

標準物質協議会

# 会 報

2020・3  
第 85 号

Japan Association of Reference Materials

## 目 次

1.  $^1\text{H}$  核定量核磁気共鳴分光法と HPLC の組み合わせによるヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液の値付け・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
2. 最近のトピックスから・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
3. 標準物質協議会見学会報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14
4. 編集後記・・ 17

## $^1\text{H}$ 核定量核磁気共鳴分光法と HPLC の組み合わせによる ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液の値付け

標準物質協議会 事務局

本稿は、公益社団法人日本分析化学会及び著者の許可を得て、学術誌である「分析化学(BUNSEKI KAGAKU)」誌から転載したもので、標準物質協議会事務局が Vol.67, No.9, pp. 541-549 (2018) の掲載論文の内容を変更せずに編集したものです。ただし、

式(1)及びそれに続く式の説明については、修正があり、その修正が反映されています。また、編集の都合上、本文中の図(Fig.)及び表(Table)は、本文と分離し、本文の後ろに掲載しました。

## $^1\text{H}$ 核定量核磁気共鳴分光法と HPLC の組み合わせによる ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液の値付け

黒江 美穂<sup>\*1</sup>, 斎藤 直樹<sup>1</sup>, 山崎 太一<sup>1</sup>, 西崎 雄三<sup>2</sup>, 杉本 直樹<sup>2</sup>, 沼田 雅彦<sup>1</sup>, 井原 俊英<sup>1</sup>

多成分の有機化合物の測定方法として、我々は定量核磁気共鳴分光法(qNMR)とクロマトグラフィーを併用した分析法の研究を進めてきた。本法は qNMR とクロマトグラフィーを併用することで、分析対象成分ごとの標準物質が不要であるという qNMR の利点に加え、qNMR の測定ではシグナルどうしが重なるような多成分溶液の濃度測定が可能となる。本研究では、鎖長の異なる成分を不純物として含むために  $^1\text{H}$  qNMR のみでは分離定量が難しい非イオン界面活性剤標準液の値付けに本法の適用を試みた。検討対象とした非イオン界面活性剤であるヘプタオキシエチレンドデシルエーテルは、紫外吸光光度検出器で汎用される波長域に特徴的な吸収がないことから、真空紫外域の波長で検出を行った。このとき示差屈折率検出器を併用したデュアル検出とすることで、測定値の検証が行えるように工夫した。本法を用いて  $1000\text{ mg L}^{-1}$  のヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液の認証標準物質を測定したところ、相対拡張不確かさ  $1.5\%$  ( $k=2$ )での定量が可能であり、得られた濃度は認証値と満足できる一致を得た。

### 1 諸言

一般的に、機器分析により有機化合物を定量するためには、分析対象成分ごとに対応する標準物質を用意する必要がある。標準物質の値付けを行う際の手法として、近年、急速に普及しているのが  $^1\text{H}$  核定量核磁気共鳴分光法( $^1\text{H}$  qNMR)である<sup>1)~3)</sup>。 $^1\text{H}$  qNMR は基準となる特定の物質中の  $^1\text{H}$  の物質量を参照して、分析対象成分に含まれる  $^1\text{H}$  の物質量を定量することで、その純度や濃度を知ることができる方法であり<sup>1)~4)</sup>。 $^1\text{H}$  量の基準となる物質から様々な分析対象成分の物質量を直接求めることができるため、迅速な値付けが可能である。しかし、 $^1\text{H}$  qNMR では  $^1\text{H}$  を含む溶媒中の成分を精確に定量することは一般に困難であり、加えて  $^1\text{H}$  シグナルのケミカルシフトが近い類似構造物質間の分離定量が難しいという弱点を有する。そのため、多数の類似構造の分析対象成分が  $^1\text{H}$  を含む溶媒に溶解している混合溶液の直接定量は事実上不可能であり、これまでの適用例の多くは高純度有機化合物の純度評価であった。

多成分溶液中の成分の定量には、分離に優れたクロマトグラフィーが有力な手法であり、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やガスクロマトグラフィーによる多成分同時定量が広く普及している。しかしながら、クロマトグラフの検出器には分析対象成分の絶対量を直接出力できるもの

がないため、例えば、内標準法で定量を行う際には、分析対象成分と内標準物質それぞれの検出感度と濃度を感度係数で予め紐づけておく必要がある。そのため、分析対象成分ごとにその純度あるいは濃度が評価された標準物質が必要となる。

$^1\text{H}$  qNMR とクロマトグラフィーのそれぞれの弱点を克服するために、近年  $^1\text{H}$  qNMR とクロマトグラフィーを併用した新しい分析法(以下、qNMR/クロマトグラフィー)の研究が進んでいる<sup>5)~11)</sup>。本法は、 $^1\text{H}$  qNMR によって求めた内標準物質に対する分析対象成分の物質量比を横軸とし、クロマトグラフィーによって求めた内標準物質に対する分析対象成分の応答比を縦軸として作成した検量線の傾きである相対モル感度(Relative Molar Sensitivity, RMS)を用いる。通常の内標準法における濃度比の代わりとして、 $^1\text{H}$  qNMR によって求めた物質量比を用いるため、純度あるいは濃度が評価された標準物質を分析対象成分ごとに用意する必要がない。試料となる混合溶液中の各成分は、内標準物質を一定量添加した試料溶液をクロマトグラフィーで分離して得られたそれぞれのピーク面積と、あらかじめ求めておいた RMS から定量できる。本法を用いることで、 $^1\text{H}$  qNMR 単独では定量が困難な多数の類似成分が  $^1\text{H}$  を含む溶媒に溶解している場合においても値付けが可能になる。

一方、界面活性剤のように疎水性基もしくは親水性基の鎖長が異なる不純物を多く含む系においても  $^1\text{H}$  qNMR の適用は困難である。例えば、界面活性剤の中でも使用量が多いポリオキシエチレンアルキルエーテル系の非イオン界

\*E-mail : miho-kuroe@aist.go.jp

<sup>1</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センター : 305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 3

<sup>2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所 : 210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-26

面活性剤は、多量に存在すると泡立ちにより水道水の品質を悪化させる。そのため、水道法で水道水質基準項目として検査が義務づけられており、精確な濃度を保証した標準液の供給が求められている。しかし、指標成分として用いられるヘプタオキシエチレンドデシルエーテル（以下、HOEDE, Fig. 1）は、一般にアルキル鎖やポリオキシエチレン鎖の長さが異なる不純物を含むことが知られており<sup>12)13)</sup>、<sup>1</sup>H qNMR ではそれらが主成分と分離できない。したがって、精確な濃度を保証するには、GC/MS や LC/MS などにより不純物を評価して純度を求めたものを原料として、質量比混合法によって調製するため、純度評価に多大な時間とコストがかかるうえに HOEDE の吸湿性により精確な調製が難しいという欠点があり、濃度の保証された認証標準物質(Certificated Reference Material, CRM)としての HOEDE 標準液は数少ないのが現状である。

