

Megazyme

ホルムアルデヒド分析法

FORMALDEHYDE ASSAY PROCEDURE

K-FRHYD 01/21

K-FRHYD
(用手法 50 回分*)
(自動分析法／マイクロプレート法 500 回分)

* 半量で分析すると検体数は2倍

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

ホルムアルデヒドは、多くの産業で豊富に使用される化学物質であり、多くの日用品に見られる化学物質です。室温では無色の可燃性ガスであり、高い反応性を示します。ホルムアルデヒドは環境中にも存在し、バイオマスの燃焼(森林火災など)またはバイオマスの分解によって放出されます。

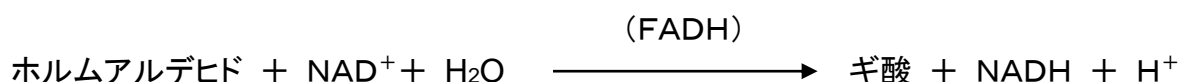
他の燃焼方法(発電所、焼却炉など)も、大気中へのホルムアルデヒド排出源です。しかしホルムアルデヒドは樹脂の製造や消毒剤や固定剤として、または日用品の防腐剤として世界中で広く工業生産されています。食品中のホルムアルデヒドの残存レベルは食品により変動し、牛乳の1 mg/kg 未満から一部の魚では 200mg/kg 超える値まで変動します。

その毒性とその広範な用途のため、ホルムアルデヒドへの暴露はヒトの健康にとって重要な懸案事項と言えます。

ホルムアルデヒド分析キット(**K-FRHYD**)は、環境サンプルや食品を含む様々な試料中のホルムアルデヒドを測定・分析するための、簡単で信頼性が高く、正確な分析方法です。

原理 - PRINCIPLE -

ホルムアルデヒドはNAD⁺の存在下、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ(FADH)の作用によりギ酸に定量的に酸化されます。



この反応で生じるNADH量はホルムアルデヒド量と化学量論的に同一です。NADH量は340nmの吸光度の増加により測定されます。

正確さ - ACCURACY -

標準誤差2%未満が容易に達成できます。再現性の結果は表1(7ページ)に示しました。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

吸光度差の最小値は 0.003 です。これは分析当たりのホルムアルデヒド濃度 0.033μg、または標準法でサンプルを処理し最大サンプル量 2.00mL を用いた場合、0.016μg/mL に相当します。定量限界は分析当たりのホルムアルデヒド濃度 0.011μg、または標準法でサンプルを処理し、最大サンプル量 2.00mL を用いた場合、0.054μg/mL で、吸光度差 0.09 に相当します。

この分析は 0.1~14 μg のホルムアルデヒド濃度間で直線性を示し、その結果を図1(8ページ)に示しました。

阻害 - INTERFERENCE -

本ブックレットに記載した分析条件下で、ホルムアルデヒドは定量的に変換されます。アセトアルデヒドがホルムアルデヒド濃度より高濃度で存在する場合は、サンプル依存のクリープ現象を引

き起こします。これは、分析後にFADHの添加時までグラフを外挿することにより除外することができます(4ページのクリーブ測定に関する注記を参照)。分析当たりのアセトアルデヒドが10 μ gを超える場合、ある程度の過大評価がみられます。

グルタルアルデヒドは、ホルムアルデヒド濃度より大過剰濃度存在する場合に影響があります。分析当たり100 μ gのグルタルアルデヒド存在下でも良好な分析結果が得られました。これは標準法でサンプル処理し試料0.1mLを用いた場合、グルタルアルデヒド濃度0.1%に相当します。

メタノールと2-プロパノールでは阻害は認められませんでした。高濃度のエタノール(標準法でサンプル処理し試料0.1mLを用いた場合、エタノール濃度100%に相当)はサンプル依存のクリーブ現象を示しました。これもグラフの外挿により計算除外することができ、高い精度での分析が可能です。非常に低レベルのホルムアルデヒドでも、高エタノール環境下で測定可能です。

ホルムアルデヒドの変換が分析法で定義された時間10分以内に完了している場合、一般に阻害が生じていないと結論付けることができます。試料中の妨害物質の存在は、内部標準を加えることにより確認することができます。標準品の量的な回収が可能なはずで

安全性 - SAFETY -

すべての化学物質に適用される一般的な安全対策を遵守する必要があります。この製品の安全な使用および取扱いの詳細、SDSについては日本バイオコンまでお問い合わせ下さい。

