

短報

冷蔵保存における開封後のpH標準液の安定性

外館史祥, 熊坂謙一, 羽田千香子, 甲斐茂美

Stability of pH standard solutions after unsealing their packages under refrigerated storage.

Fumiaki SOTODATE, Kenichi KUMASAKA,
Chikako HADA, Shigemi KAI

諸言

試薬・試液や標準品等の品質は、医薬品検査を始め理化学的な試験検査の品質保証において重要な管理事項の一つである。その中でもpH標準液はガラス電極計を用いたpH計の校正に必要不可欠なものであり、試料の測定のみならず、緩衝液や移動相のpH調製にも必要となる。

pH標準液は、JIS Z8802「pH測定方法」¹⁾や日本薬局方一般試験法pH測定法²⁾に内容は一部異なるものの、それぞれ6種類の規定がされている。これらのpH標準液はトレーサビリティのとれたJCSSのpH標準液を試薬メーカーより購入して使用するのが一般的と思われる。その使用期限については、未開封時の保証期限として容器及び証明書に記載されているが、開封後の使用期限については保証されていない。文献によっては、一度開封したpH標準液をJCSS第2種の精度(±0.015pH)に維持できる期間として、酸性側pH標準液で1ヶ月、アルカリ性側pH標準液で1週間程度とすると記載されている³⁾。また、アルカリ性側のpH標準液は保存条件によっては速やかに低下するとの報告もある⁴⁾。しかしながら、開封後のpH標準液の安定性については文献的にはほとんど知見がなく、使用状況及び保存状況によって異なるものと想定される。

そのため、本研究では、pH標準液のうちフタル酸塩pH標準液、中性りん酸塩pH標準液及びほう酸塩pH標準液の開封後のpHの安定性について、使用状況を反映したモデルケースを設定して検証した。

さらに、二酸化炭素の影響によりpHが変化しやすい

とされるほう酸塩pH標準液については、その保存条件として、容器内空気の窒素置換の有無及び小分け保存によるpHの安定性への影響について検討を行ったので、その結果について報告する。

方法

1. 試薬及び装置

pH標準液は和光純薬工業株式会社製のフタル酸塩pH標準液(pH4.01)、中性りん酸塩pH標準液(pH6.86)及びほう酸塩pH標準液(pH9.18)(いずれもJCSS第2種、500 mL、pHは25°Cの値)を使用した。なお、pH標準液は種類ごとに同一ロットの製品を使用し、1~5°Cで冷蔵保存した。

pHメーターは株式会社堀場製作所製LAQUA F-74SP、pH電極には同社製の複合電極9615-10Dを使用した。なお、pHメーターは、事前に日本薬局方一般試験法pH測定法の規定に準じて、中性りん酸塩pH標準液を用いた5回繰り返し測定による繰り返し性、温度指示値の精度及び校正に使用したpH標準液の規定値と実測値の誤差について適合することを確認した。また、恒温水槽はタイテック株式会社製Personal-10/SX-10Rを使用した。

2. pH測定方法

pHメーターの校正には、測定毎に保証期間内の上記未開封pH標準液3種類を用いた。また、pH測定時は、採取した試験液を水浴中で保温し、25.0±0.1°Cの温度範囲にて測定した。

3. 試験方法

フタル酸塩pH標準液、中性りん酸塩pH標準液及びほう酸塩pH標準液について、冷蔵保存している各同一容器より週1回使用することを想定し、1週間毎に25 mLずつ16週間繰り返し採取するモデルケースを設定した。そのうち、開封時(0週目)、4週目、8週目、12週目及び16週目に採取した各pH標準液のpHを測定した。また、ほう酸塩pH標準液は、メーカーの保存条件に従い採取後に容器内の空気を窒素で置換を行った。

また、ほう酸塩pH標準液については、容器内空気に対する窒素置換の影響を比較検討するため、窒素置換未実施のものを準備し、上記と同様の方法でpHを測定した。なお、窒素置換はパストールピペットを用い液面を泡立てない程度に静かに窒素を吹き入れて行った。

