

## < その 2 > ホルムアルデヒド試験法の簡易化に関する検討

研究協力者 中西 徹 (一財)日本食品分析センター  
研究協力者 黒山 あかね (一財)日本食品分析センター

### A. 研究目的

食品衛生法における食品・添加物等の規格基準では、フェノール樹脂、メラミン樹脂、ユリア樹脂、それ以外のホルムアルデヒドを原料とする合成樹脂製の器具・容器包装、ゴム製の器具・容器包装、内面に合成樹脂が塗装された金属缶についてホルムアルデヒドの溶出試験が設定されている。また、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令においても、内面に合成樹脂を塗装した金属缶、密栓用の合成樹脂加工アルミニウム箔についてホルムアルデヒドの溶出試験が設定されている。

いずれの規格も、溶出試験で得られた試験溶液を水蒸気蒸留し、その留液についてアセチルアセトン法による試験を行ったとき不検出であることが規定されている。また、不検出と判定する判断基準を補足するため、厚生労働省(当時の厚生省)より2つの通知が発出されている。昭和41年10月14日環食化第5070号では、対照液と目視による比較を行う場合、側方から見たときに対照液よりも明らかに濃い黄色の呈色が認められた場合のみを不適合とすること、昭和42年3月8日環食化第7006号では、試験溶液の呈する色が対照液の呈する色とほとんど差がない場合の限界量は4ppm(4µg/mL)に相当することが示されており、ほとんどの検査機関がこれら通知に基づき適合または不適合の判断を行っている。

また、規格試験で用いられている水蒸気蒸留とは、水の入ったフラスコを加熱し、

加熱により生成した水蒸気を酸性状態にした試験溶液の入った別のフラスコに連続的に吹き込んで試験溶液を加熱状態とし、そこで生成した水蒸気とともに試験溶液中のホルムアルデヒドを留出させ、冷却しながら水と共に捕集する前処理操作であり、試験溶液に着色や濁りがある場合や試験溶液中にアセチルアセトンとホルムアルデヒドの反応を妨害する物質が含まれている場合に有効である。しかし、実態としてこのようなケースは少なく、大部分の試験溶液では蒸留操作を必要としない。

水蒸気蒸留を行うためには専用の器具(蒸留装置)が必要である。また、190mLの留液を得るためにおよそ1~1.5時間程度と時間を要する。さらに、水蒸気蒸留の操作過程において、酸性下で試験溶液を加熱することで夾雑成分が分解してホルムアルデヒドが生成し検出される場合もある<sup>1)</sup>。

そこで本研究では、ホルムアルデヒド試験法の簡易化を目的として、アセチルアセトン試液の反応条件の改良、蒸留操作の省略、並びに蒸留操作の代替として活性炭を用いた方法について検討を行うとともに、夾雑成分の影響により結果判定が異なるケースが存在することが判明したので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. 試料

ニトリルブタジエンゴム製手袋、シリコンゴム製シート、エチレンプロピレンゴ

ム製シート、天然ゴム製シート、フッ素ゴム製シート、クロロプレンゴム製シート、メラミン樹脂製スプーン、メラミン樹脂製椀、ポリアセタール製プレート、フェノール樹脂製椀の 10 種。これらはいずれもインターネット等で入手した。