キット - KITS -

用手法50検体(自動分析法/マイクロプレート法500検体)分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

- ボトル1:** 緩衝液(12mL、pH 9.0)。保存剤として0.02%w/vアジ化ナトリウム含有。4 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。
- ボトル2:** NAD⁺。凍結乾燥粉末。-10 $^{\circ}$ C以下で5年以上安定です。
- ボトル3:** ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ溶液(2.5mL)。保存剤として0.02%w/vアジ化ナトリウム含有。-10 $^{\circ}$ C以下で2年以上安定です。
- ボトル4:** パラホルムアルデヒド標準品粉末(約3g)。密封条件下、4 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。

試薬溶液/懸濁液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. 付属のボトル1をそのまま使用して下さい。4 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。
2. ボトル2の内容物を蒸留水12mLに溶解します。
4 $^{\circ}$ Cで約4週間安定または-10 $^{\circ}$ C以下で2年以上安定です
(凍結/融解の繰り返しを避けるため、ポリプロピレンチューブに小分けして凍結します)。
3. 付属のボトル3をそのまま使用して下さい。-10 $^{\circ}$ C以下で2年以上安定です。

4. パラホルムアルデヒド標準品粉末 300mg を 13mL ポリプロピレンチューブに精秤し、0.1M ピロリン酸カリウム緩衝液 pH9.0 (希釈緩衝液B) 約 5mL に溶解します。溶液を 500mL 容メスフラスコに全量移し、次に 0.1M ピロリン酸カリウム緩衝液 (pH9.0) を約 300mL 加えます。完全に溶解するまで、60°C の恒温水槽で 10 分間加温します。溶液を室温に戻し、希釈緩衝液で 500mL に定容します。この溶液 0.5mL を 0.1M ピロリン酸カリウム緩衝液 (pH9.0) 4.5mL に添加して、さらに 10 倍に希釈します。

NOTE : ホルムアルデヒド標準液は、使われる分光光度計の精度やサンプル中の妨害物質による阻害が疑われる場合にのみ使用します。

ホルムアルデヒド濃度は、NADH の吸光係数から直接算出します (4 ページ)。

パラホルムアルデヒドは吸入毒性があり、皮膚に付着すると中程度の毒性があります。従いましてこの成分を使用するときは、十分な注意のうえ御使用下さい。

追加緩衝液の調製 (供給外)

- PREPARATION OF ADDITIONAL BUFFERS (not supplied) -

(A) 濃縮ピロリン酸カリウム緩衝液 (1 M, pH 9.0)

ピロリン酸四カリウム塩 (無水; Sigma #322431 または同等品) 330.3 g を蒸留水約 800mL に溶解します。8M HCl を使用して pH 9.0 に調整し、アジ化ナトリウム 0.2g を加えて攪拌して溶解し 1L に定容します。

(B) 希釈緩衝液 (100mM ピロリン酸カリウム緩衝液, pH 9.0)

濃縮ピロリン酸カリウム緩衝液 (A) 100mL に蒸留水 880mL を加え、1M HCl と 1M NaOH を使用して pH 9.0 に調整し、1L に定容します。4°C で 1 年以上安定です。

NOTE : 希釈緩衝液に保存剤としてアジ化ナトリウムを使用しない場合、緩衝液は 4°C に保管して 1 週間以内に使用して下さい。

機器 (推奨):

1. 使い捨て 13mL 容ポリプロピレン試験管。例 Sarstedt #60.541.685 PP.
2. メスフラスコ (500mL)
3. 使い捨てプラスチック製キュベット (光路 1cm、3.0mL)。紫外外部対応のもの
4. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman® (100µL、200µL)
5. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipette®
- 5.0mL Combitip® (緩衝液 1、NAD⁺溶液各 0.2mL 分注用)
- 25 mL Combitip® (蒸留水 2.0mL 分注用)
6. 上皿天秤
7. 分析用天秤
8. 340nm に設定した分光光度計
9. ボルテックスミキサー

A. 分析手順（用手法） - MANUAL ASSAY PROCEDURE -

波長:	340nm
キュベット	光路 1cm（ガラスもしくはプラスチック） 註> 蓋が必須です
反応温度	約 25°C
反応最終容量	2.55 mL
サンプル溶液	ホルムアルデヒド 0.1~14.0 µg (サンプル液量を 0.10~2.00mL とした場合)