そこで本研究では、予め精製して不純物を取り除いた少量の HOEDE を用いて RMS を求めておくことで、HOEDE 標準液の qNMR/クロマトグラフィーによる迅速かつ精確な定量を試みた。HOEDE 標準液の定量に qNMR/クロマトグラフィーを適用するために課題となるのが、HPLC における検出器の選定である。逆相分配 HPLC により、HOEDE に含まれるアルキル鎖やポリオキシエチレン鎖の長さが異なる不純物を分離することが可能であるが、HOEDE は紫外外部に特徴的な吸収を持たないことから HPLC で汎用される紫外吸光度(UV)検出器の適用が難しい。そこで、HOEDE に適用できる、真空紫外域の波長における UV 検出を適用することとした。しかし、真空紫外域は選択性が低いため、UV 検出器と示差屈折率(RI)検出器を直列につないだデュアル検出とすることで、クロマトグラム上で分析対象成分に不純物が重なる可能性について相互に検証できるように工夫した。さらに、濃度の保証された CRM である HOEDE 標準液について濃度評価を行い、本測定方法の妥当性を確認した。

## 2 実験

### 2.1 試薬

内標準物質には、国際単位系(SI)へのトレーサビリティが保証された標準物質（以下、基準物質）として、1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene-*d*<sub>4</sub>（純度：0.999 kg kg<sup>-1</sup> ± 0.005 kg kg<sup>-1</sup>(*k*=2)、和光純薬工業製(Osaka, Japan))を用いた。また、検量線用の HOEDE として、和光純薬工業により HPLC で分取精製された特注品を、品質を評価した上で用いた。検量線作成のための NMR 測定溶液の調製にはメタノール-*d*<sub>4</sub>（重水素化率 99.8 %; Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA)を用い、その溶液から HPLC 測定溶液を調製するために用いた希釈溶媒にはメタノール(LC/MS 用; 和光純薬工業製, Osaka, Japan)を用いた。HPLC の移動相には、アセトニトリル(LC/MS 用, 和光純薬工業製, Osaka,

Japan) と超純水を混和させたものを用いた。なお、超純水の製造には、Milli-Q Integral MT(Merck, Darmstadt, Germany)を使用した。さらに、本法の妥当性確認のために使用した CRM には、メタノール希釈の HOEDE 標準液（濃度：1008 mg L<sup>-1</sup> ± 22 mg L<sup>-1</sup>(*k*=2), RESTEK 製)を用いた。

### 2.2 装置

HOEDE 精製品の評価においては、NMR 装置として <sup>1</sup>H 共鳴周波数が 400 MHz の JNM-ECS400 (JEOL Ltd., Akishima, Japan)を用い、LC-MS に 6538 Q-TOF(Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いた。検量線溶液における qNMR 測定には <sup>1</sup>H 共鳴周波数が 500 MHz の JNM-ECZ500 (JEOL Ltd., Akishima, Japan)を用いた。NMR スペクトルの解析には MestReNova ver. 7.0.2. (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain)を用いた。一方、検量線溶液および試料溶液における HPLC 測定には 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)に、UV 検出器(Agilent, Santa Clara, CA, USA)と RI 検出器 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)を直列につないだものを用いた。検量線溶液と試料溶液の調製の際には、マイクロ天秤 XP56 (METTLER TOLEDO, Greifensee, Switzerland)を使用した。ただし、試料溶液の調製における基準物質の秤量については、ウルトラマイクロ天秤 XP6U (METTLER TOLEDO, Greifensee, Switzerland)を用いた。

### 2.3 実験手順

検量線溶液の調製スキームを Fig. 2 に示す。精製された HOEDE が約 10000 mg L<sup>-1</sup>、基準物質が約 5000 mg L<sup>-1</sup> になるようにメタノール-*d*<sub>4</sub>に溶解し、cs1 を調製した。なお、cs1 の調製では厳密な秤量は必要ないが、HOEDE は吸湿性が高いことから、採取後に残った試薬の再使用を考慮して、相対湿度 5 %以下の環境で開封した。この溶液を NMR 管に小分けし、Table 1 に示す条件で qNMR 測定を行って HOEDE と基準物質の物質質量比を得た。なお、qNMR の解析方法は山崎らの報告<sup>14)</sup>に従い、位相補正、積分範囲の設定およびベースライン補正をマニュアルで行った。このとき、積分範囲は <sup>13</sup>C サテライトを含む範囲とし、当該範囲の両端において直線のアルゴリズムでベースライン補正を行った。次に、HPLC 測定に供する cs2 の調製では、HOEDE が約 1000 mg L<sup>-1</sup>、基準物質が約 500 mg L<sup>-1</sup> となるように cs1 をメタノールで 10 倍に希釈した。この溶液をインサート入り LC バイアルに 0.2 mL ずつ小分けした後、Table 2 の条件で HPLC 測定を行って HOEDE と基準物質の応答比を得た。

試料溶液の調製スキームについて Fig. 3 に示す。基準物質を精密に約 1 mg 秤量し、これに試料である 1000 mg L<sup>-1</sup> の HOEDE 標準液 (2.1 で述べた RESTEK 製の CRM) を 2.0 mL 添加・秤量して、試料溶液とした。試料溶液をインサート入りの LC バイアルに 0.2 mL ずつ小分けした後、検量線溶液と同じ条件で HPLC 測定を行った。

## 2.4 RMS 及び試料濃度の求め方

### 2.4.1 RMS の計算

まず, cs1 の qNMR 測定の結果から, 式(1)に従って物質比  $R_{\text{NMR}}$  を求めた.

$$R_{\text{NMR}} = \frac{n_a}{n_r} = \frac{I_a \times H_r}{I_r \times H_a} \dots\dots\dots(1)$$

すなわち,  $R_{\text{NMR}}$  は HOEDE の物質質量  $n_a$  と基準物質の物質質量  $n_r$  の比である. ここで  $n_a$  は, NMR スペクトルにおける HOEDE のアルキル鎖の  $^1\text{H}$  シグナル面積である  $I_a$  をそのシグナルに寄与する  $^1\text{H}$  数  $H_a$  で除したものに相当する. 同様に,  $n_r$  は NMR スペクトルにおける基準物質のトリメチルシリル基の  $^1\text{H}$  シグナル面積である  $I_r$  をそのシグナルに寄与する  $^1\text{H}$  数  $H_r$  で除したものに相当する.

次に, cs2 の HPLC 測定の結果から式(2)に従って, 応答比  $R_{\text{LC}}$  を求めた.

$$R_{\text{LC}} = \frac{A_{a,\text{cs}}}{A_{r,\text{cs}}} \dots\dots\dots(2)$$

ここで,  $A_{a,\text{cs}}$  は HPLC で得られた cs2 のクロマトグラムにおける HOEDE のピーク面積であり,  $A_{r,\text{cs}}$  は基準物質のピーク面積である.

上記より得られた  $R_{\text{LC}}$  を  $R_{\text{NMR}}$  で除したものを基準物質に対する HOEDE の相対モル感度(RMS)とした.

$$RMS = \frac{R_{\text{LC}}}{R_{\text{NMR}}} \dots\dots\dots(3)$$

### 2.4.2 試料中の HOEDE 濃度の計算

試料中の HOEDE の濃度  $C_a$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) は下記の式により求めた.

$$C_a = \frac{1}{RMS} \times \frac{A_{a,\text{sp}}}{A_{r,\text{sp}}} \times \frac{M_a}{M_r} \times \frac{W_r}{W_s} \times P_r \dots\dots\dots(4)$$

ここで,  $A_{a,\text{sp}}$  と  $A_{r,\text{sp}}$  はそれぞれ HPLC で試料溶液を測定して得られた HOEDE 及び基準物質のピーク面積,  $M_a$ ,  $M_r$  はそれぞれ HOEDE 及び基準物質のモル質量 ( $\text{g mol}^{-1}$ ),  $W_r$  は基準物質の採取量 ( $\text{mg}$ ),  $W_s$  は試料の採取量 ( $\text{kg}$ ),  $P_r$  は基準物質の純度 ( $\text{kg kg}^{-1}$ ) である.