## 2 . 試薬及び試液

水：純水製造装置 Elix Advantage 10 により精製した水

1 mg/mL ホルムアルデヒド標準液：関東化学（株）製

アセチルアセトン：東京化成工業（株）特級

アセトニトリル：富士フィルム和光純薬（株）製、高速液体クロマトグラフ用

活性炭：活性炭素・粉末、富士フィルム和光純薬（株）製、和光特級

酢酸：関東化学（株）製、特級

酢酸アンモニウム：小宗化学薬品（株）特級

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）：関東化学（株）製、特級、50%水湿潤品

ホルムアルデヒド標準溶液：1 mg/mL ホルムアルデヒド標準液を水に溶かして、0.5 ~ 10 µg/mL に調製した。

アセチルアセトン試液：酢酸アンモニウム 150 g を水に溶解し、酢酸 3 mL 及びアセチルアセトン 2 mL を加え、水で 1000 mL とした。

0.1% DNPH 試液：DNPH 0.2 g をアセトニトリルに溶解し、100 mL とした。

## 3 . 器具及び装置

分光光度計：UV-1800、（株）島津製作所製

高速液体クロマトグラフ（HPLC）：LC-20AD、（株）島津製作所製

## 4 . ホルムアルデヒドの測定

### 1 ) 測定溶液の調製法

#### 水蒸気蒸留法

公定法に準じた。すなわち、試験溶液 10 mL に 20% リン酸 1 mL を加え、受器に水 10 mL を入れた後、水蒸気蒸留を行い、留液が約 190 mL になったとき蒸留をやめ、水を加えて 200 mL とした。この液 5 mL とアセチルアセトン試液 5 mL を混和後、沸騰水浴中で 10 分間加熱した。冷却後の溶液を測定溶液とし、分光光度計を用いて測定した。

#### 直接法

水蒸気蒸留法と同じ希釈倍率となるよう、試験溶液 10 mL に水を加え 200 mL とした。この液 5 mL とアセチルアセトン試液 5 mL を混和後、60 °C の水浴で 10 分間加温した。冷却後の溶液を測定溶液とし、分光光度計を用いて測定した。

#### 活性炭法

試験溶液 20 mL に活性炭約 0.05 g を加えて約 10 分間放置した後、ろ紙でろ過を行った。次に、水蒸気蒸留法と同じ希釈倍率となるよう、ろ液 10 mL を分取し、水を加えて 200 mL とした。この液 5 mL とアセチルアセトン試液 5 mL を混和後、60 °C の水浴で 10 分間加温した。冷却後の溶液を測定溶液とし、分光光度計を用いて測定した。

#### DNPH 誘導体化法<sup>2)</sup>

試験溶液を必要に応じて水で適宜希釈した液 1 mL に 20% リン酸 20 µL 及び 0.1% DNPH 試液 50 µL を加え、常温で 20 分間反応させた。これを測定溶液とし、HPLC を用いて測定した。

### 2 ) 定量

#### 分光光度計

測定溶液を 50 mm セミマイクロセルにとり、波長 415 nm における吸光度を測定し、

別に作成した検量線から試験溶液中のホルムアルデヒド濃度を求めた。

#### HPLC

測定溶液を HPLC に注入し、別に作成した検量線から試験溶液中のホルムアルデヒド濃度を求めた。HPLC 測定条件は以下の通りとした。

カラム：TSK-gel ODS-80Ts (4.6 mm i.d.×250mm、5 μm、東ソー(株)社製)

カラム温度：40

移動相：A 液：水、B 液：アセトニトリル

グラジエント：B 液 40% 直線グラジエント (15 分) B 液 70%

流速：1 mL/min

注入量：10 μL

測定波長：400 nm

## 5. 添加回収試験

### 1) 試験溶液の調製

ニトリルブタジエンゴム、シリコーンゴム、エチレンプロピレンゴム、天然ゴム、フッ素ゴム、クロロプレンゴム、メラミン樹脂 2 種、ポリアセタール、フェノール樹脂の 10 試料について、表面積 1 cm<sup>2</sup> 当たり 2 mL の水を用いて、95 で 30 分間の溶出試験を行い、試験溶液を調製した。ただし、試験は各試料 5 試行で行った。なお、メラミン樹脂製椀及びフェノール樹脂製椀については充填溶出を行い、その他の試料については浸漬溶出を行った。また、比較検証を行うためには少なくとも限界量付近の溶出量が必要であったため、使用実態とは異なるが、全試料について 95 30 分間の溶出条件で試験溶液を調製した。

### 2) 添加回収試験

得られた試験溶液に、ホルムアルデヒド濃度が 4 μg/mL となるように添加した溶液を添加試験溶液とした。試験溶液及び添加

試験溶液について各試験法に従いホルムアルデヒド濃度を求めた。回収率は添加試験溶液中のホルムアルデヒド濃度から添加前の試験溶液中のホルムアルデヒド濃度を差し引いた値を用いて算出した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. アセチルアセトン試液の反応条件の検討