空気を対照(レファレンス側にセルを入れない)、または水を対照に分析

ピペットでキュベットに添加	ブランク	サンプル
蒸留水 (約25°C)	2.10 mL	2.00 mL [†]
サンプル溶液	-	0.10 mL [†]
溶液1 (緩衝液)	0.20 mL	0.20 mL
溶液2 (NAD ⁺)	0.20 mL	0.20 mL
混合*し、試薬添加の約2分後、反応液の吸光度測定 (A ₁) 次に以下のものを添加し反応開始:		
溶液3 (FADH)	0.05 mL	0.05 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約15分)後、反応液の吸光度測定 (A ₂)。 15分後も反応が終了していない場合、 2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する**。		

* プラスチック製スパテルで攪拌するか、キュベット蓋またはパラフィンフィルムでキュベットに蓋をして穏やかに反転させる。

** 「クリープ」現象がブランクより大きい場合、吸光度を溶液3の添加時間から外挿する。
(MegaCalc™ エクセル計算シートを使うと便利です)

† サンプル量はサンプルと蒸留水添加量合計の範囲で変更可能(サンプル溶液の項参照)

算出法（用手法）

ブランクとサンプルの吸光度差(A₂-A₁)を測定します。サンプルの吸光度差からブランクの吸光度差を差し引いてΔAを求めます。

十分に正確な結果を得るには、ΔAは少なくとも0.100の吸光度差が必要です。

ホルムアルデヒドの濃度は、以下のように計算することができます。

$$c = \frac{V \times Mw}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

ここで:

V = 最終反応液量 (mL)

Mw = ホルムアルデヒドの分子量

ε = 340nmにおけるNADHの分子吸光係数 = 6,300 (L/mol/cm)

d = 光路 (cm)

v = サンプル液量 (mL)

ここでは0.1mLの例を示します。サンプル量により計算式に補正が必要です。

ホルムアルデヒド濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.55 \times 30.03}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$
$$= 0.1216 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

サンプルを調製中に希釈した場合は、計算結果に希釈係数 F を乗じる必要があります。固体および半固体サンプルを秤量後分析する場合、含有量(g/100g)は、秤量値から以下のように算出されます。

ホルムアルデヒド含量

$$= \frac{\text{ホルムアルデヒド濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*TM を使用することで簡単に計算できます。

B. 分析手順 (自動分析法) - AUTO-ANALYSER ASSAY PROCEDURE -

NOTE:

1. ホルムアルデヒドの自動分析手順は、一点標準法または検量線法の何れかを使用します。
2. 一点標準法または検量線で測定されるホルムアルデヒドの一連の分析バッチごとに、同一ロットの試薬を用いて一度に分析する必要があります。

R1 試薬調製

組成	液量
蒸留水	48.68 mL
溶液1(緩衝液)	5.50 mL
溶液2(NAD ⁺)	5.50 mL
総液量	58.68 mL

R2 試薬調製

組成	液量
蒸留水	6.00 mL
溶液3(FADH)	1.35 mL
総液量	7.35 mL

分析法

- R1: 0.200 mL
試料 ~ 0.01 mL
R2: 0.025 mL
反応温度と時間 25°Cで約15分

波長	340nm
調製試薬の安定性	冷蔵にて2日間以上
定量法	エンドポイント法
反応方向	増加
直線性	サンプル量 0.01mL 時、ホルムアルデヒド約 0.14 g/L まで

C. 分析手順(マイクロプレート法) - MICROPLATE ASSAY PROCEDURE -

NOTE :

1. ホルムアルデヒドのマイクロプレート分析手順は、一点標準法または検量線法の何れかを使用します。
2. 一点標準法または検量線で測定されるホルムアルデヒドの一連の分析バッチごとに、同一ロットの試薬を用いて一度に分析する必要があります。

分析法

波長:	340nm
マイクロプレート	96穴 (ガラスまたはプラスチック製の底が平らなもの)
反応温度	約25°C
最終反応液量	0.255 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、 ホルムアルデヒドで 0.01~1.4 µg/ウェル

ピペットでウェルに添加	ブランク	サンプル	標準
蒸留水	0.210 mL	0.200 mL [†]	0.200 mL
サンプル溶液	-	0.010 mL [†]	-
標準液	-	-	0.010 mL
溶液1 (緩衝液)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
溶液2 (NAD ⁺)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
混合*し、試薬添加の約2分後、反応液の吸光度測定(A ₁) 次に以下のものを添加し反応開始:			
溶液3 (FADH)	0.005 mL	0.005 mL	0.005 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約15分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 15分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する**。			

