

標準物質の値付けの実施について (ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液)

1. 背景

非イオン界面活性剤は水に溶解した際にイオン化しない親水基を有する界面活性剤で、水の硬度や含まれる電解質の影響を受けにくい性質を持ち、優れた乳化・分解性を持ちながらも動物や植物に対する毒性が比較的低いことから、近年では、非常に多くの用途で使用されている。しかしながら、発泡など水道水質低下の原因となりうるため、非イオン界面活性剤の水質基準値は 0.02 mg/L 以下と定められている。そして、水道基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（厚生労働省告示第 261 号）において、非イオン界面活性剤測定時にはヘプタオキシエチレンドデシルエーテルを用いて調製した標準原液を使用するよう指定されている。

すなわち、非イオン界面活性剤の濃度を適切に評価するためには、公定法に準拠した適切な測定の実施とともに、国際単位系にトレーサブルなヘプタオキシエチレンドデシルエーテルの標準物質の使用が不可欠であることから、信頼性の高い標準液の供給が望まれていた。

平成 27 年 4 月 1 日施行の水道水質基準に関する省令の改正によって、水質検査方法における標準原液として、計量法の規定に基づく標準液（JCSS）を用いることができるようになった。また、産業技術総合研究所によりヘプタオキシエチレンドデシルエーテルについて国際単位系にトレーサブルな標準物質の特性値決定方法が開発され、JCSS としての標準物質の値付けの実施が技術的に可能となったので、特定標準物質を用いて行う標準物質の値付け（特定標準器による校正等）を開始することとしたい。

2. 特定標準物質

ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液

3. 特定標準物質の概要

(1) 特定標準物質の成分

ヘプタオキシエチレンドデシルエーテルの標準液（メタノール希釈）

(2) 特定標準物質の製造方法等

特定標準物質は、ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液であって、成分濃度が 100 mg/L のものであり、指定校正機関が保管する標準液製造用精密天びん及び分析計測装置を用いて、質量比混合法により製造される。

特定標準物質の特性値は、NMIJ により値付けされた値である。

特定標準物質により値付けされた標準物質（以下、特定二次標準物質）への値付

けの不確かさは、以下に示す特定標準物質の特性値、特定標準物質の均質性、特定標準物質の保存安定性、特定二次標準物質の測定のそれぞれの不確かさを合成して求めた。

特定標準物質の特性値の不確かさは、下記のバジェット表の中に示したとおりである。

特定標準物質の均質性及び 12 か月間の保存安定性の不確かさは次のように求めた。測定には qNMR/クロマトグラフィーを用い、均質性及び安定性試験用には 33 本に小分け保存した試料を用いた。

特定標準物質のアンプル間の均質性の不確かさは調製直後に小分けした 33 本の試料から 3 本を取り出し測定した結果から評価した。なお、この 3 本は後述する保存安定性試験の 0 か月目の試料と共通である。(別添資料 参照)

また、保存安定性の不確かさは、0 か月目は充てん直後の試料から 3 本、6 か月目及び 13 か月目は保存されている試料の中からそれぞれ 1 本を取り出して測定し、12 か月間の保存安定性の不確かさを評価した。(別添資料 参照)

特定標準物質による特定二次標準物質への値付けには高速液体クロマトグラフを用い、特定標準物質を基準として特定二次標準物質を測定する場合の測定の不確かさは、20 回繰返し測定(検量線用標準液と測定用標準液を 1 組とし 20 回の繰返し測定、検出器：示差屈折率検出器)した濃度の実験標準偏差から、3 回の測定の平均値に対する標準不確かさとして計算した。(別添資料 参照)

以上の不確かさは、濃度に対する相対標準不確かさ(%)として求め、それらを二乗和した値の正の平方根を合成標準不確かさとし、包含係数($k=2$)を乗じて拡張不確かさを求めた。(下記、表 参照)。

なお、今回の申請において、容器はほうけい酸ガラス製褐色アンプル、保存温度は 5 °Cとした。

表 特定二次標準液への値付けの不確かさのバジェット表
(ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液：相対値)

標準液 種類	特定標準 物質の特 性値の標 準不確か さ(%)	均質性に 伴う標準 不確かさ (%)	保存安定 性に伴う 標準不確 かさ (%)	特定二次 標準物質 の測定の 標準不確 かさ*1(%)	合成標準 不確かさ (%)	拡張不 確かさ ($k=2$) (%)
ヘプタオキシエ チレンドデシル エーテル標準液	0.70	0.3362	0.6721	0.5434	1.16	2.4

*1：特定標準物質を基準として高速液体クロマトグラフにより測定した際の標準不確かさ

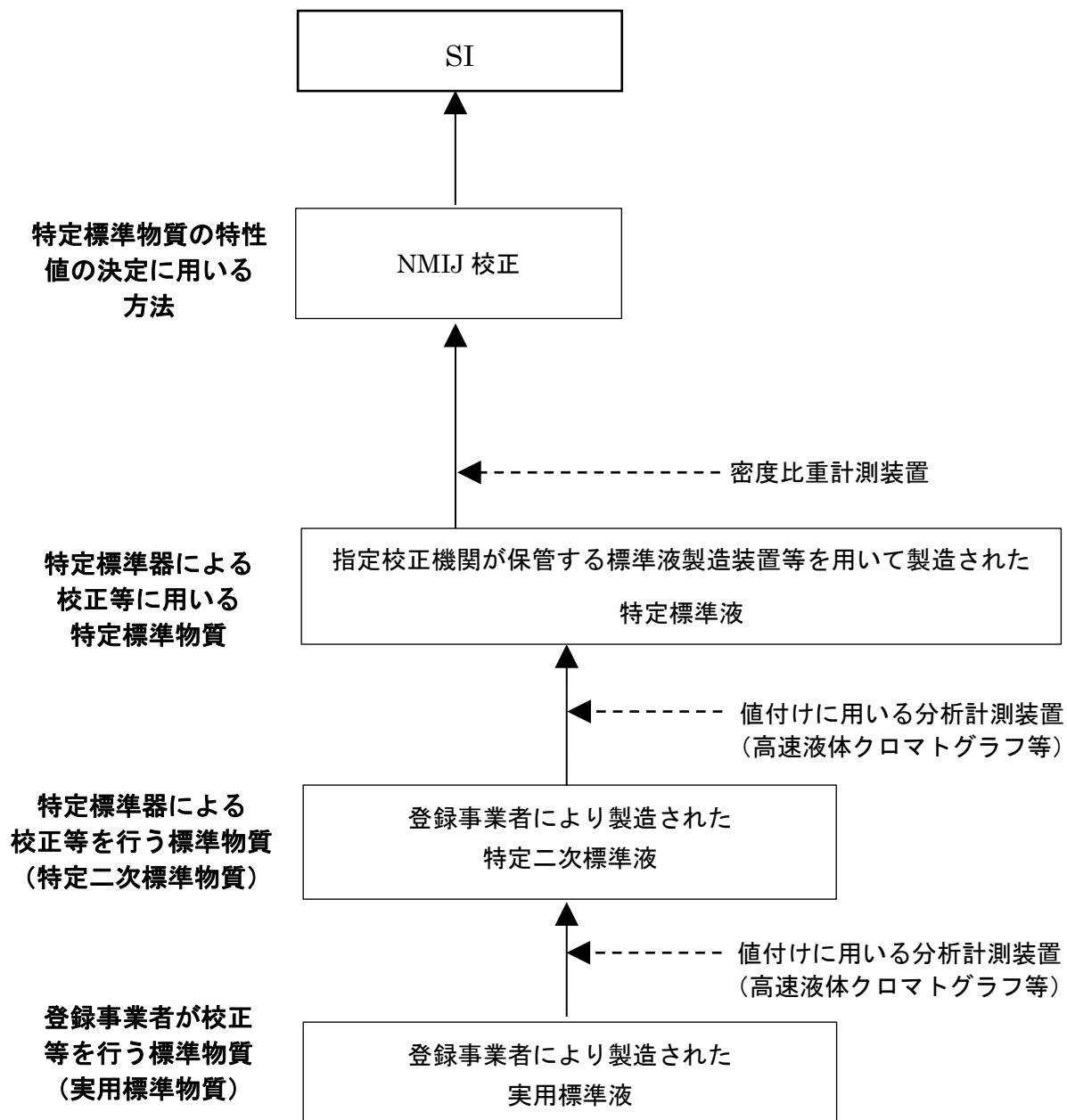
4. 計量法第135条1項に基づく校正実施機関

一般財団法人化学物質評価研究機構

5. 特定標準器による校正等を行う標準物質の校正周期及び不確かさ

特定標準器による校正等を行う標準物質	校正 周期	拡張不確かさ(相対) ($k=2$) (%)
ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液 (メタノール希釈であって濃度が100 mg/Lのもの)	12月	2.4

トレーサビリティの体系図



添付資料－１：ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液

トレーサビリティの体系図 及び 実施担当

	実施事項		NMIJ	CERI
国際単位系(SI)				
ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル 特定標準液	特定標準物質の特性値の決定 産総研依頼試験（NMIJ校正）	qNMR/クロマトグラフィー 基準物質：1, 4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン-d4)	○	
	保存安定性試験 試料調製	質量比混合法		○
	保存安定性試験 経時濃度変化の測定	qNMR/クロマトグラフィー (HPLC検出器：UV,RI)	○	
	均質性試験 試料調製	質量比混合法		○
	均質性試験 容器間均質性の測定	qNMR/クロマトグラフィー	○	
ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル 特定二次標準液	20回の繰返し測定	高速液体クロマトグラフィー (HPLC検出器：RI)		○

添付資料－２：ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液

1 不確かさの評価

ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液について、特定二次標準物質への値付けの不確かさを評価した。また、その算出には特定標準物質の特性値の不確かさ、特定標準物質の保存安定性の不確かさ、特定標準物質の均質性の不確かさ及び測定の不確かさを用いた。

評価した標準物質の種類及び濃度を、表 1 に示した。

表 1 標準液の種類及び濃度

種類	濃度 (mg/L)
ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液	100 (20 °Cにおける)

1.1 特定標準物質の特性値の不確かさ

特定標準物質の特性値は、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 と略）によって値付けされたものであり、その不確かさは校正証明書に記載されている値を用いる。現時点での特定標準物質の特性値の標準不確かさを表 2 に示した。

表 2 特定標準物質の特性値の標準不確かさ

成分	特定標準物質の特性値 の標準不確かさ (mg/kg)	相対値 (%)
ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル	0.91	0.70

1.2 保存安定性の不確かさ

ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液は 12 か月間の周期で製造し、その期間の校正試験に用いるため、保存安定性の不確かさを評価する必要がある。そこで、標準液の 0～13 か月の経時濃度変化を測定することにより、特定標準物質の 12 か月間の保存安定性の標準不確かさを算出した。試料の調製は一般財団法人化学物質評価研究機構が実施し、濃度の測定は NMIJ が実施した。測定には、特定標準物質の値付け法である qNMR/クロマトグラフィーを適用した。

1.2.1 試料の調製方法

a) 試料の種類及び濃度

試料とした標準液の種類及び濃度は表 1 に示したとおりである。

b) 原料及び溶媒

1) 原料

標準液の調製に用いた原料を、表 3 に示した。

表 3 調製に用いた原料

名 称	提供者
ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル	NMIJ

2) 溶媒

標準液の調製に用いた溶媒を、表 4 に示した。

表 4 標準液の調製に用いた溶媒

名称	製造者名	純度 (規格値)
メタノール	関東化学株式会社	99.5 %以上

c) 保存容器

1) 保存容器

試料の保存容器として、ほうけい酸ガラス製褐色アンプル(容量 10 mL)を用いた。

d) 試料の調製手順

質量比混合法により、約 40 mg の原料に約 1000 mg/L の濃度となるよう溶媒を加えて、約 40 mL の中間原料を調製し、中間原料約 28 mL を溶媒で希釈し、約 280 mL の試料を調製した。

調製容器には、ポリテトラフルオロエチレン (商品名：テフロン) 製ピストンシール型スクリュウキャップ付き密閉型ガラス容器を用いた。

e) 試料の小分け方法と保存方法

保存試料を、ほうけい酸ガラス製褐色アンプル 33 本に約 8 mL ずつ充てんした後、5 °C で保存した。また、小分けしたアンプル間の試料濃度の均質性に問題がないことを確認した。

1.2.2 検量線用溶液の測定

a) 検量線用溶液の測定方法

検量線用溶液は、高純度に精製されたヘプタオキシエチレンドデシルエーテルが約 1000 mg/L、基準物質 (1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン-*d*₄) が約 5000 mg/L になるようにメタノール-*d*₄ に溶解し、NMR 測定溶液を調製した。この溶液を NMR 管に小分けし、表 5 に示す条件で qNMR 測定を行ってヘプタオキシエチレンドデシルエーテ

ルと基準物質の物質質量比を得た。次に、これをメタノールで 10 倍に希釈した溶液について表 6 に示す条件で HPLC 測定を行って、ヘプタオキシエチレンドデシルエーテルと基準物質の応答比を得た。

qNMR 測定の結果から、式(1)に従って物質質量比 R_{NMR} を求めた。

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

R_{NMR} は、NMR 測定溶液中におけるヘプタオキシエチレンドデシルエーテルの物質質量 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ヘプタオキシエチレンドデシルエーテルのアルキル鎖の ^1H シグナル面積である I_a をそのシグナルに寄与する ^1H 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 ^1H シグナル面積である I_r をそのシグナルに寄与する ^1H 数 H_r で除したものに相当する。

次に、ヘプタオキシエチレンドデシルエーテルと基準物質の物質質量比が NMR 測定溶液と同一であるとみなせる希釈溶液の HPLC 測定の結果から、式(2)に従って応答比 R_{LC} を求めた。

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

ここで、 $A_{a,\text{cs}}$ は HPLC で得られた検量線用溶液のクロマトグラムにおけるヘプタオキシエチレンドデシルエーテル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_{LC} を R_{NMR} で除したものを基準物質に対するヘプタオキシエチレンドデシルエーテルの相対モル感度(RMS)とした。

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

b) 検量線用溶液の測定条件

表 5 NMR の測定条件

項目	条件
装置	JNM-ECZ500 Royal (50RO5AT/FGSQS)
取り込み時間	4 s
FT ポイント数	500 ppm
デジタルフィルター	Off
スペクトル中心	2 ppm
試料管スピン	Off
フリップ角 (パルス幅)	90° (6.5 ms)
¹³ C デカップリング (シークエンス)	On (MPF8)
繰り返し待ち時間	60 s
積算回数	32
ダミースキャン	2
測定温度	25 °C

表 6 高速液体クロマトグラフの測定条件

項目	条件
装置	Agilent 1290 (0 か月) HP1100 (6 か月、13 か月)
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 HT (2.1 mm i.d. x 150 mm, 1.8 µm)
ガードカラム	UHPLC Guard ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm i.d. x 5 mm, 1.8 µm)
溶離液	アセトニトリル/水 (70/30), プレミックス
流量	0.2 mL/min
カラムオープン温度	30 °C
検出器	UV (198 nm : 分析対象成分, 270 nm : 基準物質) RI (光学ユニット温度: 33 °C)
注入量	8 µL
ストップタイム	95 min

1.2.3 経時濃度変化の測定

a) 試料溶液の測定方法

0 か月目は充てん直後の試料から 3 本、6 か月目及び 13 か月目は保存されている試料の中からそれぞれ 1 本を取り出し（表 7）、それぞれ測定を行った。約 3.5 mL の保存試料に対し約 1.75 mg の基準物質を添加して精確に調製した試料溶液について繰返し HPLC 測定を行った。この際、1 本の試料からはそれぞれ 2 本の試料溶液を調製した。式(4)より試料溶液中のヘプタオキシエチレンドデシルエーテル濃度を算出し、2 本の試料溶液についての測定値の平均値を各試料の測定濃度とした。

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

ここで、 $A_{a,sp}$ と $A_{r,sp}$ はそれぞれ HPLC で試料溶液を測定して得られたヘプタオキシエチレンドデシルエーテル及び基準物質のピーク面積、 M_a 、 M_r はそれぞれヘプタオキシエチレンドデシルエーテル及び基準物質のモル質量(g/mol)、 W_r は基準物質の採取量(mg)、 W_s は試料の採取量(kg)、 P_r は基準物質の純度(kg/kg)である。

表 7 測定した試料の詳細

測定時期	試料番号
0 か月目	No.6, No.14, No.30
6 か月目	No.11
13 か月目	No.23

b) 試料溶液の測定条件

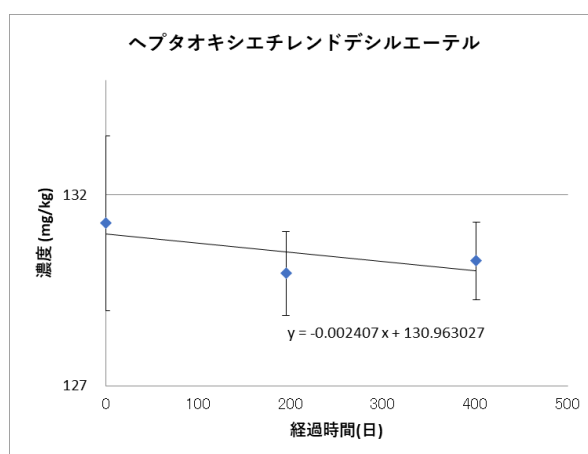
表 6 に示したものと同一測定条件を使用した。

1.2.4 経時濃度変化の測定結果

経時濃度変化の測定結果を表 8 及び図 1 に示した。表中には、各試料の測定値とその平均値を、図中には測定値の平均の変化を経時的に表示した。

表 8 測定結果

条件	調製	測定 繰り返し	経過時間(試料番号)				
			0か月目(No.6)	0か月目(No.14)	0か月目(No.30)	6か月目(No.11)	13か月目(No.23)
			測定濃度 (mg/kg)				
ヘプタオキシ エチレンドデ シルエーテル <保存温度> 5℃	1	1	129.58	134.06	130.54	130.08	130.56
	1	2	127.75	131.18	132.08	130.67	129.28
	1	3	127.20	131.69	128.64	130.71	129.86
	1	4	131.59	135.44	130.89	129.28	130.11
	1	5	133.02	133.51	130.04	129.41	130.05
	1	6	136.21	132.42	131.00	130.96	129.58
	1	7	129.52	125.96	126.73	129.60	130.46
	1	8	130.10	128.60	128.35	129.96	129.76
	1	9	133.17	129.39	131.26	128.55	131.09
	1	10	—	—	—	131.61	132.13
	1	11	—	—	—	132.03	133.18
	1	12	—	—	—	129.18	128.89
	1	13	—	—	—	131.82	131.66
	1	14	—	—	—	130.30	129.73
	1	15	—	—	—	128.27	—
	調製1の平均値		130.90	131.36	129.95	130.16	130.45
	2	1	132.24	134.48	128.63	128.92	131.14
	2	2	133.15	131.26	131.23	130.96	129.77
	2	3	131.38	131.60	131.96	130.83	130.66
	2	4	137.10	133.10	132.29	128.62	130.11
	2	5	134.01	132.99	134.04	128.74	131.03
	2	6	130.77	131.43	132.36	130.25	129.47
	2	7	130.04	130.56	128.81	129.76	130.21
	2	8	129.17	130.57	130.06	129.21	130.14
	2	9	131.91	133.07	129.29	128.21	130.50
	2	10	—	—	—	129.80	130.54
	2	11	—	—	—	130.44	130.35
	2	12	—	—	—	131.16	129.01
	2	13	—	—	—	129.34	130.11
	2	14	—	—	—	131.15	128.11
	2	15	—	—	—	128.30	—
	調製2の平均値		132.20	132.12	130.96	129.71	130.08
	調製1と調製2の平均値		131.55	131.74	130.46	129.94	130.27



◆: 各経過時間における
測定値の平均±SD

図 1 測定結果

1.2.5 保存安定性の測定結果の統計解析

劣化メカニズムを現実的に説明できるような物理的・化学的モデルがないので、経験モデルとして、 x を測定日、 y を濃度とする直線回帰分析を行った（表 9）。回帰(B)と残差(e)の分散比はいずれの成分も F 境界値 161.45 より小さい値を示し、5 %の有意水準で傾きは有意でなかった。そこで、単回帰係数の標準誤差 ($s[b]$) を求め、JIS Q 0035 に基づき、次式により 12 か月間の保存安定性の標準不確かさを計算した（表 10）。

$$u_{s1} = s[b] \times 365.24 \times 12/12$$

表 9 分散分析表

	自由度(f)	平方和(S)	平均平方	F 値
回帰(B)	1	4.66E-01	4.66E-01	1.01
残差(e)	1	4.64E-01	4.64E-01	
合計	2	9.30E-01		

表 10 保存安定性の不確かさ

成分	$s[b]$ (mg/kg)	$s[b]$ 相対値 (%)	u_{s1} (mg/kg)	u_{s1} 相対値 (%)
ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル	0.002401	0.001840	0.8769	0.6721

1.3 均質性の不確かさ

1.3.1 容器間均質性の測定

充てん直後の試料から 3 本 (No.6 , No.14 , No.30) を取り出し、試料として使用した。検量線用溶液及び試料溶液の調製・測定方法は 1.2.2 a)、1.2.3 a)に示したとおりである。結果は表 8 の 0 か月目として示した。測定条件は、表 5、表 6 に記載したとおりである。

1.3.2 容器間均質性の測定結果の解析

結果をもとに一元配置の分散分析（表 11）を行った。

表 11 分散分析表

グループ	標本数	合計	平均	分散
試料番号No.6	18	2367.91	131.5506	6.977100607
試料番号No.14	18	2371.304	131.7391	5.144882818
試料番号No.30	18	2348.209	130.4561	3.283779745

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 値
容器間	17.27817	2	8.639083	1.682308737	0.196098	3.178799
繰り返し測定	261.898	51	5.135254			
合計	279.1761	53				

JIS Q 0035 に基づき、容器間均質性の不確かさを求めるために、まず s_{bb} を式(5)から計算した。

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{(MS_{among} - MS_{within})}{n}} \quad \dots(5)$$

MS_{among} は容器間の分散、 MS_{within} は繰り返し測定の分散をそれぞれ表す。 n は各容器における標本数の調和平均である。

また、 u_{bb} は式(6)から求めた。 $\nu_{MS_{within}}$ は繰り返し測定における自由度である。

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \times \sqrt[4]{\frac{2}{\nu_{MS_{within}}}} \quad \dots(6)$$

以上により求めた s_{bb} 及び u_{bb} を表 12 に示した。両者のうち、より大きい値である s_{bb} を容器間均質性の標準不確かさとした。

表 12 容器間均質性の不確かさ

成分	s_{bb} (mg/kg)	s_{bb} 相対値 (%)	u_{bb} (mg/kg)	u_{bb} 相対値 (%)
ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル	0.4412	0.3362	0.2377	0.1811

1.4 測定の不確かさ

1.4.1 測定方法

特定標準物質から特定二次標準物質への値付けに適用される、高速液体クロマトグラフを用いた絶対検量線法について測定の不確かさを評価した。測定の不確かさを算出するために、表 1 に示した濃度の標準液について、検量線用標準液と測定用標準液を 1 組とし 20 回の繰り返し測定を行った。高速液体クロマトグラフによる測定条件を表 13 に、クロマト

グラム例を図 2 に示した。

なお、測定濃度は、次式により求めた。

$$C = C_0 \times \frac{A}{A_0}$$

ここで、 C : 試料の測定濃度(mg/L)

C_0 : 検量線用標準液の調製濃度(mg/L)

A : 試料のピーク面積

A_0 : 検量線用標準液のピーク面積

表 13 高速液体クロマトグラフの測定条件

項 目	条件
装置	島津製作所製 高速液体クロマトグラフ Prominence システム
カラム	一般財団法人化学物質評価研究機構製 L-column 2 C6-phenyl 3 μ m (4.6 mm I.D., 250 mm)
溶離液	アセトニトリル/水 (55/45), プレミックス
流量	1.0 mL/min
カラムオープン設定温度	40 °C
検出器	示差屈折率検出器(RI)
注入量	40 μ L

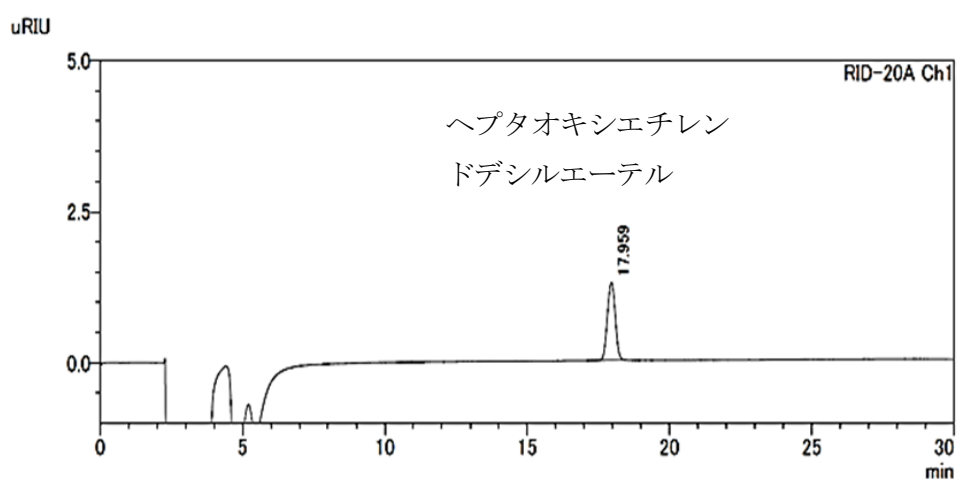


図 2 クロマトグラム例

1.4.2 測定の不確かさの算出

20回の繰返し測定結果から実験標準偏差を求め、測定の標準不確かさを算出した。標準液の繰返し測定の結果を、表 14 に示した。

表 14 標準液の繰返し測定の結果

測定回数	ピーク面積 ($\mu\text{RIU} \times \text{s}$)		測定濃度 (mg/L)
	検量線用標準液	測定用標準液	
1	24578	24774	103.60
2	24492	24544	103.00
3	24437	24593	103.44
4	24788	24586	101.94
5	24496	24500	102.80
6	24703	24648	102.55
7	24531	24620	103.15
8	24660	24768	103.23
9	24786	24729	102.54
10	24665	24698	102.92
11	24590	24550	102.61
12	24480	24642	103.46
13	24960	24793	102.09
14	24416	24974	105.13
15	24934	24755	102.04
16	24702	24688	102.72
17	24356	24945	105.27
18	24741	25063	104.12
19	24939	24793	102.18
20	24930	24653	101.64

測定濃度の平均値：103.02 mg/L

測定濃度の実験標準偏差 σ_{n-1} ：0.9696 mg/L

3回の繰返し測定を行い、その平均値を測定濃度とする場合の測定濃度のばらつきは、

$$u_{k3\text{回}} = \sigma_{n-1} / \sqrt{3} = 0.9696 / \sqrt{3} = 0.5598 \text{ mg/L}$$

となり、測定の相対標準不確かさは、

$$u_{k3\text{回}} = 0.5598 / 103.02 \times 100 = 0.5434 \%$$

となる。

2 特定二次標準液値付け時の不確かさ

ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液について、特定標準物質により特定二次標準物質の校正を行った場合の値付けの不確かさを算出し、表 15 に示した。

表 15 特定二次標準物質値付け時の不確かさ
(ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル標準液：相対値)

標準液 種類	特定標準 物質の特 性値の標 準不確か さ(%)	均質性に 伴う標準 不確かさ (%)	保存安定 性に伴う 標準不確 かさ (%)	特定二次 標準物質 の測定の 標準不確 かさ*1(%)	合成標準 不確かさ (%)	拡張不 確かさ ($k=2$) (%)
ヘプタオキシエ チレンドデシル エーテル標準液	0.70	0.3362	0.6721	0.5434	1.16	2.4

*1：特定標準物質を基準として高速液体クロマトグラフにより測定した際の標準不確かさ

以上