全・安心の確保に繋げていきたいと考える。

本報告は、平成31年3月8日に開催された第3回日本食品衛生学会近畿地区勉強会にて口頭発表したものを加筆修正したものである。

表2 妥当性評価結果

試料名 (振とう時間)	真度 (%)	精度 (RSD%)		目標値に対する適否
		併行精度	室内精度	
認証標準物質 (15分)	94.2	5.1	5.3	適
認証標準物質 (30分)	94.5	2.8	2.9	適
認証標準物質 (60分)	94.9	1.4	3.2	適
外部精度管理試料 (15分)	98.2	2.1	3.4	適
外部精度管理試料 (30分)	98.2	2.7	3.5	適
外部精度管理試料 (60分)	96.2	1.5	2.8	適
ガイドライン目標値	90~110	<15	<15	

[文献]

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発 1222 第 8 号：食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて，平成 26 年 12 月 22 日
- 2) 兵庫県健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告：3 号 (2012 年) p. 29-33
- 3) S. Akamatsu et. al. Food additives & contaminants: Part A, 29, 1696-1700 (2012)
- 4) 赤松ら 第 50 回全国衛生科学技術協議会年会講演集 p. 122-p. 123

HPLC法による特定悪臭物質アルデヒド類の分析条件の検討

Development of analytical method of aldehydes in offensive odor by HPLC

伴 創一郎

Soichiro BAN

Abstract

In Japan, Concentration of 7 aldehydes (acetaldehyde, propionaldehyde, n-butylaldehyde, Iso-butylaldehyde, valeraldehyde, iso-valeraldehyde) are regulated as offensive odor substances by offensive odor control law. The official measurement methods of aldehydes in offensive odor were revised in September 2018 by Ministry of Environment in Japan, HPLC method was newly added to the official measurement method of 7 regulated aldehydes. In this method, offensive odor air was collected in 50L sampler bag, then it was collected to 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) cartridges with sampler pump. Acetonitrile was used to elute the DNPH derivatives, eluted solutions were analyzed with HPLC. We examined the analytical condition of HPLC for 7 regulated aldehydes, but it was difficult to isolate the peak of n-butylaldehyde and iso-butylaldehyde in the reversed-phase system consisting of ODS-silica gel column and acetonitrile/water mixtures.

Peaks of n-butylaldehyde and iso-butylaldehyde were able to isolate in the reversed-phase condition consisting of C30 column and methanol /20mM Sodium acetate buffer mixtures. Validation study was conducted with HPLC method. Correlation coefficient values of calibration curve of 7 regulated aldehydes were over 0.999. The MDL of 7 regulated aldehydes ranged from 0.000078 to 0.000157ppm. The MQL of 7 regulated aldehydes ranged from 0.000213~0.000427ppm. The recovery of 7 regulated aldehydes through the analytical procedure tested in this study ranged from 66.83 to 115.59%. The data proved that the HPLC method tested in this study is valid for the analysis of 7 regulated aldehydes in offensive odor.

Key words

Aldehyde/アルデヒド, Offensive Odor/悪臭,

HPLC /高速液体クロマトグラフィ, dinitrophenylhydrazine/ジニトロフェニルヒドラジン

1 はじめに

京都市では、悪臭防止法に基づく規制基準の遵守状況を把握し、行政指導を行う資料とするため、特定悪臭物質の発生源周辺の測定を毎年、春期秋期に実施している。

特定悪臭物質のアルデヒド類については、アルデヒドを2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)液と反応させヒドラゾンとした後、熱イオン化検出器(FID)を装備したGCで分析する分析法とアルデヒド類をポーラスポリマービーズ捕集管に常温吸着した後GC/MSで分析する分析法の2種類の分析法が規定されてきた。京都市ではGC/MS法でアルデヒドを分析してきたが、手分析で捕集管への吸着と濃縮管への濃縮、加熱脱着操作を行うため操作が煩雑であり、分析に時間がかかる点、安定した結果を得るには操作の熟練を要するという問題点があった。

平成30年9月21日に、悪臭防止法施行規則第5条の特定悪臭物質の測定方法について定めた告示の一部が改正され、特定悪臭物質のうちアルデヒド類6物質(アセトアルデヒド、プロピ

オンアルデヒド、ノルマルブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、ノルマルバレールアルデヒド及びイソバレールアルデヒド)について新たな分析手法、高速液体クロマトグラフ法(HPLC法)が追加された。



図1 アルデヒド類のDNPH誘導体化反応

この方法は、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空気中のアルデヒド類を誘導体化(図1)してLC/UVで分析を行う方法であり、誘導体化反応の原理や前処理操作は有害大気汚染物質測定方法マニュアルに基づき実施している大気中のアルデヒド類(ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド)の分析法と共通であり、現行のGC/MS法に比べて前処理操作及び分析操作が簡便であるという利点を有する。