## 3 結果と考察

### 3.1 HOEDE 精製品の評価

検量線溶液の測定には qNMR と HPLC を併用したが, このとき, アルキル鎖やポリオキシエチレン鎖の長さが主成分と異なる不純物が調製に用いた HOEDE 試薬に含まれて

いると, 特に qNMR 測定において HOEDE のシグナルに不純物のシグナルが重なり, RMS にバイアスを生じる. そこでこのバイアスを防ぐため, 検量線の作成には HPLC で分取精製した HOEDE を用いた. 精製した HOEDE にアルキル鎖やポリオキシエチレン鎖の長さが異なる不純物が含まれない可能性が極めて高いことは, HPLC と qNMR を用いて下記の通りに確認した.

HPLC による確認には, 逆相分配クロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーの 2 種類の方法を用いた. その結果, HOEDE とアルキル鎖やポリオキシエチレン鎖の長さが異なる不純物は確認されなかった (Fig. 4). なお, サイズ排除クロマトグラフィーではピークトップが分離したため, LC/MS でも測定を行ったところ, 双方の  $m/z$  は同じ値が得られた. 後述する NMR 測定の結果も考慮して, これらのピークは分岐体などアルキル鎖の構造が異なる異性体であると推測した.

この精製した HOEDE をアセトニトリル- $d_3$  (重水素化率 99.8%; Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA) に溶解し, NMR で測定した. 化学シフト約 3.1 ppm ~ 約 3.8 ppm の積分範囲ではポリオキシエチレン鎖の  $^1\text{H}$  シグナルが, 化学シフト約 0.6 ppm ~ 約 1.7 ppm の積分範囲ではアルキル鎖の  $^1\text{H}$  シグナルがそれぞれ観測された (Fig. 5). そこで, 前者のシグナル面積に寄与する  $^1\text{H}$  数を 30 個, 後者のシグナル面積に寄与する  $^1\text{H}$  数を 23 個と仮定し, ポリオキシエチレン鎖とアルキル鎖の物質比を求めたところ, 1.000 となった. ポリオキシエチレン鎖長やアルキル鎖長が HOEDE と異なる不純物が有意に含まれる場合, それら不純物のポリオキシエチレン鎖とアルキル鎖における  $^1\text{H}$  数の比が HOEDE と全く同一となる場合を除き, 上記結果は 1.000 とならない. そのため, ポリオキシエチレン鎖長やアルキル鎖長が HOEDE と異なる不純物が有意に含まれる可能性は低いと考えられた.

以上の結果から, HOEDE の精製品はアルキル鎖の構造が異なる異性体を含む可能性は高いものの, qNMR におけるバイアス要因になり得る鎖長の異なる不純物が存在する可能性は極めて低いと考えられることから, 検量線溶液の調製に使用可能であると判断した.

なお, cs1 の溶媒にはメタノール- $d_4$  を用いることから, 以下の検討ではスペクトル解析においてメタノールのシグナル (化学シフト約 3.3 ppm) の影響を受けないアルキル鎖の  $^1\text{H}$  シグナルを用いて  $R_{\text{NMR}}$  を求めた.

### 3.2 HPLC における検出条件の設定

HOEDE は, HPLC の UV 検出で一般的に用いられる波長域に吸収を示す官能基を持たない. そのため本研究では, まず UV 検出器を使用して, 198 nm 付近の真空紫外域の波長を用いることで, HOEDE を検出可能であることを確認した. 同様に, RI 検出器においても HOEDE を検出できることを確認した. しかし, 真空紫外域での UV 検出と,

RI 検出はいずれも選択性が乏しいため、メタノール- $d_4$ に含まれる不純物や HPLC 測定用バイアルのセプタムから溶出する不純物などが定量を妨害することがあった。そこで、UV 検出器と RI 検出器を直列につなぐデュアル検出による qNMR/クロマトグラフィーとすることで、測定値を同時に 2 つ得て相互に検証ができるようにした。なお、基準物質として用いた 1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene- $d_4$  は一般的に汎用されるの紫外領域に吸収を持つことから、UV 検出では 270 nm で測定を行った。試料溶液 sp (1000 mg L<sup>-1</sup> の HOEDE, 500 mg L<sup>-1</sup> の基準物質) の代表的なクロマトグラムを Fig. 6 に示す。HPLC の応答比  $R_{LC}$  の繰り返し精度 (相対標準偏差) は、sp の濃度が 1000 mg L<sup>-1</sup> の HOEDE 及び、500 mg L<sup>-1</sup> の基準物質の場合で、UV 検出において 1.1%, RI 検出において 1.3% であった。なお、sp の濃度が 100 mg L<sup>-1</sup> の HOEDE 及び、500 mg L<sup>-1</sup> の基準物質の場合は UV 検出において 1.4%, RI 検出において 2.1% であり、HOEDE 濃度が低いときの測定精度は RI 検出よりも UV 検出が優れていた。そこで、本法では UV 検出により得られた値を定量値として採用することとし、万が一予測できないバイアス要因を UV 検出が持つことに備えて、RI 検出により得られた測定値と UV 検出により得られた測定値の差を不確かさ成分として考慮した。

### 3.3 検量線の直線性の確認

qNMR/クロマトグラフィーにおける RMS は式(3)によって求められることから、物質質量比と応答比の関係を示す検量線の直線性の確認が必要である。そこで、100 mg L<sup>-1</sup> から 1000 mg L<sup>-1</sup> の範囲で市販 HOEDE 標準液の値付けを行うことを想定し、Fig. 2 の cs2 における HOEDE 濃度が 50 mg L<sup>-1</sup> から 2000 mg L<sup>-1</sup> の範囲で検量線の直線性を確認した。具体的には、基準物質濃度を 5000 mg L<sup>-1</sup> に固定して、HOEDE 濃度が約 500 mg L<sup>-1</sup>, 約 1000 mg L<sup>-1</sup>, 約 5000 mg L<sup>-1</sup>, 約 10000 mg L<sup>-1</sup>, 約 20000 mg L<sup>-1</sup> となるように 5 水準のメタノール- $d_4$  溶液を調製し、qNMR 測定により物質質量比を求めた。次に、これらの溶液をそれぞれメタノールで 10 倍希釈した 5 つの溶液について HPLC 測定により応答比を求めた。その結果得られた検量線を Fig. 7 に示す。検量線の回帰式は UV 検出で  $y=0.1737x$ ,  $r=0.9999$ , RI 検出で  $y=1.7269x$ ,  $r=0.9999$  となり、いずれの場合も原点を通る良好な直線性を確認できた。なお、これらの直線の傾きである RMS の標準偏差を式

(5) から算出し、後述する不確かさの要因に加えることとした。

$$\sigma_B = \frac{\sigma_{R_{LC}}}{\sqrt{\sum R_{NMR}^2}} \dots\dots\dots(5)$$

$$\sigma_{R_{LC}} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \times \sum (R_{LC} - B \times R_{NMR})^2}$$

$$B = \frac{\sum (R_{LC} \times R_{NMR})}{\sum R_{NMR}^2}$$

ここで、 $B$  は測定結果から予想される直線の傾き、 $\sigma_B$  はその標準偏差であり、 $N$  は測定回数である。

### 3.4 重水素化溶媒の影響

Fig. 2 に示した調製スキームに示した通り、cs1 は NMR 測定のためメタノール- $d_4$  溶液としたことから、この溶液をメタノールで 10 倍希釈した cs2 にも約 10% のメタノール- $d_4$  が含まれる。一方、市販 HOEDE 標準液は重水素化溶媒を含まないメタノール溶液であることから、溶媒組成の差が RMS に影響を与えると、式(4)が成り立たなくなる。