更に、ほう酸塩pH標準液の小分け保存時の安定性検証のため、高密度ポリエチレン製30 mL容器に摺り切り一杯充填し、冷蔵保存した。その小分け保存品について充填時(0週目)4週目、8週目、12週目及び16週目にpHの測定を行った。なお、測定に使用した小分けほう酸塩pH標準液は使い切りとした。

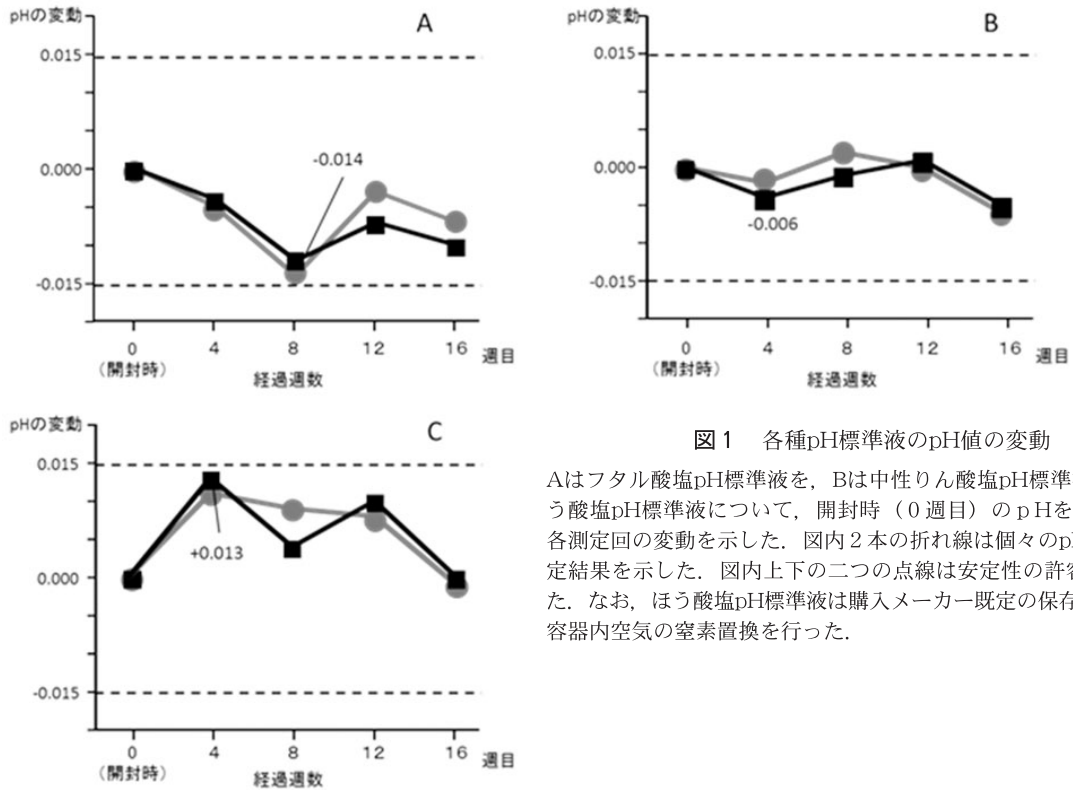


図 1 各種pH標準液のpH値の変動

Aはフタル酸塩pH標準液を、Bは中性りん酸塩pH標準液を、Cはほう酸塩pH標準液について、開封時（0週目）のpHを0とした時の各測定回の変動を示した。図内2本の折れ線は個々のpH標準液の測定結果を示した。図内上下の二つの点線は安定性の許容範囲を示した。なお、ほう酸塩pH標準液は購入メーカー既定の保存条件に従い、容器内空気の窒素置換を行った。