今回、告示に追加された高速液体クロマトグラフ法について、特定悪臭物質のアルデヒド6種にホルムアルデヒドを加えたアルデヒド類7種について分析条件の検討を行い、測定精度や検出感度の確認、実大気試料の測定を行ったので報告する。

2 実験方法

(1) 標準品および試薬

ア 標準品

Formaldehyde-2,4-DNPH, Acetaldehyde-2,4-DNPH
Propionaldehyde-2,4-DNPH, n-Butylaldehyde2,4-DNPH,
iso-Butylaldehyde-2,4-DNPH, n-Valeraldehyde2,4-DNPH
iso-Valraldehyde-2,4-DNPH の各標準品：東京化成製
Formaldehyde 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。
Acetaldehyde 標準品：SigmaAldrich 製
Propionaldehyde, n-Butylaldehyde, iso-Butylaldehyde,
n-Valeraldehyde, iso-Valeraldehyde の各標準品：
東京化成製

イ 試薬

DNPHcartridge: InertSepminiAeroDNPH300mg (GLscience)
OzoneScrubber: InertSepminiAeroOzoneScrubber1.5g (GLscience)

(2) 試料採取装置

ア 試料採取用バッグ

フレックサンプラーバッグ：近江オドエア製

イ 試料採取用ポンプ

フレックスポンプ DC1-NA 型(現場での試料採取用)
柴田科学：MPΣ300N II (DNPH 捕集管に試料採取用)

(3) 装置

HPLC 装置

ポンプ A：島津 LC-10AT

ポンプ B：島津 LC-10AT

カラムオープン：島津 CTO-10AC

オートサンプラー：島津 SIL-20AC

紫外分光光度検出器：島津 SPD-10AVp

検出波長：360nm

注入量：20μL

(4) 試料採取及び試験液の調製

ア アルデヒド DNPH 誘導体混合標準溶液の調製

測定対象としたアルデヒド類7種の DNPH 誘導体についてアセトニトリルで溶解して、標準原液 1000ppm を作成後、混合してアセトニトリルで希釈して混合標準溶液アルデヒド類 DNPH 誘導体7種混合液 10ppm を作成した。これをアセトニトリルで希釈し、標準列を作成した。

イ 添加回収用アルデヒド混合標準溶液

添加回収用に、誘導体化していないアルデヒド類7種の標準品を N,Nジメチルホルムアミドおよび超純水に溶解して約 800ppm のアルデヒド混合標準溶液を作成した。これを超純水で10倍希釈して添加回収用アルデヒド混合標準溶液とした。

ウ 試料の採取

試料を採取した試料採取用袋とオゾンスクラバ、DNPH 捕集管2本、採取用ポンプを図2のように接続し、1L/min の流量で大気を一定時間(15分～30分)採取した。

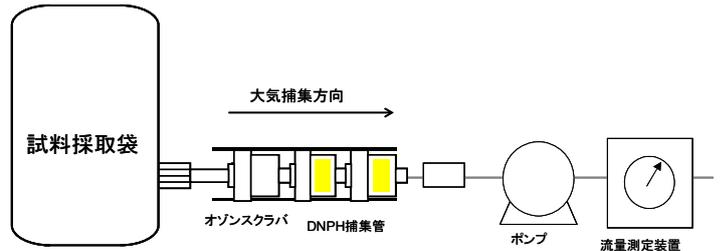


図2 DNPH 捕集管への試料の採取

エ 試験溶液の調製

採取終了後の DNPH 捕集管にアセトニトリル 5mL を入れたシリリングを接続し 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) 分析条件の検討

測定対象としたアルデヒド類7種の DNPH 誘導体標準の HPLC 分析条件を検討した。

はじめに、有機溶媒系移動相にアセトニトリルを使用し、分離カラムとして、ODS カラム (GLscience 製：Inertsil ODS-3 4.6mmx250mm) を使用する有害大気汚染物質のアルデヒド類の分析と同系統の分析条件 I (図3) で測定し、標準物質の分離を確認した。混合標準溶液 250ppb の測定結果を図3に示す。測定対象の7種のアルデヒド類の DNPH 誘導体うち、iso-ブチルアルデヒド DNPH と n-ブチルアルデヒド DNPH のピークが分離せず1本のピークとなった。