そこで、cs1 をメタノールとメタノール- $d_4$  の割合を調整した溶媒で 10 倍希釈し、100%メタノール- $d_4$ 、60%メタノール- $d_4$ 、20%メタノール- $d_4$ 、10%メタノール- $d_4$  を溶媒とする cs2 をそれぞれ調製した (メタノール- $d_4$  の濃度は体積分率)。同様に、メタノールのみを用いて 0%メタノール- $d_4$  の cs2 に相当する溶液を質量比混合により精確に調製した。これら 5 つの cs2 に相当する溶液を HPLC 測定し、RMS を求めた。なお、100%から 10%のメタノール- $d_4$  を用いて調製した cs2 に相当する溶液は cs1 の qNMR 測定により、メタノールのみを用いて調製した cs2 に相当する溶液は各成分の秤量値とモル質量から、それぞれ HOEDE と基準物質の物質質量比を求めた。

得られた結果を Fig. 8 に示すが、UV 検出及び RI 検出とも溶媒組成の変化に伴う RMS の有意な変動は見られなかった。したがって、検量線溶液におけるメタノール- $d_4$  の存在は、メタノール希釈の標準液の定量に影響しないことが確認できた。

### 3.5 CRM への値付けと不確かさ評価

設定した測定方法の妥当性を確認するために、Fig. 2, Fig. 3 に示した実験手順に従って、CRM である 1000 mg L<sup>-1</sup> の HOEDE 標準液の定量を行った。その結果、今回の HOEDE 標準液の測定では、両検出の測定値はばらつきの範囲内で一致した (Fig. 9)。すなわち、クロマトグラム上で、HOEDE のピークに不純物のピークが重なった可能性は低いことが示唆され、得られた測定値の信頼性をデュアル検出により高めることができた。

3.2 で述べた通り、定量値は UV 検出により得られた測定値とし、付随する不確かさは以下のように評価した。

検量線溶液の測定では、式(3)に基づき、NMR 測定で求めた物質質量比、HPLC 測定における応答比及び検量線の直線性を RMS の不確かさ要因とした。

また、試料溶液の測定では、式(4)に基づき、前述の RMS の不確かさに加えて、試料溶液の繰り返し測定の不確かさ、HOEDE 及び基準物質のモル質量の不確かさ、基準物質の採取量の不確かさ、試料の採取量の不確かさ、基準物質の純度の不確かさを不確かさ要因とした。なお、CRM への値付けにおいては、試料溶液の調製を 2 回行ったが、調製間差は有意では無かったため、不確かさ要因から除外した。

以上より求めた UV 検出における測定値に付随する合成標準不確かさ(相対値)は、0.73%であった。

加えて、万が一 UV 検出が検出特性による何らかのバイアス要因を有する場合に備え両検出における測定値の差を不確かさ成分として考慮したものを UV 検出における測定値の不確かさに合成し、95%の信頼の水準に相当する包含係数として  $k=2$  を乗じた式(6)<sup>15)</sup>を、標準液の定量値に付随する不確かさ  $U$  (拡張不確かさ)とした。

$$U = \sqrt{u_{UV}^2 + \frac{(C_{UV} - C_{RI})^2}{6}} \times 2 \dots\dots\dots(6)$$

ここで、 $u_{UV}$ は UV 検出における測定値の不確かさ、 $C_{UV}$ は UV 検出における測定値、 $C_{RI}$ は RI 検出における測定値である。なお、3・2 に示した通り、UV 検出は RI 検出に比べて測定精度が優れていた。そのため、UV 検出で得られた値を中心、かつ最も測定値の信頼性が高くなるよう、差に由来する不確かさは  $C_{UV}$  を中心とし、 $C_{UV}$  と  $C_{RI}$  の差の 2 倍の幅の三角分布を仮定して求めた。

上述の通りに求めた、CRM の定量結果(定量値)は  $1249 \text{ mg kg}^{-1} \pm 19 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $k=2$ )であり、拡張不確かさは相対値として 1.5%であった。今回購入した CRM の認証値は  $1008 \text{ mg L}^{-1} \pm 22 \text{ mg L}^{-1}$  ( $k=2$ )であったため、比較のために本法で得られた結果を、振動式密度計(Anton Paar DMA5000M)を用いて測定した 20 °Cにおける 1000  $\text{mg L}^{-1}$  の HOEDE 溶液の密度である  $0.791568 \text{ g cm}^{-3}$  を用いて単位変換したところ、 $989 \text{ mg L}^{-1} \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$  ( $k=2$ )となった。定量結果と認証値について、ISO/IEC 17043「適合性評価—技能試験に対する一般要求事項」<sup>16)</sup>の附属書 B に基づき  $En$  数を求めたところ 0.73 であり、本測定の定量結果は CRM の認証値と満足できる一致が得られたことから、本測定方法の妥当性を確認できた。

なお、Fig. 10 に示したように、HPLC 測定のばらつき以外では、基準物質の採取量と、基準物質の純度が不確かさ要因としての寄与が相対的に大きかった。このことから、基準物質の採取量を大きくすることや、より純度の不確かさの小さい基準物質を選定することで、さらなる精確さの向上が可能であると考えられる。

#### 4 結 言

本研究では、100  $\text{mg L}^{-1}$  から 1000  $\text{mg L}^{-1}$  の HOEDE 標準液に精確な濃度を付与することを想定して、qNMR/クロマトグラフィーの適用を目指した。50  $\text{mg L}^{-1}$  から 2000  $\text{mg L}^{-1}$  の HOEDE 濃度で直線性の確認を行い、また、NMR 測定の都合により検量線溶液に含まれる重水素化溶媒が定量値に影響しないことを確認した。市販の 1000  $\text{mg L}^{-1}$  HOEDE 標準液を本法を用いて測定したところ、拡張不確かさ(相対値) 1.5%で定量することができた。

本法は、検量線作成用に精製した HOEDE が少量必要であるものの、その物質量は qNMR で基準物質との比として求めることができるため、HOEDE の純度が既知である必要がない。また、HOEDE は吸湿性が高い物質であるが、同じ理由で含水量の変化が定量値に影響しないなど、検量線溶液を精確に調製する必要がないという従来の内標準法には無い利点を有する。

また、本法では UV と RI のデュアル検出により、両検出から得られた測定値の比較が可能である。これにより、クロマトグラム上で分析対象成分のピークに重なる夾雑物が存在するような場合においても、両検出の夾雑物に対する感度差がある場合は、測定値のバイアスに気付くことができる。

以上のことから、本法は HOEDE 以外の界面活性剤や、その他の吸湿性や揮発性のある成分の標準液に対する値付けに広く適用でき、かつ夾雑物によるバイアスの可能性を低減できると考えられる。

(本研究は、The Asian Conference on Oleo Science 2017 (平成 29 年 9 月 12 日)において、一部口頭発表)

#### 謝 辞

本研究の一部は、一般財団法人化学物質評価研究機構の研究助成事業である「CERI 提案型共同研究」(有機標準液のための新たな特性値決定方法の開発)の支援によりなされたことを付記し、ここに謝意を表します。

