

内分泌攪乱物質関連標準液(フェノール類)の開発

Development of Standard Solutions for Endocrine Disruptors (phenols)

財団法人 化学物質評価研究機構 東京事業所 化学標準部

宮田 由起子

YUKIKO MIYATA

四角目 和広

KAZUHIRO SHIKAKUME

Chemical Standards Department, Tokyo Laboratory, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan (CERI)

1. はじめに

最近、さまざまな分野において認証、品質システム、トレーサビリティなどの用語が用いられるようになった。その背景には、社会や経済のグローバル化に伴い、地球環境問題、製品の質や安全に関する問題などが、ひとつの国だけでは解決できないほど大きな問題として注目を集め、これらの問題を新しい枠組みで解決しようとする国際的な動きがある。このような状況のなか、化学的な分析は、これらの問題に対する現状把握や解決のためには欠かせない重要な部分を占めている。これらの化学的な分析においては、質量や体積の測定を基本とした重量分析や容量分析から、高度な機器を用いる機器分析の占める部分が大きくなり、最近の化学分析とは、機器分析を指すと言っても過言ではないほど機器分析法が多く用いられるようになってきている。最近の化学的な分析結果の多くが様々な機器分析法によるものであり、内分泌攪乱物質(いわゆる環境ホルモン)やダイオキシン類などは、機器分析計によらなければ測定できない物質である。ところがこれらの機器分析の結果として得られる値は電流値や電圧値であり、測定対象物の濃度として換算するためには、電流値や電圧値と測定対象物の濃度との関係が明らかとならなければならない。このために必要となるのが標準物質ということになる。従来行われてきた重量分析などの化学分析では、主に分析者の技能が分析結果の質を左右していたようであるが、一般的な機器分析では前処理操作等を除けば、分析者の技能に左右される部分は少なくなり、機器分析には必要不可欠な標準物質の質

がそのまま分析値の質に繋がっている。このような意味から標準物質の信頼性が、そのまま機器分析による測定結果の信頼性を左右することとなる。標準物質の重要性はこの点にあるといえる。特にトレーサビリティを形成する手順によってその特性値が決定された認証標準物質は、国際社会の中でその重要性が一層増大している。また、分析機器の高感度化、高精度化にはめざましいものがあり、測定結果の信頼性という点では分析機器そのものの信頼性だけでなく、試験環境や分析方法と併せて、分析機器の校正に用いる標準物質の信頼性も重要な問題であると考えられているのが現状である。

一方、経済産業省(当時は、通商産業省)は、産業技術審議会・日本工業標準調査会合同会議知的基盤整備特別委員会を設け、計量標準、標準物質、生物資源情報、化学物質安全、材料関連知的基盤及び生活・福祉関連知的基盤の分野について、その推進方策を検討し、平成10年6月に「我が国の知的基盤の充実に向けて」と題した報告書¹⁾を取りまとめた。その中で標準物質については、平成13年度末(2001年度末)までに平成10年度当時の42物質を120物質までに整備拡充するとし、これらの施策に加え、内分泌攪乱物質として疑いのある物質の計測に必要な標準物質の開発も提案された。

このような背景のもと、当機構では環境ホルモン計測に必要な標準物質のうち、フタル酸エステル、フェノール類等の標準物質の開発を行ってきた。このうち、本稿ではフェノール類の標準物質の開発の状況について紹介する。

2. 開発の内容

2.1 概要

これまでも当機構では、計量法トレーサビリティ制度(Japan Calibration Service System:JCSS)における標準物質供給体系に基づいて、標準物質を供給することを目的とした標準物質の開発を行っており、濃度値が精確で保存安定性に優れた標準液を供給するために

- ・純度の決定された高純度基準物質
- ・高精度な調製技術
- ・再現性の良い測定方法
- ・標準液の保存安定性の評価 等

を検討項目としてあげ無機標準液、有機標準液について開発を進めてきた。

本研究では、ビスフェノールA、4-n-ニルフェノール及び2,4-ジクロロフェノールについての基準物質の純度確定、単成分標準液の調製方法の確立、濃度測定方法の確立、保存安定性の評価、さらに4-t-ブチルフェノール、4-n-ヘプチルフェノール、4-t-オクチルフェノール、ビスフェノールA、4-n-ニルフェノール及び2,4-ジクロロフェノールのフェノール類6種混合標準液について、標準液の調製方法の確立、濃度測定方法の確立、保存安定性の評価を行った。