本検討における測定数は、いずれも $n = 2$ とし、安定性の許容範囲は初回測定時のpH値に対してJCSS第2種の精度である ± 0.015 pHとした。

結果及び考察

本モデルケースにおいては、実施期間を長く設定する兼ね合いから週当たりの想定使用頻度を少なく設定しており、採取は週1回25 mLと設定した。

各種pH標準液の開封後のpHの安定性を測定した開封時（0週目）のpHと比較した時の各測定回の最大変動幅は、フタル酸塩pH標準液で-0.014pH、中性りん酸塩pH標準液で-0.006pH、ほう酸塩pH標準液で+0.013pHであり、16週目まで安定であった（図1）。また、各種pH標準液とも許容範囲内における変動は上昇・低下とも特定の傾向は認められなかった。

一般にpH標準液を繰り返し使用する場合は、容器から一定量取り出して使用するため、容器内の空気は増大し、空気も入れ替わる。JIS Z8802「pH測定方法」¹⁾によれば、ほう酸塩調製pH標準液及び炭酸塩調製pH標準液は、二酸化炭素などを吸収してpH値が低下すること、日本薬局方一般試験法pH測定法²⁾では、アルカリ性側pH標準液の保存として二酸化炭素吸収管を付けての保存が有効との記載があるように、容器内空間の二酸化炭素は、アルカリ性側pH標準液のpHの安定性に影響を及ぼすものと考えられる。そこで、ほう酸塩pH標準液を

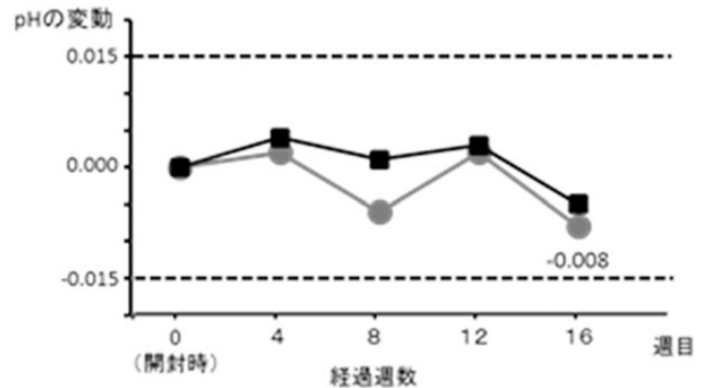


図 2 窒素置換未実施におけるほう酸塩pH標準液のpH値の変動

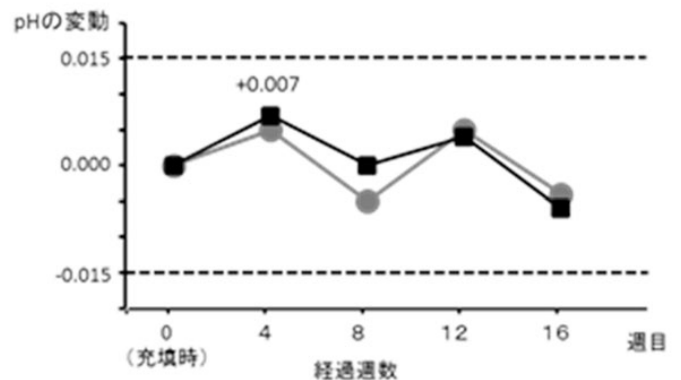


図 3 小分け保存したほう酸塩pH標準液のpH値の変動

用いて、二酸化炭素を含む容器内の空気のパHの安定性への影響を以下の2つの方法で検討した。

初めに、容器内空気の窒素置換の有無の影響については、窒素置換を行わない場合であっても、開封時(0週目)のpHと比較した時の各測定回の最大変動幅は-0.008 pHであり、窒素置換を行ったものと同様に16週目まで安定であった(図2)。次に使い切りを想定し、pH標準液を摺り切り一杯で空気の入らないように充填率100%として小分け保存した場合の安定性については、小分け直後(0週目)のpHと比較した時の各測定回の最大変動幅は+0.007pHであり、16週目まで安定であった(図3)。

本検討においてほう酸塩pH標準液のpH値が長期間安定であった要因として、その保存条件の寄与が考えられる。四角目らの報告⁵⁾によれば、容器の材質、保存温度及び充填百分率の影響が大きいとされており、容器材質は高密度ポリエチレン製、保存温度は5℃及び充填百分率は100%が最適な保存条件とされている。本検討でもほぼ同一の保存条件下で安定性を検討していたことから、そのpHの安定性に大きく寄与したものと考えられる。なお、高密度ポリエチレン容器は低密度ポリエチレン容器と比較し二酸化炭素、窒素及び酸素ガスの透過率が低いことが知られており⁶⁾、小分け保存時の容器の選択に留意する必要があると考えられた。