#### 文 献

- 1) N. Saito, T. Saito, T. Yamazaki, Y. Fujimine: *Accred. Qual. Assur.*, **22**, 171 (2017).
- 2) 齋藤剛, 井原俊英, 佐藤浩志, JANCKE Harald, 衣笠晋一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 1029 (2003).
- 3) T. Yamazaki, A. Takatsu: *Accred. Qual. Assur.*, **19**, 275 (2014).
- 4) JIS K 0138, 定量核磁気共鳴分光法通則 (qNMR 通則) (2017).
- 5) S. Liu, S. Yao, H. Zhang, C. Hu: *AAPS PharmSciTech.*, **18**, 1895 (2016).
- 6) G. K. Webster, I. Marsden, C. A. Pommerening, C. M. Tyrakowski, B. Tobias: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 1261 (2009).
- 7) M. Y. Iqbal, K. M. V. N. Rao, G. Sridhar, P. P. Raju, G. R. Deshpande, J. M. Babu: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56**, 484 (2011).
- 8) Y. Kitamaki, N. Saito, T. Yamazaki, S. Otsuka, S. Nakamura, Y. Nishizaki, N. Sugimoto, M. Numata, T. Ihara: *Anal. Chem.*, **89**, 6963 (2017).
- 9) 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 伊藤祐才, 小野田絢, 杉本直樹, 穂山浩: 食品衛生学雑誌, **56**, 185 (2015).
- 10) Y. Nishizaki, N. Stao-Masumoto, A. Yokota, T. Mikawa, K. Nakashima, T. Yamazaki, M. Kuroe, M. Numata, T. Ihara, Y. Ito, N. Sugimoto, K. Sato: *Food Addit. Contam., Part A*, **35**, 838 (2018).
- 11) W. Zhang, T. Huang, H. Li, X. Dai, C. Quan, Y. He: *Talanta*, **172**, 78 (2017).
- 12) K. Toerne, R. Jackson, R. von Wandruszka: *J. Colloid Interface. Sci.*, **257**, 412 (2003).
- 13) W. Miszkiewicz, J. Szymanowski: *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **25**,

203 (1996).

- 14) 山崎太一, 斎藤剛, 三浦亨, 井原俊英: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **61**, 963 (2012).
- 15) TS Z 0033, 測定における不確かさの表現のガイド(2012) .
- 16) ISO/IEC 17043, 適合性評価-技能試験に対する一般要求事項 (2010).

# Characterization of a Heptaoxyethylene Dodecyl Ether Standard Solution by a Combination of $^1\text{H}$ Quantitative NMR Spectroscopy and HPLC

Miho KUROE\*<sup>1</sup>, Naoki Saito<sup>1</sup>, Taichi Yamazaki<sup>1</sup>, Yuzo Nishizaki<sup>2</sup>,

Naoki Sugimoto<sup>2</sup>, Masahiko Numata<sup>1</sup> and Toshihide Ihara<sup>1</sup>

\* E-mail : miho-kuroe@aist.go.jp

<sup>1</sup> National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central 3, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8563

<sup>2</sup> National Institute of Health Sciences, 3-25-26, Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501

(Received March 2, 2018; Accepted April 20, 2018)

We are pursuing research on an analytical method for measuring multiple organic compounds that combines quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy (qNMR) and chromatography. Combining qNMR and chromatography provides two advantages: qNMR that reference materials corresponding to each analyte are not required, and that this method can measure concentrations in multi-component solutions in which signals overlap each other in qNMR. In this study, this method was applied to measure the concentration of non-ionic surfactant standard solutions that are difficult to measure in isolation by  $^1\text{H}$  qNMR alone because they usually contain impurities, such as similar components of different chain lengths. However, heptaoxyethylene dodecyl ether, which was used in this study as one of the non-ionic surfactants, had no characteristic absorption in the ultraviolet wavelength band for which ultraviolet adsorption detectors were widely used, so the vacuum ultraviolet band was adopted to detect heptaoxyethylene dodecyl ether. In addition, a refractive-index detector was used in tandem with an ultraviolet adsorption detector to verify the measured values. By using this method, a certified reference material of  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  of heptaoxyethylene dodecyl ether standard solution was measured. As a result, measurements could be performed with a relative expanded uncertainty of 1.5 % ( $k=2$ ); the obtained concentration matches the certified value.

Keywords : quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy; high performance liquid chromatography; relative molar sensitivity; non-ionic surfactant; heptaoxyethylene dodecyl ether; vacuum ultraviolet.



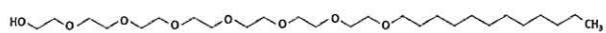


Fig.1 Structural formula of HOEDE

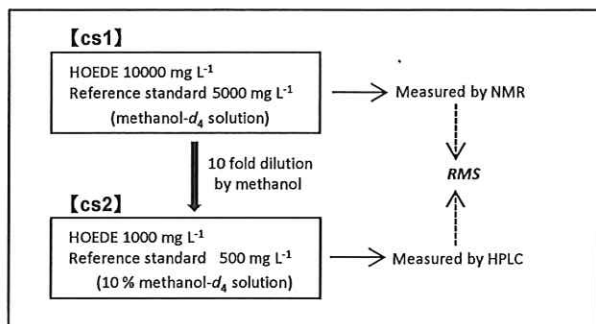


Fig. 2 Preparation of the calibration solution

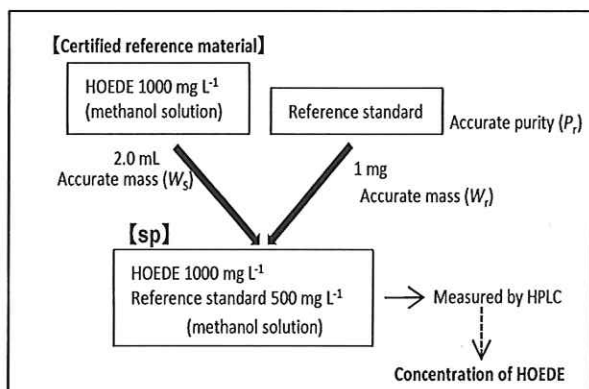


Fig. 3 Preparation of the sample solution

Table 2 HPLC conditions for the calibration solution and the sample solution

Parameters	Conditions
Instrument	Agilent 1290
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18 HT (2.1 mm i.d. x 150 mm, 1.8 μm)
Guard column	UHPLC Guard ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm i.d. x 5 mm, 1.8 μm)
Column temperature	30 °C
Flow rate	0.2 mL min <sup>-1</sup>
Mobile phase	Acetonitrile - water (70:30), premix
Injection volume	8 μL
Stop time	95 min
Detector	UV (198 nm for HOEDE, 270 nm for reference standard) RI(Optical unit temperature: 33 °C)

Table 1 NMR conditions for the calibration solution

Parameters	Conditions
Instrument	JNM-ECZ500
Probe (model)	Royal (50RO5AT/FGSQS)
Acquisition time	4 s
Spectral width	500 ppm
Digital filter	Off
Frequency offset	2 ppm
Sample spin	Off
Flip angle (pulse width)	90° (6.5 μs)
<sup>13</sup> C decoupling (sequence)	On (MPF8)
Relaxation delay	60 s
Number of scans	32
Dummy scans	2
Measurement temperature	25 °C