その後、有機溶媒の混合比率やグラジエント条件等を分析変更して、測定を繰り返し、分離の改善を試みたがいずれの条件でもブチルアルデヒド DNPH は分離しなかった。

ODS カラムでは、iso-ブチルアルデヒド DNPH と n-ブチルアルデヒド DNPH のピーク分離は困難であることが明らかになった。

そのため、5μm シリカゲルにトリアコンチル基 (C30) を化学結合させた充填剤を使用したカラム (和光純薬製：Wakopak Wakosil DNPH 4.6mmx250mm) を導入し、以後はこのカラムで iso-ブチルアルデヒドと n-ブチルアルデヒドのピークが分離する分析条件を検討することとした。

はじめに、水系移動相に超純水、有機溶媒系移動相にメタノールを用いてカラムの取扱説明書を参考に流速 0.6mL/min, カラム温度 37 度で分析する分析条件Ⅱ (図4) で測定し標準物質の分離を確認した。混合標準溶液 250ppb の測定結果を図4に示す。分析条件Ⅱでは、iso-ブチルアルデヒド DNPH と n-ブチルアルデヒド DNPH のピークが分離度 1.15 で分離した。(注:日本薬局方では分離度 1.5 でピークが完全に分離していることを示している。)

しかし、試料採取をしていない DNPH 捕集管について抽出操作を行い、得られた操作ブランクの試験液を分析条件Ⅱで分析したところ、クロマトグラムのベースラインの変動が大きくなり、アルデヒドのピーク幅も標準溶液分析時に比べてブロードになり広がった(図5)。そのため、分析条件Ⅱでは実試料の分析が困難であった。

そこで、水系移動相に塩(酢酸ナトリウム)を加え、流速を 1.0mL/min に変更した分析条件を検討したところベースラインの変動とピーク形状が改善し(図6)実試料の分析が可能となった。そのため、以降の検討では流速は 1.0mL/min とし水系移動相は 20mM 酢酸ナトリウム、有機溶媒系移動相はメタノールを使用することとした。

つぎに、有機溶媒混合比率、グラジエント条件を変更して iso-ブチルアルデヒド DNPH と n-ブチルアルデヒド DNPH のピーク分離の改善を試みた。その結果、35 分まで初期有機溶媒比率 65%を維持した分析条件Ⅲで混合標準溶液 250ppb を測定したところ、iso-ブチルアルデヒド DNPH と n-ブチルアルデヒドのピークの分離度が 1.475 となりほぼ完全分離した(図7)。

しかし、分析条件Ⅲでは n-バレルアルデヒド DNPH の保持時間が 51.416 分となり、分析時間が非常に長くなった。また分析条件Ⅲでは iso-ブチルアルデヒド DNPH ピークの理論段数が 17695、n-ブチルアルデヒド DNPH ピークの理論段数が 23385 となりピークがややブロードとなった。

そのため、ブチルアルデヒド DNPH の分離度と全体の分析時間のバランスがよいグラジエント条件を検討した。20 分まで初期有機溶媒比率 65%を維持した後、50 分まで直線的に 95%まで有機溶媒比率を上げる条件Ⅳで混合標準溶液 250ppb を測定したところ、iso-ブチルアルデヒド DNPH と n-ブチルアルデヒド DNPH のピークの分離度が 1.333 となった。(図8) iso-ブチルアルデヒド DNPH ピークの理論段数が 64024、n-ブチルアルデヒド DNPH ピークの理論段数が 79419 となり分離度はやや減少したがピーク形状は改善した。また n-バレルアルデヒドの保持時間が 41.921 分となり、分析時間が短縮した。

分離度と分析時間のバランスのよい分析条件Ⅳを最終的な分析条件とし以後の検討は表1の分析条件で行うこととした。

表1 悪臭アルデヒド類HPLC法 分析条件

Column	:Wakosil DNPH 4.6mmI.D.x250mm
EluentA	:20mM Sodium acetate Buffer
EluentB	:Methanol
0-20min	:B.conc 65%
20-50min	:B.conc 65-95%
50-60min	:B.conc 95%
60-65min	:B.conc 65%
Flowrate	:1.0mL/min
Oven	:37°C
Detection	:360nm

(2) 検量線の直線性の検討

測定対象としたアルデヒド類7種のDNPH誘導体の混合標準溶液を(4, 10, 25, 50, 250, 500ng/mL)の濃度範囲で作成し、HPLC/UVで測定して検量線を作成した。結果を図9に示す。測定対象としたアルデヒド類7種のDNPH誘導体すべてで4-500ng/mLの範囲で相関係数0.999以上の良好な直線性を示した。