#### 1) 反応温度の検討

公定法では、溶出試験で得られた試験溶液を水蒸気蒸留し、その留液 5 mL にアセチルアセトン試液 5 mL を加え、沸騰水浴中で 10 分間加熱後、冷却し、呈色を確認するよう規定している。これはホルムアルデヒドがアンモニアの存在下でアセチルアセトンと反応し、3,5-ジアセチル-1,4-ジヒドロルチジンを生成して黄色に呈色することを利用している<sup>3)</sup>。このように公定法において反応条件が沸騰水浴中で 10 分間と定められているため、溶出試験で使用する 95 又は 60 の水浴を、ホルムアルデヒドの試験に用いることができず、沸騰水浴を準備しなければならない。しかし、溶出試験で使用する水浴をアセチルアセトン試液との反応時にそのまま利用することができれば、沸騰水浴を準備する必要がなくなり試験作業が効率的となる。そこで、95 及び 60 の温度条件で標準溶液とアセチルアセトン試液を反応させ、沸騰 10 分間で反応させた標準溶液との比較検証を行った。なお、95 の反応時間は沸騰水浴と同じ 10 分間とし、60 の反応時間は 30 分間<sup>4)</sup>とした。

ホルムアルデヒド濃度が 0、0.1、0.2、0.5、1、2 μg/mL となるように標準溶液に水を加えて 5 mL とし、アセチルアセトン試液 5 mL を加え、沸騰水浴で 10 分間、95 の水浴で 10 分間及び 60 の水浴で 30 分間加熱又は加温した。公定法では、冷却後目視

で判定することが規定されているが、試験法の精度を上げるため分光光度計を用いて415nmにおける吸光度を測定した。各濃度における吸光度を表1に、各反応条件における濃度と吸光度の相関を図1に示した。

いずれの反応温度においても吸光度はほぼ同じであり、ホルムアルデヒド濃度と吸光度に良好な相関がみられた。一方、5試行の標準偏差は、反応温度が低いほど低濃度で小さくなる傾向がみられた。

以上より、60 30分間の反応条件でも試験結果に影響がないことが確認でき、さらに限界量(4 µg/mL)未満の結果が安定することが判明した。

## 2) 反応時間の検討

次いで、0、0.1、0.2、0.5、1、2 µg/mLの標準溶液を用いて60 での反応時間の短縮を検討した。60 の水浴で5分間、10分間及び30分間で加温したときの吸光度を表2に、各反応条件における相関を図2に示した。いずれの反応時間においてもホルムアルデヒド濃度と吸光度に良好な相関がみられ、各反応時間における吸光度とその標準偏差に差はみられなかった。ただし、5分間では反応温度を十分に管理できない可能性があると考えられたため、反応時間は公定法と同じ10分間とした。

表1 標準溶液の濃度および反応温度における測定溶液の吸光度

標準溶液 (µg/ml)	沸騰10分間	95 10分間	60 30分間
0 <sup>*1</sup>	0.044±0.013	0.026±0.006	0.018±0.005
0.1	0.105±0.006	0.090±0.005	0.083±0.002
0.2 <sup>*2</sup>	0.158±0.005	0.151±0.005	0.149±0.001
0.5	0.346±0.015	0.334±0.006	0.341±0.004
1	0.651±0.012	0.647±0.010	0.667±0.006
2	1.250±0.016	1.250±0.018	1.295±0.017
決定係数 (R <sup>2</sup> )	1.000	1.000	1.000

各5試行で試験を行い、平均値±標準偏差で示した。

\*1：対照液(水)に相当

\*2：試験溶液の呈する色が対照液の呈する色とほとんど差がない場合の限界量(4 ppm)