2.2 標準液の原料

2.2.1 基準物質

基準物質を原料とする特定標準液は国家標準となるものである。したがって基準物質は高純度であることに加え、その純度値が国際単位(SI)にトレーサブルな方法で決定され、表示されていることが必要となる。基準物質の高純度化、純度の決定は独立行政法人 産業技術総合研究所(以下、産総研という)が行った。基準物質の純度値が99.9%程度となることを目標として合成または精製方法を検討したが、最終的には市販試薬から純度の高い原料を選定し、これを再結晶または蒸留法にて精製することにより高純度化を図った。精製された基準物質は、一次標準測定法(SIにトレーサブルな測定法)である凝固点降下法により純度が測定された。純度値はビスフェノールAが99.93%、4-n-ニルフェノールが99.86%、2,4-ジクロロフェノールが99.69%であった。なお、これら純度値の標準不確かさは0.02%~0.08%であった。

2.2.2 溶媒

溶媒のみを標準液の測定と同条件で測定した際に、定量成分の面積値の算出に影響を与えるクロマトグラムが得られる場合がある。これは主として溶媒中に元々含まれる夾雑成分の影響であるが、定量成分そのものでなくとも妨害成分となりうるため、分析装置、分析条件等に広く依存する。そのため妨害成分が全くないことを証明することは事実上不可能であり、よって検出限界付近の濃度の標準液のクロマトグラムと溶媒のみのクロマトグラムを比較することで、溶媒ブランクとして求めることとした。産総研において以下のような検討が行われ、標準液の溶媒として用いたメタノール及びヘキサンについての溶媒ブランクの不確かさが算出された。

まず、検出限界付近の濃度の標準液として濃度100 μ g/Lのフェノール類混合標準液を調製した。希釈に用いた溶媒はメタノール(関東化学製水質試験用)及びヘキサン(関東化学製水質試験用)である。この標準液及び溶媒を高速液体クロマトグラフにより同条件で分析してクロマトグラムを得た。標準液の分析で得られたクロマトグラムから算出した定量成分のS/Nと、溶媒の分析で得られたクロマトグラムから算出した各定量成分の保持時間付近のS/Nを比較し、溶媒の分析におけるS/Nが標準液の分析におけるS/N以上でないことを確認した。したがって、メタノール、ヘキサンとも定量成分であるビスフェノールA、4-n-ニルフェノール、2,4-ジクロロフェノールに関して、溶媒に起因する妨害成分は100 μ g/L以下であることが保証された。そこで溶媒ブランクの不確かさとしては、妨害成分の濃度が標準液として調製した各定量成分の濃度100 μ g/Lと0 μ g/Lの間の一様分布であると仮定し、 $100/2\sqrt{3}\approx 30\mu\text{g/L}$ とした²⁾。以上のことより、溶媒ブランクの不確かさとして、標準液の濃度が1000mg/Lの場合は0.003%、また100mg/Lの場合は0.03%と見積もった。

2.3 標準液の調製方法

標準液の調製は、操作のしやすさと気密性の高さから、テフロン製ピストンシール型スクリューキャップ付密閉型ガラス容器を調製容器とし、質量比混合法で行う方法とした³⁾。まず、質量を測定した調製容器に原料を入れてひょう量し、溶媒を加えて10000mg/Lの試料原液とした。この試料原液を質量比法により順次希釈して単成分標準液(1000mg/L)及び混合標準液(100mg/L)を調製した。

調製した標準液の種類は、単成分標準液(1000 mg/L)としてビスフェノールA、4-n-ニルフェノール及び2,4-ジクロロフェノールのメタノール溶液及びヘキサン溶液(ビスフェノールAについてはメタノール溶液のみ)、また混合標準液(100mg/L)として4-t-ブチルフェノール、4-n-ヘプチルフェノール、4-t-オクチルフェノール、ビスフェノールA、4-n-ニルフェノール及び2,4-ジクロロフェノールを混合したメタノール溶液(6種)及びヘキサン(ビスフェノールA以外の5種)溶液である。

2.4 標準液の測定方法

ガスクロマトグラフ法または高速液体クロマトグラフ法による測定方法の比較検討を行った。まず、フェノール類混合標準液(メタノール溶液及びヘキサン溶液)をオートインジェクタにて連続注入し、5回の繰返し測定におけるピーク面積の変動係数(%)を各条件について比較した。ガスクロマトグラフ法においては、パージバックドカラム注入よりも、クールオンカラム注入を行った条件が変動係数が小さく、各物質について変動係数が0.08~0.24%となり再現性は良好であった。高速液体クロマトグラフ法については、ステップワイズ溶離法に比べグラジエント溶離法が変動係数が小さく、その変動係数は0.04~0.09%であった。さらに、標準液の濃度付近である80~120mg/Lの範囲で濃度を変えて調製した標準液をガスクロマトグラフ及び高速液体クロマトグラフにて測定し、ピーク面積と調製濃度の関係から検量線の直線性を確認した。信頼性のある標準液を供給するためには、より再現性の良い測定方法での値付けが必要であるので、フェノール類標準液の測定方法としては高速液体クロマトグラフ法を用いることとした。測定条件を

表1に示す。

表1 フェノール類標準液の測定条件

装置	高速液体クロマトグラフ
検出器	UV 検出器 (277nm)
カラム	ODS カラム 4.6mm i.d.×250mm
カラム槽温度	40℃
試料導入装置	オートインジェクタ
試料注入量	10 μL
溶離液の組成	アセトニトリル/水 溶離法、組成比率は標準液の種類により異なる
溶離液の流量	1.0mL/min

2.5 標準液の保存安定性

標準液の濃度は、長期の保存により仮に濃度変化があったとしてもその変化分を補正せずに初期に決めた値を標準液の濃度として用いるため、標準液はその保存安定性が評価されていることが必要である。標準液の保存安定性試験として、上述の調製、測定方法を用いて次のような試験を行った。

調製した標準液をほうけい酸ガラス製褐色アンプルに充てんしてバーナーで熔封したのち、5℃及び20℃で保存した。濃度の測定は調製直後を0ヶ月目とし、保存後3ヶ月目、6ヶ月目の計3回、保存したアンプルを3本ずつ取り出し、その都度新たに調製した検量線用標準液を基準として行った。その結果、測定濃度の調製濃度からの偏差は全ての条件において±0.5%以内となり、標準液の保存安定性が確認され、またアンプル間に差が無いことが確認された。フェノール類6種混合標準液(メタノール溶液)を20℃保存した結果を図1に示す。また、アンプルに充てん後、5℃で保存した場合と20℃で保存した場合の測定値からEn値⁴⁾を計算した結果、両者は不確かさの範囲で一致し(En<1)、保存温度による有意な差がないことが確認された。

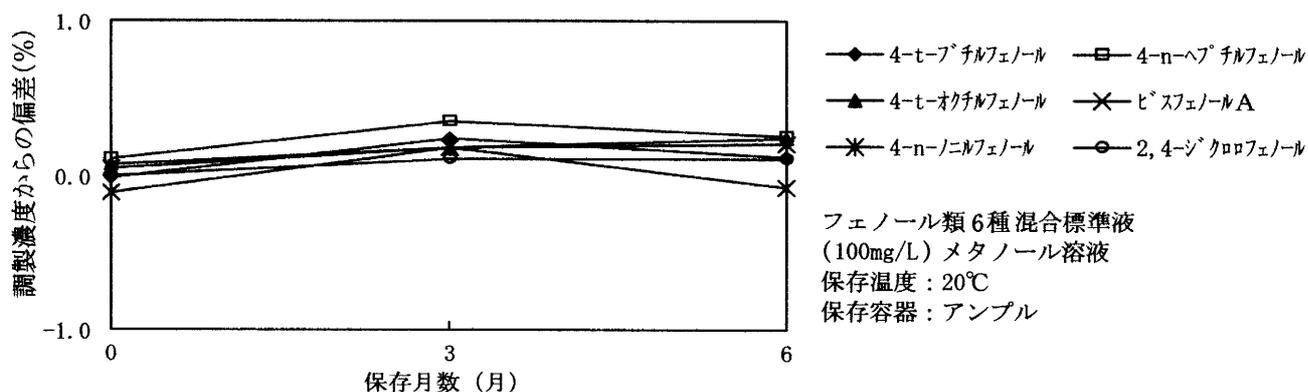


図1 フェノール類標準液の保存安定性

2.6 標準液の不確かさ

計量法における標準物質供給体系において標準液を供給する場合、特定標準液による特定二次標準液への値付け(jcss校正)においては、その値付けされた濃度値とともにその不確かさを明らかにする必要がある。そのため、標準物質の開発の一部として不確かさの算出を行った。

まず、標準液の不確かさを見積もるにあたり、要因として基準物質純度の不確かさ、溶媒ブランクの不確かさ、特定標準液(検量線用標準液)調製の不確かさ、値付け(濃度測定)の不確かさ、6ヶ月の安定性の不確かさを取り上げ、それぞれの不確かさを算出した。調製の不確かさ及び測定の不確かさを算出するために、独立した4個の検量線用標準液を調製して、標準液の濃度を繰返し測定する試験を行った。ここで得られた測定値の解析では、jcss校正(特定標準液を1回調製して特定二次標準液の濃度を測定し、測定濃度は3回測定の平均値で表示する値付け法)を想定し、1回調製の不確かさ、3回測定の不確かさを算出した。開発された方法による標準液の調製の標準不確かさは0.00%~0.32%、また測定の標準不確かさは0.07%~0.19%であった。さらに、保存安定性試験の結果を統計的に解析した結果、6ヶ月間の保存安定性の標準不確かさは、各物質について0.04%~0.22%と見積もられた。

さらに、各要因の不確かさをもとに、不確かさの伝播則に従って標準液の不確かさを計算した。その結果、特定標準液により値付けする場合の特定二次標準液の拡張不確かさは、単成分標準液(1000mg/L)で0.3%~0.6%(k=2)、混合標準液(100mg/L)で0.3%~0.9%(k=2)と見積もられた。不確かさの一例を表2に示す。

2.7 混合標準液の測定における検量線用標準液の種類

混合標準液は、単成分標準液に比べ調製における操作が複雑になり、また測定条件も各成分の分離を十分に考慮しなければならない。したがって、調製方法及び測定条件によっては、混合標準液の測定において混合標準液を検量線用標準液として用いた場合と、単成分標準液を検量線用標準液として用いた場合との間で、測定濃度に差が生ずることも考えられる。そこで次のような試験を行い、検量線用標準液の種類による測定濃度間の差異について検討した。

まず、混合標準液と単成分標準液をそれぞれ4回ずつ調製し、これらを検量線用標準液として混合標準液の濃度を測定した。測定は一つの検量線用標準液につき3回ずつ行い、得られた24個の測定値をJIS Q 0035⁵⁾に基づいて解析した。解析の手順としては、まず一元配置の二段枝分かれを用いて有意差検定を行い、次に一元配置の分散分析を行い、jcss校正(調製1回、測定3回)

表2 標準液の不確かさの一例

物質	溶媒の種類	保存温度	原料純度と溶媒ブランク		検量線用標準液 μ_{p1} 調製	濃度測定 μ_{k3} 3回測定	保存安定性 μ_{s1} 6か月	合成標準不確かさ u_c	拡張不確かさ U (k=2)
			原料	溶媒					
単成分標準液 (1000mg/L)									
ヒスフェノール A	メタノール	5°C	0.02	0.003	0.07	0.11	0.09	0.16	0.4
		20°C	0.02	0.003	0.07	0.11	0.05	0.14	0.3
4-n-ニルフェノール	ヘキサン	5°C	0.04	0.003	0.08	0.11	0.14	0.20	0.4
		20°C	0.04	0.003	0.08	0.11	0.04	0.15	0.3
2,4-ジクロロフェノール	ヘキサン	5°C	0.08	0.003	0.07	0.07	0.08	0.15	0.4
		20°C	0.08	0.003	0.07	0.07	0.04	0.13	0.3
混合標準液 (100mg/L)									
4-t-ブチルフェノール	メタノール	5°C	0.02	0.03	0.08	0.13	0.06	0.17	0.4
		20°C	0.02	0.03	0.08	0.13	0.12	0.20	0.4
4-n-ヘプチルフェノール	メタノール	5°C	0.05	0.03	0.22	0.16	0.10	0.29	0.6
		20°C	0.05	0.03	0.22	0.16	0.13	0.31	0.7
4-t-オクチルフェノール	メタノール	5°C	0.20	0.03	0.00	0.15	0.07	0.26	0.6
		20°C	0.20	0.03	0.00	0.15	0.14	0.29	0.6
ヒスフェノール A	メタノール	5°C	0.02	0.03	0.11	0.16	0.21	0.29	0.6
		20°C	0.02	0.03	0.11	0.16	0.11	0.22	0.5
4-n-ニルフェノール	メタノール	5°C	0.04	0.03	0.20	0.13	0.14	0.28	0.6
		20°C	0.04	0.03	0.20	0.13	0.22	0.33	0.7
2,4-ジクロロフェノール	メタノール	5°C	0.08	0.03	0.00	0.17	0.08	0.20	0.5
		20°C	0.08	0.03	0.00	0.17	0.09	0.21	0.5