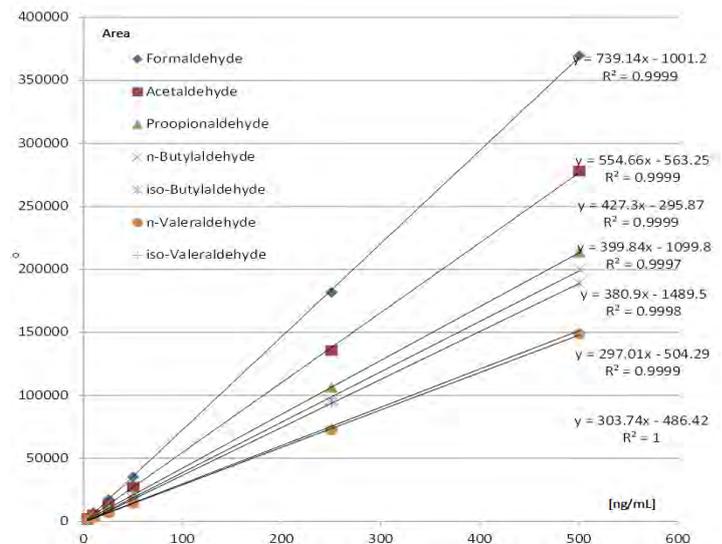


図9 4-500ng/mL AldehydeDNPH誘導体7種 検量線

(3) IDL(装置検出限界) IQL(装置定量限界)の算出

検量線の最低濃度4ng/mLの標準溶液を用いて7回の繰り返し分析を行い、装置検出限界(IDL)及び装置定量限界(IQL)の算出を行った。結果を表2に示す。なお、捕集量は30Lとして計算した。測定対象のアルデヒド類7種のIDLは、大気濃度に換算して、0.000044~0.000099ppmの範囲であった。IQLは、大気濃度に換算して、0.000119~0.000271ppmの範囲であった。IQLは悪臭防止法の敷地境界のA区域での敷地境界における規制基準の値の1/10より十分に小さい値であった。検討した分析装置は、悪臭防止法に基づくアルデヒド類の分析に十分な測定感度を有していると考えられる。

(4) MDL(分析法の検出限界)MQL(分析法の定量限界)の算出

操作ブランク試験として、試料採取をしていないDNPH捕集管カートリッジについて7回抽出操作を行い、得られた試験溶液の各アルデヒド類のブランク値(ng)を測定し、大気濃度(ppm)に換算し、MDL(分析法の検出限界)及びMQL(分析法の定量限界)を算出した。結果を表3に示す。

測定対象のアルデヒド類7種のMDLは、大気濃度に換算して、0.000078~0.000157 ppmの範囲であった。

測定対象のアルデヒド類7種のMQLは、大気濃度に換算して、0.000213~0.000427 ppmの範囲であった。MQLは悪臭防止法の規制地域での敷地境界における規制基準の値より小さい値であり、現行のGC/MSによるアルデヒド分析法の定量下限0.0005 ppmより小さい値である。今回検討したHPLCによるアルデヒド分析法は、悪臭防止法に基づくアルデヒド類の分析に十分な性能を有していると考えられた

表2 IDL及びIQLの算出

Compounds	Formaldehyde		Acetaldehyde		Propionaldehyde		iso-Butylaldehyde		n-Butylaldehyde		iso-Valeraldehyde		n-Valeraldehyde	
	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
捕集量 (L)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
試験液量 (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
注入濃度 (ng/mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
装置注入量 (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
結果1 (ng/mL)	4.59	4.79	5.50	4.60	6.06	5.10	5.85							
結果2 (ng/mL)	4.60	4.92	5.08	5.34	5.91	6.35	5.70							
結果3 (ng/mL)	4.75	5.06	5.33	5.49	5.57	6.34	6.47							
結果4 (ng/mL)	4.58	4.95	4.80	5.09	5.64	6.38	5.68							
結果5 (ng/mL)	4.76	5.16	4.71	5.67	5.71	6.34	5.98							
結果6 (ng/mL)	4.93	5.66	5.34	5.84	6.08	6.22	5.81							
結果7 (ng/mL)	4.91	5.10	4.96	5.41	5.63	6.31	5.91							
平均値 (ng/mL)	4.73	5.09	5.10	5.35	5.80	6.15	5.91							
標準偏差	0.149	0.278	0.298	0.408	0.214	0.464	0.268							
IDL (ng/mL)	0.545	1.021	1.091	1.496	0.786	1.701	0.982							
IDL試料換算値 (ppm)	0.000073	0.000093	0.000099	0.000083	0.000044	0.000079	0.000046							
IQL (ng/mL)	1.49	2.78	2.98	4.08	2.14	4.64	2.68							
IQL試料換算値 (ppm)	0.000198	0.000253	0.000271	0.000227	0.000119	0.000216	0.000125							