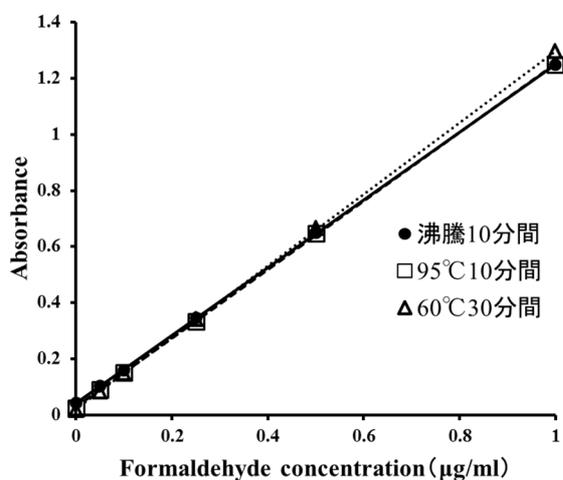


図1 各反応条件における濃度と吸光度の相関

表2 標準溶液の濃度および反応時間における測定溶液の吸光度

標準溶液 (µg/ml)	60 5分間	60 10分間	60 30分間
0 <sup>*1</sup>	0.024±0.008	0.016±0.003	0.029±0.008
0.1	0.084±0.004	0.083±0.003	0.089±0.006
0.2 <sup>*2</sup>	0.151±0.006	0.146±0.002	0.145±0.002
0.5	0.338±0.004	0.332±0.003	0.331±0.006
1	0.656±0.011	0.647±0.008	0.649±0.012
2	1.273±0.017	1.275±0.025	1.277±0.021
決定係数 (R <sup>2</sup> )	1.000	1.000	1.000

各5試行で試験を行い，平均値±標準偏差で示した。

\*1：対照液（水）に相当

\*2：試験溶液の呈する色が対照液の呈する色とほとんど差がない場合の限界量（4 ppm）

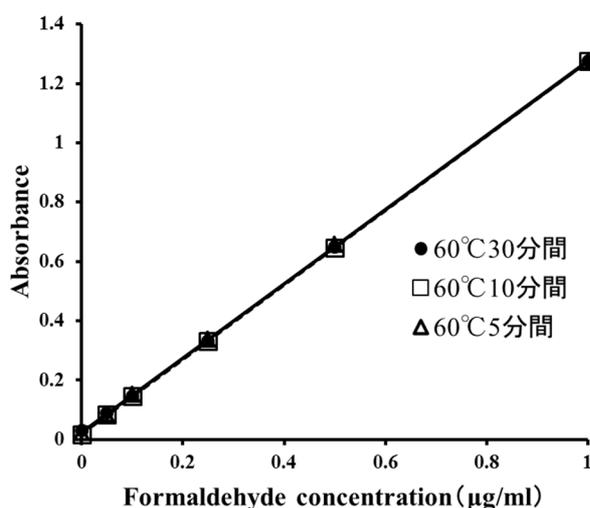


図2 各反応条件における濃度と吸光度の相関

## 2. 水蒸気蒸留法と直接法の同等性の検証

公定法に準じた水蒸気蒸留法と、水蒸気蒸留を省略し試験溶液をそのままアセチルアセトンと反応させる直接法の同等性を検証した。ニトリルブタジエンゴム、シリコーンゴム、エチレンプロピレンゴム、天然ゴム、フッ素ゴム、クロロプレンゴム、メラミン樹脂2種、ポリアセタール、フェノール樹脂の10種類の試料から試験溶液を調製し、さらにこの液に4 µg/mLとなるようにホルムアルデヒドを添加して添加試験溶液を調製した。試験溶液及び添加試験溶液についてそれぞれの方法でホルムアルデヒド濃度を測定し、溶出量及び添加回収率を算出した(表3)。

その結果、ニトリルブタジエンゴム、シリコーンゴム、エチレンプロピレンゴム、天然ゴム、フッ素ゴム、クロロプレンゴム、フェノール樹脂では、ホルムアルデヒド溶出量はいずれも定量限界(2 µg/mL)未満で

