

参考資料 8

ホルムアルデヒド及び前駆物質の分析方法

- ホルムアルデヒドの簡易分析法
- ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの前駆物質の一斉分析法の開発及び検討

(1) ホルムアルデヒドの簡易分析法

国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部

小林憲弘、久保田領志、五十嵐良明

今般の事故のようなホルムアルデヒドによる水質汚染事故に関しては、早急な状況把握と対応が必要であり、長時間を要するガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を使った告示法よりは精度は劣っても、水道水質基準レベルのホルムアルデヒドを迅速に分析する方法が求められる。そこで、ホルムアルデヒドの簡易分析法として、一部の水道事業者で現在実際に行われている方法に関する情報を収集し、その中で有用と考えられた 5 つの方法について、検証試験を行った。水道水にホルムアルデヒドを添加し、各方法による分析結果を、告示法 (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 (平成 15 年厚生労働省告示第 261 号) 別表第 19) での分析結果と比較した。

1. 検討対象とした分析法

選択した 5 つの簡易分析法及び告示法 (表 1)、及びそれらの操作手順の概要及びフローチャートを図 1~6 に示す。

表 1. ホルムアルデヒドの簡易分析法と告示法

| 分析法 | 反応試薬 | 検出機器 | 出典、他 |
|---|--------------|--------------|------------------------------------|
| 1 パックテスト | MBTH | 比色、 分光光度計 | WAK-FOR [株式会社 共立理化学研究所] |
| 2 MBTH 吸光光度法 | MBTH | 分光光度計 | DR/2400 [HACH COMPANY] |
| 3 アセチルアセトン吸光 光度法 | アセチルアセ トン | 分光光度計 | 衛生試験法注解 参照 |
| 4 4-アミノ-3-ヒドラジノ -5-メルカプト-1, 2, 4- トリアゾール (AHMT) 吸 光光度法 | AHMT | 分光光度計 | 衛生試験法注解 参照 |
| 5 告示法短縮法 (反応時間 短縮) | PFBOA | GC/MS | 平成 15 年厚生労働省告示 第 261 号別表第 19 参照 |
| 6 告示法 | PFBOA | GC/MS | 平成 15 年厚生労働省告示 第 261 号別表第 19 参照 |

1) パックテスト

検水 1.5 mL に WAK-FOR (株式会社 共立理化学研究所) 小パック 1 包を添加し、5~6 回振とうして反応させ、3 分間静置する。これをポリチューブに全量を吸い込み 5~6 回振とうして発色させ、1 分間静置する。これを、分光光度計を用いて吸光度を測定し、別途作成した検量線によってホルムアルデヒド濃度を定量する。

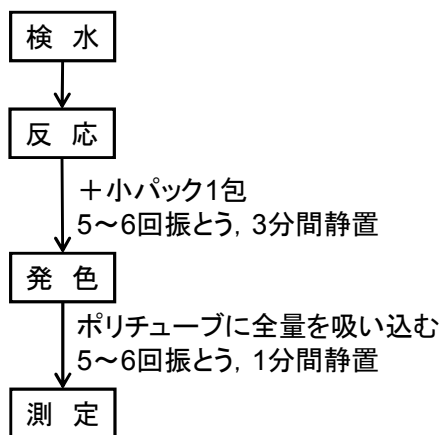


図 1. パックテスト (WAK-FOR) のフローチャート

2) MBTH 吸光光度法

検水 25 mL に MBTH 試薬 1 包 を添加し、20 秒間振とう後、5 分間静置する。これに低濃度ホルムアルデヒド用発色試薬 2.5 mL を添加し、10 分間静置して発色させる。これを、分光光度計 (例えば DR/2400、HACH COMPANY USA。) を用いて吸光度を測定し、別途作成した検量線によってホルムアルデヒド濃度を定量する。

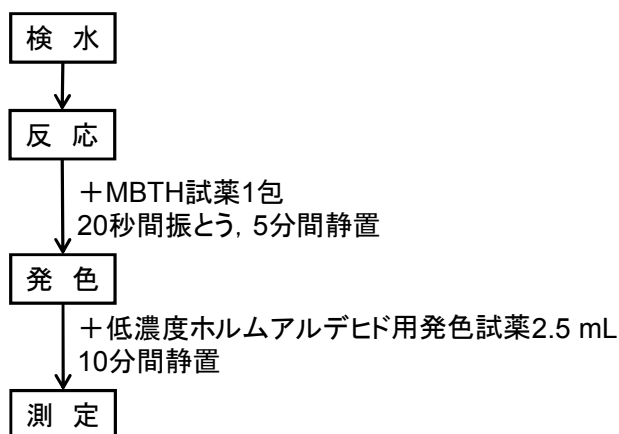


図 2. MBTH 吸光光度法のフローチャート

3) アセチルアセトン法

検水 10 mL にアセチルアセトン溶液 5.0 mL を添加し、60°C 中で 30 分間加温して反応させた後、30 分間放冷する。これを、分光光度計を用いて吸光度を測定し、別途作成した検量線

によってホルムアルデヒド濃度を定量する。

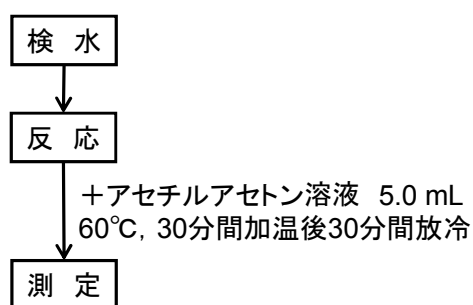


図 3. アセチルアセトン法のフローチャート

4) AHMT 吸光光度法

検水 2.0 mL に 5 mol/L KOH 溶液 2.0 mL 及び AHMT 溶液 2.0 mL を添加し、20 分間放置して反応させた後、 KIO_4 溶液 2.0 mL を添加する。これを、分光光度計を用いて吸光度を測定し、別途作成した検量線によってホルムアルデヒド濃度を定量する。

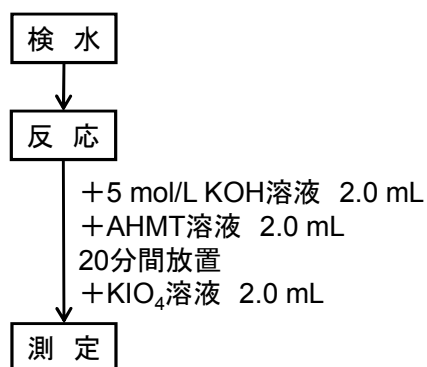


図 4. AHMT 吸光光度法のフローチャート

5) 告示法短縮法(反応時間短縮)

検水 50 mL にペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン (PFBOA) 溶液 3 mL を加え、60°C 保温、30 分間静置後、硫酸 (1+1) 0.8 mL 及び塩化ナトリウム 20 g を加えて混合する。次に、内部標準添加ヘキサン 5 mL を加えて 5 分間激しく振り混ぜ、数分間静置後、ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムを少量加える。この溶液の一定量をガスクロマトグラフ—質量分析計 (GC/MS) に注入し、別途作成した検量線にホルムアルデヒド濃度を定量する。GC/MS 分析条件の一例を以下に示す。

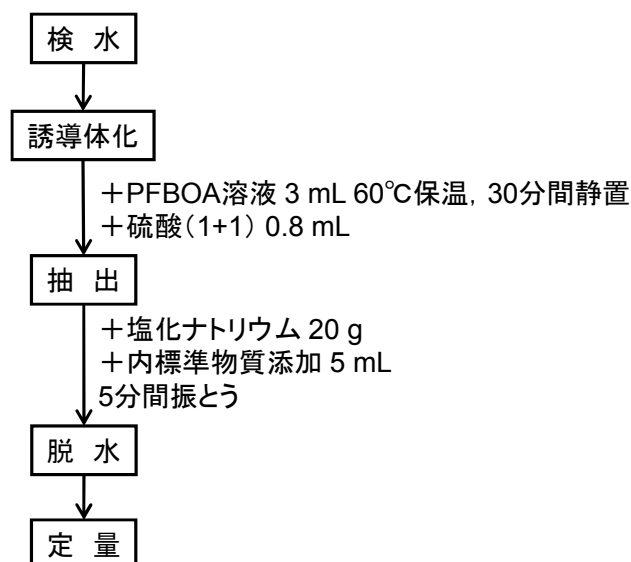


図 5. 告示法短縮法(反応時間短縮)のフローチャート

*GC/MS 分析条件

機種：6890N/5973inert[Agilent Technologies、Inc.]

カラム：DB-1 [Agilent Technologies、Inc.] ϕ 0.25 mm×60 m、膜厚 1.00 μ m

導入系：パルスドスプリットレス

温度：注入口 250 $^{\circ}$ C

カラム 80 $^{\circ}$ C(2 min 保持) \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 110 $^{\circ}$ C(0 min 保持) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C(3 min 保持)

キャリアーガス：ヘリウム 2 mL/min

インターフェイス温度：280 $^{\circ}$ C

イオン源温度：230 $^{\circ}$ C

イオン化エネルギー：70 eV

イオン化法：EI

注入量：1 μ L

設定質量数：ホルムアルデヒド m/z 181、195(確認イオン)

1-クロロデカン (内標準物質) m/z 91、105(確認イオン)

* 内部標準物質

6) 告示法

検水 50mL にペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン (PFBOA) 溶液 3mL を加え、2 時間静置後、硫酸 (1+1) 0.8mL 及び塩化ナトリウム 20 g を加えて混合する。次に、内部標準添加ヘキサン 5mL を加えて 5 分間激しく振り混ぜ、数分間静置後、ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムを少量加える。この溶液の一定量をガスクロマトグラフー質量分析計 (GC/MS) に注入し、別途作成した検量線にホルムアルデヒド濃度を定量する。

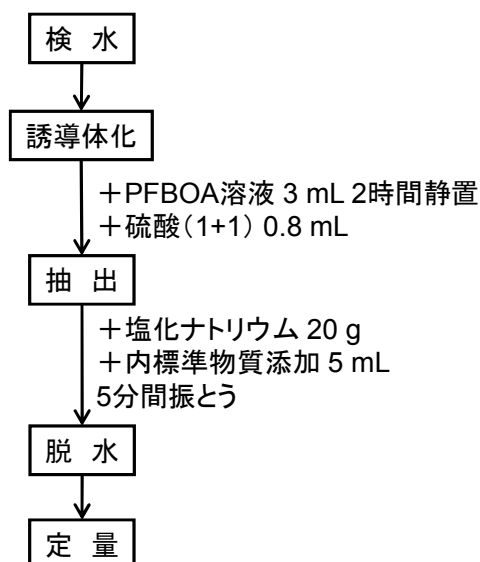


図 6. 告示法のフローチャート

2. 簡易分析法の検証方法

東京都多摩市の水道水を検水とし、チオ硫酸ナトリウム溶液を添加して残留塩素を還元した後、ホルムアルデヒドを 0 (空試験)、0.04、及び 0.08 mg/L の 3 濃度となるように添加し、各濃度につき 5 回の繰り返し分析を行った。なお、定量に用いた検量線は、0 (ブランク)、0.02、0.04、0.06、0.08、及び 0.10 mg/L の 5 濃度で作成した。

3. 結果と考察

3-1. パックテスト

キットとして市販されている。検水を MBTH 試薬と混合し目視で比色する。今回は反応液を採取し吸光度も測定した。試験操作は容易で反応時間は数分、採水現場での判定が可能である。以下に述べる MBTH 吸光度法と同様に、試薬との反応時間を厳守することが一定した発色のためには重要である。基準値 (0.08 mg/L) 程度のホルムアルデヒドは、比色列から判断できるような色の変化を起こさず、吸光度値にも変化が認められなかった。0.1 mg/L の濃度で発色がようやく確認できる程度で、基準値を超えているかどうかの判定に用いるには感度不足であった。酸化性物質、還元性物質が発色に影響する場合がある。本キットは冷暗所に保管することとされ、保証期間は 14 カ月とされている。

3-2. MBTH 吸光光度法

室温 (25°C) で MBTH キット試薬と反応させ、吸光度を分光光度計で測定する。試験操作は容易で分析時間は数十分、採水現場での検査可能である。反応試薬は黄色であるが、ホルムアルデヒドと化学反応して青色に変化する。ホルムアルデヒド濃度 0.02 mg/L では色の変化の確認が困難であるが、0.04 mg/L 以上の濃度になると目視で色調変化を識別できる。試験ごとに一定した吸光度値を得るためには反応温度及び時間を厳密に管理する必要がある。これを守れば、繰り返し測定でもばらつきが小さく良好な回収率が得られた。本検証で使用し

た HACH 社製分光光度計にはあらかじめ検量線データが内蔵されている。この検量線と実測の検量線を用いて得られた定量値は同程度であるため、検量線試料を測定時に用時調製する必要がなく簡易に判定することが可能であった。なおホルムアルデヒドの濃度によっては、サンプルセルに反応液の色が沈着し正の誤差の要因になるため、定期的に硝酸等を用いて洗浄する必要がある。なお、MBTH キット試薬の保証期間は室温で約 2 年である。

3-3. アセチルアセトン吸光光度法

試験操作は容易で、現場での実施が可能である。分析時間は数十分で済むが、60℃という加温が必要である。MBTH 吸光度法と同様に、反応温度及び時間を厳密に管理する必要がある。目視で基準値付近のホルムアルデヒドによる発色（黄色）を識別するのは困難であるが、吸光度としては値が得られた。添加回収試験では良好な再現性と回収率が得られた。アセチルアセトンとの反応終了後、時間の経過とともに吸光度が減少すること（24 時間で 10%程度）が知られているが、実際測定に要する時間は短時間であり判定に影響を与えない。検査に必要な試薬は室温で長期に保存可能である。

3-4. AHMT 吸光光度法

検水を AHMT 試薬と反応させ、分光光度計により吸光度を測定する。分析時間は数十分、厳密な反応温度及び時間の管理は不要である。試験操作は容易で、採水現場での分析が可能である。過ヨウ素酸溶液との反応により気泡が発生し測定に影響するため、気泡の消失を確認することが重要である。MBTH 吸光光度法及びアセチルアセトン吸光光度法と比較すると若干検出感度は劣り、0.06 mg/L 以下のホルムアルデヒド濃度では安定した吸光度値を得ることは難しかった。検査に必要な試薬は室温で長期に保存可能である。

3-5. 告示法短縮法（反応時間短縮）

告示法では検水を常温で 2 時間静置し誘導体化を行うが、短縮法では 60℃湯浴中で 30 分間静置して行った。基準値及びその 1/2 における添加回収試験の結果は、短縮法と告示法でほぼ同等であった。GC-MS を用いるため実験室で実施しなければならないが、公定法に比べ 1 検体あたり 1 時間程度は短縮可能である。

以上、パックテストを除く 4 方法は、簡易法としての適用できる可能性が示唆された。上述のように、ホルムアルデヒドはいずれも誘導体化して分析する。上記以外の方法としては、ホルムアルデヒドを 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）でヒドラジン誘導体化、アセトニトリルで溶出し液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定する方法がある（環境省 有害大気汚染物質測定方法マニュアル、1997）。DNPH を充填した補集管は市販されており、大気分析では一般的な方法である。本法は告示法と同様に精密機器を用いるため実験室での分析となり、採水現場での検査には適さない。水試料のホルムアルデヒドを測定するためには、市販 DNPH 試液を調製し、誘導体化することも考えられる。しかし DNPH の化学的安定性は悪く、試薬の純度が低下する可能性があるため、使用前に繰り返し再結晶する等煩雑な操作が必要となることがある。こうした点が解決されれば反応時間は告示法よりも短く済む利点がある。

ある。

3-6. まとめ

水道水を用いた分析結果から、各簡易分析方法の特徴を表2に示す。

表2. 各簡易分析方法の特徴

| 分析法 | 分析時間 | 検出限界 | 特徴 | 留意点 | 分析場所 |
|------------------|------|-------------|--|--|------|
| 1 パックテスト | 数分 | 0.1 mg/L以上 | 基準値を超えているかどうかの判定に用いるには感度不足。 | 一定した発色のため、試薬との反応時間の厳守が必要。 | 現場 |
| 2 MBTH 吸光度法 | 数十分 | 0.04mg/L程度 | 繰り返し測定でもばらつきが小さく回収率が良い。本検証で使用した機器はあらかじめ検量線データが内蔵されており、検量線を用時調製する必要がない。 | 反応温度及び時間を厳密に管理する必要。 | 現場 |
| 3 アセチルアセトン吸光度法 | 数十分 | 0.02mg/L程度 | 添加回収試験で良好な再現性と回収率が得られた。 | 加温(60°C)が必要。時間の経過とともに吸光度が減少(24時間で10%程度)。 | 現場 |
| 4 AHMT 吸光度法 | 数十分 | 0.06mg/L程度 | 厳密な反応温度及び時間の管理が不要。 | 0.08 mg/L以下では安定した吸光度値を得ることは困難。 | 現場 |
| 5 告示法短縮法(反応時間短縮) | 数時間 | 0.001mg/L以下 | 基準値及びその1/2における添加回収試験の結果は、短縮法と告示法とでほぼ同等。公定法に比べ1検体あたり1時間程度は短縮可能。 | GC-MSが必要。採水現場では検査できない。 | 実験室 |
| 6 告示法 | 半日 | | | | 実験室 |

(詳細は別添参照)

今後は、ホルムアルデヒド前駆物質(ヘキサメチレンテトラミン)を添加した水道原水を塩素処理してホルムアルデヒド生成能を測定し、これら簡易分析法の水道原水への適用性を評価する必要がある。

各簡易分析法の特徴

別添

| | 分析法 | 試験結果 | 定量限界 | 試験の操作性 | 検査場所 | 特徴 | 留意点 | 試薬等の保存性 |
|---|---|---|-------------|----------|----------------------------|--|---|----------------------------|
| 1 | バックテスト | 基準値 (0.08 mg/L) 程度のホルムアルデヒドは、比色列から判断できるような色の変化を起こさず、吸光度値にも変化が認められなかった。 0.1 mg/Lの濃度で発色がようやく確認できる程度で、基準値を超えているかどうかの判定に用いるには感度不足であった。 | 0.1 mg/L以上 | ・試験操作は容易 | ・採水現場での検査可能 | 基準値を超えているかどうかの判定に用いるには感度不足 | 一定した発色のため、試薬との反応時間の厳守が必要。 酸性物質、還元性物質が発色に影響する可能性がある。 | キットは冷暗所に要保管。 保証期間は14カ月。 |
| 2 | MBTH吸光光度法 | ホルムアルデヒド濃度0.02 mg/Lでは色の変化の確認が困難であるが、0.04 mg/L以上の濃度になると目視で色調変化を識別できる。 反応温度及び時間を厳密に管理することにより、繰り返し測定でもばらつきが小さく良好な回収率が得られた。 本検証で使用したHACH社製分光光度計にはあらかじめ検量線データが内蔵され、この検量線と実測の検量線を用いて得られた定量値は同程度であり、検量線試料を測定時に用時調製する必要がなく簡易に判定することが可能。 | 0.04mg/L程度 | ・試験操作は容易 | ・採水現場での検査可能 | 繰り返し測定でもばらつきが小さく回収率が良好。 本検証で使用した機器はあらかじめ検量線データが内蔵されており、検量線を用時調製する必要がない。 | 反応温度及び時間を厳密に管理する必要。 ホルムアルデヒドの濃度により、サンプルセルに試薬の色が沈着し正の誤差の要因になるやすいため、定期的に硝酸等を用いて洗浄する必要。 | MBTHキット試薬の保証期間は室温で約2年。 |
| 3 | アセチルアセトン吸光光度法 | 目視で基準値付近のホルムアルデヒドによる発色(黄色)を識別するのは困難であるが、吸光度としては値が得られた。 添加回収試験では良好な再現性と回収率が得られた。 アセチルアセトンとの反応終了後、時間の経過とともに吸光度が減少すること(24時間で10%程度)が知られているが、実際測定に要する時間は短時間であり判定に影響を与えない。 | 0.02mg/L程度 | ・試験操作は容易 | ・採水現場での検査可能 | 添加回収試験で良好な再現性と回収率が得られた。 | 加温(60℃)が必要。 時間の経過とともに吸光度が減少(24時間で10%程度) 反応温度及び時間を厳密に管理する必要。 | 試薬は室温で長期に保存可能。 |
| 4 | 4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メルカプト-1,2,4-トリアゾール(AHMT)吸光光度法 | MBTH吸光光度法及びアセチルアセトン吸光光度法と比較すると若干検出感度は劣り、0.06 mg/L以下のホルムアルデヒド濃度では安定した吸光度値を得ることは難しかった。 | 0.06mg/L程度 | ・試験操作は容易 | ・採水現場での検査可能 | 厳密な反応温度及び時間の管理が不要。 | 0.08 mg/L以下では安定した吸光度値を得ることは困難。 過ヨウ素酸溶液との反応により気泡が発生し測定に影響するため、気泡の消失を確認することが重要。 | 試薬は室温で長期に保存可能。 |
| 5 | 告示法短縮法(反応時間短縮) | 基準値及びその1/2における添加回収試験の結果は、短縮法と告示法とではほぼ同等であった。 公定法に比べ1検体あたり1時間程度は短縮可能。 | 0.001mg/L以下 | | GC-MSを用いるため実験室で実施しなければならない | 基準値及びその1/2における添加回収試験の結果は、短縮法と告示法とではほぼ同等公定法に比べ1検体あたり1時間程度は短縮可能。 | GC-MSが必要。 採水現場では検査できない。 | |

ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの前駆物質の一斉分析法の開発及び検討

国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部

小林憲弘、久保田領志、五十嵐良明

水質汚染事故が発生した場合に速やかに対策をとるためには、その原因物質を特定することが重要である。平成 24 年 5 月に利根川水系で発生した水道水質汚染事故においては、原因物質がヘキサメチレンテトラミンであることを化学分析によって明らかにしたことにより、排出源が特定され、事態の収束に繋がった。

しかしながら、ヘキサメチレンテトラミン以外のアルデヒド類前駆物質による水質汚染事故も想定され、これらの前駆物質の分析法が事前に整備されていなければ、原因物質を速やかに特定することは極めて困難である。

そこで、塩素消毒によって水質基準のホルムアルデヒド、要検討項目のアセトアルデヒド等のアルデヒド類が生成し水質汚染が発生した場合に、その原因を特定するために利用可能な、アルデヒド前駆物質の一斉分析法の開発を現在行っている。

対象物質は、ヘキサメチレンテトラミンを含む、水道における規制対象外物質（PRTR 法第一種指定化学物質 462 物質のうち、ホルムアルデヒド前駆物質であるアミン類およびその関連物質）とした。これらのうちアルデヒド類を生成する可能性のあるもの、すなわち N-アルキル基（メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基）を有する 42 物質について、環境、食品等の公定法、学術論文・学会要旨、研究所紀要等、分析法データベース（環境省の EnvMethod 等）、機器メーカーのアプリケーションノート等を参照し、分析法に関する情報を調査・収集し、データベースを作成した。

次に、これらの物質の中で、過去に国立医薬品食品衛生研究所において開発した、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（LC/MS/MS）を用いたヘキサメチレンテトラミンの分析方法*と類似の方法で測定できる可能性のあるものを選択し、これらの分析条件について検討した。

*ヘキサメチレンテトラミンの LC/MS/MS 分析条件

| | |
|----|---|
| LC | 機種：Shimadzu Prominence UFLC（島津製作所） カラム：Shim-pack FC-ODS、長さ 75 mm × 内径 2.0 mm、粒子径 3 μm（島津製作所） 移動相 A：5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 移動相 B：5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液 グラジエント条件：B5% (0 min) - B40% (4 min) - B75% (39 min) - B100% (44-50 min) - B5% (50.1-60 min) 流速：0.15 mL/min カラム温度：40°C サンプルクーラー温度：5°C 注入量：100 μL |
| MS | 機種：Shimadzu LCMS-8030（島津製作所） イオン化法：ESI Positive/Negative プローブ電圧：+4.5 kV (ESI+) / -3.5 kV (ESI-) ネブライザーガス流量：1.5 L/min |

ドライングガス流量：10 L/min
 脱溶媒部(DL)温度：250° C
 ヒートブロック温度：400° C

最初に、各物質の個別標準溶液を用いて、スキャンモードにより各物質のESI ポジティブ(+)およびネガティブ(-)モードのマススペクトルを測定し、最も強度の強いイオンをMRMモードでの測定におけるプリカーサイオンとして選択した。次に、プロダクトイオンのスキャンを行い、各電圧(Q1 Pre Bias、CE、およびQ3 Pre Bias)の最適化を行った後で、最も強度の強いイオンを定量イオンとして、2番目に強度の強いイオンを定性イオンとして選択した

検討を行った物質のうち、ホルムアルデヒド又はアセトアルデヒドを生成しやすいと考えられる物質（農薬成分を除く）について分析条件の最適化を行った結果を以下の表に示す。

なお、ホルムアルデヒド又はアセトアルデヒドの生成しやすさの評価は、国立保健医療科学院の研究によるものである。

表 2. ホルムアルデヒド等の前駆物質の基本的情報と各物質の分析条件

| 基本的情報 | | | | 分析条件 | | | |
|-------|--------------------------------|-----------|---|---------|-----------|--------------------------------|----------|
| 類型 | 物質名 | CAS No | 分子式 | 分子量 | イオン 化法 | モニターイ オン (m/z) | 検出 感度 |
| A-1 | ヘキサメチレンテ トラミン | 100-97-0 | C ₆ H ₁₂ N ₄ | 140. 11 | ESI+ | 141. 1>42. 2 141. 1>112. 1 | ++ |
| A-1 | 1,-ジメチルヒド ラジン | 57-14-7 | C ₂ H ₈ N ₂ | 60. 10 | ESI+ | 61. 1>44. 1 61. 1>45. 1 | + |
| A-1 | N,N-ジメチルアニ リン | 121-69-7 | C ₈ H ₁₁ N | 121. 18 | ESI+ | 122. 3>107. 1 122. 3>106. 1 | ++ |
| A-1 | N,N-ジメチルドデ シルアミン | 112-18-5 | C ₁₄ H ₃₁ N | 213. 40 | ESI+ | 214. 4>46. 1 214. 4>57. 1 | + |
| A-2 | N,N-ジメチルドデ シルアミン=N-オ キシド | 1643-20-5 | C ₁₄ H ₃₁ NO | 229. 40 | ESI+ | 230. 4>58. 1 230. 4>62. 1 | +++ |
| A-2 | ヘキサデシルトリ メチルアンモニウ ム=クロリド | 112-02-7 | C ₁₉ H ₄₂ ClN | 320. 00 | ESI+ | 284. 3>60. 1 284. 3>57. 1 | ++ |
| B | トリエチルアミン | 121-44-8 | C ₆ H ₁₅ N | 101. 19 | ESI+ | 102. 3>58. 1 102. 3>74. 1 | + |
| B | 2-(ジエチルアミ ノ)エタノール | 100-37-8 | C ₆ H ₁₅ NO | 117. 19 | ESI+ | 118. 3>44. 1 118. 3>100. 1 | ++ |

(注) 類型 A-1:ホルムアルデヒド前駆物質（生成多）、A-2:ホルムアルデヒド前駆物質（生成少）、B:アセトアルデヒド前駆物質

今後は、一斉分析が可能であるかどうか、分析条件の最適化を行うとともに、分析法の妥当性（真度と併行精度）について評価を行う必要がある。現在開発中の一斉分析法は、アルデヒド類による水質汚染が発生した場合に、その原因物質（前駆物質）の速やかな特定に利用できると考えられる。