※ IDL = t(n-1, 0.05) × σ_{n-1} × 2, IQL = σ_{n-1} × 10

(5) 添加回収試験

測定対象のアルデヒド類7種の混合標準溶液を2(4)イの方法に従って作成し、混合標準溶液80μg/mLを10μL、窒素ガスを充填した試料採取袋(フレックスサンプラーバッグ)に添加して(※添加量各800ng)、2(2)試料の採取に従って、試料採取袋、DNPH捕集管、ポンプを接続し、試料採取袋中の試料大気を全量DNPH捕集管に捕集する添加回収試験を行った。添加したアルデヒド標準溶液を十分に気化させるため、標準溶液を添加後、試料採取袋をドライヤーで短時間加熱し、標準溶液を気化させてから試料の捕集を行った。

試料の捕集後、2(4)の試験溶液の調製に従って、DNPH捕集管を前処理し、調製した試験溶液をHPLC/UVで測定した。

結果を表4に示す。平均回収率は、66.83~115.59%の範囲でRSDは4.35~5.89%の範囲であった。検討した7種のアルデヒド類のうち分子量が小さく気化しやすいホルムアルデヒドの回収率は100%近くで良好であった。そのほかの化合物の回収率は70%前後であったが、分子量が大きく気化しにくいn-バレラルデヒドの回収率がやや低めの値(66.8%)であった。これは添加回収試験時の試料採取袋への標準液添加後の標準液の気化が不十分であったため、n-バレラルデヒドの回収率がやや低くなったと考えられる。当所で以前行った環境大気中のホルムアルデヒドとアセトアルデヒドの分析条件検討時にDNPHカートリッジに直接アルデヒド標準液を添加した場合には、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドともに110%前後の良好な回収率が得られた²⁾ことを考慮すると、今回の検討対象のアルデヒド類7種はDNPH捕集管に良好に回収されていたと考えられる。

表4 添加回収試験結果

Compounds	Formaldehyde		Acetaldehyde		Propionaldehyde		iso-Butylaldehyde		n-Butylaldehyde		iso-Valeraldehyde		n-Valeraldehyde	
	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
添加量 (ng)	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
平均回収率(%)	115.59	70.50	70.03	68.38	83.36	72.80	66.83							
RSD(%)	5.89	5.49	4.35	4.67	4.71	4.42	4.68							

表3 MDL及びMQLの算出

Compounds	Formaldehyde		Acetaldehyde		Propionaldehyde		iso-Butylaldehyde		n-Butylaldehyde		iso-Valeraldehyde		n-Valeraldehyde	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
試験液量 (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
装置注入量 (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
操作ブランク1 (ppm)	0.000425	0.000199	0.000749	0.000118	0.000294	0.000255	0.000343							
操作ブランク2 (ppm)	0.000349	0.000149	0.000783	0.000109	0.000350	0.000323	0.000336							
操作ブランク3 (ppm)	0.000393	0.000185	0.000829	0.000140	0.000352	0.000243	0.000309							
操作ブランク4 (ppm)	0.000412	0.000173	0.000820	0.000083	0.000310	0.000350	0.000330							
操作ブランク5 (ppm)	0.000342	0.000208	0.000794	0.000147	0.000321	0.000275	0.000307							
操作ブランク6 (ppm)	0.000432	0.000208	0.000823	0.000120	0.000388	0.000243	0.000279							
操作ブランク7 (ppm)	0.000456	0.000177	0.000876	0.000093	0.000324	0.000290	0.000288							
平均値 (ppm)	0.000401	0.000186	0.000811	0.000116	0.000334	0.000283	0.000313							
標準偏差	0.000043	0.000021	0.000040	0.000023	0.000031	0.000041	0.000024							
MDL (ppm)	0.000157	0.000078	0.000148	0.000085	0.000115	0.000151	0.000089							
MQL (ppm)	0.000427	0.000213	0.000404	0.000232	0.000314	0.000411	0.000242							

※ MDL = t(n-1, 0.05) × σ_{n-1} × 2, MQL = σ_{n-1} × 10

(6) 実大気試料の測定

令和元年5月27日～9月2日に実施した悪臭防止法に基づく発生源工場周辺の敷地境界の試験検査サンプルについて、今回検討したHPLC法で分析を実施し、GC/MS法による分析結果と比較した。京都市内の4箇所の工場・事業所について敷地境界の風上側BG地点、風下側A地点、風下側B地点の3地点で延べ5回サンプリングを行った。

結果を表5表6に示す。HPLC法による測定結果は、GC/MS法による測定結果に比べて高めの値となり、GC/MS法では検出下限以下であったプロピオンアルデヒドもHPLC法では検出下限以上の値で検出した。これは、GC/MS法の試験法がアルデヒドをポーラスポリマービーズに常温吸着して分析する試験法であるのに対して、HPLC法の試験法は、アルデヒドを2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応させて誘導体化してから分析する試験法であり、DNPH誘導化が鋭敏で収率が高い反応であるため、GC/MS法のポーラスポリマービーズ捕集管よりHPLC法のDNPH捕集管により多くのアルデヒドが捕集されたためであると考えられる。また、DNPH誘導体化法は、室内大気中に存在するアルデヒドや試薬溶液中に蓄積されたアルデヒドの影響を受けやすいため、これらのバックグラウンドのアルデヒド類が測定値に影響した可能性も考えられる。

チル基(C30)を化学結合させた充填剤を使用したアルデヒド分析専用カラム、水系移動相に20mM酢酸ナトリウム、有機溶媒系移動相にメタノールを使用する条件で測定対象のアルデヒド類7種のピークが分離し分析が可能となった。

アルデヒドDNPH誘導体7種について0.004ppm～0.5ppmの標準列を作成し測定した結果相関係数0.999以上の良好な直線性が得られた。IDLは、大気濃度に換算して0.000044～0.000099ppmの範囲でありIQLは、大気濃度に換算して、0.000119～0.000271ppmの範囲であった。

MDLは、大気濃度に換算して、0.000078～0.000157ppmの範囲であった。MQLは、大気濃度に換算して0.000213～0.000427ppmの範囲であった。

試料採取袋にアルデヒド類を添加する添加回収試験を実施したところ平均回収率は、66.83～115.59%の範囲であった。

今回、検討したHPLC法は検出感度、回収率ともに良好であり、従来のGC/MS法に比べて前処理操作、分析操作が簡便であり、オートサンプラーによる自動分析も可能であることから、悪臭防止法のアルデヒド類の分析方法として非常に有用であると考えられた。悪臭防止法に基づく試験検査の実大気サンプルについてHPLC法と従来のGC/MS法の両方で分析を実施した結果、HPLC法のほうが高めの定量値となった。

4 まとめ

平成30年9月21日に、施行された悪臭防止法のアルデヒドのHPLC分析法について、アルデヒド7物質のDNPH誘導体の分析条件を検討した結果、分析カラムにシリカゲルにトリアコン

5 文献

- 1) 「特定悪臭物質の測定の方法の一部を改正する告示」(平成30年9月環境省告示第78号)
- 2) 京都市衛生環境研究所年報No83 p99-102

表5 悪臭防止法に基づくアルデヒド類の測定結果 HPLC法 (単位ppm)

測定事業所	A			B			C			D			D		
測定日	2019/5/27			2019/6/17			2019/6/19			2019/6/24			2019/9/2		
測定地点	A	B	BG	A	B	BG									
Formaldehyde	0.028	0.014	0.016	0.0069	0.0081	0.0088	0.020	0.022	0.025	0.0056	0.0059	0.0088	0.0013	0.0093	0.0083
Acetaldehyde	0.0089	0.0079	0.0091	0.0040	0.0042	0.0041	0.012	0.011	0.013	0.0029	0.0040	0.0056	0.0073	0.0051	0.0046
Propionaldehyde	0.0042	0.0027	0.0027	0.0021	0.0026	0.0029	0.0043	0.0035	0.0037	0.0030	0.0034	0.0030	0.0027	0.0021	0.0020
iso- Butylaldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
n- Butylaldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0017	0.0023	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
iso-Valeraldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
n- Valeraldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005

表6 悪臭防止法に基づくアルデヒド類の測定結果 GC/MS法 (単位ppm)

測定事業所	A			B			C			D			D		
測定日	2019/5/27			2019/6/17			2019/6/19			2019/6/24			2019/9/2		
測定地点	A	B	BG	A	B	BG									
Formaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetaldehyde	0.0011	0.0013	0.00091	0.00070	0.00061	0.00078	0.0014	0.0012	<0.0005	<0.0005	0.00071	0.00073	0.00079	0.0010	0.00066
Propionaldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
iso- Butylaldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
n- Butylaldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
iso-Valeraldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
n- Valeraldehyde	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005

注)GC/MS法ではホルムアルデヒドの分析は実施していない

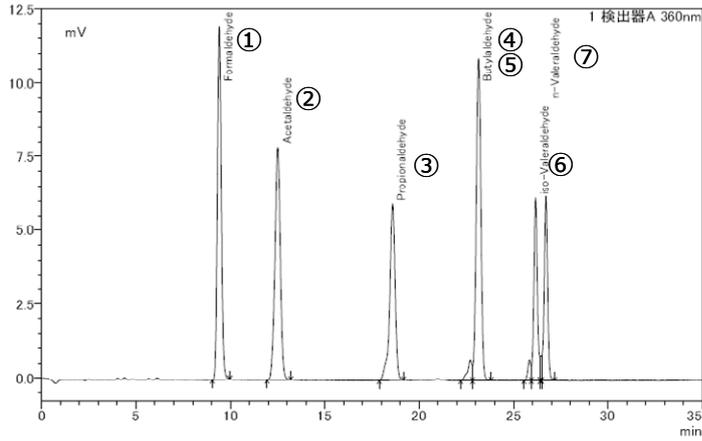


図3 AlldehydeDNPH7 種混合標準液 250ng/mL ODS カラム 水/アセトニトリル移動相 クロマトグラム

分析条件I

Column: Inertsil ODS3

4.6mm id x 250mm

Eluent A: Water

Eluent B: Acetonitrile

0-10min B.conc 55%

10-32min B.conc 55-95%

32-38min B.conc 95%

38-45min B.conc 55%

Flowrate: 1mL/min at 40°C

Detection: UV 360nm

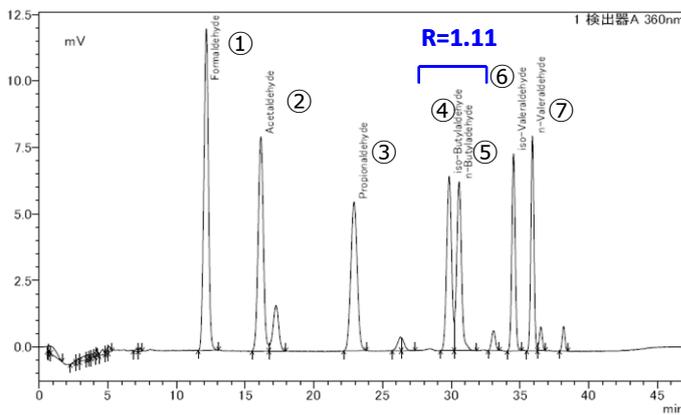


図4 AlldehydeDNPH7 種混合標準液 250ng/mL Wakosil DNPH カラム 水/MeOH 移動相 クロマトグラム

分析条件II

Column: Wakosil DNPH

4.6mm x 250mm

Eluent A: Water

Eluent B: Methanol

0-16min B.conc 73%

16-35min B.conc 73-93%

35-40min B.conc 93%

Flowrate: 0.6mL/min at 37°C

Detection: UV 360nm

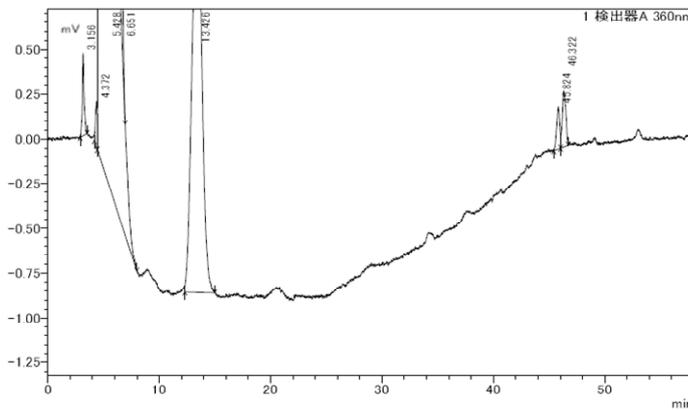


図5 操作ブランク試験溶液 Wakosil DNPH カラム 水/MeOH 移動相 クロマトグラム

分析条件III

Column: Wakosil DNPH

4.6mm x 250mm

Eluent A: Water

Eluent B: Methanol

0-16min B.conc 73%

16-35min B.conc 73-93%

35-40min B.conc 93%

Flowrate: 0.6mL/min at 37°C

Detection: UV 360nm

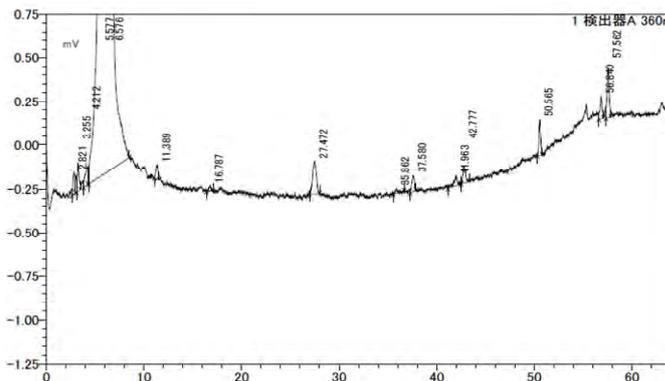


図6 操作ブランク試験溶液 Wakosil DNPH カラム 酢酸ナトリウム緩衝液/MeOH 移動相 クロマトグラム

分析条件IV

Column: Wakosil DNPH

4.6mm x 250mm

Eluent A: 20mM Sodium Acetate

Eluent B: Methanol

0-20min B.conc 65%

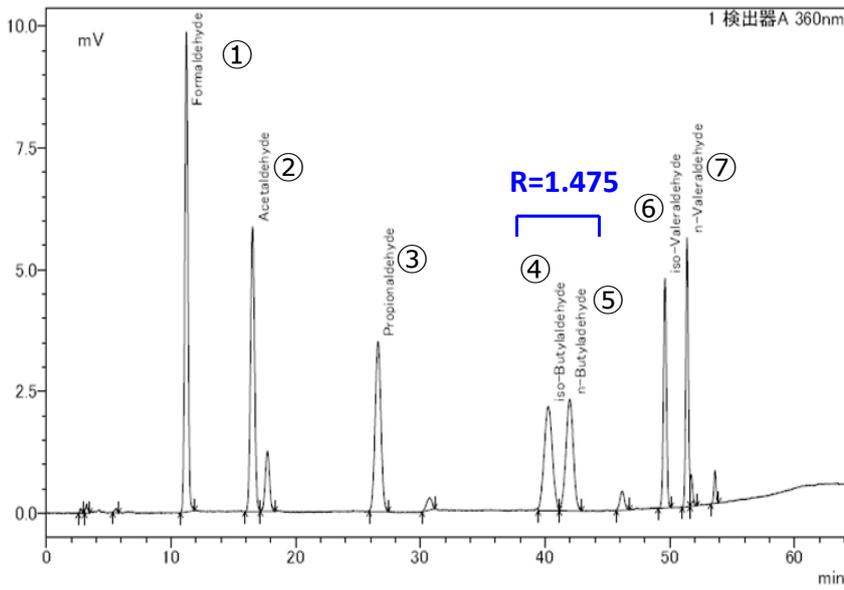
20-50min B.conc 65-95%

50-52min B.conc 95%

52-60min B.conc 65%

Flowrate: 1mL/min at 37°C

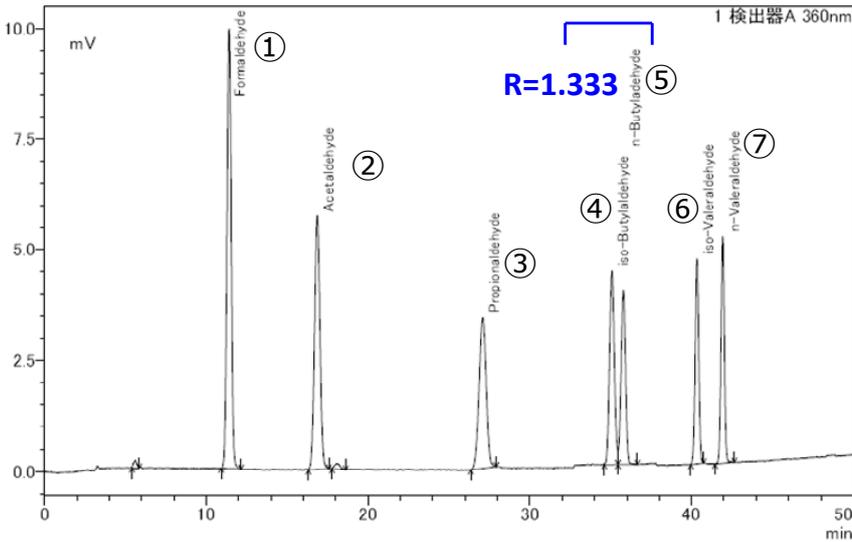
Detection: UV 360nm



分析条件V

Column: Wakosil DNPH
 4.6mm x 250mm
 Eluent A: 20mM Sodium Acetate
 Eluent B: Methanol
 0-35min B.conc 65%
 35-55min B.conc 65-95%
 55-60min B.conc 95%
 60-65min B.conc 65%
 Flowrate: 1mL/min at 37°C
 Detection: UV 360nm

図7 AlldehydeDNPH7種混合標準液 250ng/mL WakosilDNPH カラム 酢酸ナトリウム緩衝液/MeOH 移動相 クロマトグラム



分析条件VI

Column: Wakosil DNPH
 4.6mm x 250mm
 Eluent A: 20mM Sodium Acetate
 Eluent B: Methanol
 0-20min B.conc 65%
 20-50min B.conc 65-95%
 50-52min B.conc 95%
 52-60min B.conc 65%
 Flowrate: 1mL/min at 37°C
 Detection: UV 360nm

図8 AlldehydeDNPH7種混合標準液 250ng/mL WakosilDNPH カラム 酢酸ナトリウム緩衝液/MeOH 移動相 クロマトグラム