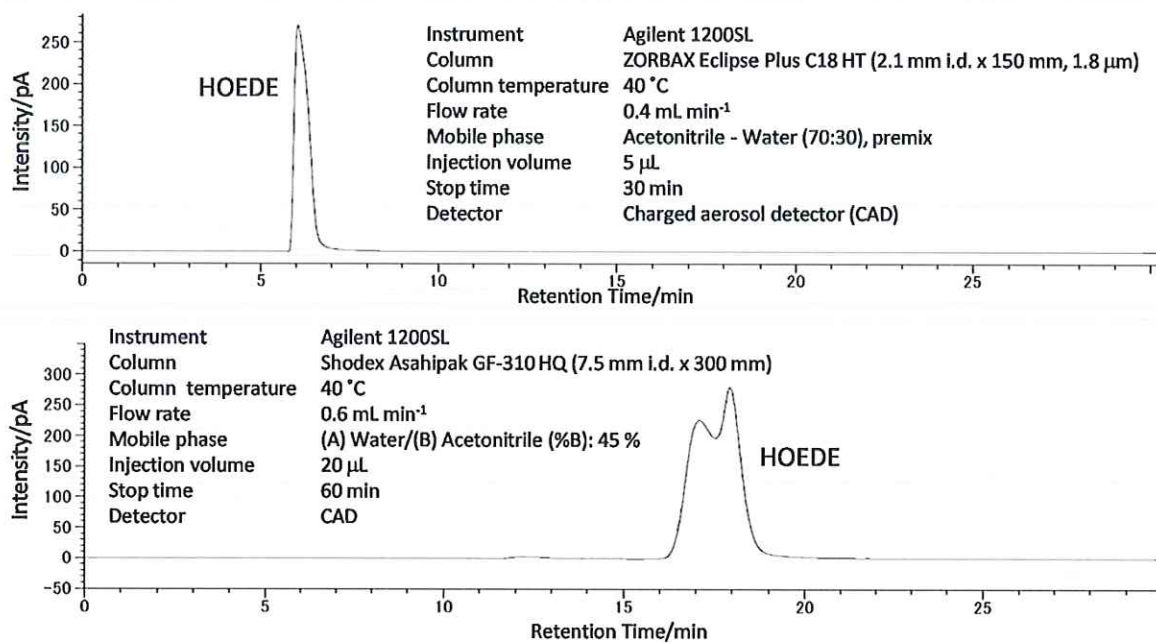


Fig. 4 HPLC chromatograms of purified HOEDE ( 10000 mg L<sup>-1</sup> in methanol)

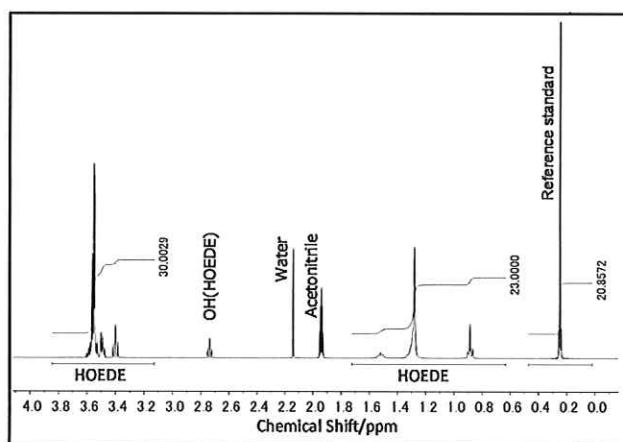


Fig. 5 Representative NMR spectrum of 10000 mg L<sup>-1</sup> HOEDE and 5000 mg L<sup>-1</sup> reference standard in acetonitrile-*d*<sub>3</sub> solution

Reference of chemical shift: Acetonitrile= 1.94 ppm

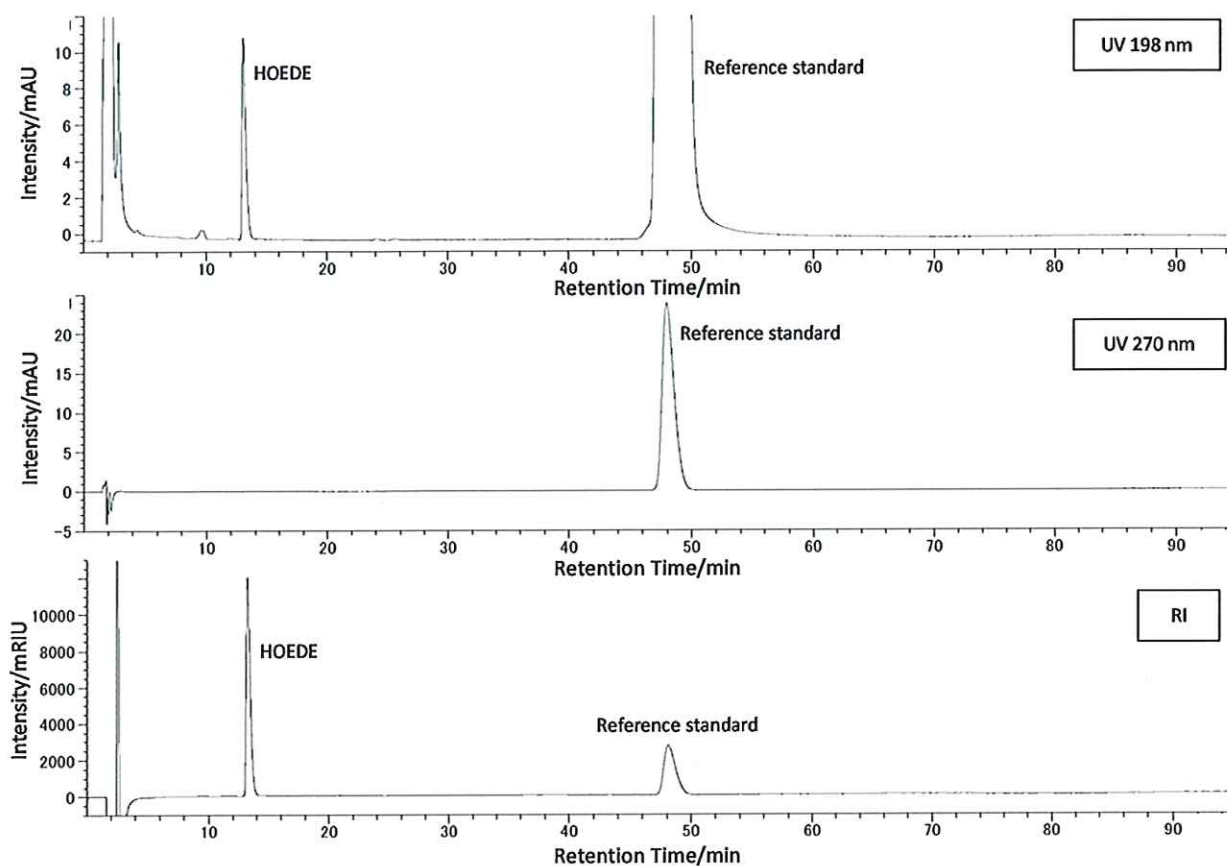


Fig. 6 Representative HPLC chromatograms of 1000 mg L<sup>-1</sup> HOEDE (certified reference material) and 500 mg L<sup>-1</sup> reference standard in the sample solution (sp)

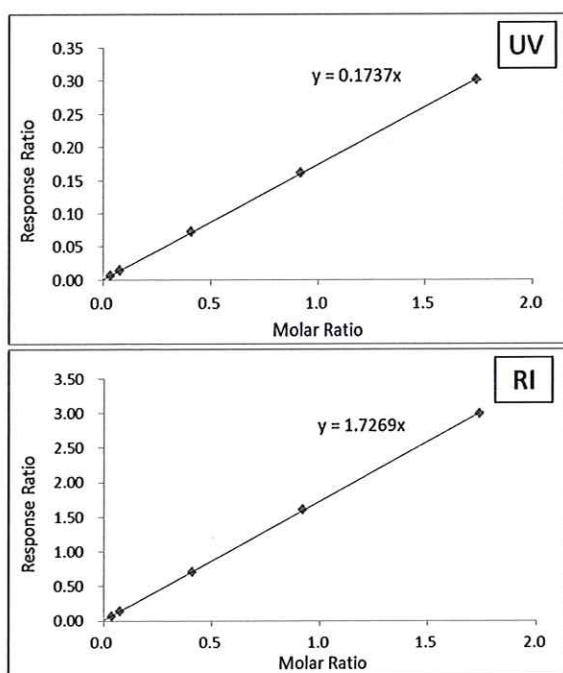


Fig. 7 Calibration curves obtained by UV detection and RI detection

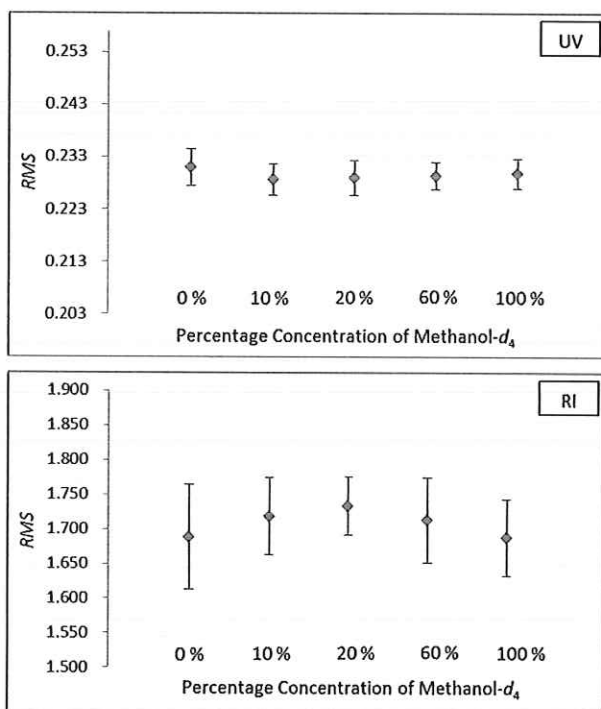


Fig. 8 RMSs evaluated from the calibration solution that percentage concentrations of methanol-*d*<sub>4</sub> were 0 %, 10 %, 20 %, 60 % and 100 % (Bars show ± 2SD)

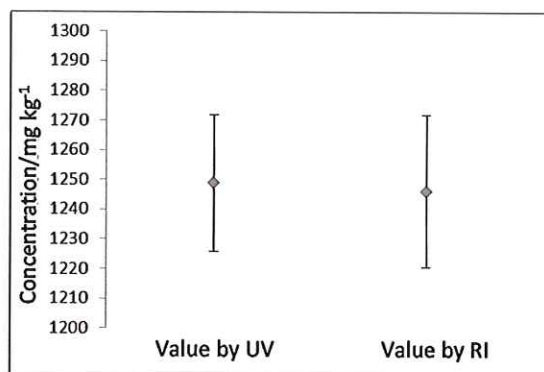


Fig. 9 Comparison of measured values obtained by UV detection and RI detection (Bars show ± 2SD)

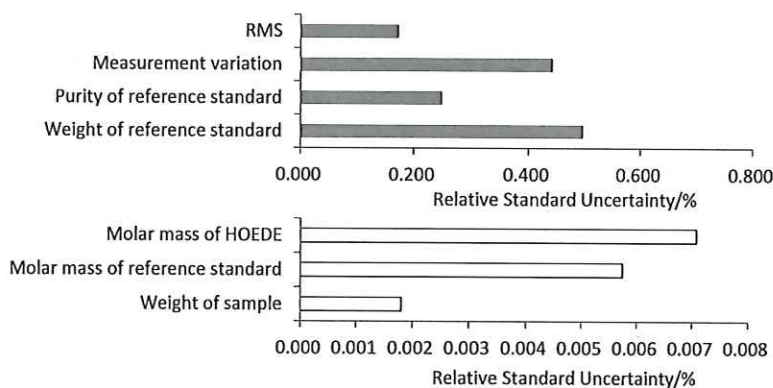


Fig. 10 Uncertainty budget in the relative standard uncertainty for the concentration of HOEDE obtained by UV detection

## 最近のトピックスから

一般財団法人化学物質評価研究機構  
四角目 和広

### 1. 計測標準フォーラム第17回講演会の開催

標準物質協議会も会員機関となっている計測標準フォーラムの「第17回講演会」を国立研究開発法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センターによる講演会「第15回 NMIJ 国際計量標準シンポジウム」との共催として、令和2年2月21日に開催しました。

昨年5月20日のSIの定義改定のその後として「新時代を迎えた計量基本単位 -SI定義改定の総括とこれから」と題して「SI定義改定について総括し、SI定義改定がもたらす効果」をテーマとした講演会が開催されました。

講演会をはじめるにあたり、ご来賓としてご臨席の 経済産業省 産業技術環境局 計量行政室 阿部一貴 室長の挨拶があり、産業技術総合研究所 計量標準総合センター 臼田 孝センター長から本講演会の背景の紹介がありました。

【基調講演】としてドイツ 物理工学研究所 (PTB)の Joachim Hermann Ullrich 所長からは、「The revised SI for innovation, science and the second quantum revolution.」について、また【招待講演】として 慶応義塾大学の名誉教授で、SI定義改定プロモーション委員会委員長の本多敏 名誉教授からは、「SDGs達成に貢献するセンシング技術を支える計量標準」についての講演がありました。

続いて、産業技術総合研究所 計量標準総合センターから「130年ぶりとなるキログラムの定義改定：藤井賢一 首席研究員」、「ケルビンの定義改定とこれからの熱力学温度測定：山田 善郎 首席研究員」、「モルと化学標準物質：高津章子 部門長

(物質計測標準研究部門)」の3名の方から講演がありました。最後に、【招待講演】として「さらなる計量結果の信頼性の確保に向けて -質量-：メトラートレド株式会社 高柳庸一郎 計量計測ビジネスユニットマネージャー」について講演がありました。

新型コロナウイルスの影響で、開催が危ぶまれましたが、ほぼ満席に近い状態までの参加申し込みがあり、大変盛況なシンポジウムとなりました。

### 2. マネジメントシステムのための計量トレーサビリティ講演会の開催

今年度も標題の講演会を令和2年1月及び2月に開催しました。

主催は、(一財)日本品質保証機構、(独)製品評価技術基盤機構、後援は、(国研)産業技術総合研究所計量標準総合センター、(国研)情報通信研究機構、(公財)日本適合性認定協会、(一財)化学物質評価研究機構、(一社)日本計量振興協会及び計測標準フォーラムです。

今回は、大阪、福岡の各1回、東京2回の計4回開催を計画しましたが、残念ながら東京の2回目は、新型コロナウイルスの影響により直前で中止となりました。300名を超える方々の参加があり、大変好調な講演会となったようです。

## 標準物質協議会見学会報告

一般財団法人化学物質評価研究機構  
化学標準部 技術第一課  
太田 涼

令和元年 11 月 21 日（木）に標準物質協議会主催の見学会が開催されました。今回は、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センター（以下 NMIJ）を見学させていただきましたので、報告いたします。

当日は、つくばエクスプレス「つくば」駅に集合し、目的地へ向かいました。爽やかな秋晴れで、絶好の見学会日和でした。産業技術総合研究所はいくつもの棟に分かれており、周りには自然も多く、屋外を散策するのも非常に気持ち良さそうに感じられました。受付を済ませ、会議室にて研究所のパンフレットと見学スケジュールを受け取り、まず NMIJ の概要をご説明いただきました。NMIJ では、日本の国家計量標準機関として国際的に同等性の確保された計量標準の開発・維持・供給やそれらのトレーサビリティの確立に向けて、計測技術の開発などが行われています。NMIJ の研究部門は「工学計測標準研究部門」、「物理計測標準研究部門」、「物質計測標準研究部門」、「分析計測標準研究部門」に分かれており、今回は「物質計測標準研究部門」の研究室を見学させていただけるということでした。

続いて、A 班と B 班に分かれて所内の見学に移りました。ここからは、各研究室で見学した内容をいくつか紹介します。

まず、ガス・湿度標準の研究室では、標準ガスを調製する際、ガスの質量を測定する天びんを見せていただきました。天びんは温度、湿度、浮力などの影響を除外するために隔離されており、天びんが置いてある床も周りの振動が伝わらないように独立させてあるという徹底ぶ

りでした。容器の秤量自体は自動で行うものの、標準ガス 1 本を調製するために、2 日ほどの時間を要するそうです。

有機基準物質の研究室では、定量 NMR を用いた測定技術の開発や純度校正サービスなどを行っています。定量 NMR では、水素原子を指標にすることで、原理的には 1 つの基準物質で、混合液の濃度を決定することが可能だそうです。現在は、東京オリンピックでのドーピング検査に向けて、世界アンチ・ドーピング機関（WADA）からの要請に基づき、認証標準物質の開発にも取り組んでいるということです。

表面・ナノ分析の研究室では、昨年の「キログラム」の定義改定に深く関わってきた  $^{28}\text{Si}$  単結晶球体を見せていただきました。このシリコン球は真球に近く、球体であるのは、角がないので様々な方位からの測定が可能となるからだそうです。また、このシリコン球の表面には、水や  $\text{SiO}_2$  などの膜があり、純粋なシリコン部分を測定するためには、この膜の化学組成や質量等を正確に測定することが必要不可欠だったということでした。

各研究室の見学が終了した後、会議室に戻ってきた私たちをメートル原器が出迎えてくれました。このメートル原器は、1960 年まで長さの基準として使用されており、細長くてもひずみにくいように X 型の断面をしています。また、それ自体の長さではなく、原器の両端付近にそれぞれ記された目盛間の距離が 1 m となるように設定されているそうです。現在は役目を終え、重要文化財として指定されていますが、間近で見られる機会もめったにないので、参加者

の皆さんは、メートル原器に刻まれた目盛りなどの写真を熱心に撮っておられました。

今回は、多種多様な研究室を見学させていただき、標準物質の必要性やその測定の難しさを再認識しました。

また、試験設備等を目の前に、業務に携わる方から直接お話を伺うことができ、大変貴重な経験となりました。

最後に、このような機会を提供していただき、また、非常にわかりやすくご説明いただきました国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センターの関係者の方々にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。



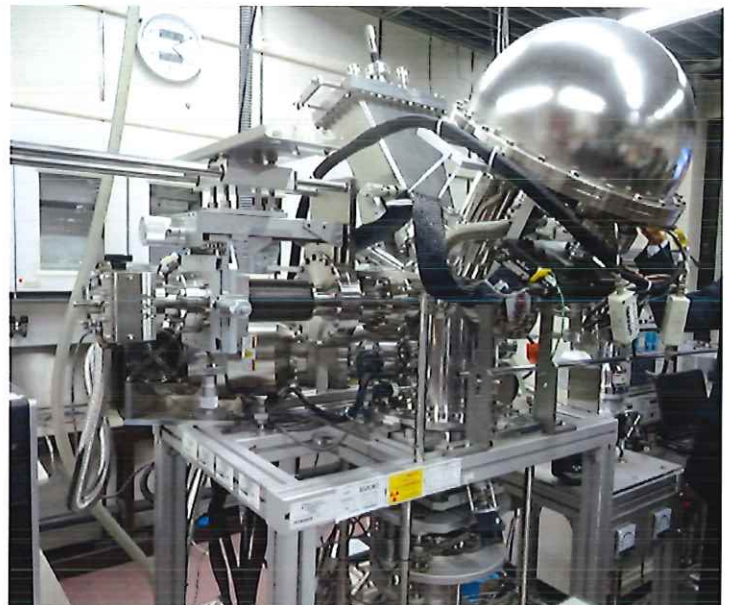
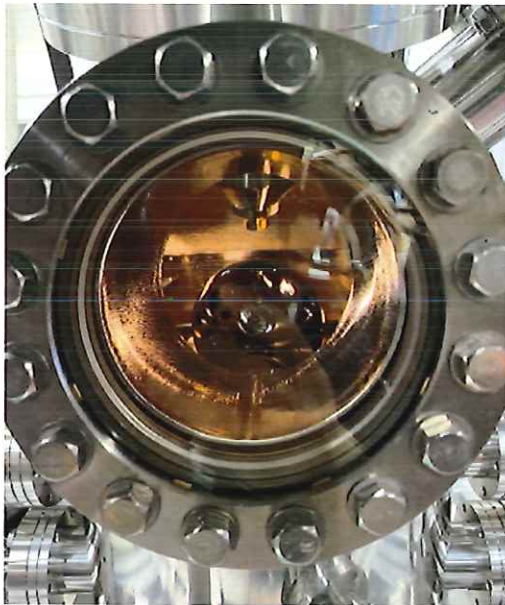
試験内容説明



試験室見学



充填ガス質量測定装置



$^{28}\text{Si}$  単結晶球体と球体表面分析装置 (XPS)



重要文化財となっているメートル原器



## 編集後記

新型コロナウイルスで世界中が混乱しており、各種行事の中止、縮小、延期など、大きな影響が出ています。本会報をお届けするところでも、まだ先が見通せない状況かもしれません。これまで、ほとんど経験のないことで、お仕事やご家庭でも影響が出ている方も多いのではと思います。

皆さまいかがお過ごしでしょうか。

会報第 85 号をお届けいたします。

黒江様には、最近注目を集めている新しい標準物質の値付け方法の論文について寄稿いただきました。この技術を用いることで、吸湿性の高い物質であるため、質量比混合法による濃度決定が難しい場合や複雑な混合標準物質の濃度決定の

精確さの向上に大きく貢献するものと期待するところです。

太田様には、昨年 11 月に開催されました見学会の報告を書いていただきました。当日は、多くの方に見学会にご参加いただきました。普段はなかなか見ることができない試験室の見学や業務内容を説明いただき貴重な経験となりました。特に、シリコン球や重要文化財となった昔の原器の見学の機会をいただきましたこと、あらためて NMIJ のご担当の皆様へ感謝申し上げます。

皆様方のご協力によりまして第 85 号を発行することができました。引き続き、皆様からのご寄稿をいただきたく、よろしくお願い申し上げます。

(四角目)



(ノースポール 埼玉県宮代町)

〒345-0043

埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600 番地

一般財団法人化学物質評価研究機構内

標準物質協議会 事務局 四角目和広

Tel. 0480-37-2601 Fax. 0480-37-2521

E-mail shikakume-kazuhiro@ceri.jp