また、中村らの報告⁴⁾によると、ほう酸塩標準液は、容器内に空間のある状態にて実験室内に保存するとpH値は徐々に低下し、1か月の保存では精密分析用標準液として使用できなくなる。本検討では窒素置換未実施のほう酸塩pH標準液でも容器内の空間があったにもかかわらずpHへの影響は見られない。しかし、このことは直ちに二酸化炭素がほう酸塩pH標準液のpHの安定性に影響しないということではなく、モデルケースにおける週1回の使用頻度では、容器内空気の外気との交換頻度が少なく、pHの変動を引き起こすほどの影響は無かった可能性もある。そのため、使用頻度の増加により、容器内空気と外気との交換頻度が増えれば、pHの安定性に影響する可能性も否定できない。

また、保存温度については、各pH標準溶液とも容器に25℃以下で保存する旨の注意書きがある。今回は実質的に1~5℃で保存していたことから、四角目らの示した至適温度条件に近く、pHの安定性に寄与した可能性も考えられた。

なお、今回購入した製品には、フタル酸塩pH標準液にはチモール0.04%、中性りん酸塩pH標準液にはアジ化ナトリウム0.1%が防腐剤として使用されている。チモールのようなフェノール系化合物の抗菌作用は細胞膜に機

能的・構造的に障害を与え⁷⁾、アジ化ナトリウムは細菌内のシトクロムオキシダーゼやカタラーゼに含まれるヘム鉄と結合し静菌作用を引き起こす⁸⁾ことが報告されている。そのため、防腐剤の使用は微生物の増殖を抑え二酸化炭素の産生を防いでいることでpHの安定性に寄与している可能性がある。なお、他のメーカーのJCSSのpH標準液には防腐剤不含の製品や、保存条件の異なる製品もあるため、その影響については検討が必要である。

まとめ

3種類のpH標準液を用いて開封後のpH標準液の安定性についてモデルケースを設定して検討したところ、いずれも16週目まで安定であった。また、ほう酸塩pH標準液は二酸化炭素による影響を検討するため容器内空気の窒素置換の有無及び小分け保存について検討したところ、いずれも16週目まで安定であった。今回の研究結果では開封後のpH標準液も安定であることが示されたが、保存条件及び防腐剤の有無等により安定性が異なる可能性もある。そのため、開封後のpH標準液の使用期限を決める際には、実態に合った使用頻度及び保存条件、その他、購入メーカー又は自家調製による相違点等により、各々に検証する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 一般財団法人日本規格協会：JIS Z8802: pH測定方法, pp1-8, 一般財団法人日本規格協会(2011)
- 2) 厚生労働省告示第64号: 第十七改正日本薬局方(平成28年3月7日), 一般試験法2.54 pH測定法
- 3) 田中龍彦：JIS使い方シリーズ 化学分析の基礎と実際, 第1版, 田中龍彦編, pp.109-120, 一般財団法人日本規格協会(2008)
- 4) 中村進, 札川紀子, 川瀬晃：pH標準液の安定性, 分析化学, **28**, 39-42(1979)
- 5) 四角目和広, 栗原力, 中村進, 久保田正明：pH標準液の保存条件の検討, 分析化学, **37**, 17 - 21(1988)
- 6) 葛良忠彦：包装材料としての高分子フィルム, 繊維と工業, 41,348-354(1985)
- 7) Makhil S.,Kumar S., Giri A.:Effectiveness of thymol in extending keeping quality of cottage cheese, J Food Sci Technol,**51**, pp.2022-2029(2014)
- 8) Winter C., Kerros ME., Weinbauer MG.: Effect s of sodium azide on the abundance of prokaryotes and viruses in marine samples, PLoS One,**7**,pp.1-4(2012)