表3 検量線用標準液による測定濃度の比較

検量線用標準液の種類	混合標準液		単成分標準液		En 値
	測定濃度 (mg/L)	不確かさ (k=2) (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	不確かさ (k=2) (mg/L)	
4-t-ブチルフェノール	100.66	0.26	100.86	0.26	0.57
4-n-ヘプチルフェノール	99.05	0.22	99.31	0.24	0.80
4-t-オクチルフェノール	98.24	0.31	98.08	0.44	0.30
4-n-ノニルフェノール	100.47	0.74	100.59	0.53	0.14
2,4-ジクロロフェノール	98.58	0.34	98.73	0.24	0.35

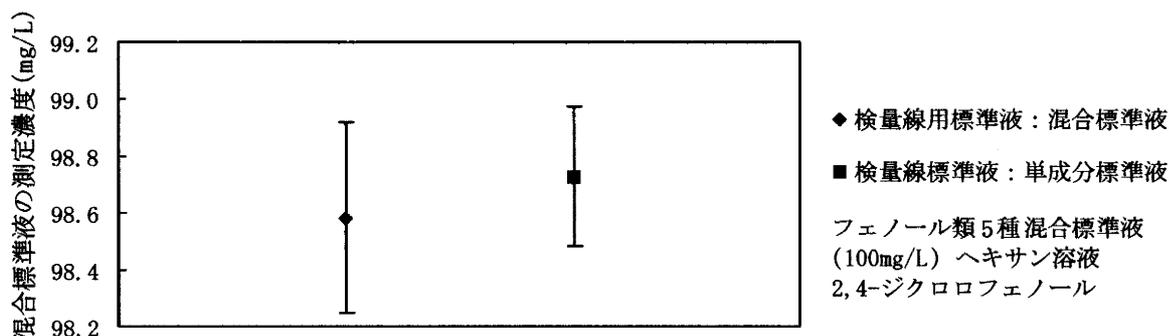


図2 検量線用標準液の種類による測定濃度の比較

における不確かさの算出を行った。解析の結果、有意差検定では検量線用標準液が混合標準液の場合と単成分標準液の場合で、有意な差(有意水準5%)があることが示唆された物質があったが、全ての物質において測定値は不確かさの範囲内で一致した(En<1)。一例としてヘキサン溶液の結果を表3及び図2に示す。このことから、当該試験法において混合標準液の調製及び測定は問題なく行われており、混合標準液の測定に用いる検量線用標準液としては、混合標準液また単成分標準液のいずれを用いても問題ないと判断された。

3. まとめ

本研究を含め、当機構では平成11年度から13年度にかけて環境ホルモン計測に必要とされる標準物質のうちフタル酸エステル4物質の単成分標準液及び混合標準液、フェノール類6物質の単成分標準液及び混合標準液の開発を行った。標準液の調製に用いる基準物質の純度を国際単位(SI)にトレーサブルな方法で決定し、標準液の調製方法及び測定方法を検討して、保存安定性のすぐれた精確な標準液を開発した。さらに標準液の不確かさを算出して、環境ホルモン計測に必要な計10物質の標準物質が、計量法トレーサビリティ制度において特定標準物質として指定され、精確で不確かさの明らかな

標準液を供給する準備が整った。今後、これら標準物質の供給に向けての取り組みが期待される。

なお、この開発は新エネルギー・産業技術総合開発機構からの委託により実施したものであり、横浜国立大学大学院工学研究院教授佐藤寿邦氏を委員長とする「内分泌攪乱化学物質関連標準物質の研究開発委員会」を設置して進めた。さらに、基準物質の純度確定は共同研究機関である独立行政法人産業技術総合研究所の協力を得て実施した。委員会委員及び関係者の皆様方に謝意を表します。

参考文献

- 1) 産業技術審議会・日本工業標準調査会合同会議知的基盤整備特別委員会, 報告書 我が国の知的基盤の充実に向けて(平成10年6月).
- 2) ISO 6143(2001).
- 3) 上野博子, THE CHEMICAL TIMES, No.187,1(2003).
- 4) JIS Q 0043-1, 試験所間比較による技能試験 第1部:技能試験スキームの開発(1998).
- 5) JIS Q 0035, 標準物質の認証—一般的及び統計学的原則(1997).