* マイクロプレートリーダーの自動攪拌機能を使用、もしくは 50~100µL のピペッティング

** この「クリープ」現象がブランクより大きい場合、試料の吸光度を溶液3の添加時間から外挿する

† サンプル量はサンプルと蒸留水添加量合計の範囲で変更可能(直線性の項参照)

算出法 (マイクロプレート法)

$$\text{g/L} = \frac{\Delta A_{\text{試料}}}{\Delta A_{\text{標準}}} \times \text{標準 [g/L]} \times F$$

サンプルを調製中に希釈した場合は、計算結果に希釈係数 F を乗じる必要があります。

サンプルの調製 - SAMPLE PREPARATION -

1. サンプル希釈

キュベット中に添加されるホルムアルデヒドの量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.1~14 μg の範囲である必要があります。従って試料溶液のホルムアルデヒドが 0.001~0.14 g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定ホルムアルデヒド濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.14	希釈不要	1
	0.14~1.4	1 + 9	10
	1.4~14	1 + 99	100
	14~140	1 + 999	1000
	> 140	1 + 9999	10000

サンプル吸光度 ΔA の値が低すぎる(例えば<0.100)場合、サンプル量を増やすか、希釈度を下げます。またはサンプルと蒸留水添加量の合計が 2.10mL となるよう、キュベットに添加するサンプル量を 2.00mL まで増やし、計算式のサンプル量を変える方法もあります。

2. サンプルの取扱い留意点 - Sample handling -

- ホルムアルデヒドは非常に揮発性であるため、全てのサンプルと標準品を密閉容器に保管する必要があります。
- ホルムアルデヒドを含む溶液は、蒸発による損失を最小限に抑えるために、常に緩衝液または水溶液に分注する必要があります。
- ホルムアルデヒドは、大気中の酸素によって容易に酸化されます。従って、サンプルを準備後速やかに分析することが不可欠です。標準液は調製当日に使用する必要があります。
- 標準物質にはホルムアルデヒドよりも揮発性が低く、容易に酸化または重合しないパラホルムアルデヒド粉末を採用しています。

付録 - APPENDIX -

表1. ホルムアルデヒド標準液系列を使用して得られた中間精度

ホルムアルデヒド $\mu\text{g}/\text{テスト}$	分析数	平均 ΔA	標準偏差	% CV
2	12	0.162	0.0030	1.83
4	12	0.323	0.0034	1.05
6	12	0.486	0.0038	0.78
8	12	0.645	0.0019	1.85
10	12	0.810	0.0110	1.36
12	12	0.971	0.0116	1.20
14	12	1.128	0.0129	1.15