あったが、添加回収率は80~120%の範囲内であった。メラミン樹脂のホルムアルデヒド溶出量はいずれの試験法においてもよく一致しており、添加回収率も80~110%の範囲内であった。一方、ポリアセタールでは、水蒸気蒸留法と直接法で結果に差がみられた。そこで、溶出試験においてホルムアルデヒドの溶出が認められたメラミン樹脂2種及びポリアセタールの試験溶液について、水道法で用いられるホルムアルデヒド測定法をもとに阿部らが改良したDNPH誘導体化法を参考に試験溶液中のホルムアルデヒド濃度を測定した。その結果、いずれの試験溶液においてもホルムアルデヒド濃度は直接法と同程度であった(表4)。この結果から、ポリアセタールの試験溶液では、水蒸気蒸留時に試験溶液中の夾雑成分からホルムアルデヒドが生成したと考えられた。

表3 水蒸気蒸留法と直接法におけるホルムアルデヒド定量値と添加回収率

材質	水蒸気蒸留法		直接法	
	溶出量 (µg/ml)	添加回収率 (%)	溶出量 (µg/ml)	添加回収率 (%)
NBR	ND	94±10	ND	99±4
Q	ND	93±8	ND	98±1
EPDM	ND	98±5	ND	99±4
NR	ND	98±10	ND	98±4
FKM	ND	98±7	ND	97±5
CR	ND	91±6	ND	100±3
MF	5.25±0.38	88±8	5.24±0.26	95±5
MF	4.68±0.87	100±6	4.59±0.45	95±3
POM	6.34±0.38	100±11	3.17±0.26	100±5
PF	ND	101±11	ND	95±6

溶出量は5回の平均値±標準偏差で示した。

添加回収率は5回の平均値±標準偏差で示した。

NBR:ニトリルブタジエンゴム, Q:シリコーンゴム, EPDM:エチレンプロピレンゴム, NR:天然ゴム

FKM:フッ素ゴム, CR:クロロプレンゴム, MF:メラミン樹脂, POM:ポリアセタール, PF:フェノール樹脂

ND: < 2 µg/ml

表4 試験法によるホルムアルデヒド定量値の比較

材質	水蒸気蒸留法	直接法	DNPH誘導体化法
	溶出量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	溶出量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	溶出量 ( $\mu\text{g/ml}$ )
MF	5.25 $\pm$ 0.38	5.24 $\pm$ 0.26	5.65 $\pm$ 0.30
MF	4.68 $\pm$ 0.87	4.59 $\pm$ 0.45	5.01 $\pm$ 0.36
POM	6.34 $\pm$ 0.38	3.17 $\pm$ 0.26	3.28 $\pm$ 0.07

溶出量は5回の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

MF：メラミン樹脂，POM：ポリアセタール

水蒸気蒸留法では、蒸留操作で20%リン酸を加えるため試験溶液は酸性となり、そこに水蒸気を吹き込むため、長時間高温状態となる。また、アセチルアセトン試液との反応で沸騰水浴を用いるため、他の方法の反応温度である60に比べ高温となる。

そこで、ポリアセタールの試験溶液を用いて蒸留操作における酸及び加熱による影響を確認した。試験溶液2 mLを採ったのち、95で1時間加熱、20%リン酸0.2 mLを加えて常温で1時間放置、20%リン酸0.2 mLを加えて95で1時間放置の3条件で処理し、それぞれ1 mLを分取して水で20 mLとした。これらの液5 mLとアセチルアセトン試液5 mLを混和後、60で10分間加熱した。得られたそれぞれの溶液中のホルムアルデヒド濃度を測定した。その結果ホルムアルデヒドの定量値は、3.52  $\mu\text{g/mL}$ 、3.13  $\mu\text{g/mL}$ 及び5.78  $\mu\text{g/mL}$ となった。このことから、酸性条件下で加熱を行う水蒸気蒸留法では、蒸留操作の過程で夾雑物からホルムアルデヒドが生成する可能性があることが示唆された。

### 3. 活性炭による夾雑物の除去

試験溶液に着色や濁りがある試験溶液やアセチルアセトンとホルムアルデヒドの

反応を妨害する物質が含まれている試験溶液に対応するため、水蒸気蒸留法に代わる方法として活性炭を用いて試験溶液を処理する方法（活性炭法）について検証した。本法は専用の器具類を必要とせず、操作も活性炭を添加後ろ過するのみであるため簡便であり、試験溶液の加熱や酸溶媒の添加が不要であるため処理操作で夾雑物からホルムアルデヒドが生成することがない。

活性炭法を用いて、同様の方法で添加回収試験を行ったところ、その定量値及び回収率は直接法と同程度の良好な結果であった（表5）。さらに、ポリアセタールの試験溶液についても測定した結果、直接法及びDNPH誘導体化法と同等の値が得られた。

以上から、活性炭法は蒸留操作でホルムアルデヒドが生成する試験溶液の前処理法として水蒸気蒸留法の代替法となり得る可能性が示唆された。しかし、試験溶液の着色や反応を妨害する成分の除去能力については、適当な試料が入手できず、十分な検証ができなかった。そのため、今後、適切な試料または試験溶液を用いて有効性と水蒸気蒸留法との同等性を検証する必要がある。

表5 活性炭法におけるホルムアルデヒド定量値と添加回収率

材質	溶出量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	添加回収率 (%)
NBR	ND	96 $\pm$ 3
Q	ND	99 $\pm$ 4
EPDM	ND	91 $\pm$ 7
NR	ND	98 $\pm$ 2
FKM	ND	95 $\pm$ 2
CR	ND	96 $\pm$ 4
MF	5.20 $\pm$ 0.34	94 $\pm$ 3
MF	4.67 $\pm$ 0.47	94 $\pm$ 3
POM	3.30 $\pm$ 0.25	98 $\pm$ 4
PF	ND	98 $\pm$ 2

溶出量は5回の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

添加回収率は5回の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

NBR：ニトリルブタジエンゴム，Q：シリコンゴム，EPDM：エチレンプロピレンゴム

NR：天然ゴム，FKM：フッ素ゴム，CR：クロロプレンゴム，MF：メラミン樹脂

POM：ポリアセタール，PF：フェノール樹脂

ND：< 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$

#### D．結論

合成樹脂及びゴム製器具・容器包装、金属缶の規格試験で規定されるホルムアルデヒド試験法の簡易化に関する検討を行った。

アセチルアセトン試液の反応条件を検討した結果、水浴中で60～10分間加熱すれば、現行の反応条件である沸騰水浴で10分間加熱した時と同等の値が得られたことから、反応条件を60～10分間に簡易化することが可能である。

また、現行の水蒸気蒸留の操作は、試験溶液に着色や濁りがある場合や、試験溶液中にアセチルアセトンとの反応を妨害する物質が含まれている場合に必要であるが、このようなケースは少ないため、大部分の試験溶液では蒸留操作を必要としない。そこで、水蒸気蒸留を省略した直接法との同等性を検証した。その結果、大部分の試験溶液では同等の測定値が得られたことから、試験法として同等以上の性能を有することが確認できた。一方、水蒸気蒸

留の操作中にホルムアルデヒドが生成する試験溶液が存在した。

そこで、試験溶液中の夾雑物の除去方法として活性炭法の検証を行った。その結果、定量値及び回収率は直接法と同程度であった。本法は操作が簡便であるほか、試験溶液の加熱や酸溶媒の添加が不要であるため処理操作で夾雑物からホルムアルデヒドが生成することがない。そのため、活性炭法は蒸留操作でホルムアルデヒドが生成する試験溶液の前処理法として水蒸気蒸留の代替法となり得る可能性が示唆された。しかし、試験溶液の着色や反応を妨害する成分の除去能力については、今後、適切な試料または試験溶液を用いて検証する必要がある。

#### E．参考文献

- 1) 保健衛生安全基準 家庭用品規制関係実務便覧 第2編 技術編、p.2047
- 2) 尾崎麻子：食品用ペットボトルから溶出する化学物質の摂取量の推定に関する

## 研究

- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2015、  
p.647、 金原出版 (2015)
- 4) 平成 24 年度第 3 回水道水源における消  
毒副生成物前駆物質汚染対応方策検討  
会 資料 2 参考 8