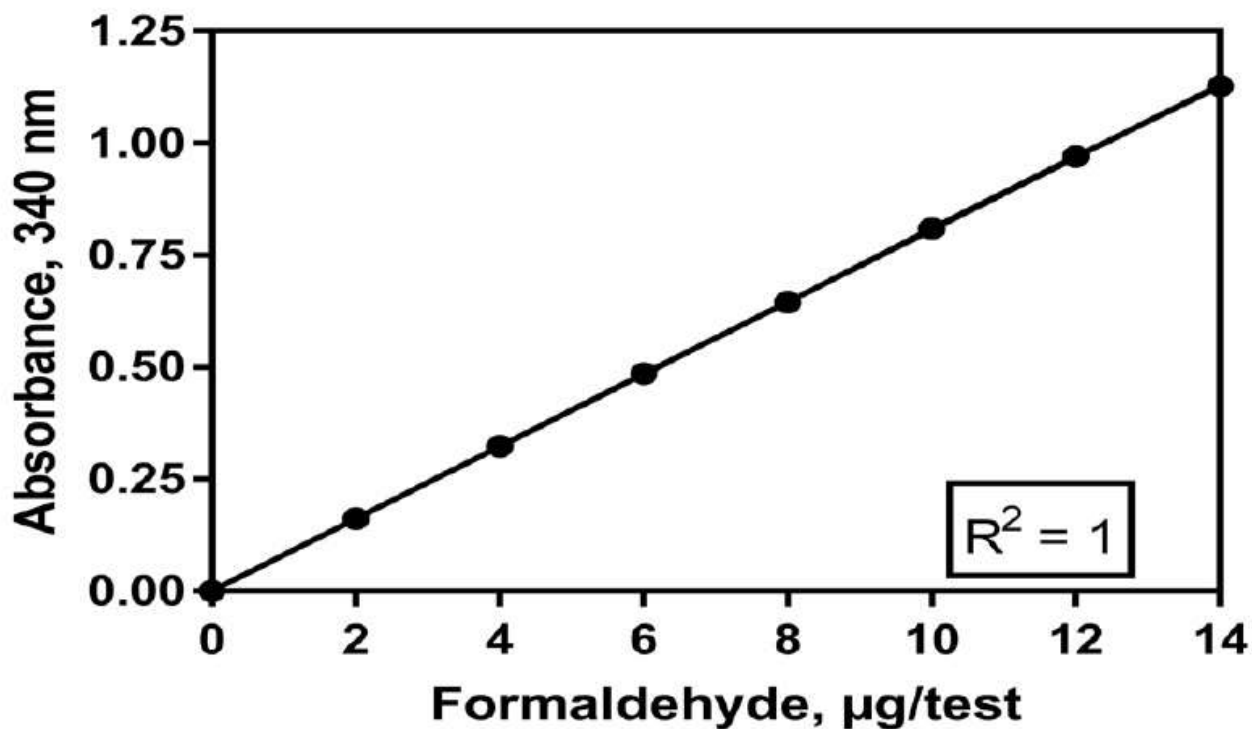


図1. ホルムアルデヒド分析の直線性

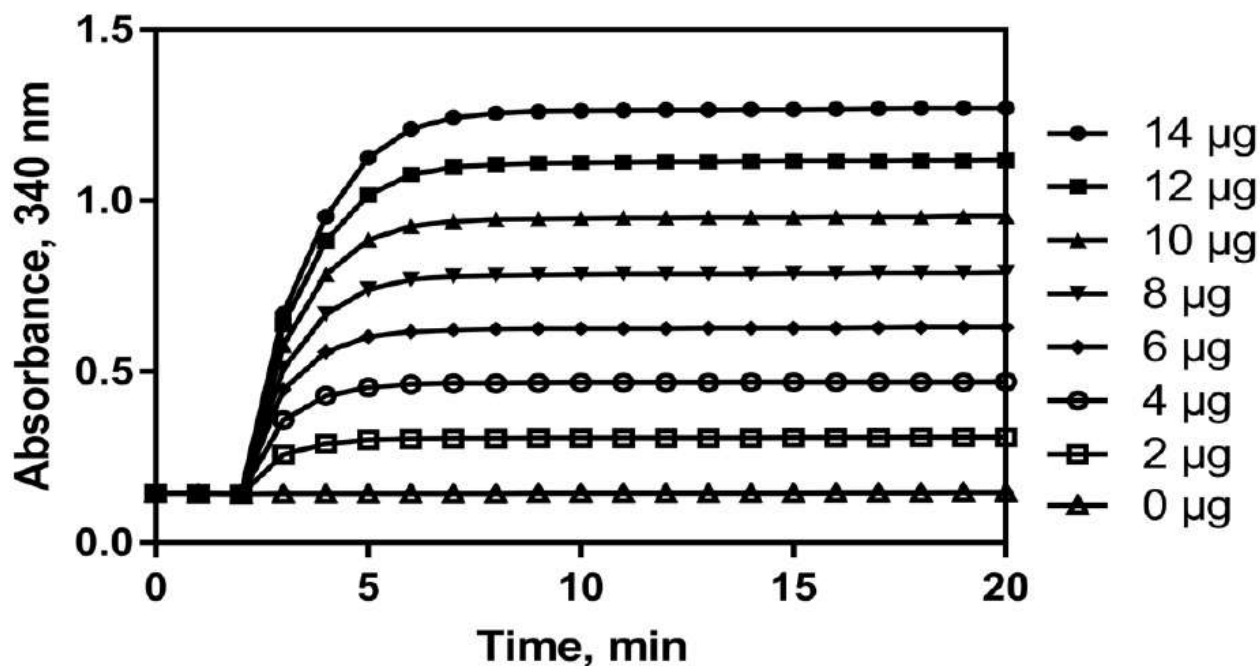


図2. ホルムアルデヒド 0~14 µg 含有試料による 340nm 吸光度の増加

文献 - REFERENCES -

European Food Safety Authority. (2014). Endogenous formaldehyde turnover in humans compared with exogenous contribution from food sources. *EFSA Journal*, 12, 3550-3561.

日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル

TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)

E-mail : bj-megazyme@biocon.co.jp

Homepage : <http://www.biocon.co.jp>

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません