

## 6. その他の制限事項に係る試験

### 6.1 ジシアンジアミド性窒素

#### 6.1.a 高速液体クロマトグラフ法(1)

##### (1) 概要

石灰窒素及びそれを含む肥料に適用する。

メタノールを分析試料に加えてジシアンジアミド(Dd)を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、アミノプロピルシリカゲルカラムで分離し、波長 215 nm で測定し、分析試料中のジシアンジアミド性窒素(Dd-N)を求める。なお、この試験法の性能は備考 4 に示す。

##### (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- b) **メタノール**: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- c) **アセトニトリル**: HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) **ジシアンジアミド標準液(1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: ジシアンジアミド[C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup>0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のメタノールを加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) **ジシアンジアミド標準液(0.1 mg/mL)**: ジシアンジアミド標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノールを加える。
- f) **検量線用ジシアンジアミド標準液(10 µg/mL～50 µg/mL)**: 使用時にジシアンジアミド標準液(0.1 mg/mL)の 5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- g) **検量線用ジシアンジアミド標準液(1 µg/mL～10 µg/mL)**: 使用時に検量線用ジシアンジアミド標準液(20 µg/mL)の 2.5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) ジシアンジアミドとして 98%(質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

**備考 1.** ジシアンジアミドは和光純薬工業及び関東化学よりジシアノジアミドとして市販されている。

##### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にアミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 215 nm 付近で測定できるもの。
- b) **振とう機**
- c) **高速遠心分離機**: 8000×g～10000×g で遠心分離可能なもの。

**備考 2.** カラムは Hibar LiChrosorb NH<sub>2</sub>、Inertsil NH<sub>2</sub>、Unison UK-Amino、Mightysil NH<sub>2</sub>、Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>、Shodex NH-5A、Unisil Q NH<sub>2</sub> 等の名称で市販されている。

**(4) 試験操作**

**(4.1) 抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL～300 mL に入れる。
- b) 直ちにメタノール 100 mL を加え<sup>(3)</sup>、振とう機を用いて約 10 分間振り混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 8000×g～10000×g で約 5 分間遠心分離する<sup>(5)</sup>。
- e) 上澄み液 1 mL を試料溶液とする。

**注(3)** 空気中に放置すると定量値が高くなるので、直ちにメタノールを加える。

(4) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 8100×g～10000×g 程度となる。

**備考 3.** (4.1)c)～e)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**(4.2) 測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

**a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** アミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm、粒径 5 μm)
- 2) **カラム槽温度:** 30 °C～40 °C
- 3) **溶離液:** アセトニトリル-メタノール(6+1)
- 4) **流量:** 1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 215 nm

**b) 検量線の作成**

- 1) 各検量線用ジシアンジアミド標準液 10 μL を HPLC に注入し、波長 215 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用ジシアンジアミド標準液の濃度と波長 215 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

**c) 試料の測定**

- 1) 試料溶液を 10 μL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線からジシアンジアミド(Dd)量を求め、分析試料中のジシアンジアミド(Dd)濃度を算出する。
- 3) 次の式によってジシアンジアミド性窒素(Dd-N)を算出する。

分析試料中のジシアンジアミド性窒素(Dd-N) (%(質量分率))

$$=A \times (MW_1/MW_2)$$

$$=A \times 0.6664$$

A: 分析試料中のジシアンジアミド(Dd) (%(質量分率))

MW<sub>1</sub>: 窒素の 4 原子量(56.027)

$MW_2$ : ジシアンジアミドの分子量(84.080)

**備考 4.** 石灰窒素(3点)及び石灰窒素入り配合肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、ジシアンジアミドとして6及び0.6%(質量分率)の濃度レベルでの回収率は94.9%~105.1%及び95.6%~103.5%であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表1に示す。

なお、この試験法の定量下限は0.01%(質量分率)程度である。

表1 ジシアンジアミド性窒素試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup> (%)	$s_R$ <sup>6)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_R$ <sup>7)</sup> (%)
石灰窒素1	9	0.0321	0.0010	3.2	0.0012	3.8
石灰窒素2	10	0.159	0.002	1.3	0.006	3.8
石灰窒素3	11	0.245	0.002	0.7	0.008	3.3
配合肥料1	11	0.124	0.001	0.7	0.002	2.0
配合肥料2	11	0.410	0.007	1.6	0.008	1.9

1) 解析に用いた試験室数

2) 平均値( $n$ =試験室数×試料数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 室間再現標準偏差

7) 室間再現相対標準偏差

## 参考文献

- 1) 齊木雅一, 浅尾美由起: 石灰窒素等中のジシアンジアミド性窒素測定 -高速液体クロマトグラフ法-, 肥料研究報告, 2, 25~31 (2009)
- 2) 齊木雅一, 義本将之: 石灰窒素等中のジシアンジアミド性窒素測定 -共同試験成績-, 肥料研究報告, 2, 32~37 (2009)

(5) **ジシアンジアミド性窒素試験法フローシート** 石灰窒素及び石灰窒素を含む肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法のフローシートを次に示す。

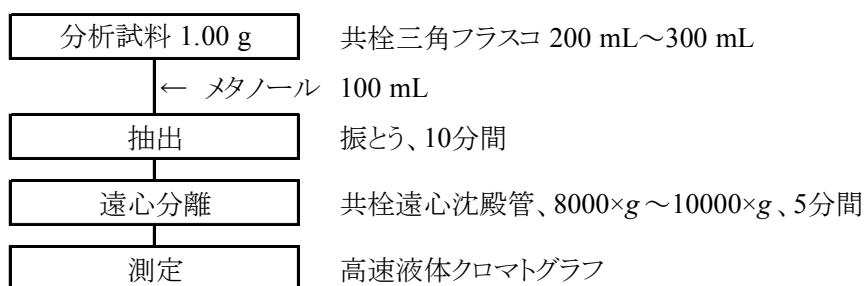
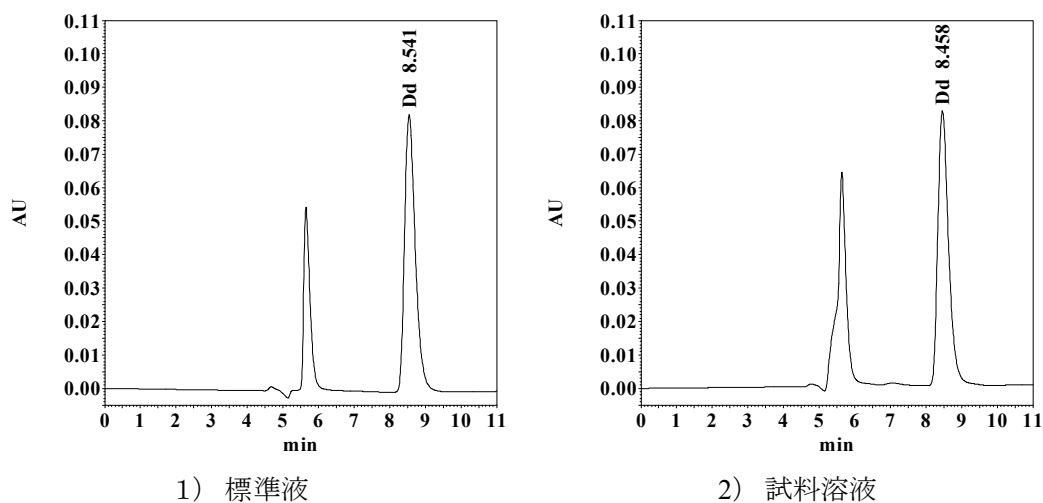


図 石灰窒素及び石灰窒素を含有する肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法フローシート

**参考** 検量線用ジシアンジアミド標準液及び試料溶液(石灰窒素)の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 ジシアンジアミドの HPLC クロマトグラム

- 1) ジシアンジアミド標準液(ジシアンジアミド 100 ng 相当量(10  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{L}$ ))
- 2) 試料溶液(石灰窒素)

HPLC の測定条件

カラム: Hibar LiChrosorb  $\text{NH}_2$ (内径 4.6 mm、長さ 25 cm、粒径 5  $\mu\text{m}$ )

その他の条件は(4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 6.1.b 高速液体クロマトグラフ法(2)

## (1) 概要

この試験法は肥料に適用する。

分析試料に水を加えてジシアンジアミドを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、弱酸性イオン交換カラムで分離し、波長 190 nm で測定し、分析試料中のジシアンジアミド性窒素(Dd-N)を求める。

この方法によって、ビウレット性窒素(B-N)、尿素性窒素(U-N)、グアニジン性窒素(Gu-N)及びグアニル尿素性窒素(Gy-N)が同時に測定できる(備考 5 参照)。

## (2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) リン酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- c) リン酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- d) ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 2 mg/mL)<sup>(1)</sup>: ジシアンジアミド[C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup>0.300 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- e) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 200 µg/mL): ビウレット性窒素標準液(B-N 2 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- f) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 50 µg/mL~100 µg/mL): ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 200 µg/mL) 25 mL~50 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 1 µg/mL~50 µg/mL): 使用時にジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 100 µg/mL) を 1 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) ジシアンジアミドとして 98%(質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. ジシアンジアミドは東京化成工業より市販されている。また、和光純薬工業及び関東化学よりジシアノジアミドとして市販されている。

## (3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 7.5 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm~10 µm の弱酸性イオン交換樹脂を充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出器: 吸光光度検出器で波長 190 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Asahipak ES-502C 7C の名称で市販されている。

**(4) 試験操作**

**(4.1) 抽出** 抽出は、次のとおり行う。

**(4.1.1) 粉状分析用試料**

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(3)</sup>を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (3)** 試料溶液中のジシアンジアミド性窒素(Dd-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

**(4.1.2) 液状分析用試料**

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れる。
- b) 水約 50 mL を加えて、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え<sup>(6)</sup>、共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (6)** 試料溶液中のジシアンジアミド性窒素(Dd-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、定容した溶液の一定量を水で希釈する。

**備考 3.** (4.1.1)c)～d) 又は(4.1.2)c)～d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**(4.2) 測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** 弱酸性イオン交換樹脂カラム(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ ～10  $\mu\text{m}$ )
- 2) **カラム槽温度:** 40  $^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液<sup>(1)</sup>:** りん酸二水素カリウム 3.92 g 及びりん酸 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とする。親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過する。
- 4) **流量:** 0.6 mL/min
- 5) **注入量:** 10  $\mu\text{L}$
- 6) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

**備考 4.** 溶離液は、りん酸二水素カリウム 19.6 g 及びりん酸 0.584 g を水に溶かして 500 mL とし、冷蔵保存し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過して調製してもよい。

## b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。
- 2) 各検量線用標準液のジシアンジアミド性窒素 (Dd-N) 濃度と波長 190 nm のピーク面積の検量線を作成する。

## c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10  $\mu\text{L}$  を b) 1) と同様に操作する。
- 2) ピーク面積から検量線よりジシアンジアミド性窒素 (Dd-N) 量を求め、分析試料中のジシアンジアミド性窒素 (Dd-N) を算出する。

**備考 5.** この試験法ではビウレット性窒素 (B-N)、尿素性窒素 (U-N)、ジシアンジアミド性窒素 (Dd-N)、グアニジン性窒素 (Gu-N) 及びグアニル尿素性窒素標準液 (Gy-N) の同時測定が可能である。その場合は、5.10.a 備考 5 を参照のこと。

(5) **試験法フローシート** 肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法のフローシートを次に示す。

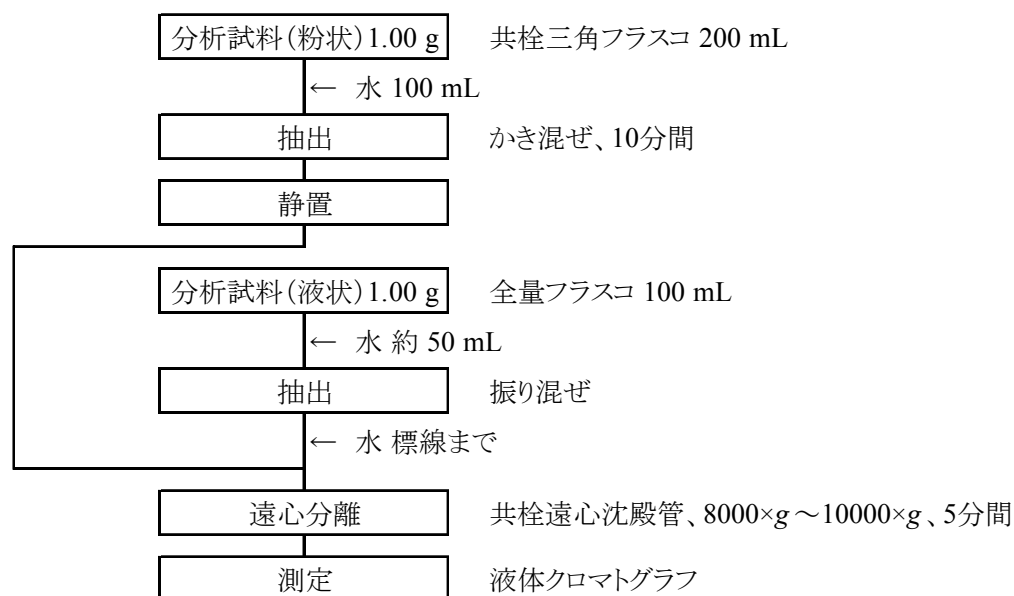


図 肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法のフローシート

## 6.2 塩素

### 6.2.a イオンクロマトグラフ法

#### (1) 概要

硫酸加里、重炭酸加里、硫酸加里苦土、魚かす粉末、魚かす、堆肥に適用する。

分析試料に水を加えて塩化物イオンを抽出し、イオンクロマトグラフ(IC)に導入し、イオン交換カラムで分離した後、電気伝導度検出器で測定し、分析試料中の塩素(Cl)を求める。なお、この試験法の性能は備考 3 に示す。

#### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A4 の水。
- b) 1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液: イオンクロマトグラフィー用のもの。
- c) フタル酸: 純度 98 % (質量分率) 以上の試薬。
- d) 6-アミノヘキサン酸<sup>(1)</sup>: 純度 97 % (質量分率) 以上の試薬。
- e) フェニルボロン酸: 純度 97 % (質量分率) 以上の試薬。
- f) 塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 1 mg/mL): 国家計量標準にトレーサブルな塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 1000 mg/L)。
- g) 塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 100 µg/mL): 塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 1 mg/mL) の一定量を全量フラスコにとり、標線まで水を加える。
- h) 検量線用塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 5 µg/mL~50 µg/mL): 塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 100 µg/mL) 5 mL ~50 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- i) 検量線用塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 1 µg/mL~2 µg/mL): 検量線用塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 20 mg/L) 5 mL~10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- j) サプレッサー法用溶離液: 1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液 6.4 mL を全量フラスコ 1000 mL にとり、標線まで水を加え、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過する<sup>(2)</sup>。
- k) ノンサプレッサー法用溶離液: フタル酸 0.349 g、6-アミノヘキサン酸 0.380 g、フェニルボロン酸 0.732 g を全量フラスコ 1000 mL にとり、水約 500 mL 加えて溶かし標線まで水を加え、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過する<sup>(2)(3)</sup>。

注(1) 別名 6-アミノ-*n*-カプロン酸ともいう。

(2) 調製例であり、必要に応じた量を調整する。

(3) 事前に 10 倍濃度液を調製し、その都度 10 倍希釈して使用してもよい。

備考 1. (2) の塩化物イオン標準液に換えて、国家計量標準にトレーサブルな塩化物イオン標準液 (Cl<sup>-</sup> 0.1 mg/mL) を用いて検量線用塩化物イオン標準液を調製することもできる。

#### (3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) マグネチックスターラー
- b) 遠心分離機: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- c) イオンクロマトグラフ(IC): JIS K 0127 に規定する IC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: サプレッサー法に使用する場合、内径 4.0 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm に第 4 級アンモニウム



基を結合したポリビニルアルコール系多孔質粒子を充填したもの<sup>(4)</sup>。

ノンサプレッサー法に使用する場合、内径 4.6 mm、長さ 100 mm に第 4 級アンモニウム基を結合した親水性ポリメタクリレート系ゲルを充填したもの<sup>(5)</sup>。

- 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 40 °C に調節できるもの。
- 3) **サプレッサー**: 陽イオン交換膜又は樹脂を用いたものであること。
- 4) **検出部**: 電気伝導度検出器。
- d) **メンブレンフィルター**: 孔径 0.45 µm 以下、親水性 PTFE 製

**注(4)** Shodex IC SI-52 4E 等の名称で市販されている。

(5) Shodex IC NI-424 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。
- d) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(6)</sup>、上澄み液を抽出液とする。
- e) 抽出液の一定量を取り、水で正確に 20 倍希釈する<sup>(7)</sup>。
- f) メンブレンフィルター(孔径 0.45 µm 以下)でろ過し、試料溶液とする。

**注(6)** ローター半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。

(7) 検量線を越える場合には 20 倍以上で希釈する。

**備考 2.** (4.1.1)c) 及び d) の操作に代えて、ろ紙 3 種を用いてろ過し、ろ液を抽出液としてもよい。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0127 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用するイオンクロマトグラフ(IC)の操作方法による。

a) **イオンクロマトグラフ(IC)の測定条件**: 測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

##### aa) サプレッサー法

- 1) **カラム**: 第 4 級アンモニウム基を結合したポリビニルアルコール系多孔質粒子カラム(内径 4 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm)
- 2) **カラム槽温度**: 40 °C
- 3) **溶離液**: (2)j) により調製したもの。
- 4) **流量**: 0.8 mL/min
- 5) **注入量**: 20 µL
- 6) **検出器**: 電気伝導度検出器

##### ab) ノンサプレッサー法

- 1) **カラム**: 第 4 級アンモニウム基を結合した親水性ポリメタクリレート系ゲルカラム(内径 4.6 mm、長さ 100

mm)

- 2) **カラム槽温度**: 40 °C
- 3) **溶離液**: (2)k)により調製したもの。
- 4) **流量**: 1.0 mL/min
- 5) **注入量**: 20 µL
- 6) **検出器**: 電気伝導度検出器

#### b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 20 µL を IC に注入し、電気伝導度のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。
- 2) 各検量線用標準液の濃度と電気伝導度のピーク面積の検量線を作成する。  
検量線の作成は、試料の測定時に行う。

#### c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 20 µL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) ピーク面積から検量線より塩化物イオン濃度を求め、分析試料中の塩素(Cl)を算出する。

**備考 3.** 硫酸加里、硫酸加里苦土、重炭酸加里、牛ふん堆肥及び魚かす粉末に塩素として 1.8 %～33.4 % (質量分率)の塩化ナトリウムを添加した試料を用いてサプレッサー法で添加回収試験を行った結果、33.4 % (質量分率)、10 %～13.4 % (質量分率)及び 1.8 %～9.1 % (質量分率)の塩素としての添加レベルで平均回収率は 100.8 %、98.6 %～101.1 %及び 96.2 %～103.2 %であり、ノンサプレッサー法では 100.2 %、96.4 %～97.2 %及び 93.3 %～101.4 %であった。

精度の評価のため、硫酸加里、硫酸加里苦土、重炭酸加里、牛ふん堆肥及び魚かす粉末を用いて日を変えての反復試験の試験成績について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を算出した結果を表 1 に示す。

なお、この試験法の定量下限は 0.1 % (質量分率)程度である。

表1 日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験		併行精度		中間精度	
	日数 $T^{1)}$	平均値 <sup>2)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$s_r^{4)}$	$RSD_r^{5)}$	$s_{1(T)}^{6)}$	$RSD_{1(T)}^{7)}$
			(%) <sup>3)</sup>	(%)	(%) <sup>3)</sup>	(%)
＜サブレッサー法＞						
硫酸加里	5	9.93	0.01	0.1	0.03	0.3
魚かす粉末	5	6.13	0.03	0.5	0.07	1.1
＜ノンサブレッサー法＞						
硫酸加里	5	4.86	0.01	0.2	0.08	1.7
硫酸加里苦土	5	4.89	0.02	0.4	0.06	1.2
重炭酸加里	5	4.85	0.02	0.4	0.06	1.3
牛ふん堆肥	5	13.15	0.04	0.3	0.16	1.2

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値(試験日数( $T$ )×併行試験数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 中間標準偏差

7) 中間相対標準偏差

## 参考文献

- 1) 坂井田里子, 藤田真理子, 白井裕治: イオンクロマトグラフ(IC)法による肥料中の塩素の測定, 肥料研究報告, 8, 50~60 (2015)

- (5) 試験法フローシート 肥料中の塩素試験法のフローシートを次に示す。

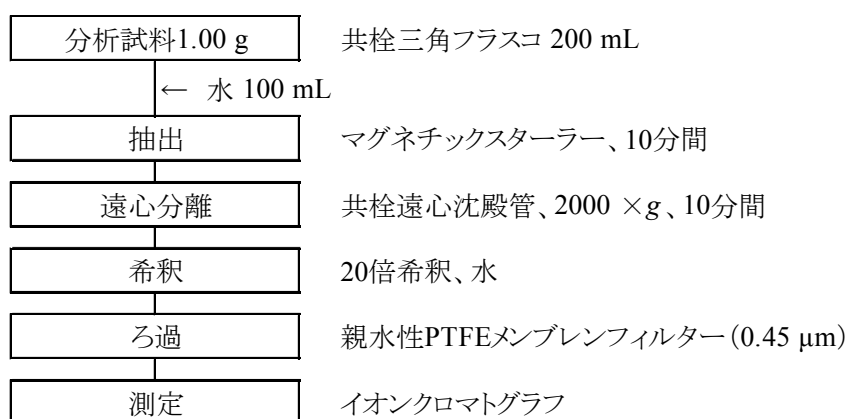
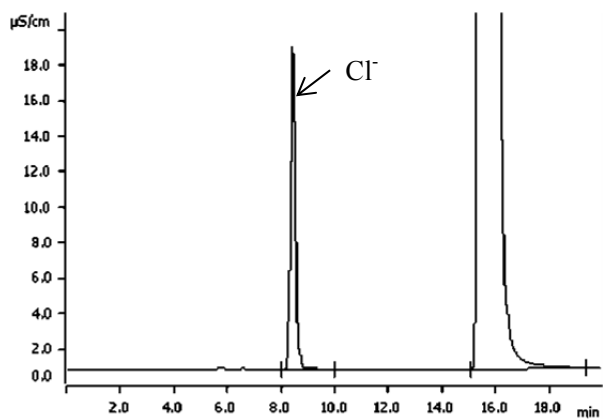
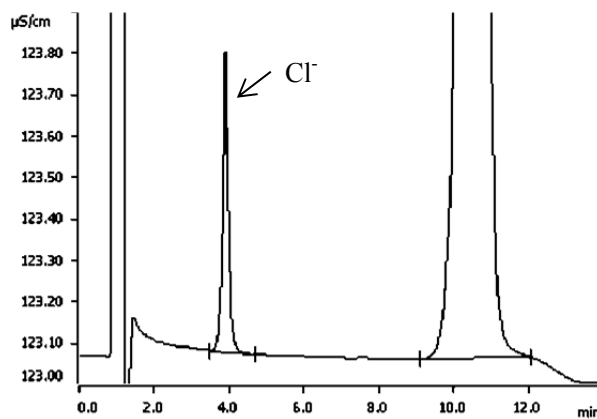


図 肥料中の塩素試験法フローシート

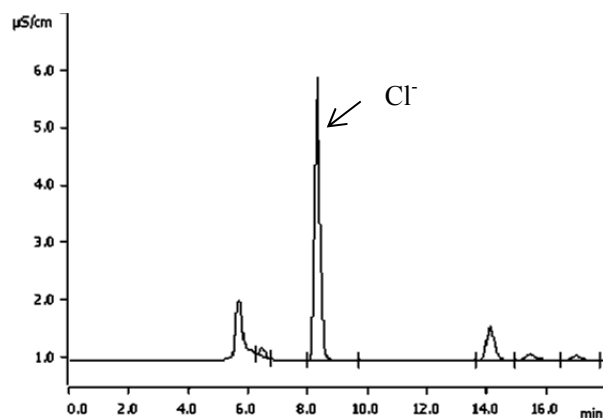
参考 試料溶液(硫酸加里苦土及び魚かす粉末)の IC クロマトグラムを次に示す。



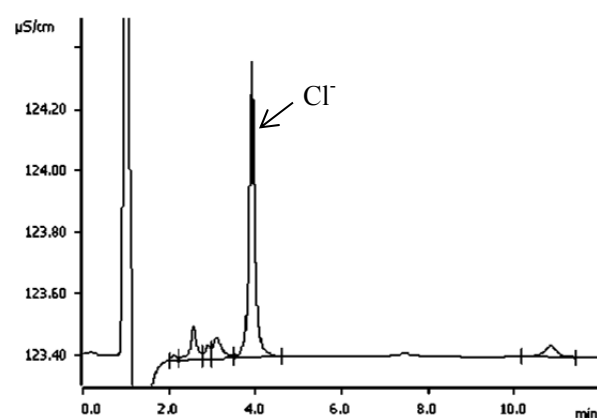
(A) 硫酸加里苦土のクロマトグラム  
(サプレッサー法)



(B) 硫酸加里苦土のクロマトグラム  
(ノンサプレッサー法)



(C) 魚かす粉末のクロマトグラム  
(サプレッサー法)



(D) 魚かす粉末のクロマトグラム  
(ノンサプレッサー法)

参考図 塩化物イオンの IC クロマトグラム  
(ピーク:1.塩化物イオン(Cl<sup>-</sup>))

## 6.2.b 硝酸銀法

## (1) 概要

この試験法は硫酸加里、重炭酸加里及び硫酸加里苦土に適用する。

分析試料に水を加えて塩化物イオンを抽出し、0.1 mol/L 硝酸銀標準液で滴定(沈殿)し、分析試料中の塩素(Cl)を求める。

## (2) 試薬 試薬及び水は、次による。

a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。

b) 硝酸: JIS K 8541 に規定する特級(HNO<sub>3</sub> 60%(質量分率))又は同等の品質の試薬。

c) 0.1 mol/L 硝酸銀溶液<sup>(1)</sup>: JIS K 8550 に規定する硝酸銀 17 g をビーカー2000 mL にはかりとり、水 1000 mL を加えて溶かし、着色瓶に貯蔵する。

**標定:** JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質の塩化ナトリウムを 600 °C±25 °C で1時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、約 1.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加えて塩化ナトリウム溶液とする<sup>(1)</sup>。0.1 mol/L 硝酸銀溶液の使用日毎に、塩化ナトリウム溶液 10 mL を三角フラスコ 200 mL にとり、指示薬としてクロム酸カリウム溶液(5 g/100 mL)数滴を加え、0.1 mol/L 硝酸銀溶液で溶液の色が赤褐色になるまで滴定する。次の式によって 0.1 mol/L 硝酸銀溶液のファクターを算出する。

0.1 mol/L 硝酸銀溶液のファクター( $f$ )

$$\begin{aligned} &= W_1 \times (A/100) \times (1/58.44) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C) \\ &= (W_1 \times A/V_3) \times (4/58.44) \end{aligned}$$

$W_1$ : 採取した塩化ナトリウムの質量(g)

$A$ : 塩化ナトリウムの純度(%(質量分率))

$V_1$ : 分取した塩化ナトリウム溶液の容量(10 mL)

$V_2$ : 塩化ナトリウム溶液の定容量(250 mL)

$V_3$ : 滴定に要した 0.1 mol/L 硝酸銀溶液の容量(mL)

$C$ : 0.1 mol/L 硝酸銀溶液の設定濃度(0.1 mol/L)

d) クロム酸カリウム(5 g/100 mL)<sup>(1)</sup>: JIS K 8312 に規定するクロム酸カリウム 5 g を水 100 mL に溶かす。

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

## (3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) マグネチックスターラー

b) pH 試験紙: 指示薬を紙に染み込ませ、乾燥させたもので、pH 1~pH 11 の範囲を測定でき、pH 1 間隔の変色表が添付されているもの。

**備考 1.** pH 試験紙は UNIV 試験紙等の名称で市販されている。

**(4) 試験操作**

**(4.1) 抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とする。

**(4.2) 測定** 測定は、次のとおり行う。

- a) 試料溶液 25 mL をトールビーカー 200 mL にとる。
- b) pH 試験紙で溶液の pH を確認し、塩基性の場合は硝酸 (1+10) で中和する。
- c) 指示薬としてクロム酸カリウム溶液 (5 g/100 mL) 数滴を加え、0.1 mol/L 硝酸銀溶液で溶液の色が赤褐色になるまで滴定する。
- d) 次の式によって分析試料中の塩素 (Cl) を算出する。

分析試料中の塩素 (% (質量分率))

$$= V_4 \times C \times f \times (35.45) / W_2 \times (100/1000) \times (V_5 / V_6)$$

$$= V_4 \times f \times (35.45/25) / W_2$$

$V_4$ : 試料溶液の滴定に要した 0.1 mol/L 硝酸銀溶液の容量 (mL)

$C$ : 0.1 mol/L 硝酸銀溶液の設定濃度 (0.1 mol/L)

$f$ : 0.1 mol/L 硝酸銀溶液のファクター

$V_5$ : (4.1) b) における抽出に供した水の液量 (100 mL)

$V_6$ : (4.2) a) において滴定に供した試料溶液の分取量 (25 mL)

$W_2$ : 分析試料の質量 (g)

**参考文献**

- 1) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.199~201, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 試験法フローシート 硫酸加里等中の塩素試験法のフローシートを次に示す。

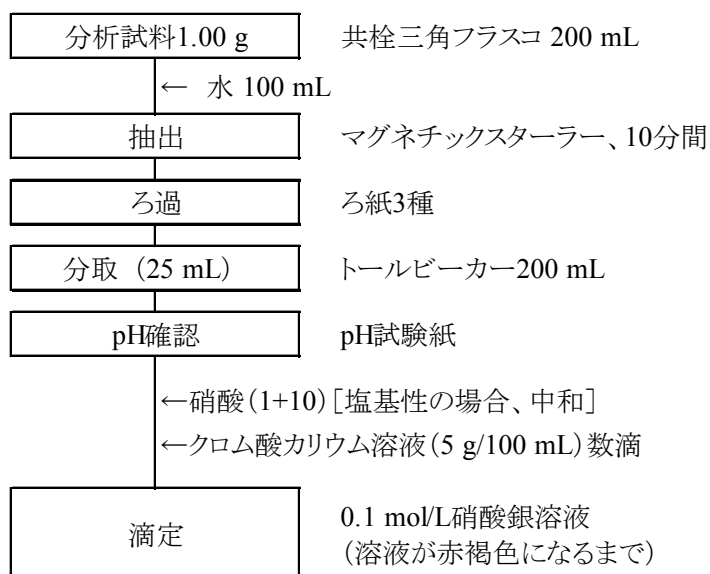


図 硫酸加里等中の塩素試験法フローシート

## 6.3 尿素性窒素

### 6.3.a ウレアーゼ法

#### (1) 概要

この試験法は尿素を含む肥料又はアセトアルデヒド縮合尿素等の尿素化合物に適用する。ただし、加熱により分解する石灰窒素等の化合物を含む肥料には適用できない場合がある。

水又はりん酸塩溶液(冷緩衝液)を分析試料に加えて抽出し、ウレアーゼを抽出液の一定量に加えて尿素をアンモニウムイオンに加水分解する。水酸化ナトリウム溶液を加えて溶液をアルカリ性にして水蒸気蒸留する。分離したアンモニアを 0.25 mol/L 硫酸で捕集し、余剰の硫酸を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で(中和)滴定し、別途ウレアーゼ空試験及びウレアーゼ未分解空試験の滴定値を補正して分析試料中の尿素性窒素(U-N)を求める。又は、分離したアンモニアをほう酸溶液で捕集し、アンモニウムイオンを 0.25 mol/L 硫酸で(中和)滴定し、同様に補正して分析試料中のアンモニア性窒素(A-N)を求める。この試験法は、肥料分析法(1992年版)のウレアーゼ法に対応する。

#### (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液<sup>(1)</sup>**: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して 4～5 日間放置する。その上澄み液 5.5 mL～11 mL を共栓保存容器にとり、水 1000 mL を加える。

**標定**: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後、約 2.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加える<sup>(1)</sup>。この液一定量を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、指示薬としてプロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定する。次の式によって 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

$$0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ = (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1)$$

$W_1$ : 採取したアミド硫酸の質量(g)

$A$ : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

$V_1$ : 分取したアミド硫酸溶液の容量(mL)

$V_2$ : アミド硫酸溶液の定容量(250 mL)

$V_3$ : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

- b) **酸化マグネシウム**: JIS K 8432 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

- c) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

- d) **0.25 mol/L 硫酸<sup>(1)(2)</sup>**: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1000 mL とする。

**標定**: 0.25 mol/L 硫酸一定量<sup>(3)</sup>を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、メチルレッド～メチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色<sup>(4)</sup>になるまで滴定する。



次の式(1)によって0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を算出する。又は、次の式(2)によって0.25 mol/L 硫酸のファクターを算出する。

$$\begin{aligned} & \text{0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(B)} \\ & = V_4/V_5 \quad \dots\dots (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{0.25 mol/L 硫酸のファクター}(f_2) \\ & = (f_1 \times C_1 \times V_4/V_5)/(C_2 \times 2) \quad \dots\dots (2) \end{aligned}$$

$V_4$ : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$V_5$ : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

$C_2$ : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

- e) **ほう酸溶液(40 g/L)**: JIS K 8863 に規定するほう酸 40 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- f) **ウレアーゼ**: ウレアーゼ 0.5 g で尿素 0.25 g を完全に分解する試薬。
- g) **水酸化ナトリウム溶液(5 g/L)<sup>(1)</sup>**: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 5 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- h) **塩酸**: JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- i) **プロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8842 に規定するプロモチモールブルー0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95)20 mL で溶かし、水で 100 mL とする。
- j) **メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8896 に規定するメチルレッド 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95)100 mL に溶かす。
- k) **メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8897 に規定するメチレンブルー0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95)100 mL に溶かす。
- l) **メチルレッドーメチレンブルー混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)2 容量に対し、メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)1 容量を加える。
- m) **ブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)**: JIS K 8840 に規定するブロムクレゾールグリーン0.5 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95)100 mL に溶かす。
- n) **メチルレッドーブロムクレゾールグリーン混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)に同量のブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)を加える。

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 肥料分析法(1992年版)の標準硫酸液 0.5 M(1/2 硫酸)溶液に対応する。

(3) 5 mL～10 mL

(4) 青紫色から暗青色を経て灰緑色になった時を終点とする。

**備考 1.** (2)a)の 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。

**備考 2.** (2)d)の 0.25 mol/L 硫酸に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.25 mol/L 硫酸を用いることもできる。

**備考 3.** ナタマメ由来の精製品が市販されている。冷蔵庫に保存しておいても活性が落ちることがあるので、使用前に JIS K 8731 に規定する尿素を用いて同様に試験してその活性を確認することを推奨する。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) **回転振り混ぜ機:** 全量フラスコ 500 mL を 30~40 回転/分で上下転倒して回転させられるもの。
- b) **水蒸気蒸留装置**
- c) **蒸留フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ又は丸底フラスコ

(4) **試験操作**

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

(4.1.1) **尿素を含む複合肥料**

- a) 分析試料 5.00 g をはかりとり、全量フラスコ 500 mL に入れる。
- b) 水約 400 mL を加え、30~40 回転/分で約 30 分間振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加える。
- d) ろ紙 3 種でろ過し、抽出液とする。

**備考 4.** a) の操作で、分析試料 2.50 g をはかりとり、全量フラスコ 250 mL に入れても良い。

**備考 5.** (4.1.2) の操作は、4.2.4.a の(4.1)と同様の操作である。

(4.1.2) **尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料**

- a) 分析試料<sup>(5)</sup> 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 250 mL に入れる。
- b) リン酸塩溶液 200 mL を加え、30~40 回転/分で 30 分間振り混ぜる。
- c) 放冷後、標線まで水を加える。
- d) ろ紙 3 種でろ過し、抽出液とする。

**注(5)** 尿素化合物は**備考 6**により分析用試料を調製する。

**備考 6.** 目開き 850  $\mu\text{m}$  のふるいを通すまで、試験品を乳鉢、乳棒等を用いて押し砕く。

**備考 7.** 加水分解して尿素を生成するのおそれのない分析試料の場合は、(4.1.1)により抽出液を調製してもよい。

**備考 8.** (4.1)b)~d)の操作における溶液の温度は 26  $^{\circ}\text{C}$ 以下とする。

**備考 9.** (4.1.2)の操作は、6.5.a の(4.1)と同様の操作である。

(4.2) **ウレアーゼによる加水分解** 加水分解は、次のとおり行う。

- a) 抽出液の一定量(U-Nとして 10 mg 相当量以上、Nとして 10 mg~100 mg 相当量)を蒸留フラスコ 300 mL に入れる。
- b) 水を加えて液量を約 50 mL とする。
- c) メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)数滴加え、溶液の色がうすい黄赤色になるまで水酸化ナトリウム溶液(5 g/L)又は塩酸(1+200)を加える<sup>(6)</sup>。
- e) 抽出液中の尿素を分解するために十分な量のウレアーゼを加え<sup>(7)(8)</sup>、密栓して 40  $^{\circ}\text{C}$ ~45  $^{\circ}\text{C}$ の水浴中で

加温する。

- f) 放冷して試料溶液とする。
- g) 抽出液空試験として、別の蒸留フラスコを用いて a) の操作を実施し<sup>(9)</sup>、未分解試験溶液を調製する。
- h) ウレアーゼ空試験として、別の蒸留フラスコを用いて b)、e) 及び f) の操作を実施し<sup>(8)(10)</sup>、空試験溶液を調製する。

**注(6)** pH 5.6～pH 5.8

- (7) ウレアーゼの添加量の一例を備考 20 に示す。
- (8) ウレアーゼが容器の壁面についた場合、少量の水で洗い落とす。
- (9) 試料溶液の調製と同量の抽出液を分取する。
- (10) 試料溶液の調製と同量のウレアーゼを加える。

(4.2) **蒸留** 蒸留は、次のとおり行う。具体的な蒸留操作は、測定に使用する水蒸気蒸留装置の操作方法による。

- a) 0.25 mol/L 硫酸の一定量<sup>(11)</sup>を受器<sup>(12)</sup>にとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。又は、ほう酸溶液(40 g/L)の一定量<sup>(11)</sup>を受器<sup>(12)</sup>にとり、メチルレッドーブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。
- b) 試料溶液の入った蒸留フラスコに酸化マグネシウム 2 g～3 g を加え<sup>(13)</sup>、この蒸留フラスコを水蒸気蒸留装置に連結する。
- c) 水蒸気を蒸留フラスコに送り、蒸留フラスコ内の溶液を加熱し、留出速度 5 mL/min～7 mL/min で蒸留を行う。
- d) 120 mL～160 mL が留出したら蒸留を止める。
- e) 受器内の溶液と接した水蒸気蒸留装置の部分を少量の水で洗い、洗液を留出液と合わせる。
- f) 未分解試験溶液を a)～e) と同様に操作して未分解試験溶液よりの留出液を得る。
- h) 空試験溶液を a)～e) と同様に操作して空試験溶液よりの留出液を得る。

**注(11)** 5 mL～20 mL

- (12) 受器は水蒸気蒸留装置の留出液の出口を 0.25 mol/L 硫酸又はほう酸溶液(40 g/L)に浸せる三角フラスコ 200 mL～300 mL 又はビーカー 200 mL～300 mL を用いる。
- (13) 必要に応じて、少量のシリコーン油を加える。

**備考 10.** (4.2)b) の操作は、容器内のアンモニアガスが放出しないように素早く実施する。

(4.3) **測定** 測定は、次のとおり行う。

(4.3.1) (4.2) で 0.25 mol/L 硫酸を用いた場合

- a) 留出液を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色<sup>(4)</sup>になるまで滴定する。
- b) 未分解試験溶液よりの留出液を a) と同様に操作して滴定する。
- c) 空試験溶液よりの留出液を a) と同様に操作して滴定する。
- e) 次の式によって分析試料中の尿素性窒素(U-N)を算出する。

分析試料中の尿素性窒素(U-N) (%(質量分率))

$$= (B \times ((V_6 - V_7) - (V_6 - V_8) - (V_6 - V_9)) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (14.007/W_2) \times (100/1000))$$

$$= (B \times (-V_6 - V_7 + V_8 + V_9)) \times C_1 \times f_1 \times (V_{10}/V_{11}) \times (1.4007/W_2)$$

$B$ : 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量

$V_6$ : (4.2) a)において受器にとつた 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$V_7$ : (4.3.1) a)において滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$V_8$ : (4.3.1) b)において滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$V_9$ : (4.3.1) c)において滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

$f_1$ : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

$V_{10}$ : (4.1.1) c)又は(4.1.2) c)における抽出液の定容量(mL)

$V_{11}$ : (4.2) a)において加水分解に供した抽出液の分取量(mL)

$W_2$ : (4.1.1) a)又は(4.1.2) a)における分析試料の質量(g)

(4.3.2) (4.2)でほう酸溶液(40 g/L)を用いた場合

- 留出液を 0.25 mol/L 硫酸で溶液の色がうすい紅色<sup>(14)</sup>になるまで滴定する。
- 未分解試験溶液よりの留出液を a)と同様に操作して滴定する。
- 空試験溶液よりの留出液を a)と同様に操作して滴定する。
- 次の式によって分析試料中の尿素性窒素(U-N)を算出する。

分析試料中の尿素性窒素(U-N) (%(質量分率))

$$= (V_{12} - V_{13} - V_{14}) \times C_2 \times 2 \times f_2 \times (V_8/V_9) \times (14.007/W_2) \times (100/1000)$$

$$= (V_{12} - V_{13} - V_{14}) \times C_2 \times f_2 \times (V_8/V_9) \times (2.8014/W_2)$$

$V_{12}$ : (4.3.2) a)において滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$V_{13}$ : (4.3.2) b)において滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$V_{14}$ : (4.3.2) c)において滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$C_2$ : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

$f_2$ : 0.25 mol/L 硫酸のファクター

$V_{10}$ : (4.1.1) c)又は(4.1.2) c)における抽出液の定容量(mL)

$V_{11}$ : (4.2) a)において加水分解に供した抽出液の分取量(mL)

$W_2$ : (4.1.1) a)又は(4.1.2) a)における分析試料の質量(g)

注(14) 緑色からうすい紅色になった時を終点とする。

備考 11. 酸化マグネシウムを用いることにより、抽出液中に炭酸塩に由来する二酸化炭素のために終点が見にくい場合は、蒸留終了後抽出液を 1~2 分間煮沸し、冷却後滴定するとよい。

備考 12. 自動滴定装置を用いて(2) a) 標定、(2) d) 標定及び(4.3)の滴定操作を実施することができる。滴定プログラム及び終点判定パラメーターの設定並びに受器等の容器は、使用する自動滴定装置の仕様及

び操作方法による。

**備考 13.** ウレアーゼの添加量及び滴定量の一例を次に示す。

尿素有量が推定できる場合、(4.1.1)又は(4.1.1)の操作後の(4.2)a)における抽出液の分取量中の尿素有量は次式により算出される。

抽出液の分取量中の尿素有量の推定量(mg)

$$= (D_1/100) \times W_2 \times (V_{11}/V_{10})$$

$D_1$ : 分析試料中の尿素有量の推定量(%(質量分率))

$V_{10}$ : (4.1.1)c)又は(4.1.2)c)における抽出液の定容量(mL)

$V_{11}$ : (4.2)a)において加水分解に供した抽出液の分取量(mL)

$W_2$ : (4.1.1)a)又は(4.1.2)a)における分析試料の質量(g)

尿素有量が推定できる場合は、尿素化合物の尿素性窒素有量の含有許容量又は表示成分量の窒素有量からアンモニア性窒素有量及び硝酸性窒素有量を差し引いた窒素有量を尿素性窒素有量(U-N)の含有量の最大量付近として見積もる。この場合、(4.1.1)又は(4.1.1)の操作後の(4.2)a)における抽出液の分取量中の尿素有量の見積量は次式により算出される。

抽出液の分取量中の尿素有量の見積量(mg)

$$= (D_2/100) \times (60.056/(14.007 \times 2)) \times W_2 \times (V_{11}/V_{10})$$

$$= (D_2/100) \times 2.1438 \times W_2 \times (V_{11}/V_{10})$$

$D_2$ : 分析試料中の尿素性窒素有量(U-N)の見積量(%(質量分率))

$V_{10}$ : (4.1.1)c)又は(4.1.2)c)における抽出液の定容量(mL)

$V_{11}$ : (4.2)a)において加水分解に供した抽出液の分取量(mL)

$W_2$ : (4.1.1)a)又は(4.1.2)a)における分析試料の質量(g)

ウレアーゼは「0.5 g 以下で尿素 0.25 g を完全に分解するもの」と規定されていることから、尿素 1 mg の分解にはウレアーゼ 2 mg 程度必要となる。抽出液の分取量中の尿素有量の推定量又は見積量を約 43 mg (尿素性窒素有量として約 20 mg)とした場合、ウレアーゼは約 86 mg 必要となる。

なお、尿素性窒素有量として約 20 mg 分取した際、試料溶液からの留出液の滴定値((4.3.2)a)又は(4.3.2)a))と未分解試験溶液よりの留出液の滴定値((4.3.2)a)又は(4.3.2)a))の差は、滴定液として 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いた場合は 14 mL 程度、0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いた場合は 7 mL 程度、0.25 mol/L 硫酸を用いた場合は 3 mL 程度と推定される。

## 参考文献

- 1) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, p.56~59, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 尿素性窒素試験法フローシート 肥料中の尿素性窒素試験法のフローシートを次に示す。

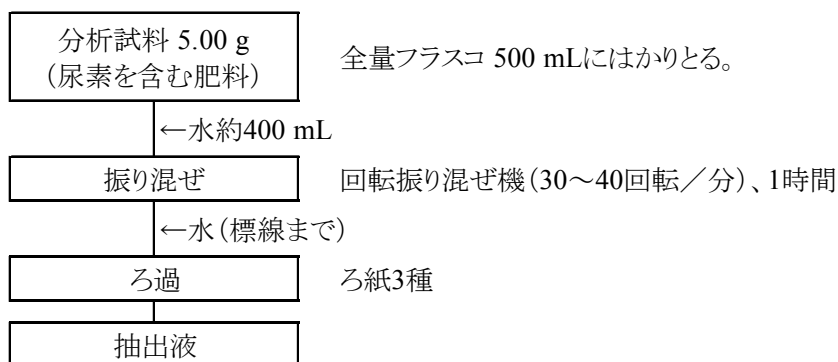


図 尿素性窒素試験法フローシート(1)  
(尿素を含む肥料の抽出操作)

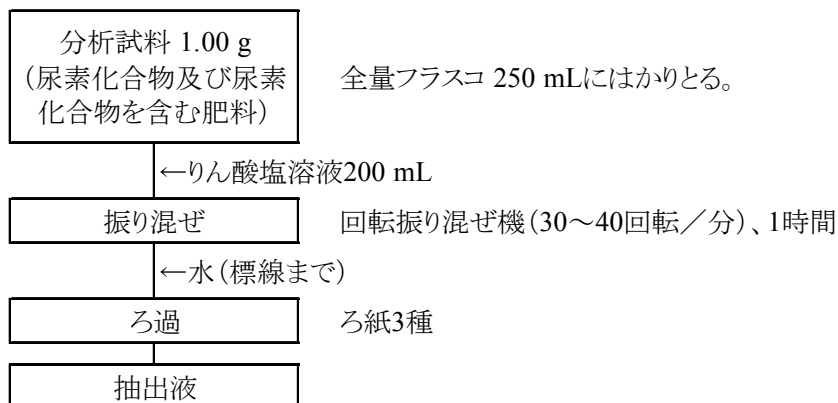


図 尿素性窒素試験法フローシート(2)  
(尿素化合物及び尿素化合物を含む肥料の抽出操作)

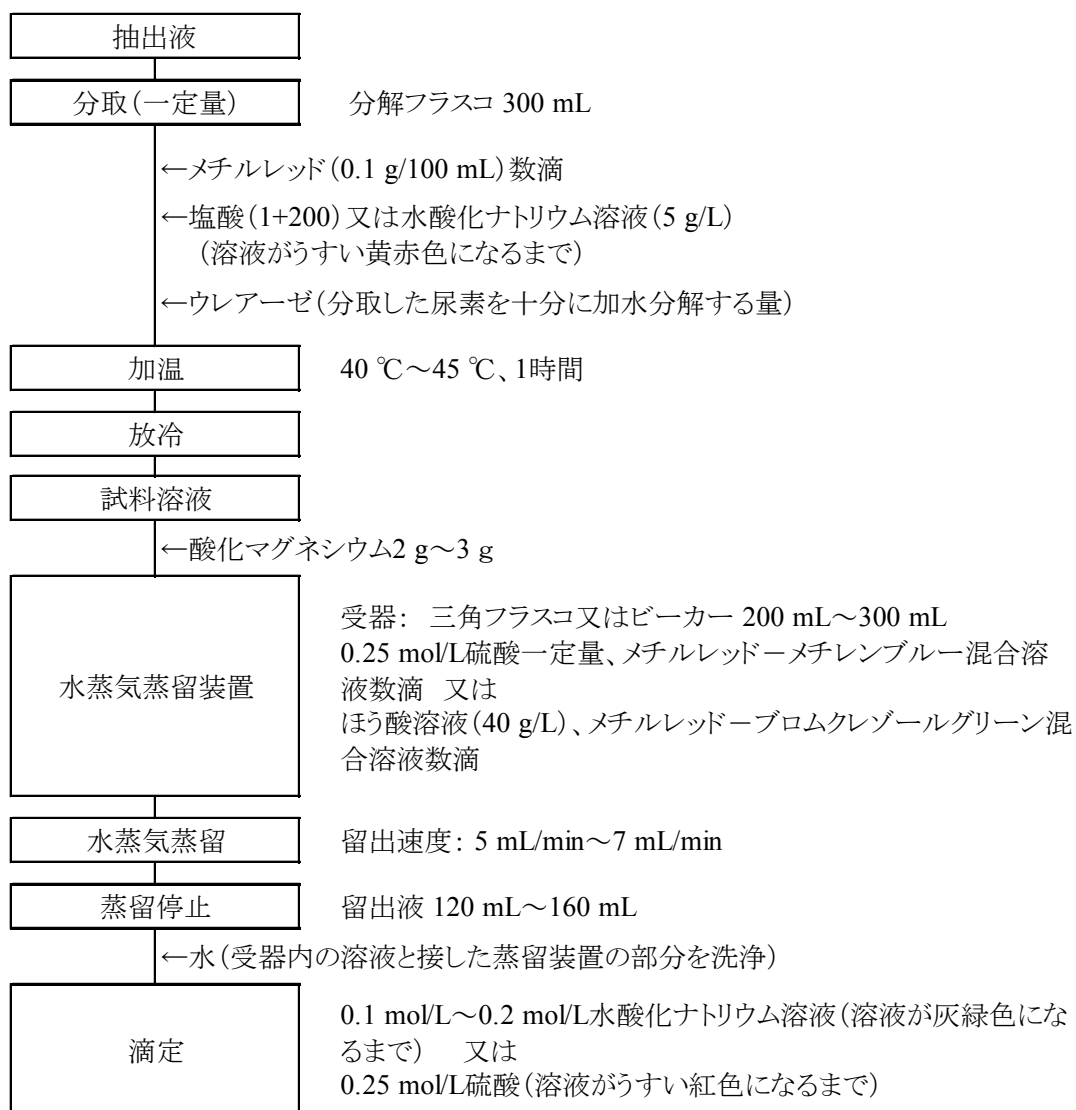


図 尿素性窒素試験法フローシート(3)  
(ウレアーゼによる加水分解、蒸留及び測定操作)

### 6.3.b 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法は肥料に適用する。

分析試料に水を加えて尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、弱酸性イオン交換カラムで分離し、波長 190 nm で測定し、分析試料中の尿素性窒素(U-N)を求める。

この方法によって、ビウレット性窒素(B-N)ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、グアニジン性窒素(Gu-N)及びグアニル尿素性窒素(Gy-N)が同時に測定できる(備考 4 参照)。

#### (2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) リン酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- c) リン酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- d) 尿素性窒素標準液(U-N 2 mg/mL)<sup>(1)</sup>: JIS K 8731 に規定する尿素 0.429 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- e) 検量線用尿素性窒素標準液(U-N 200 µg/mL): 尿素性窒素標準液(U-N 2 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- f) 検量線用尿素性窒素標準液(U-N 50 µg/mL~100 µg/mL): 尿素性窒素標準液(U-N 200 µg/mL) 25 mL~50 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用尿素性窒素標準液(U-N 1 µg/mL~50 µg/mL): 使用時に尿素性窒素標準液(U-N 0.1 mg/mL)を 1 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

#### (3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 7.5 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm~10 µm の弱酸性イオン交換樹脂を充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出器: 吸光光度検出器で波長 190 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 1. カラムは Asahipak ES-502C 7C の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

##### (4.1.1) 粉状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。



- c) 静置後、上澄み液<sup>(2)</sup>を共栓遠心沈殿管<sup>(3)</sup>1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(4)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (2)** 試料溶液中の尿素性窒素(U-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(3) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(4) 回転半径 7.2 cm $\sim$ 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

#### (4.1.2) 液状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れる。
- b) 水約 50 mL を加えて、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え<sup>(5)</sup>、共栓遠心沈殿管<sup>(3)</sup>1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(4)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (5)** 試料溶液中の尿素性窒素(U-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、定容した溶液の一定量を水で希釈する。

**備考 2.** (4.1.1)c)～d) 又は(4.1.2)c)～d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** 弱酸性イオン交換樹脂カラム(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ ～10  $\mu\text{m}$ )
- 2) **カラム槽温度:** 40  $^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液<sup>(1)</sup>:** りん酸二水素カリウム 3.92 g 及びりん酸 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とする。親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過する。
- 4) **流量:** 0.6 mL/min
- 5) **注入量:** 10  $\mu\text{L}$
- 6) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

**備考 3.** 溶離液は、りん酸二水素カリウム 19.6 g 及びりん酸 0.584 g を水に溶かして 500 mL とし、冷蔵保存し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過して調製してもよい。

#### b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。
- 2) 各検量線用標準液の尿素性窒素(U-N)濃度と波長 190 nm のピーク面積の検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10  $\mu$ L を b) 1) と同様に操作する。
- 2) ピーク面積から検量線より尿素性窒素(U-N) 量を求め、分析試料中の尿素性窒素(U-N)を算出する。

**備考 4.** この試験法ではビウレット性窒素(B-N)、尿素性窒素(U-N)、ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、グアニジン性窒素(Gu-N)及びグアニル尿素性窒素標準液(Gy-N)の同時測定が可能である。その場合は、5.10.a 備考 5 を参照のこと。

(5) **試験法フローシート** 肥料中の尿素性窒素試験法のフローシートを次に示す。

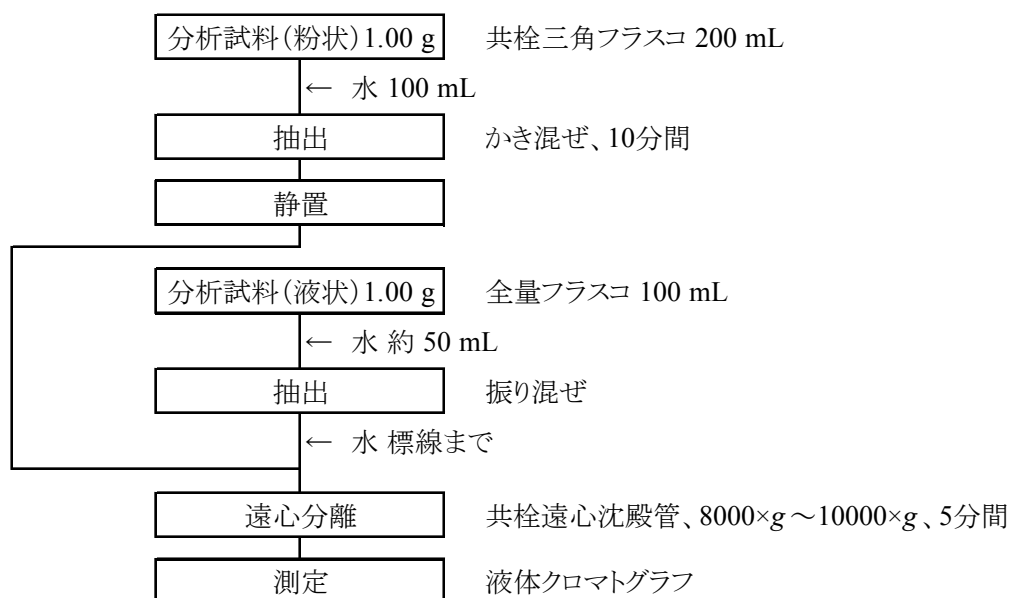


図 肥料中の尿素性窒素試験法のフローシート

## 6.4 グアニジン性窒素

### 6.4.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法は肥料に適用する。

分析試料に水を加えてグアニジンを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、弱酸性イオン交換カラムで分離し、波長 190 nm で測定し、分析試料中のグアニジン性窒素(Gu-N)を求める。

この方法によって、ビウレット性窒素(B-N)、ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、尿素性窒素(U-N)及びグアニル尿素性窒素(Gy-N)が同時に測定できる(備考 5 参照)。

#### (2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) リン酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- c) リン酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- d) グアニジン性窒素標準液(Gu-N 2 mg/mL)<sup>(1)</sup>: グアニジン硫酸塩[ $C_2H_{10}N_6 \cdot H_2SO_4$ ]<sup>(2)</sup> 0.515 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- e) 検量線用グアニジン性窒素標準液(Gu-N 200 µg/mL): グアニジン性窒素標準液(Gu-N 2 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- f) 検量線用グアニジン性窒素標準液(Gu-N 50 µg/mL~100 µg/mL): グアニジン性窒素標準液(Gu-N 200 µg/mL) 25 mL~50 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用グアニジン性窒素標準液(Gu-N 1 µg/mL~50 µg/mL): 使用時にグアニジン性窒素標準液(Gu-N 100 µg/mL) を 1 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) グアニジン硫酸塩として 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. グアニジン硫酸塩は和光純薬工業及び関東化学及び東京化成工業より市販されている。

#### (3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 7.5 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm~10 µm の弱酸性イオン交換樹脂を充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出器: 吸光光度検出器で波長 190 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Asahipak ES-502C 7C の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

(4.1.1) 粉状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(3)</sup>を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

注 (3) 試料溶液中のグアニジン性窒素 (Gu-N) 濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

(4.1.2) 液状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れる。
- b) 水約 50 mL を加えて<sup>(6)</sup>、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え、共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

注 (6) 試料溶液中のグアニジン性窒素 (Gu-N) 濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、定容した溶液の一定量を水で希釈する。

備考 3. (4.1.1)c)～d) 又は (4.1.2)c)～d) の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) 高速液体クロマトグラフの測定条件: 測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) カラム: 弱酸性イオン交換樹脂カラム(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ ～10  $\mu\text{m}$ )
- 2) カラム槽温度: 40  $^{\circ}\text{C}$
- 3) 溶離液<sup>(1)</sup>: りん酸二水素カリウム 3.92 g 及びりん酸 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とする。親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過する。
- 4) 流量: 0.6 mL/min
- 5) 注入量: 10  $\mu\text{L}$
- 6) 検出器: 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

備考 4. 溶離液は、りん酸二水素カリウム 19.6 g 及びりん酸 0.584 g を水に溶かして 500 mL とし、冷蔵保存し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過して調製してもよい。

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。
- 2) 各検量線用標準液のグアニジン性窒素 (Gu-N) 濃度と波長 190 nm のピーク面積の検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10  $\mu\text{L}$  を b) 1) と同様に操作する。
- 2) ピーク面積から検量線よりグアニジン性窒素 (Gu-N) 量を求め、分析試料中のグアニジン性窒素 (Gu-N) を算出する。

**備考 5.** この試験法ではビウレット性窒素 (B-N)、尿素性窒素 (U-N)、ジシアンジアミド性窒素 (Dd-N)、グアニジン性窒素 (Gu-N) 及びグアニル尿素性窒素標準液 (Gy-N) の同時測定が可能である。その場合は、5.10.a 備考 5 を参照のこと。

(5) 試験法フローシート 肥料中のグアニジン性窒素試験法のフローシートを次に示す。

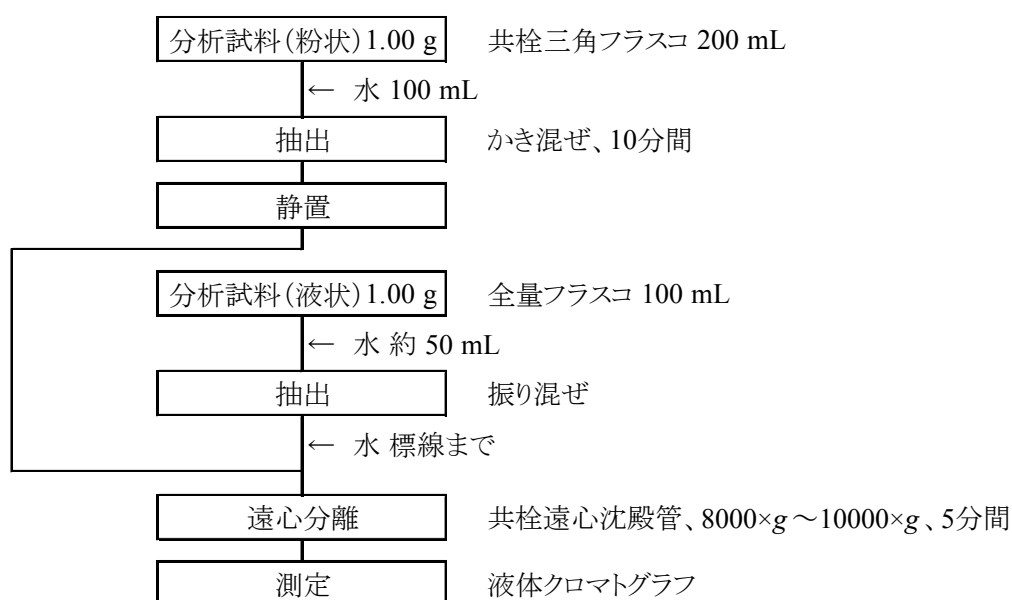


図 肥料中のグアニジン性窒素試験法のフローシート

## 6.5 冷緩衝液可溶性窒素(水に溶ける窒素)

### 6.5.a 冷緩衝液法

#### (1) 概要

この試験法はホルムアルデヒド加工尿素肥料に適用する。

りん酸塩溶液(冷緩衝液)を分析試料に加えて抽出し、硫酸銅(Ⅱ)五水和物、硫酸及び硫酸カリウムを加え、ケルダール法で前処理して冷緩衝液可溶性窒素をアンモニウムイオンにし、水酸化ナトリウム溶液を加えて水蒸気蒸留する。分離したアンモニアを0.25 mol/L 硫酸で捕集し、余剰の硫酸を0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で(中和)滴定し、分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素(水に溶ける窒素)を求める。又は、分離したアンモニアをほう酸溶液で捕集し、アンモニウムイオンを0.25 mol/L 硫酸で(中和)滴定し、分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素(水に溶ける窒素)を求める。

#### (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液<sup>(1)</sup>**: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して4～5 日間放置する。その上澄み液 5.5 mL～11 mL を共栓保存容器にとり、水 1000 mL を加える。

**標定**: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後、約 2.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加える<sup>(1)</sup>。この液一定量を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、指示薬としてプロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定する。次の式によって 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

$$\begin{aligned} &0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ &= (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1) \end{aligned}$$

$W_1$ : 採取したアミド硫酸の質量(g)

$A$ : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

$V_1$ : 分取したアミド硫酸溶液の容量(mL)

$V_2$ : アミド硫酸溶液の定容量(250 mL)

$V_3$ : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

- b) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

- c) **0.25 mol/L 硫酸<sup>(1)(2)</sup>**: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1000 mL とする。

**標定**: 0.25 mol/L 硫酸一定量<sup>(3)</sup>を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色<sup>(4)</sup>になるまで滴定する。次の式(1)によって 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を算出する。又は、次の式(2)によって 0.25 mol/L 硫酸のファクターを算出する。

$$0.25 \text{ mol/L 硫酸 } 1 \text{ mL に相当する } 0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(B)} \\ = V_4/V_5 \quad \dots\dots (1)$$

$$0.25 \text{ mol/L 硫酸のファクター}(f_2) \\ = (f_1 \times C_1 \times V_4/V_5)/(C_2 \times 2) \quad \dots\dots (2)$$

$V_4$ : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$V_5$ : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

$C_2$ : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

- d) **ほう酸溶液(40 g/L)**: JIS K 8863 に規定するほう酸 40 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- e) **水酸化ナトリウム溶液(200 g/L～500 g/L)<sup>(1)</sup>**: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 100 g～250 g を水に溶かして 500 mL とする。
- f) **プロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8842 に規定するプロモチモールブルー0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 20 mL で溶かし、水で 100 mL とする。
- g) **メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8896 に規定するメチルレッド 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- h) **メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8897 に規定するメチレンブルー0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- i) **メチルレッド－メチレンブルー混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) 2 容量に対し、メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL) 1 容量を加える。
- j) **ブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)**: JIS K 8840 に規定するブロムクレゾールグリーン 0.5 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- k) **メチルレッド－ブロムクレゾールグリーン混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) に同量のブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)を加える。
- l) **りん酸塩溶液**: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 3.63 g 及び JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 5.68 g を水 1000 mL に溶かす<sup>(5)</sup>。使用に際して、液温を約 25 °C に調整する(冷緩衝液)

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 肥料分析法(1992年版)の標準硫酸液 0.5 M(1/2 硫酸)溶液に対応する。

(3) 5 mL～10 mL

(4) 青紫色から暗青色を経て灰緑色になった時を終点とする。

(5) pH 7.0±pH 0.2

**備考 1.** (2) a) の 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。

**備考 2.** (2) c) の 0.25 mol/L 硫酸に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.25 mol/L 硫酸を用いることもできる。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) **回転振り混ぜ機**: 全量フラスコ 250 mL を 30~40 回転/分で上下転倒して回転させられるもの。
- b) **水蒸気蒸留装置**
- c) **分解フラスコ**: 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料<sup>(6)</sup> 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 250 mL に入れる。
- b) りん酸塩溶液 200 mL を加え、30~40 回転/分で 30 分間振り混ぜる。
- c) 放冷後、標線まで水を加える。
- d) ろ紙 3 種でろ過し、抽出液とする。

**注(6)** 分析用試料は**備考 3**により調製する。

**備考 3.** 目開き 850  $\mu\text{m}$  のふるいを通過するまで、試験品を乳鉢、乳棒等を用いて押し砕く。

**備考 4.** 加水分解のおそれのない分析試料の場合は、りん酸溶液に代えて水を用いてもよい。

**備考 5.** (4.1) b)~d)の操作における溶液の温度は 26  $^{\circ}\text{C}$ 以下とする。

(4.2) **ケルダール分解** 分解は、次のとおり行う。

- a) 試料溶液の一定量(冷緩衝液可溶性窒素として 0.5 g 相当量以下)を分解フラスコ 300 mL に入れる。
- b) JIS K 8962 に規定する硫酸銅(II)五水和物<sup>(7)</sup> 0.1 g を加え、更に硫酸 5 mL を加えて振り混ぜ、徐々に加熱して水分を蒸発させる。
- f) 放冷後、JIS K 8962 に規定する硫酸カリウム 1 g を加え、加熱して分解する。
- d) 更に 30 分間強熱する。
- e) 放冷後、液量が約 30 mL になるまで振り混ぜながら水を加え、放冷して分解液とする。

**注(7)** 必要に応じて粉末にする。

(4.3) **蒸留** 蒸留は、次のとおり行う。具体的な蒸留操作は、測定に使用する水蒸気蒸留装置の操作方法による。

- a) 0.25 mol/L 硫酸の一定量<sup>(8)</sup>を受器<sup>(9)</sup>にとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。又は、ほう酸溶液(40 g/L)の一定量<sup>(8)</sup>を受器<sup>(9)</sup>にとり、メチルレッドーブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。
- b) 水酸化ナトリウム溶液(200 g/L~500 g/L)適量<sup>(10)</sup>を分解液に加え、この分解フラスコを水蒸気蒸留装置に速やかに連結する。
- c) 水蒸気を蒸留フラスコに送り、蒸留フラスコ内の溶液を加熱し、留出速度 5 mL/min~7 mL/min で蒸留を行う。
- d) 120 mL~160 mL が留出したら蒸留を止める。
- e) 受器内の溶液と接した水蒸気蒸留装置の部分を少量の水で洗い、洗液を留出液と合わせる。

**注(8)** 5 mL~20 mL



- (9) 受器は水蒸気蒸留装置の留出液の出口を 0.25 mol/L 硫酸又はほう酸溶液(40 g/L)に浸せる三角フラスコ 200 mL～300 mL 又はビーカー200 mL～300 mL を用いる。
- (10) 溶液を強アルカリ性にするために十分な量。青色が生ずる。

(4.4) 測定 測定は、次のとおり行う。

(4.4.1) (4.2)で 0.25 mol/L 硫酸を用いた場合

- a) 留出液を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色<sup>(4)</sup>になるまで滴定する。
- b) 次の式によって分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素(\% (質量分率))} \\ & = (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (14.007/W_2) \times (100/1000) \\ & = (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (1.4007/W_2) \end{aligned}$$

$B$ : 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量

$V_6$ : (4.2) a)において受器にとった 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$V_7$ : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

$f_1$ : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

$V_8$ : (4.1) c)における抽出液の定容量(mL)

$V_9$ : (4.2) a)においてケルダール分解に供した抽出液の分取量(mL)

$W_2$ : 分析試料の質量(g)

(4.4.2) (4.2)でほう酸溶液(40 g/L)を用いた場合

- a) 留出液を 0.25 mol/L 硫酸で溶液の色がうすい紅色<sup>(11)</sup>になるまで滴定する。
- b) 次の式によって分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素(\% (質量分率))} \\ & = V_{10} \times C_2 \times 2 \times f_2 \times (V_{11}/V_{12}) \times (14.007/W_2) \times (100/1000) \\ & = V_{10} \times C_2 \times f_2 \times (V_{11}/V_{12}) \times (2.8014/W_2) \end{aligned}$$

$V_{10}$ : 滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$C_2$ : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

$f_2$ : 0.25 mol/L 硫酸のファクター

$V_{11}$ : (4.1) c)における抽出液の定容量(mL)

$V_{12}$ : (4.2) a)においてケルダール分解に供した抽出液の分取量(mL)

$W_2$ : 分析試料の質量(g)

注(11) 緑色からうすい紅色になった時を終点とする。

備考 6. 自動滴定装置を用いて(2) a) 標定、(2) c) 標定及び(4.4)の滴定操作を実施することができる。滴定

プログラム及び終点判定パラメーターの設定並びに受器等の容器は、使用する自動滴定装置の仕様及び操作方法による。

**参考文献**

- 1) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, p.67~68, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 冷緩衝液可溶性窒素試験法フローシート ホルムアルデヒド加工尿素肥料中の冷緩衝液可溶性窒素試験法のフローシートを次に示す。

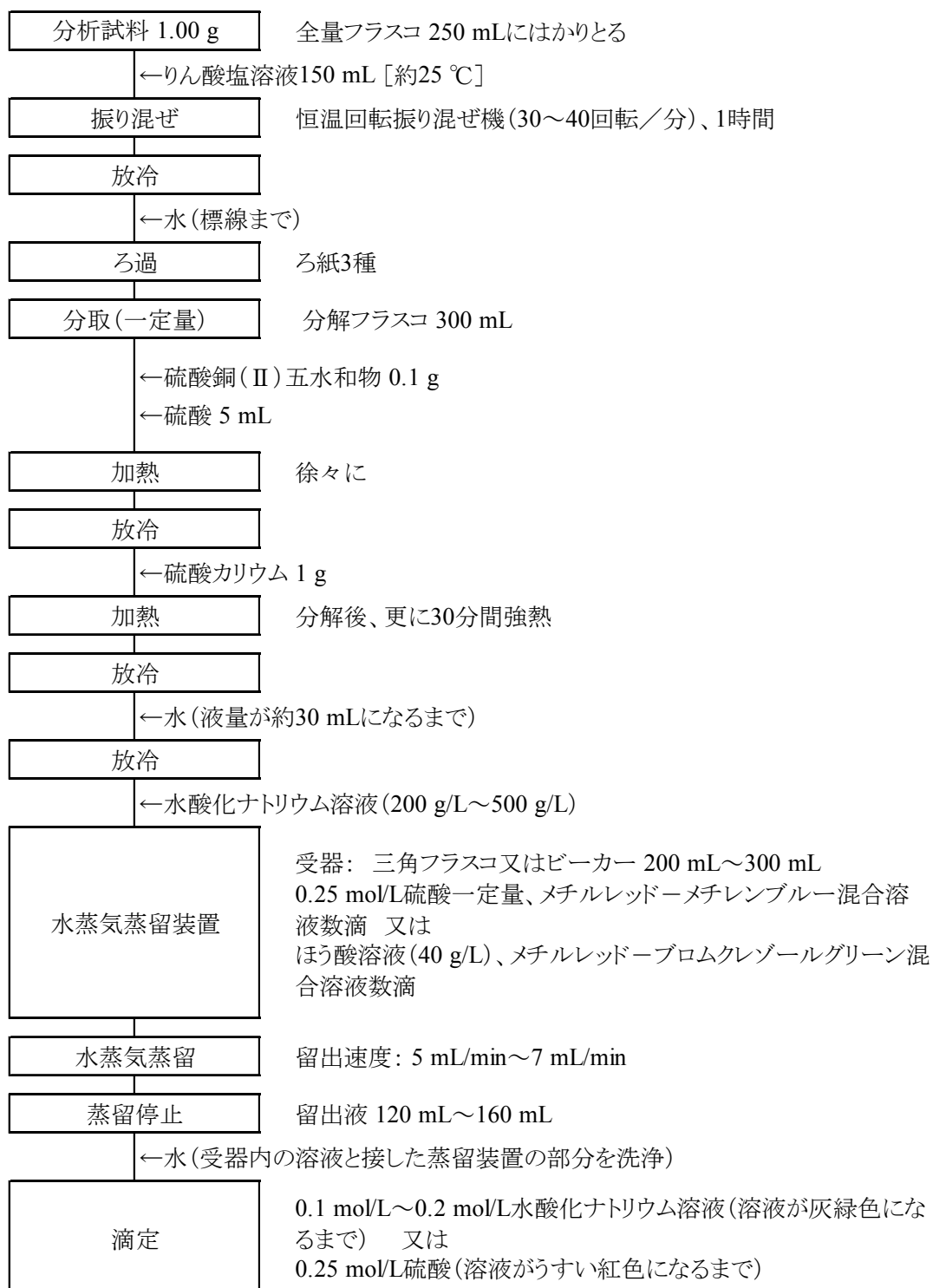


図 ホルムアルデヒド加工尿素肥料中の冷緩衝液可溶性窒素試験法フローシート

## 6.6 熱緩衝液可溶性窒素(熱水に溶出する窒素)

### 6.6.a 熱緩衝液法

#### (1) 概要

この試験法はメチロール尿素重合肥料に適用する。

熱りん酸塩溶液(熱緩衝液)を分析試料に加えて熱緩衝液可溶性窒素を溶離し、不溶解物を硫酸カリウム及び硫酸銅(Ⅱ)五水和物及び硫酸を加え、ケルダール法で前処理して熱緩衝液不溶性窒素をアンモニウムイオンにし、水酸化ナトリウム溶液を加えて水蒸気蒸留する。分離したアンモニアを 0.25 mol/L 硫酸で捕集し、余剰の硫酸を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で(中和)滴定し、分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を求める。又は、分離したアンモニアをほう酸溶液で捕集し、アンモニウムイオンを 0.25 mol/L 硫酸で(中和)滴定し、分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を求める。別途 4.1.1 により測定した窒素全量(T-N)から熱緩衝液不溶性窒素を差し引き、熱緩衝液可溶性窒素(熱水に溶出する窒素)を算出する。

#### (2) 試薬 試薬は、次による。

a) **0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液<sup>(1)</sup>**: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して 4～5 日間放置する。その上澄み液 5.5 mL～11 mL を共栓保存容器にとり、水 1000 mL を加える。

**標定**: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後、約 2.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加える<sup>(1)</sup>。この液一定量を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、指示薬としてプロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定する。次の式によって 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

$$\begin{aligned} &0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ &= (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1) \end{aligned}$$

$W_1$ : 採取したアミド硫酸の質量(g)

$A$ : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

$V_1$ : 分取したアミド硫酸溶液の容量(mL)

$V_2$ : アミド硫酸溶液の定容量(250 mL)

$V_3$ : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

b) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

c) **0.25 mol/L 硫酸<sup>(1)(2)</sup>**: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1000 mL とする。

**標定**: 0.25 mol/L 硫酸一定量<sup>(3)</sup>を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色<sup>(4)</sup>になるまで滴定する。次の式(1)によって 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を算出する。又は、次の式(2)によって 0.25 mol/L 硫酸のファクターを算出する。

$$0.25 \text{ mol/L 硫酸 } 1 \text{ mL に相当する } 0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(B)} \\ = V_4/V_5 \quad \dots\dots (1)$$

$$0.25 \text{ mol/L 硫酸のファクター}(f_2) \\ = (f_1 \times C_1 \times V_4/V_5)/(C_2 \times 2) \quad \dots\dots (2)$$

$V_4$ : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$V_5$ : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

$C_2$ : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

- d) **ほう酸溶液(40 g/L)**: JIS K 8863 に規定するほう酸 40 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- e) **分解促進剤<sup>(5)</sup>**: JIS K 8962 に規定する硫酸カリウムと JIS K 8983 に規定する硫酸銅(Ⅱ)五水和物<sup>(6)</sup>を 9 対 1 の割合で混合する。
- f) **水酸化ナトリウム溶液(200 g/L~500 g/L)<sup>(1)</sup>**: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 100 g~250 g を水に溶かして 500 mL とする。
- g) **プロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8842 に規定するプロモチモールブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 20 mL で溶かし、水で 100 mL とする。
- h) **メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8896 に規定するメチルレッド 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- i) **メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8897 に規定するメチレンブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- j) **メチルレッド-メチレンブルー混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) 2 容量に対し、メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL) 1 容量を加える。
- k) **ブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)**: JIS K 8840 に規定するブロムクレゾールグリーン 0.5 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- l) **メチルレッド-ブロムクレゾールグリーン混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) に同量のブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)を加える。
- m) **熱りん酸塩溶液**: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 3.63 g 及び JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 5.68 g を水 1000 mL に溶かす<sup>(7)</sup>。使用に際して、沸騰するまで加熱する(熱緩衝液)。

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 肥料分析法(1992年版)の標準硫酸液 0.5 M(1/2 硫酸)溶液に対応する。

(3) 5 mL~10 mL

(4) 青紫色から暗青色を経て灰緑色になった時を終点とする。

(5) 錠剤が市販されている。

(6) 必要に応じて粉末にする。

(7) pH 7.0±pH 0.2

**備考 1.** (2) a) の 0.1 mol/L ~ 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。

**備考 2.** (2) c) の 0.25 mol/L 硫酸に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.25 mol/L 硫酸を用いることもできる。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **水浴:** 水を沸騰させることができるもの。

b) **水蒸気蒸留装置**

c) **分解フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ

d) **蒸留フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ又は丸底フラスコ

(4) **試験操作**

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料<sup>(8)</sup> 1.00 g をはかりとり、トールビーカー 300 mL に入れる。

b) 熱りん酸塩溶液 100 mL を加え、静かにかき混ぜる。

c) トールビーカーを時計皿で覆い、沸騰水浴中で 10 分ごとにかき混ぜながら 30 分間加熱する。

d) 直ちにろ紙 3 種でろ過し、容器を熱りん酸塩溶液 100 mL で不溶解物を全てろ紙上に移し、更に熱水で不溶解物を洗浄する。

**注(8)** 分析用試料は**備考 3**により調製する。

**備考 3.** 目開き 850  $\mu\text{m}$  のふるいを通すまで、試験品を乳鉢及び乳棒を用いて押し砕く。

(4.2) **ケルダール分解** 分解は、次のとおり行う。

a) (4.1) d) の不溶解物をろ紙ごとを分解フラスコ 300 mL ~ 500 mL に入れる。

b) 分解促進剤 5 g ~ 10 g を加え、更に硫酸 20 mL ~ 40 mL を加えて振り混ぜ、穏やかに加熱する。

c) 泡が生じなくなつてから硫酸の白煙が発生するまで加熱する。

d) 有機物が完全に分解するまで強熱する<sup>(9)</sup>。

e) 放冷後、少量の水を加えて良く振り混ぜ、水で全量フラスコ 250 mL ~ 500 mL に移し<sup>(10)</sup>、更に振り混ぜる。

f) 放冷後、標線まで水を加え、分解液とする。

**注(9)** 溶液の色が変化しなくなつてから、更に 2 時間以上加熱する。

(10) 測定で試料溶液を全量使用する場合は、全量フラスコに移す操作は必要ない。

(4.3) **蒸留** 蒸留は、次のとおり行う。具体的な蒸留操作は、測定に使用する水蒸気蒸留装置の操作方法による。

a) 0.25 mol/L 硫酸の一定量<sup>(11)</sup>を受器<sup>(12)</sup>にとり、メチルレッド-メチレンブルー混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。又は、ほう酸溶液(40 g/L)の一定量<sup>(11)</sup>を受器<sup>(12)</sup>にとり、メチルレッド-ブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。

b) 分解液の一定量を蒸留フラスコ 300 mL にとり、水酸化ナトリウム溶液(200 g/L ~ 500 g/L)適量<sup>(13)</sup>を加え、この蒸留フラスコを水蒸気蒸留装置に速やかに連結する。

- c) 水蒸気を蒸留フラスコに送り、蒸留フラスコ内の溶液を加熱し、留出速度 5 mL/min～7 mL/min で蒸留を行う。
- d) 120 mL～160 mL が留出したら蒸留を止める。
- e) 受器内の溶液と接した水蒸気蒸留装置の部分を少量の水で洗い、洗液を留出液と合わせる。

**注(11)** 5 mL～20 mL

- (12) 受器は水蒸気蒸留装置の留出液の出口を 0.25 mol/L 硫酸又はほう酸溶液(40 g/L)に浸せる三角フラスコ 200 mL～300 mL 又はビーカー 200 mL～300 mL を用いる。
- (13) 溶液を強アルカリ性にするために十分な量。青色が生ずる。

**(4.4) 測定** 測定は、次のとおり行う。

**(4.4.1)** (4.3)で 0.25 mol/L 硫酸を用いた場合

- a) 留出液を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色<sup>(4)</sup>になるまで滴定する。
- b) 次の式によって分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を算出する。
- c) 別途 4.1.1 により測定した窒素全量(T-N)から熱緩衝液不溶性窒素を差し引いて熱緩衝液可溶性窒素を求める<sup>(14)</sup>。

分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素(%(質量分率))

$$= (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (14.007/W_2) \times (100/1000)$$

$$= (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (1.4007/W_2)$$

B: 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量

V<sub>6</sub>: (4.2) a)において受器にとった 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

V<sub>7</sub>: 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

C<sub>1</sub>: 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

f<sub>1</sub>: 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

V<sub>8</sub>: (4.2) f)における分解液の定容量(mL)

V<sub>9</sub>: (4.3) b)において蒸留に供した抽出液の分取量(mL)

W<sub>2</sub>: 分析試料の質量(g)

**注(14)** 窒素全量(T-N)及び熱緩衝液不溶性窒素は数値の丸めを実施しない生データを用いる。

**(4.4.2)** (4.3)でほう酸溶液(40 g/L)を用いた場合

- a) 留出液を 0.25 mol/L 硫酸で溶液の色がうすい紅色<sup>(15)</sup>になるまで滴定する。
- b) 次の式によって分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を算出する。
- c) 別途 4.1.1 により測定した窒素全量(T-N)から熱緩衝液不溶性窒素を差し引いて熱緩衝液可溶性窒素を求める。

分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素(%(質量分率))

$$= V_{10} \times C_2 \times 2 \times f_2 \times (V_{11}/V_{12}) \times (14.007/W_2) \times (100/1000)$$

$$=V_{10} \times C_2 \times f_2 \times (V_{11}/V_{12}) \times (2.8014/W_2)$$

$V_{10}$ : 滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量 (mL)

$C_2$ : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度 (0.25 mol/L)

$f_2$ : 0.25 mol/L 硫酸のファクター

$V_{11}$ : (4.2) f) における分解液の定容量 (mL)

$V_{12}$ : (4.3) b) において蒸留に供した抽出液の分取量 (mL)

$W_2$ : 分析試料の質量 (g)

**注(15)** 緑色からうすい紅色になった時を終点とする。

**備考 4.** 自動滴定装置を用いて(2) a) 標定、(2) c) 標定及び(4.4)の滴定操作を実施することができる。滴定プログラム及び終点判定パラメーターの設定並びに受器等の容器は、使用する自動滴定装置の仕様及び操作方法による。

#### 参考文献

- 1) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.68~69, 養賢堂, 東京 (1988)



(5) 熱緩衝液可溶性窒素試験法フローシート メチロール尿素重合肥料中の熱緩衝液可溶性窒素試験法のフローシートを次に示す。

分析試料 1.00 g	トールビーカー 300 mLにはかりとる。
	←熱りん酸塩溶液150 mL
かき混ぜ	静かに
加熱	沸騰水浴 10分間ごとにかき混ぜながら30分間
ろ過	ろ紙3種、熱りん酸塩溶液100 mLで移し込む
	←熱水で洗淨
移し入れ	分解フラスコ300 mL～500 mL
	←分解促進剤 5 g～10 g
	←硫酸 20 mL～40 mL
加熱	穏やかに
加熱	泡が発生しなくなってから、有機物が完全に分解するまで強熱
放冷	
	←水 少量
移し込み	全量フラスコ 250 mL～500 mL、水
放冷	室温
	←水(標線まで)
分取(一定量)	蒸留フラスコ 300 mL
	←水酸化ナトリウム溶液(200 g/L～500 g/L)
水蒸気蒸留装置	受器: 三角フラスコ又はビーカー 200 mL～300 mL 0.25 mol/L硫酸一定量、メチルレッド-メチレンブルー混合溶液数滴 又は ほう酸溶液(40 g/L)、メチルレッド-ブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴
水蒸気蒸留	留出速度: 5 mL/min～7 mL/min
蒸留停止	留出液 120 mL～160 mL
	←水(受器内の溶液と接した蒸留装置の部分を洗淨)
滴定	0.1 mol/L～0.2 mol/L水酸化ナトリウム溶液(溶液が灰緑色になるまで) 又は 0.25 mol/L硫酸(溶液がうすい紅色になるまで)

図 メチロール尿素重合肥料中の熱緩衝液可溶性窒素試験法フローシート

## 6.7 窒素の活性係数

### 6.7.a 緩衝液法

#### (1) 概要

この試験法はホルムアルデヒド加工尿素肥料に適用する。

分析試料に水を加えて冷水可溶性窒素を溶離し、不溶解物を硫酸カリウム及び硫酸銅(Ⅱ)五水和物及び硫酸を加え、ケルダール法で前処理して冷水不溶性窒素をアンモニウムイオンにし、水酸化ナトリウム溶液を加えて水蒸気蒸留する。分離したアンモニアを 0.25 mol/L 硫酸で捕集し、余剰の硫酸を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で(中和)滴定し、分析試料中の冷水不溶性窒素を求める。又は、分離したアンモニアをほう酸溶液で捕集し、アンモニウムイオンを 0.25 mol/L 硫酸で(中和)滴定し、分析試料中の冷水可溶性窒素を求める。別途、熱りん酸塩溶液(熱緩衝液)を分析試料に加えて熱緩衝液可溶性窒素を溶離し、以下同様の操作を行って分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を求める。冷水不溶解物から熱緩衝液不溶性窒素を差し引いた値を冷水不溶解物で除して窒素の活性係数を算出する。

#### (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液<sup>(1)</sup>**: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して 4～5 日間放置する。その上澄み液 5.5 mL～11 mL を共栓保存容器にとり、水 1000 mL を加える。

**標定**: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後、約 2.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加える<sup>(1)</sup>。この液一定量を三角フラスコ 200 mL～300 mL とり、指示薬としてプロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL) 数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定する。次の式によって 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

$$0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ = (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1)$$

$W_1$ : 採取したアミド硫酸の質量(g)

$A$ : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

$V_1$ : 分取したアミド硫酸溶液の容量(mL)

$V_2$ : アミド硫酸溶液の定容量(250 mL)

$V_3$ : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

- b) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

- c) **0.25 mol/L 硫酸<sup>(1)(2)</sup>**: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1000 mL とする。

**標定**: 0.25 mol/L 硫酸一定量<sup>(3)</sup>を三角フラスコ 200 mL～300 mL とり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色<sup>(4)</sup>になるまで滴定する。次の式(1)によって 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を

算出する。又は、次の式(2)によって 0.25 mol/L 硫酸のファクターを算出する。

$$\begin{aligned} &0.25 \text{ mol/L 硫酸 } 1 \text{ mL に相当する } 0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(B)} \\ &= V_4/V_5 \quad \dots\dots (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &0.25 \text{ mol/L 硫酸のファクター}(f_2) \\ &= (f_1 \times C_1 \times V_4/V_5)/(C_2 \times 2) \quad \dots\dots (2) \end{aligned}$$

$V_4$ : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$V_5$ : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

$C_2$ : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

- d) **ほう酸溶液(40 g/L)**: JIS K 8863 に規定するほう酸 40 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- e) **分解促進剤<sup>(5)</sup>**: JIS K 8962 に規定する硫酸カリウムと JIS K 8983 に規定する硫酸銅(II)五水和物<sup>(6)</sup>を 9 対 1 の割合で混合する。
- f) **水酸化ナトリウム溶液(200 g/L~500 g/L)<sup>(1)</sup>**: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 100 g~250 g を水に溶かして 500 mL とする。
- g) **プロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8842 に規定するプロモチモールブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 20 mL で溶かし、水で 100 mL とする。
- h) **メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8896 に規定するメチルレッド 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- i) **メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8897 に規定するメチレンブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- j) **メチルレッド-メチレンブルー混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) 2 容量に対し、メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL) 1 容量を加える。
- k) **ブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)**: JIS K 8840 に規定するブロムクレゾールグリーン 0.5 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- l) **メチルレッド-ブロムクレゾールグリーン混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)に同量のブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)を加える。
- m) **熱りん酸塩溶液**: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 1.43 g 及び JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 9.10 g を水 1000 mL に溶かす<sup>(7)</sup>。使用に際して、沸騰するまで加熱する(熱緩衝液)。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 肥料分析法(1992年版)の標準硫酸液 0.5 M(1/2 硫酸)溶液に対応する。

(3) 5 mL~10 mL

(4) 青紫色から暗青色を経て灰緑色になった時を終点とする。

(5) 錠剤が市販されている。

(6) 必要に応じて粉末にする。

(7) pH 7.5±pH 0.2

**備考 1.** (2) a) の 0.1 mol/L ~ 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。

**備考 2.** (2) c) の 0.25 mol/L 硫酸に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.25 mol/L 硫酸を用いることもできる。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **水浴:** 水を沸騰させることができるもの。

b) **水蒸気蒸留装置**

c) **分解フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ

d) **蒸留フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ又は丸底フラスコ

(4) **試験操作**

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。(4.1.1) f) 及び(4.1.2) d) の不溶解物をそれぞれ(4.2) **ケルダール分解** に供する。

(4.1.1) **冷水による抽出**

a) 分析試料<sup>(8)</sup> 1.00 g をはかりとり、ビーカー 50 mL に入れる。

b) 少量の JIS K 8101 に規定するエタノールを加えて潤し、25 °C ± 2 °C の水 20 mL を加え、かき混ぜる。

c) 5 分間ごとにかき混ぜながら 15 分間放置する。

d) 上澄み液をろ紙 2 種でろ過する。

e) 不溶解物を 25 °C ± 2 °C の水で 5 回洗浄し、上澄み液をろ過する。

f) 25 °C ± 2 °C の水で不溶解物を全てろ紙上に移し、更に同温度の水で不溶解物をろ液が 250 mL になるまで洗浄する。

**注(8)** 分析用試料は**備考 3** により調製する。

**備考 3.** 目開き 850 µm のふるいを通すまで、試験品を乳鉢、乳棒等を用いて押し砕く。

(4.1.2) **熱りん酸塩溶液による抽出**

a) 冷水不溶解物窒素 0.12 g 相当量の分析試料<sup>(8)</sup> をはかりとり、トールビーカー 200 mL に入れる。

b) 熱りん酸塩溶液 100 mL を加え、かき混ぜる。

c) トールビーカーを時計皿で覆い、沸騰水浴中で 10 分ごとにかき混ぜながら 30 分間加熱する。

d) 直ちにろ紙 2 種でろ過し<sup>(9)</sup>、容器を沸騰した水で不溶解物を全てろ紙上に移し、更に沸騰した水 100 mL で不溶解物を洗浄する。

**注(9)** ろ過操作に 4 分間以上の時間を要した場合は、新たに**備考 4** により抽出操作を実施する。

**備考 4.** (4.1.2) a) ~ c) の操作を実施した後、けい藻土 1 g を加えてかき混ぜ、(4.1.2) d) の操作を実施する。

(4.2) **ケルダール分解** 分解は、次のとおり行う。

a) (4.1.1) f) 又は(4.1.2) d) の不溶解物をろ紙ごとを分解フラスコ 300 mL ~ 500 mL に入れる。

- b) 分解促進剤 5 g～10 g を加え、更に硫酸 20 mL～40 mL を加えて振り混ぜ、穏やかに加熱する。
- c) 泡が生じなくなってから硫酸の白煙が発生するまで加熱する。
- d) 有機物が完全に分解するまで強熱する<sup>(10)</sup>。
- e) 放冷後、少量の水を加えて良く振り混ぜ、水で全量フラスコ 250 mL～500 mL に移し<sup>(11)</sup>、更に振り混ぜる。
- f) 放冷後、標線まで水を加え、分解液とする。

**注(10)** 溶液の色が変化しなくなってから、更に 2 時間以上加熱する。

(11) 測定で試料溶液を全量使用する場合は、全量フラスコに移す操作は必要ない。

**(4.3) 蒸留** 蒸留は、次のとおり行う。具体的な蒸留操作は、測定に使用する水蒸気蒸留装置の操作方法による。

- a) 0.25 mol/L 硫酸の一定量<sup>(12)</sup>を受器<sup>(13)</sup>にとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。又は、ほう酸溶液(40 g/L)の一定量<sup>(12)</sup>を受器<sup>(13)</sup>にとり、メチルレッドーブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。
- b) 分解液の一定量を蒸留フラスコ 300 mL にとり、水酸化ナトリウム溶液(200 g/L～500 g/L)適量<sup>(14)</sup>を加え、この蒸留フラスコを水蒸気蒸留装置に速やかに連結する。
- c) 水蒸気を蒸留フラスコに送り、蒸留フラスコ内の溶液を加熱し、留出速度 5 mL/min～7 mL/min で蒸留を行う。
- d) 120 mL～160 mL が留出したら蒸留を止める。
- e) 受器内の溶液と接した水蒸気蒸留装置の部分を少量の水で洗い、洗液を留出液と合わせる。

**注(12)** 5 mL～20 mL

(13) 受器は水蒸気蒸留装置の留出液の出口を 0.25 mol/L 硫酸又はほう酸溶液(40 g/L)に浸せる三角フラスコ 200 mL～300 mL 又はビーカー 200 mL～300 mL を用いる。

(14) 溶液を強アルカリ性にするために十分な量。青色が生ずる。

**(4.4) 測定** 測定は、次のとおり行う。

**(4.4.1)** (4.3)で 0.25 mol/L 硫酸を用いた場合

- a) 留出液を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色<sup>(4)</sup>になるまで滴定する。
- b) 次の式(3)によって分析試料中の冷水不溶性窒素( $N_1$ )及び熱緩衝液不溶性窒素( $N_2$ )をそれぞれ算出する。
- c) 次の式(4)によって分析試料中の窒素の活性係数を求める<sup>(15)</sup>。

$$\begin{aligned} & \text{分析試料中の冷水不溶性窒素}(N_1) \text{ 又は熱緩衝液不溶性窒素}(N_2) (\% \text{ (質量分率)}) \\ & = (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (14.007/W_2) \times (100/1000) \\ & = (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (1.4007/W_2) \quad \dots\dots (3) \end{aligned}$$

$B$ : 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量

$V_6$ : (4.2) a)において受器にとった 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$V_7$ : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

$C_1$ : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

$f_1$ : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

$V_8$ : (4.2 f)における分解液の定容量(mL)

$V_9$ : (4.3 b)において蒸留に供した抽出液の分取量(mL)

$W_2$ : 分析試料の質量(g)

窒素の活性係数(%)

$$= ((N_1 - N_2) / N_1) \times 100 \quad \dots\dots (4)$$

$N_1$ : 冷水不溶性窒素(%(質量分率))

$N_2$ : 熱緩衝液不溶性窒素(%(質量分率))

**注(15)** 冷水不溶性窒素( $N_1$ )又は熱緩衝液不溶性窒素( $N_2$ )は数値の丸めを実施しない生データを用いる。

(4.4.2) (4.3)でほう酸溶液(40 g/L)を用いた場合

a) 留出液を0.25 mol/L 硫酸で溶液の色がうすい紅色<sup>(16)</sup>になるまで滴定する。

b) 次の式(5)によって分析試料中の冷水不溶性窒素( $N_1$ )及び熱緩衝液不溶性窒素( $N_2$ )をそれぞれ算出する。

c) (4.4.1)の式(4)によって分析試料中の窒素の活性係数を求める<sup>(14)</sup>。

分析試料中の冷水不溶性窒素( $N_1$ )又は熱緩衝液不溶性窒素( $N_2$ )(%(質量分率))

$$\begin{aligned} &= V_{10} \times C_2 \times 2 \times f_2 \times (V_{11} / V_{12}) \times (14.007 / W_2) \times (100 / 1000) \\ &= V_{10} \times C_2 \times f_2 \times (V_{11} / V_{12}) \times (2.8014 / W_2) \quad \dots\dots (3) \end{aligned}$$

$V_{10}$ : 滴定に要した0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

$C_2$ : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

$f_2$ : 0.25 mol/L 硫酸のファクター

$V_{11}$ : (4.2 f)における分解液の定容量(mL)

$V_{12}$ : (4.3 b)において蒸留に供した抽出液の分取量(mL)

$W_2$ : 分析試料の質量(g)

**注(16)** 緑色からうすい紅色になった時を終点とする。

**備考 5.** 自動滴定装置を用いて(2) a) 標定、(2) c) 標定及び(4.4)の滴定操作を実施することができる。滴定プログラム及び終点判定パラメーターの設定並びに受器等の容器は、使用する自動滴定装置の仕様及び操作方法による。

## 参考文献

1) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, p.68~69, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 窒素の活性係数試験法フローシート ホルムアルデヒド加工尿素肥料の窒素の活性係数試験法のフローシートを次に示す。

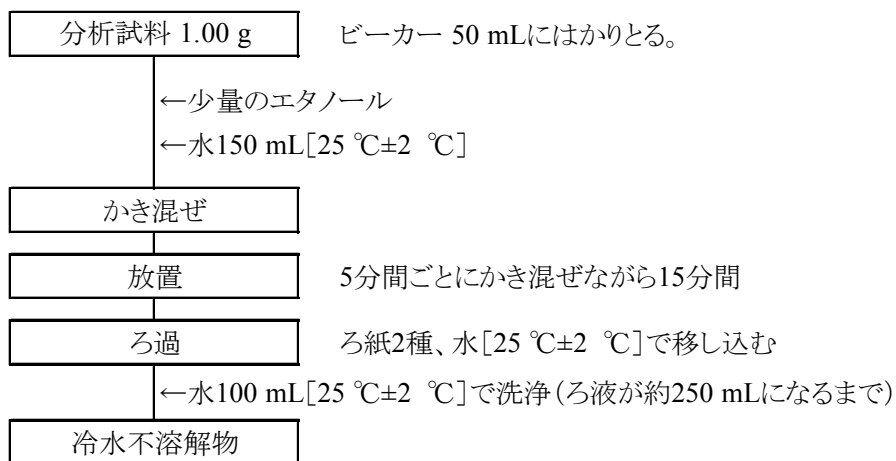


図 ホルムアルデヒド加工尿素肥料の窒素の活性係数試験法フローシート(1)  
(冷水による抽出)

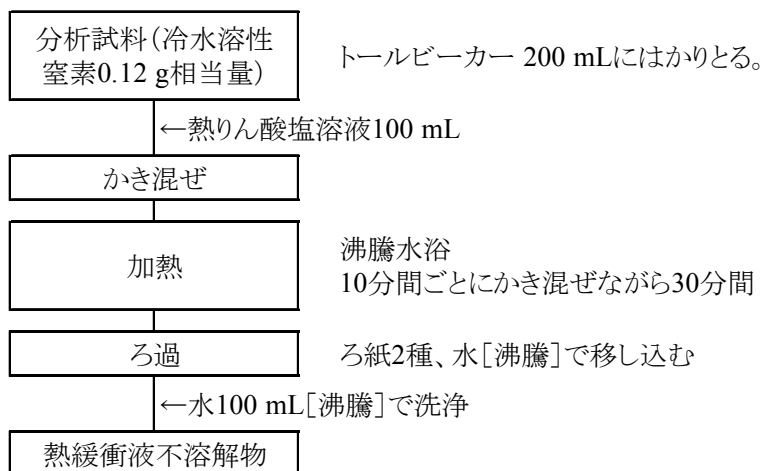


図 ホルムアルデヒド加工尿素肥料の窒素の活性係数試験法フローシート(2)  
(熱りん酸塩溶液による抽出)

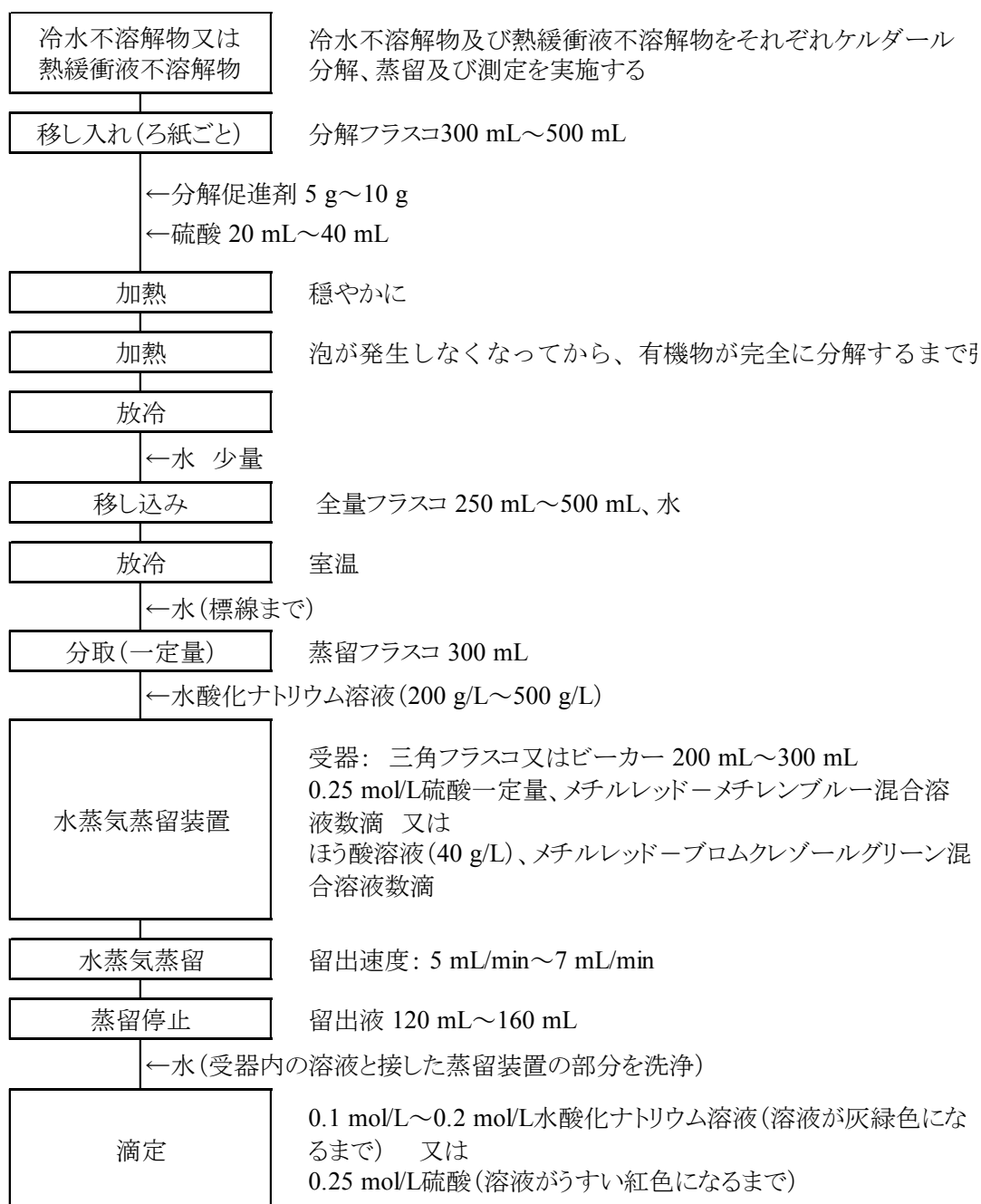


図 ホルムアルデヒド加工尿素肥料の窒素の活性係数試験法フローシート(3)  
(測定操作)



## 6.8 初期溶出率

### 6.8.a 水中静置法

#### (1) 概要

被覆肥料に適用する。初期溶出率は被覆肥料の速効性成分であり、対象成分として窒素全量(T-N)、アンモニア性窒素(A-N)、硝酸性窒素(N-N)、水溶性りん酸(W-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)、水溶性加里(W-K<sub>2</sub>O)及び水溶性苦土(W-MgO)がある。

試験品に水を加え、24時間30℃の水中で保温静置し、対象成分の初期溶出量を求める。別途4.1.1、4.1.2、4.1.3、4.2.4、4.3.3又は4.6.3により該当する成分量を求める。対象成分の初期溶出量を該当する成分量で除して初期溶出率を算出する。

#### (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **窒素全量用試薬液**: 窒素全量を測定する場合4.1.1の各項の試薬。
- b) **アンモニア性窒素用試薬液**: アンモニア性窒素を測定する場合は4.1.2の各項の試薬。
- c) **硝酸性窒素用試薬液**: 硝酸性窒素を測定する場合は4.1.3の各項の試薬。
- d) **水溶性りん酸用試薬液**: 水溶性りん酸を測定する場合は4.2.4の各項の試薬。
- e) **水溶性加里用試薬液**: 水溶性加里を測定する場合は4.3.3の各項の試薬。
- f) **水溶性苦土用試薬液**: 水溶性苦土を測定する場合は4.6.3の各項の試薬。

#### (3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) **恒温器**: 30℃±1℃もの。
- b) **窒素全量**: 窒素全量を測定する場合4.1.1の各項の器具及び装置。
- c) **アンモニア性窒素**: アンモニア性窒素を測定する場合は4.1.2の各項の器具及び装置。
- d) **硝酸性窒素**: 硝酸性窒素を測定する場合は4.1.3の各項の器具及び装置。
- e) **水溶性りん酸**: 水溶性りん酸を測定する場合は4.2.4の各項の器具及び装置。
- f) **水溶性加里**: 水溶性加里を測定する場合は4.3.3の各項の器具及び装置。
- g) **水溶性苦土**: 水溶性苦土を測定する場合は4.6.3の各項の器具及び装置。

#### (4) 試験操作

##### (4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 試験品12.5gをはかりとり、共栓付き三角フラスコ300mLに入れる<sup>(1)</sup>。
- b) 30℃±1℃の水250mLを加え、30℃±1℃の恒温器に入れ、24時間静置する<sup>(2)</sup>。
- c) ろ紙3種でろ過し<sup>(3)</sup>、ろ液を振り混ぜて試料溶液とする。

**注(1)** 粉碎操作を実施せず、均質化されていない試験品を用いるため、3～5点併行で試験を実施し、定量値の信頼性を高めることが望ましい。

**(2)** 試験品が水中で振動すると初期溶出量が高く見積られるため、水は静かに加え、c)のろ過が終了するまで試料溶液を振り混ぜないこと。

**(3)** 不溶解物は三角フラスコに残すようにして、大部分の溶液をろ過する。

##### (4.2) 測定 対象成分の初期溶出量の測定は該当するa)～f)のそれぞれの項のとおり行う。なお、各成

分の具体的な測定操作は対応する各項による。

- a) **窒素全量**: 試料溶液の一定量をとり、**4.1.1**の各項により窒素全量を定量し、初期溶出量とする。
- b) **アンモニア性窒素**: 試料溶液の一定量をとり、**4.1.2**の各項によりアンモニア性窒素を定量し、初期溶出量とする。
- c) **硝酸性窒素**: 試料溶液の一定量をとり、**4.1.3**の各項により硝酸性窒素を定量し、初期溶出量とする。
- d) **水溶性りん酸**: 試料溶液の一定量をとり、**4.2.4**の各項により水溶性りん酸を定量し、初期溶出量とする。
- e) **水溶性加里**: 試料溶液の一定量をとり、**4.3.3**の各項により水溶性加里を定量し、初期溶出量とする。
- f) **水溶性苦土**: 試料溶液の一定量をとり、**4.6.3**の各項により水溶性苦土を定量し、初期溶出量とする。

### (5) 初期溶出率の計算

- a) (4.2)で求めた対象成分の初期溶出量及び別途測定した<sup>(4)</sup>該当する成分量を用い、次の式によって初期溶出率(%)を算出する<sup>(5)</sup>。

初期溶出率(%)

$$= (C_1/C_2) \times 100$$

$C_1$ : 対象成分の初期溶出量(%(質量分率))

$C_2$ : 該当する成分量(%(質量分率))

**注(4) 2.3 分析用試料の調製**によって調製した分析用試料を用いて、**4.1.1**、**4.1.2**、**4.1.3**、**4.2.4**、**4.3.3** 又は **4.6.3** により窒素全量(T-N)、アンモニア性窒素(A-N)、硝酸性窒素(N-N)、水溶性りん酸(W-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)、水溶性加里(W-K<sub>2</sub>O)又は水溶性苦土(W-MgO)を測定する。

(5) 初期溶出量及び該当する成分量は数値の丸めを実施しない生データを用いる。

### 参考文献

- 1) 越野正義：第二改訂詳解肥料分析法, p.288~290, 養賢堂, 東京 (1988)

- (6) **初期溶出率試験法フローシート** 被覆肥料の初期溶出率試験法のフローシートを次に示す。

試験品 12.5 g	三角フラスコ 300 mL
	← 30 °C ± 1 °C の水 250 mL
抽出	30 °C ± 1 °C 24時間
ろ過	ろ紙3種
対象成分の測定	対象成分の初期溶出量

図 被覆肥料の初期溶出率試験法フローシート

## 6.9 腐植酸(酸不溶アルカリ可溶分)

### 6.9.a 重量法

#### (1) 概要

この試験法は腐植酸塩肥料に適用する。

分析試料に塩酸(1+9)を加えて酸溶解物を溶離し、不溶解物をろ過し、不溶解物の質量を測定し、分析試料中の酸不溶解物を求める。別途分析試料に塩酸(1+9)を加えて酸溶解物を溶離し、不溶解物に水酸化ナトリウム液(10 g/L)を加えてアルカリ溶解物を溶離し、不溶解物をろ過し、分析試料中の酸不溶アルカリ不溶解物を求める。酸溶解物から酸不溶アルカリ不溶解物を差し引き、腐植酸(酸不溶アルカリ可溶分)を算出する。

#### (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **塩酸**: JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- b) **水酸化ナトリウム**: JIS K 8576 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **振とう機**
- b) **乾燥器**: 105 °C～110 °Cに調節できるもの。
- c) **るつぼ形ガラスろ過器**: JIS R 3503 に規定するるつぼ形ガラスろ過器 1G4。予め 105 °C～110 °Cの乾燥器で加熱した後、デシケーター中で放冷し、質量を 1 mg の桁まで測定しておく。
- d) **共栓はかり瓶<sup>(1)</sup>**: JIS R 3503 に規定する平形はかり瓶 50 mm×30 mm。予め 105 °C～110 °Cの乾燥器で加熱乾燥した後、デシケーター中で放冷し、質量を 1 mg の桁まで測定しておく。

**注(1)** 飼料分析法・解説-2009-に記載されているアルミニウム製ひょう量皿を用いてもよい。

- (2) 共栓遠心沈殿管 100 mL を 30～40 回転/分で上下転倒して回転させられる回転振り混ぜ機を用いてもよい。

#### (4) 試験操作

##### (4.1) 酸不溶解物

##### (4.1.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、共栓遠心沈殿管 100 mL に入れる。
- b) 塩酸(1+9) 50 mL を加え、振とう機を用いて<sup>(2)</sup>1 時間振り混ぜる。
- c) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(3)</sup>、上澄み液を除去する<sup>(4)</sup>。
- d) 水を加えてかき混ぜ<sup>(5)</sup>、遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(3)</sup>、上澄み液を除去する<sup>(4)</sup>。
- e) d) の操作を 3 回繰り返す。

**注(2)** 回転振り混ぜ機を使用する場合は、30～40 回転/分に調整する。

- (3) 半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。

(4) 駒込ピペット等を用いて取り除く。

- (5) ガラス棒を用いてかき混ぜ、ガラス棒に付着した不溶解物を水で洗浄し、洗浄液を遠心沈殿管に加える。

(4.1.2) **測定** 測定は、次のとおり行う。

- a) 水で(4.1.1)e)の不溶解物を全てるつぼ形ガラスろ過器中に移し、減圧ろ過する。
- b) 不溶解物をるつぼ形ガラスろ過器とともに乾燥器に入れ、105℃～110℃で3時間加熱する。
- c) 加熱後、速やかにデシケーターに移して放冷する。
- d) 放冷後、るつぼ形ガラスろ過器をデシケーターから取り出し、その質量を1mgの桁まで測定する。

(4.2) **酸不溶－アルカリ不溶解物**

(4.2.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料1gを1mgの桁まではかりとり、共栓遠心沈殿管100mLに入れる。
- b) 塩酸(1+9)50mLを加え、振とう機<sup>(2)</sup>を用いて<sup>(2)</sup>1時間振り混ぜる。
- c) 遠心力約1700×gで約5分間遠心分離し<sup>(3)</sup>、上澄み液を除去する<sup>(4)</sup>。
- d) 水を加えてかき混ぜ<sup>(5)</sup>、遠心力約1700×gで約5分間遠心分離し<sup>(3)</sup>、上澄み液を除去する<sup>(4)</sup>。
- e) d)の操作を3回繰り返す。
- f) 水酸化ナトリウム溶液(10g/L)50mLを加え、振とう機を用いて<sup>(2)</sup>1時間振り混ぜる。
- g) 遠心力約1700×gで約5分間遠心分離し<sup>(3)</sup>、上澄み液を除去する<sup>(4)</sup>。
- h) 水を加えてかき混ぜ<sup>(5)</sup>、遠心力約1700×gで約5分間遠心分離し<sup>(3)</sup>、上澄み液を除去する<sup>(4)</sup>。
- i) h)の操作を3回繰り返す。

(4.2.2) **測定** 測定は、次のとおり行う。

- a) 不溶解物を共栓はかり瓶とともに乾燥器に入れて加熱する<sup>(6)</sup>。
- b) 放冷後、不溶解物を共栓はかり瓶に移し替える。
- c) 不溶解物を共栓はかり瓶とともに乾燥器に入れ、105℃～110℃で3時間加熱する。
- d) 加熱後、共栓はかり瓶に蓋をし、速やかにデシケーターに移して放冷する。
- e) 放冷後、共栓はかり瓶をデシケーターから取り出し、その質量を1mgの桁まで測定する。

**注(6)** (4.2.2)b)の操作が可能になる程度の温度で乾燥する。

(5) **腐植酸の計算**

- a) 次の式によって腐植酸を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{腐植酸}(\%(\text{質量分率})) \\ & = (A_1/W_1) \times 100 - (A_2/W_2) \times 100 \quad \dots\dots (1) \end{aligned}$$

$A_1$ : (4.1.2)d)で測定した酸不溶解物の質量(g)

$W_1$ : (4.1.1)a)で採取した分析試料の質量(g)

$A_2$ : (4.2.2)e)で測定した酸不溶アルカリ不溶解物の質量(g)

$W_2$ : (4.2.1)a)で採取した分析試料の質量(g)

**参考文献**

- 1) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, p.316~317, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 腐植酸試験法フローシート 腐植酸試験法のフローシートを次に示す。

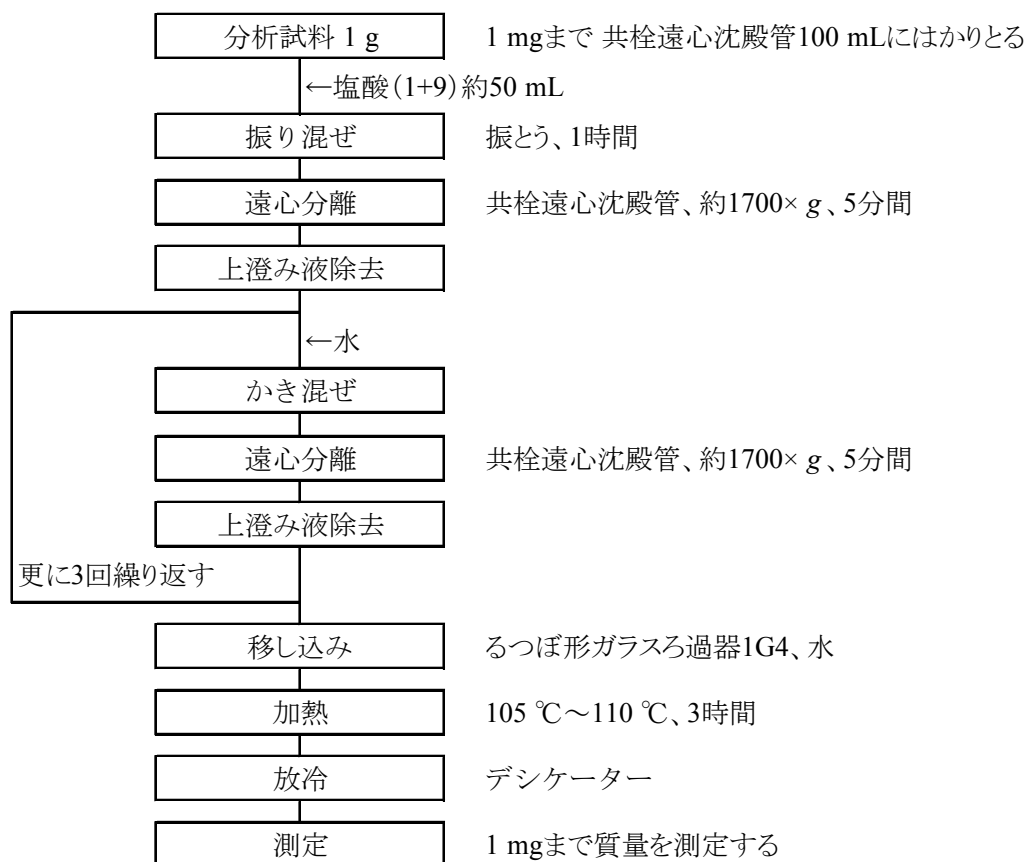


図 腐植酸塩肥料中の腐植酸試験法フローシート(1)  
(酸不溶解物の測定)

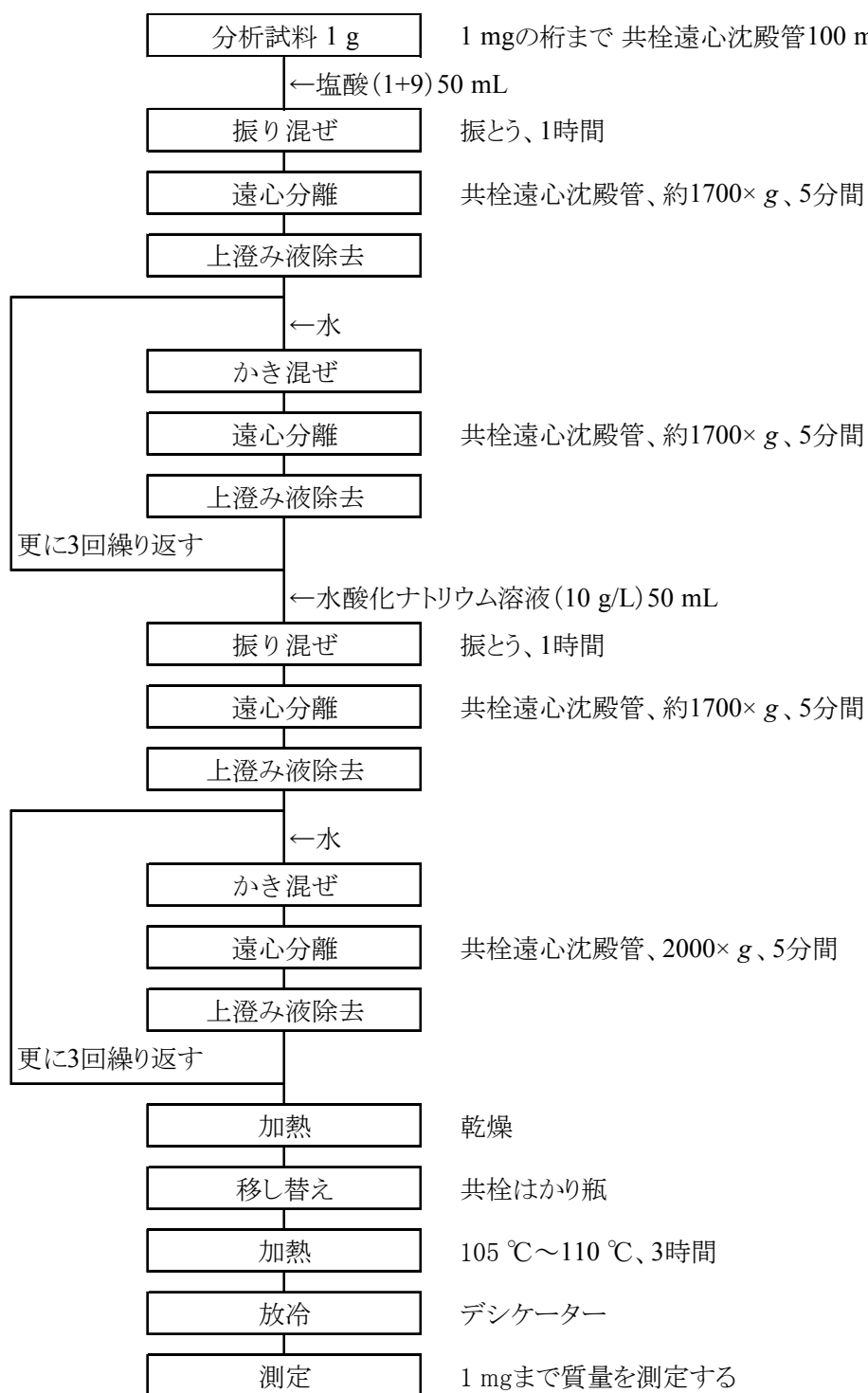


図 腐植酸塩肥料中の腐植酸試験法フローシート(2)  
(酸不溶アルカリ不溶解物の測定)

## 6.10 硫酸塩

肥料分析法(1992年版)の5.29.2 硫酸塩の分析法による。

### 参考文献

- 1) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992年版), p.145~147, 日本肥糧検定協会, 東京(1992)
- 2) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, p.285~286, 養賢堂, 東京(1988)

## 6.11 二酸化炭素

肥料分析法(1992年版)の5.20 二酸化炭素の分析法による。

### 参考文献

- 1) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992年版), p.121~123, 日本肥糧検定協会, 東京(1992)
- 2) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, p.259~261, 養賢堂, 東京(1988)



## 7. 硝酸化成抑制材

### 7.1 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)

#### 7.1.a 高速液体クロマトグラフ法

##### (1) 概要

この試験法は 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を含む肥料に適用する。

分析試料にメタノール-水(1+1)を加えて 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 295 nm で測定し、分析試料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を求める。なお、この試験法の性能は備考 6 に示す。

##### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) **2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン [C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub>]<sup>(2)</sup> 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノール-水(1+1)を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) **2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- f) **検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(10 µg/mL~50 µg/mL)**: 使用時に 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- g) **検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 µg/mL~10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンとして 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンは和光純薬工業及び関東化学より市販されている。

##### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 295 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**
- c) **遠心分離機**: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- d) **高速遠心分離機**: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

e) **酸性アルミナカートリッジカラム**: 酸性アルミナ 500 mg~1 g を充てんしたもの<sup>(3)</sup>に注射筒 10 mL を連結し、メタノール 3 mL を入れ、流下させる。

**注(3)** 容量 3 mL~6 mL のカラムにシリカゲル 500 mg~1 g を充てんしたカートリッジを用いてもよい。

**備考 2.** カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C<sub>18</sub>、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

**備考 3.** 酸性アルミナカートリッジは Bond Elut AL-A、Sep-Pak Alumina-A、Supelclean LC-Alumina-A 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- メタノール-水(1+1) 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 30 分間かき混ぜる。
- 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。
- 遠心力約  $1700 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(4)</sup>、上澄み液を抽出液<sup>(5)</sup>とする。

**注(4)** 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力  $1700 \times g$  程度となる。

(5) 試料溶液中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、抽出液の一定量をメタノール-水(1+1)で希釈する。

(4.2) **クリーンアップ** クリーンアップは、次のとおり行う。

- 抽出液を酸性アルミナカートリッジカラムに入れる。
- 初めの流出液約 3 mL を捨て、その後の流出液約 2 mL を試験管にとる。
- 流出液を共栓遠心沈殿管<sup>(6)</sup> 1.5 mL にとる。
- 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(7)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(6)** ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(7) 回転半径 7.2 cm~8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

**備考 4.** (4.2)c~d)の操作に代えて、PTFE製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**備考 5.** 有機物を含有しない肥料の場合には、次の方法で試験することができる。

(4.1)c)~d)及び(4.2)a)~b)の操作を省略し、(4.2)c)の「流出液」を「静置後、上澄み液」に変えて操作する。

(4.3) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

- 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件**: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム**: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm、粒径 5  $\mu$ m)
- 2) **カラム槽温度**: 30  $^{\circ}$ C~40  $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液**: メタノール-水 (4+6)
- 4) **流量**: 1 mL/min
- 5) **検出器**: 吸光光度検出器、測定波長 295 nm

**b) 検量線の作成**

- 1) 各検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液 10  $\mu$ L を HPLC に注入し、波長 295 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液の濃度と波長 295 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

**c) 試料の測定**

- 1) 試料溶液 10  $\mu$ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン量を求め、分析試料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を算出する。

**備考 6.** 化成肥料(1点)及び配合肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンとして 1.0%(質量分率)、0.4%(質量分率)及び 0.1%(質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は 99.1%~100.5%、99.3%~101.6%及び 100.2%~100.7%であった。

なお、この試験法の定量下限は 0.005%(質量分率)程度である。

**参考文献**

- 1) 白井裕治: 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンの定量法について, 肥検回報, **44 (3)**, 26~41(1991)

(5) 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)試験法フローシート 肥料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン試験法のフローシートを次に示す。

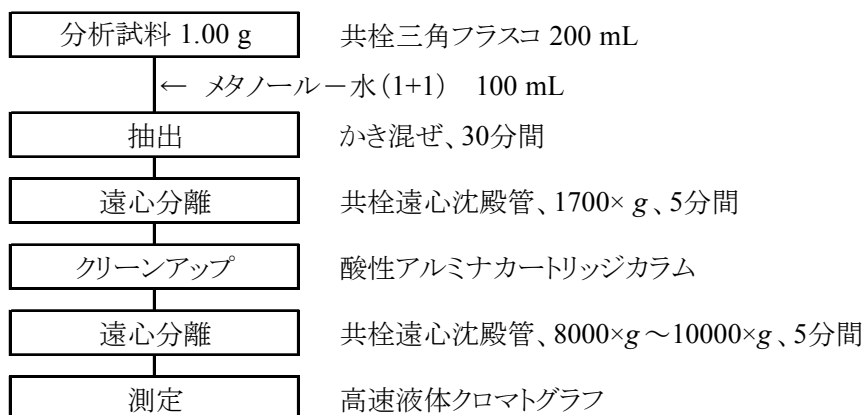
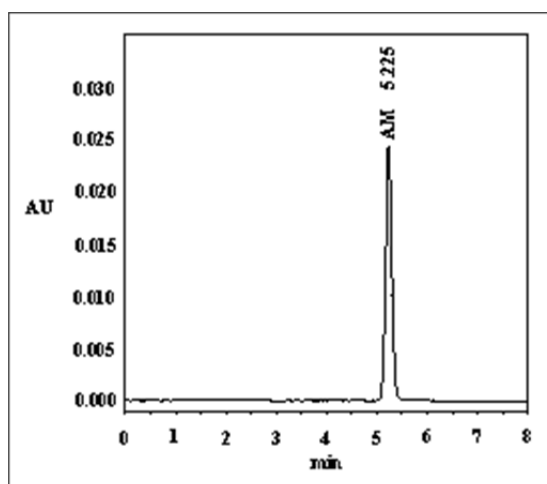


図 肥料中の2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)試験法フローシート

参考 検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)標準液の HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(100 ng 相当量)

その他の条件は(4.3) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 7.2 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)

## 7.2.a 高速液体クロマトグラフ法

## (1) 概要

この試験法は 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)を含む肥料に適用する。

水を分析試料に加えて 1-アミノ-2-チオ尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 262 nm で測定し、分析試料中の 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)を求める。なお、この試験法の性能は備考 4 に示す。

## (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) メタノール: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- c) 1-ヘキサスルホン酸ナトリウム: イオンペアークロマトグラフィー用又は同等の品質の試薬。
- d) 酢酸: HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- e) 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 mg/mL)<sup>(1)</sup>: 1-アミノ-2-チオ尿素 [C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>S]<sup>(2)</sup>0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- f) 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(0.1 mg/mL): 使用時に 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(10 µg/mL～50 µg/mL): 使用時に 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線まで水を加える。
- h) 検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 µg/mL～10 µg/mL): 使用時に検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 1-アミノ-2-チオ尿素として 98%(質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 1-アミノ-2-チオ尿素はグアニルチオ尿素として東京化成工業より、アミノチオ尿素として関東化学より市販されている。

## (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出部: 吸光光度検出器で波長 262 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g～10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C<sub>18</sub>、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

**(4) 試験操作**

**(4.1) 抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーで約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(3)</sup>を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup>1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(3)** 試料溶液中の 1-アミノ-2-チオ尿素濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm $\sim$ 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

**備考 3.** (4.1)c $\sim$ d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu$ m 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**(4.2) 測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm $\sim$ 6 mm、長さ 150 mm $\sim$ 250 mm、粒径 5  $\mu$ m)
- 2) **カラム槽温度:** 30  $^{\circ}$ C $\sim$ 45  $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液:** メタノール-水(2+8)1000 mL に 1-ヘキサスルホン酸ナトリウム 0.94 g を溶かし、酢酸で pH 3.15 に調整し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu$ m 以下)でろ過する<sup>(1)</sup>。
- 4) **流量:** 1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 262 nm

**b) 検量線の作成**

- 1) 各検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液 10  $\mu$ L を HPLC に注入し、波長 262 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液の濃度と波長 262 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

**c) 試料の測定**

- 1) 試料液 10  $\mu$ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から 1-アミノ-2-チオ尿素量を求め、分析試料中の 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)を算出する。

**備考 4.** 化成肥料(2点)を用いて3点併行で回収試験を実施した結果、1-アミノ-2-チオ尿素として 1.0 % (質量分率)、0.5 % (質量分率)及び 0.25 % (質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は 99.0 % $\sim$ 104.3 %、97.7 % $\sim$ 100.7 %及び 99.7 % $\sim$ 101.3 %であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表1に示す。

なお、この試験法の定量下限は0.005%(質量分率)程度である。

表1 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験 室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup> (%)	$s_R$ <sup>6)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_R$ <sup>7)</sup> (%)
化成肥料1	10	0.093	0.009	9.1	0.010	11.2
化成肥料2	10	0.246	0.021	8.6	0.021	8.6
化成肥料3	10	0.511	0.018	3.6	0.025	4.9
化成肥料4	10	0.759	0.039	5.1	0.040	5.3
化成肥料5	10	1.020	0.039	3.8	0.044	4.3

1) 解析に用いた試験室数

2) 平均値( $n$ =試験室数×試料数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 室間再現標準偏差

7) 室間再現相対標準偏差

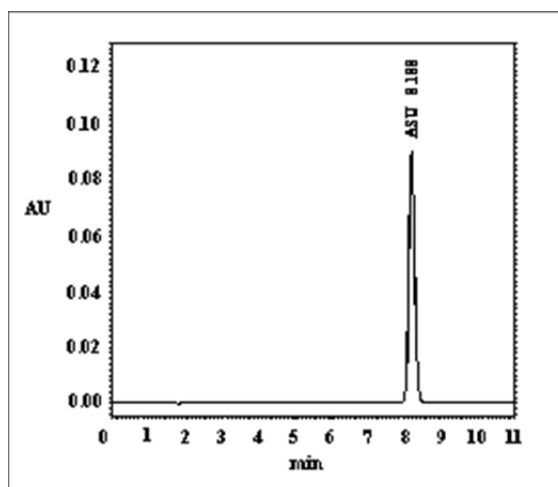
## 参考文献

- 千葉一則：高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の硝酸化成抑制材 1-アミノ-2-チオウレア(ASU)の分析法について，肥検回報，**43** (4)，15~22 (1990)
  - 甲斐茂浩，渡部絵里菜：化成肥料中の硝酸化成抑制材 1-アミノ-2-チオ尿素の測定 —共同試験成績—，肥料研究報告，**6**，36~32 (2013)
- (5) **1-アミノ-2-チオ尿素試験法フローシート** 肥料中の 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)試験法のフローシートを次に示す。

分析試料 1.00 g	共栓三角フラスコ 200 mL
← 水 100 mL	
抽出	かき混ぜ、10分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、8000×g～10000×g、5分間
測定	高速液体クロマトグラフ

図 肥料中の1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)試験法フローシート

**参考** 検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素 (ASU) 標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 1-アミノ-2-チオ尿素 (ASU) 標準液の HPLC クロマトグラム

#### HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5  $\mu$ m)

1-アミノ-2-チオ尿素標準液 (200 ng 相当量)

その他の条件は (4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり



## 7.3 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)

## 7.3.a 高速液体クロマトグラフ法

## (1) 概要

この試験法は 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を含み有機物を含まない肥料に適用する。

メタノールを分析試料に加えて 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、アミノプロピルシリカゲルカラムで分離し、波長 220 nm で測定し、分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を求める。なお、この試験法の性能は備考 4 に示す。

## (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- b) **メタノール**: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- c) **アセトニトリル**: HPLC の溶離液に使用するアセトニトリルは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) **4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 mg/mL)**<sup>(1)(2)</sup>: 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4]$ <sup>(3)</sup> 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノールを加えて溶かし、褐色全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線までメタノールを加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) **4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノールを加える。
- f) **検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(10 µg/mL~50 µg/mL)**: 使用時に 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- g) **検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 µg/mL~10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。

**注(1)** 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩として 1.434 mg/mL を含有している。

(2) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(3) 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールとして 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

**備考 1.** 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールは 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールとして和光純薬工業及び東京化成工業より、4-アミノ-4*H*-1,2,4-トリアゾールとして関東化学より市販されている。

## (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にアミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 220 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**
- c) **高速遠心分離機**: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

**備考 2.** カラムは Hibar LiChrosorb NH<sub>2</sub>、Inertsil NH<sub>2</sub>、Unison UK-Amino、Mightysil NH<sub>2</sub>、Shim-pack

CLC-NH<sub>2</sub>、Shodex NH-5A、Unisil Q NH<sub>2</sub>等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 gをはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mLに入れる。
- b) メタノール 100 mLを加え、マグネチックスターラーで約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mLにとる。
- d) 遠心力 8000×g～10000×gで約 5 分間遠心分離<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

注(4) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 8100×g～10000×g 程度となる。

備考 3. (4.1) c)～d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** アミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm、粒径 5 μm)
- 2) **カラム槽温度:** 30 °C～40 °C
- 3) **溶離液:** アセトニトリル-メタノール(9+1)
- 4) **流量:** 1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 220 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液 10 μL を HPLC に注入し、波長 220 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液の濃度と波長 220 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

c) **試料の測定**

- 1) 試料液 10 μL を b) 1)と同様に操作する。
- 2) 検量線から 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール量を求め、分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールを算出する。
- 3) 次の式によって 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(\% (質量分率))} \\ & = A \times 1.434 \end{aligned}$$

A: 分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール(\% (質量分率))

**備考 4.** 化成肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩として、0.5% (質量分率)、0.3% (質量分率)及び0.2% (質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は100.2%～104.9%、100.8%～103.0%及び100.7%～104.2%であった。

なお、この試験法の定量下限は0.005% (質量分率)程度である。

#### 参考文献

1) 坂上光一: 高速液体クロマトグラフィーによる4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩の分析法について, 肥検回報, **40** (4), 9~16 (1987)

(5) **4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)試験法フローシート** 肥料中の4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩試験法のフローシートを次に示す。

分析試料 1.00 g	共栓三角フラスコ 200 mL
← メタノール 100 mL	
抽出	かき混ぜ、10分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、8000×g～10000×g、5分間
測定	高速液体クロマトグラフ

図 肥料中の4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)試験法フローシート

## 7.4 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)

## 7.4.a 高速液体クロマトグラフ法

## (1) 概要

この試験法は N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を含み有機物を含まない肥料に適用する。

メタノール-りん酸(996+4)と水を分析試料に加えて N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 246 nm で測定し、分析試料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を求める。なお、この試験法の性能は備考 3 に示す。

## (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) メタノール: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) メタノール: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) りん酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- e) N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 mg/mL)<sup>(1)</sup>: N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸 [C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>]0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノールを加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線までメタノールを加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- f) N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(0.1 mg/mL): 使用時に N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノールを加える。
- g) 検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(10 µg/mL~50 µg/mL): 使用時に N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- h) 検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 µg/mL~10 µg/mL): 使用時に検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

## (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出部: 吸光光度検出器で波長 246 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 1. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C<sub>18</sub>、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

**(4) 試験操作**

**(4.1) 抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) メタノール-りん酸 (996+4) 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 30 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(2)</sup>を共栓遠心沈殿管<sup>(3)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(4)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(2)** 試料溶液中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、流出液の一定量をメタノールで希釈する。

**(3)** ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

**(4)** 回転半径 7.2 cm $\sim$ 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

**備考 2.** (4.1)c $\sim$ d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu$ m 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**(4.2) 測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

**a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm $\sim$ 6 mm、長さ 150 mm $\sim$ 250 mm、粒径 5  $\mu$ m)
- 2) **カラム槽温度:** 30  $^{\circ}$ C $\sim$ 40  $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液:** メタノール-水<sup>(5)</sup> (55+45)
- 4) **流量:** 0.8 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 246 nm

**注(5)** 使用する水は、予めりん酸で pH 3 に調整する。

**b) 検量線の作成**

- 1) 各検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液 10  $\mu$ L を HPLC に注入し、波長 246 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液の濃度と波長 246 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

**c) 試料の測定**

- 1) 試料溶液 10  $\mu$ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸量を求め、分析試料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を算出する。

**備考 3.** 化成肥料(2点)及び配合肥料(1点)を用いて回収試験を実施した結果、N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸として 0.4%(質量分率)、0.2%(質量分率)及び 0.1%(質量分率)の濃度レベルでの平均回

収率は 100.9 %～101.4 %、100.8 %～101.4 %及び 101.2 %～103.4 %であった。

なお、この試験法の定量下限は 0.005 % (質量分率) 程度である。

### 参考文献

- 久保 明： 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の硝酸化成抑制材 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の分析法の検討について，肥検回報，**44** (4)，25～36 (1991)
- (5) **N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)試験法フローシート** 肥料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS) 験法のフローシートを次に示す。

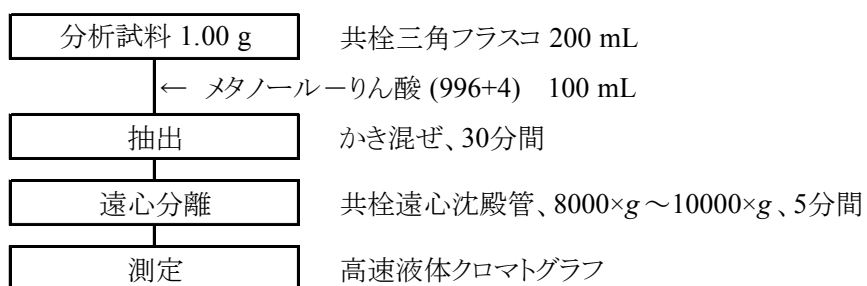
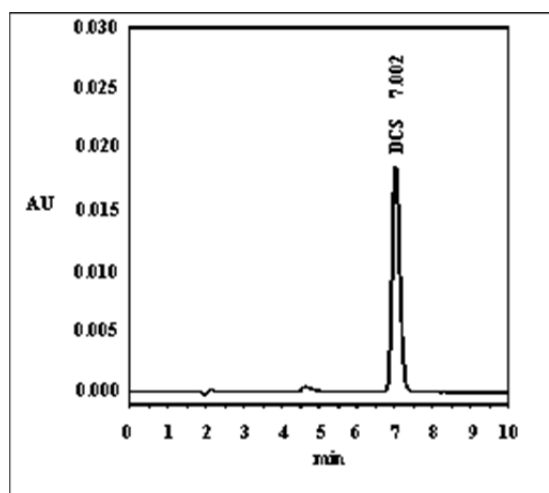


図 肥料中のN-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)試験法フローシート

**参考** 検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の HPLC クロマトグラム

### HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液 (100 ng 相当量)

その他の条件は (4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 7.5 ジシアンジアミド(Dd)

### 7.5.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法はジシアンジアミド(Dd)を含む肥料に適用する。

分析試料に水を加えて少時放置した後、メタノールを加えてジシアンジアミドを抽出し、シリカゲルカートリッジカラムで妨害物質を除去した後、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、アミノプロピルシリカゲルカラムで分離し、波長 215 nm で測定し、分析試料中のジシアンジアミド(Dd)を求める。なお、この試験法の性能は備考 5 に示す。

#### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) **アセトニトリル**: HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- e) **ジシアンジアミド標準液(1 mg/mL)**<sup>(1)</sup>: ジシアンジアミド[C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup>0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のメタノールを加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- f) **ジシアンジアミド標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時にジシアンジアミド標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノールを加える。
- g) **検量線用ジシアンジアミド標準液(10 µg/mL～50 µg/mL)**: 使用時にジシアンジアミド標準液(0.1 mg/mL)の 5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- h) **検量線用ジシアンジアミド標準液(1 µg/mL～10 µg/mL)**: 使用時に検量線用ジシアンジアミド標準液(20 µg/mL)の 2.5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- i) **硫酸ナトリウム**: JIS K 8987 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) ジシアンジアミドとして 98 %以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. ジシアンジアミドは和光純薬工業及び関東化学よりジシアノジアミドとして市販されている。

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にアミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C～40 °Cで調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 215 nm 付近で測定できるもの。
- b) **振とう機**
- c) **遠心分離機**: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- d) **高速遠心分離機**: 8000×g～10000×g で遠心分離可能なもの。
- e) **シリカゲルカートリッジカラム**: シリカゲル 500 mg～1 g を充てんしたもの<sup>(3)</sup>に注射筒 10 mL を連結し、メタ

ノール 3 mL を入れ、流下させる。

**注(3)** 容量 3 mL～6 mL のカラムにシリカゲル 500 mg～1 g を充てんしたカートリッジを用いてもよい。

**備考 2.** カラムは Hibar LiChrosorb NH<sub>2</sub>、Inertsil NH<sub>2</sub>、Unison UK-Amino、Mightysil NH<sub>2</sub>、Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>、Shodex NH-5A、Unisil Q NH<sub>2</sub> 等の名称で市販されている。

**備考 3.** シリカゲルカートリッジカラムは Sep-Pak Plus Silica、InertSep Si 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 1 mL を加え<sup>(4)</sup>、約 5 分間放置する。
- c) メタノール 100 mL を加え、振とう機で約 10 分間振り混ぜる。
- d) 硫酸ナトリウム適量<sup>(5)</sup>を加える。
- e) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。
- f) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(6)</sup>、上澄み液を抽出液<sup>(7)</sup>とする。

**注(4)** 試料がすべて水と触れるようによく混ぜる。

(5) 5 g～10 g 程度。

(6) 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。

(7) 試料溶液中のジシアンジアミド濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、抽出液の一定量をメタノールで希釈する。

(4.2) **クリーンアップ** クリーンアップは、次のとおり行う。

- a) 抽出液をシリカゲルカートリッジカラムに入れる。
- b) 初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液約 2 mL を試験管にとる。
- c) 流出液を共栓遠心沈殿管<sup>(8)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 8000×g～10000×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(9)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(8)** ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(9) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 8100×g～10000×g 程度となる。

**備考 4.** (4.2)c)～d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.3) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

1) **カラム:** アミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm



～250 mm、粒径 5 μm)

- 2) カラム槽温度: 30 °C～40 °C
- 3) 溶離液: アセトニトリル-メタノール(6+1)
- 4) 流量: 0.5 mL/min～1 mL/min
- 5) 検出器: 吸光光度検出器、測定波長 215 nm

#### b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用ジシアンジアミド標準液 10 μL を HPLC に注入し、波長 215 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用ジシアンジアミド標準液の濃度と波長 215 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

#### c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線からジシアンジアミド量を求め、分析試料中のジシアンジアミド(Dd)を算出する。

**備考 5.** 無機化成肥料(2 点)及び有機入り化成肥料(3 点)を用いて回収試験を実施した結果、2%(質量分率)及び0.2%(質量分率)の濃度レベルでの回収率は101.2%～102.6%及び98.4%～100.6%であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表1に示す。

なお、この試験法の定量下限は0.01%(質量分率)程度である。

表1 ジシアンジアミド試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup> (%)	$s_R$ <sup>6)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_R$ <sup>7)</sup> (%)
化成肥料1	11	0.263	0.009	3.2	0.019	7.4
化成肥料2	11	2.04	0.04	1.7	0.07	3.2
化成肥料3	13	0.548	0.011	2.0	0.033	6.0
化成肥料4	12	0.423	0.013	3.2	0.022	5.2
化成肥料5	12	1.02	0.01	1.4	0.04	4.3

1) 解析に用いた試験室数

2) 平均値( $n$ =試験室数×試料数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 室間再現標準偏差

7) 室間再現相対標準偏差

#### 参考文献

- 1) 齊木雅一: 肥料中の硝酸化成抑制材ジシアンジアミド測定 –高速液体クロマトグラフ法の改良–, 肥料研究報告, **3**, 43~50 (2010)
- 2) 齊木雅一: 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の硝酸化成抑制材ジシアンジアミド測定 –共同試験–, 肥料研究報告, **4**, 16~22 (2011)

(5) ジシアンジアミド試験法フローシート 肥料中のジシアンジアミド試験法のフローシートを次に示す。

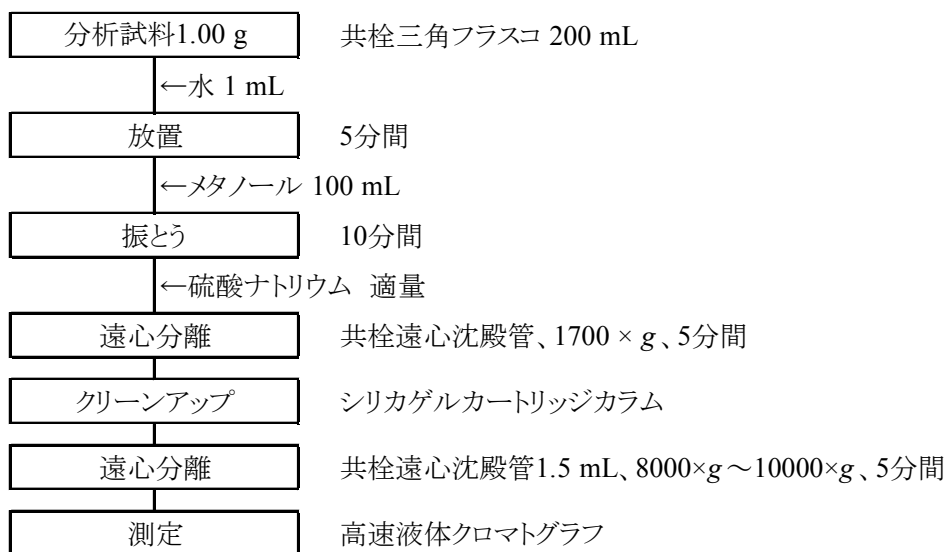
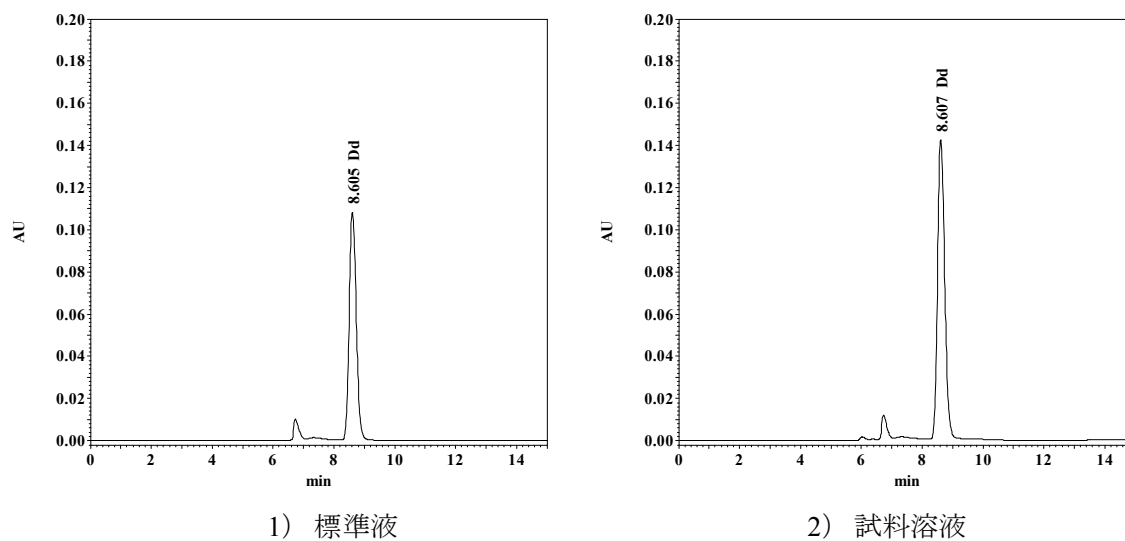


図 肥料中のジシアンジアミド(Dd)試験法のフローシート

**参考** 検量線用ジシアンジアミド(Dd)標準液及び試料溶液(化成肥料)のHPLCクロマトグラムを次に示す。



参考図 ジシアンジアミド(Dd)のHPLCクロマトグラム

- 1) ジシアンジアミド標準液(ジシアンジアミド 100 ng 相当量(10  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{L}$ ))
- 2) 試料溶液(化成肥料)

HPLC の測定条件

カラム: Inertsil NH<sub>2</sub>(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ )

カラム槽温度: 30  $^{\circ}\text{C}$

流量: 0.5 mL/min

その他の条件は(4.3) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 7.6 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)

### 7.6.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法は 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)を含む肥料に適用する。

メタノール-水 (1+1)を分析試料に加えて 2-スルファニルアミドチアゾールを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 285 nm で測定し、分析試料中の 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)を求める。なお、この試験法の性能は備考 6 に示す。

#### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) メタノール: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) メタノール: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(1 mg/mL)<sup>(1)</sup>: 2-スルファニルアミドチアゾール  $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2]$ <sup>(2)</sup> 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。水を加えて溶かし、全量フラスコ 1000 mL に移し入れ、標線までメタノール-水(1+1)を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(0.1 mg/mL): 使用時に 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(100 µg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- f) 検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(10 µg/mL~50 µg/mL): 使用時に 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(0.1 mg/mL)の 5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノール-水 (1+1)を加える。
- g) 検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(1µg/mL~10 µg/mL): 使用時に検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(20 µg/mL)の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 2-スルファニルアミドチアゾールとして 98 % (質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 2-スルファニルアミドチアゾールは東京化成工業、和光純薬工業及び関東化学よりスルファチアゾールとして市販されている。

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出部: 吸光光度検出器で波長 285 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 遠心分離機: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- d) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

e) **酸性アルミナカートリッジカラム**: 酸性アルミナ 500 mg~1 g を充てんしたもの<sup>(3)</sup>に注射筒 10 mL を連結し、メタノール 3 mL を入れ、流下させる。

**注(3)** 容量 3 mL~6 mL のカラムにシリカゲル 500 mg~1 g を充てんしたカートリッジを用いてもよい。

**備考 2.** カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C<sub>18</sub>、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

**備考 3.** 酸性アルミナカートリッジは Bond Elut AL-A、Sep-Pak Alumina-A、Supelclean LC-Alumina-A 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) メタノール-水(1+1) 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 15 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。
- d) 遠心力  $1700 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(4)</sup>、上澄み液を抽出液<sup>(5)</sup>とする。

**注(4)** 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力  $1700 \times g$  程度となる。

(5) 試料溶液中の 2-スルファニルアミドチアゾール濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、抽出液の一定量をメタノールで希釈する。

(4.2) **クリーンアップ** クリーンアップは、次のとおり行う。

- a) 抽出液を酸性アルミナカートリッジカラムに入れる。
- b) 初めの流出液約 3 mL を捨て、その後の流出液約 2 mL を試験管にとる。
- c) 流出液を共栓遠心沈殿管<sup>(6)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(7)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(6)** ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(7) 回転半径 7.2 cm~8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

**備考 4.** (4.2)c)~d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**備考 5.** 有機物を含有しない肥料の場合には、次の方法で試験することができる。

(4.1)c)~d)及び(4.2)a)~b)の操作を省略し、(4.2)c)の「流出液」を「静置後、上澄み液」に変えて操作する。

(4.3) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件**: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム**: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm、粒径 5  $\mu$ m)
- 2) **カラム槽温度**: 30  $^{\circ}$ C~40  $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液**: メタノール-水 (2+8)
- 4) **流量**: 1 mL/min
- 5) **検出器**: 吸光光度検出器、測定波長 285 nm

#### b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液 10  $\mu$ L を HPLC に注入し、波長 285 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液の濃度と波長 285 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

#### c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10  $\mu$ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から 2-スルファニルアミドチアゾール量を求め、分析試料中の 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)を算出する。

**備考 6.** 化成肥料(1点)及び配合肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、2-スルファニルアミドチアゾールとして 1.0%(質量分率)、0.4%(質量分率)及び 0.1%(質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は 101.2%~102.1%、99.6%~101.7%及び 99.4%~101.0%であった。  
なお、この試験法の定量下限は 0.005%(質量分率)程度である。

#### 参考文献

- 1) 白井裕治: 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の 2-スルファニルアミドチアゾールの定量法について, 肥検回報, **44 (1)**, 10~20 (1991)

- (5) **2-スルファニルアミドチアゾール(ST)試験法フローシート** 肥料中の 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)試験法のフローシートを次に示す。

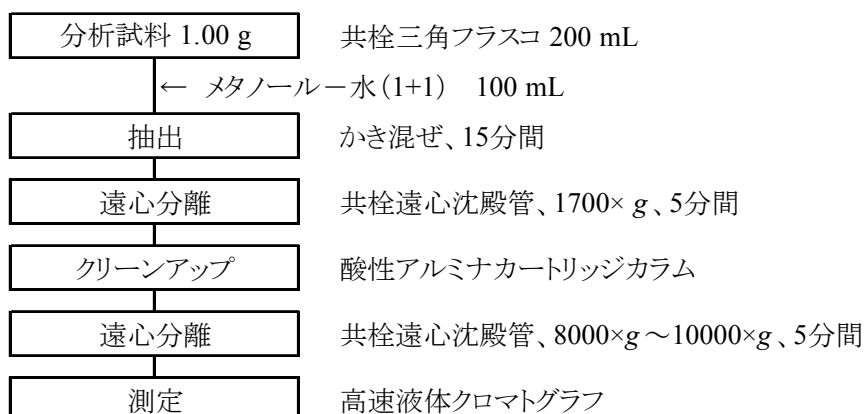
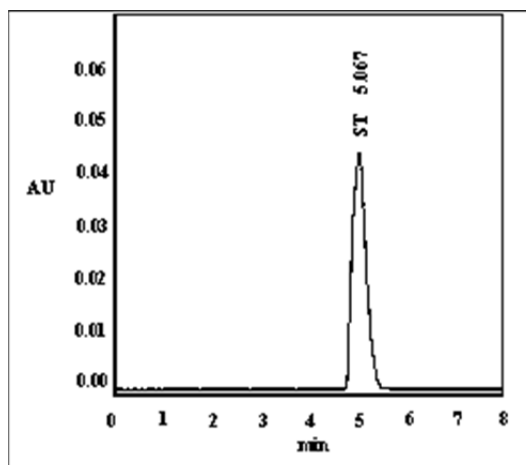


図 肥料中の2-スルファニルアミドチアゾール(ST)試験法フローシート

**参考** 検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール(ST) 標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 2-スルファニルアミドチアゾール (ST) の HPLC クロマトグラム

#### HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5  $\mu$ m)

2-スルファニルアミドチアゾール標準液 (200 ng 相当量)

その他の条件は (4.3) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 8. その他

## 8.1 メラミン及びその関連物質

## 8.1.a ガスクロマトグラフ質量分析法

## (1) 概要

有機物及び無機物を含む肥料中のメラミン及びその関連物質(以下、「メラミン等」という。)をジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)で抽出し、BSTFA-TMCS(99+1)で誘導体化した後ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて測定し、分析試料中のメラミン等を求める。なお、この試験法の性能は備考8に示す。

**備考 1.** メラミン及びその関連物質の構造式は図1のとおりである。メラミンの製造過程において R<sub>1</sub>~R<sub>3</sub>の-NH<sub>2</sub>が-OHに置き換わった副産物が生ずることがある。

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	MW
メラミン	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	126.12
アンメリン	OH	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	127.10
アンメリド	OH	OH	NH <sub>2</sub>	128.09
シアヌル酸	OH	OH	OH	129.07

図1 メラミン及びその関連物質の構造式

(2) **試薬等** 試薬及び水は、次による。

- 水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- アセトニトリル**: JIS K 8039 に規定する残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- ジエチルアミン**: 特級又は同等の品質の試薬。
- ピリジン(脱水)<sup>(1)</sup>**: 純度 99.5 % (質量分率) 以上及び水分 0.05 mg/mL 以下の有機合成用又は同等の品質の試薬。
- 誘導体化試薬<sup>(2)</sup>**: ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド-トリメチルクロロシラン(99+1)。
- メラミン等標準液(0.5 mg/mL)<sup>(3)</sup>**: メラミン[C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>]<sup>(3)</sup>、アンメリン[C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O]<sup>(3)</sup>、アンメリド[C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>(3)</sup>及びシアヌル酸[C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>(3)</sup>約 0.05 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のジエチルアミン-水(1+4)で溶かし、それぞれ全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える。
- 混合標準液(50 µg/mL)<sup>(3)</sup>**: 各メラミン等標準液(0.5 mg/mL) 5 mL を全量フラスコに 50 mL とり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を加える。

**注(1)** 開封後は、硫酸ナトリウム(無水)適量を加えて密栓して保管する。

(2) 混合された誘導体化試薬は BSTFA-TMCS(99+1)の名称で市販されている。

(3) メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸としてそれぞれ標準試薬が市販されている。

**備考 2.** BSTFA-TMCS(99+1)は SUPELCO から 1 mL のアンプルで販売されている。開封後は、その日のうちに使用する。

**備考 3.** メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸の標準試薬は和光純薬工業、関東化学及び林純薬工業より販売されている。



(3) **装置** 装置は、次のとおりとする。

a) **ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)**: JIS K 0123 に規定する GC/MS で次の要件を満たすもの。

1) **ガスクロマトグラフ**:

① 試料導入部: スプリットレス方式が可能なもの。

② キャピラリーカラム: 内径 0.25 mm~0.32 mm、長さ 30 m の熔融シリカ製のキャピラリーカラム。5 %フェニル 95 %メチルポリシロキサンを 0.25 μm 厚さでキャピラリーカラム内表面へ化学結合し、質量分析計仕様のもの。

③ キャリヤーガス: 純度 99.999 % (体積分率) 以上の高純度ヘリウム

2) **質量分析計**:

① イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)法

② イオン検出方式: 選択イオン検出(SIM)法

b) **超音波発生器**: 超音波洗浄器を用いることができる。

c) **高速遠心分離機**: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

d) **濃縮器**: 70 °C±2 °C に調節できる遠心エバポレーター

e) **水浴**: 70 °C±2 °C に調節できるもの。

**備考 4.** キャピラリーカラムは DB-5ms、Rtx-5ms、HP-5ms、SLB-5ms、BPX-5、CP-Sil 8CB low Bleed/MS、TC-5HT for GC/MS 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料 0.50 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL~300 mL に入れる。

b) ジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5) 160 mL~200 mL を加え、超音波発生器を用いて約 30 分間超音波処理する。

c) 約 1.5 mL を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとり、遠心力 8000×g~10000×g で約 5 分間遠心分離する<sup>(5)</sup>。

d) 上澄み液 1 mL を全量フラスコ 5 mL~50 mL にとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5) を加え、抽出液とする。

**注(4)** ポリプロピレン製等で試験に影響しないことを確認する。

(5) 回転半径 7.2 cm~8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 8100×g~10000×g 程度となる。

**備考 5.** 500 μm のふるいを通すまで粉砕して分析用試料を調製する。

**備考 6.** 分析試料 0.5 g をはかりとり、ジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5) 200 mL で抽出し、d) の操作で 50 倍に希釈した場合は、分析試料中のメラミン等の定量範囲は 0.2 %~10 % (質量分率) となる。その定量範囲未満のメラミン等を測定する場合は d) の操作の希釈倍率を下げる。また、メラミン等の含有量がそれぞれ 10 % (質量分率) を超える場合は分析試料の採取量を減らす必要がある。

(4.2) **誘導体化** 誘導体化は、次のとおり行う。

a) 抽出液 0.2 mL をスクルー栓付き試験管 5 mL~10 mL にとる。

- b) 試験管を濃縮器にいれ、70 °C±2 °Cで減圧濃縮し、完全に溶媒を揮散させる<sup>(6)</sup>。  
 c) ピリジン(脱水)<sup>(1)</sup> 0.3 mL 及び誘導体化試薬<sup>(2)</sup> 0.2 mL を残留物に加えて混合し、栓をして密封する。  
 d) 70 °C±2 °Cの水浴中で約 45 分間加熱した<sup>(7)</sup>後、放冷し、試料溶液とする<sup>(8)</sup>。

**注(6)** 吹きつけ型濃縮機等を用いることができる。

- (7) b) の操作で水分が残留した場合又は c) の操作で使用する試薬に水分が含まれていた場合は、d) における誘導体化の反応が十分に進まないことがある。  
 (8) 必要に応じて、試料溶液を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとり、8000×g～10000×g で約 5 分間遠心分離する<sup>(5)</sup>。

**(4.3) 測定** 測定は、JIS K 0123 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用するガスクロマトグラフ質量分析計の操作方法による。

**a) ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件** ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

**1) ガスクロマトグラフ:**

- ① 試料導入方法: スプリットレス注入法(1 min)
- ② 試料導入部温度: 280 °C
- ③ キャピラリーカラム: 5 %フェニル 95 %メチルポリシロキサンをキャピラリーカラム内表面へ化学結合した溶融シリカ製のキャピラリーカラム(内径 0.25 mm～0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)
- ④ カラム槽温度: 100 °C(1 min)→(15 °C/min)→320 °C(3 min)
- ⑤ GC/MS 接続部温度: 250 °C
- ⑥ キャリヤーガス: ヘリウム、流量: 1.5 mL/min

**2) 質量分析計:**

- ① イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)法
- ② イオン化電圧: 70 V
- ③ イオン源温度: 230 °C
- ④ イオン検出方式: 選択イオン検出(SIM)法
- ⑤ 測定イオン: 表 1 のとおり

**b) 検量線の作成**

- 1) 混合標準液(50 μg/mL) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を加え、混合標準液(5 μg/mL)とする。
- 2) 混合標準液(5 μg/mL) 1 mL～20 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を加え、混合標準液(0.1 μg/mL～2 μg/mL)とする。
- 3) 混合標準液(0.1 μg/mL～2 μg/mL)を(4.2) b)～d)の操作を行って 0.04 μg/mL～0.8 μg/mL 相当量の検量線用混合標準液とする。
- 4) 各検量線用混合標準液 1 μL を GC/MS に注入し、測定対象物質の定量用イオン( $m/z$ )及び確認用イオン( $m/z$ )のクロマトグラムを記録し、それぞれのピーク面積又は高さを求める。
- 5) 各測定対象物質の定量用イオン( $m/z$ )と確認用イオン( $m/z$ )のピーク面積比又は高さ比を算出する。
- 6) 各検量線用混合標準液の測定対象物質濃度と定量用イオン( $m/z$ )のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

## c) 試料の測定

- 1) 試料溶液を 1  $\mu$ L を **b) 4) ~ 5)**と同様に操作する<sup>(9)</sup>。
- 2) 検量線から各測定対象物質量を求め、分析試料中の各測定対象物質を算出する。

**注(9)** 標準液のピーク面積比又は高さ比に対して $\pm 30$  %程度の範囲内であることを確認する。なお、ピーク面積比又は高さ比は濃度によって異なることがある。

**備考 7.** メラミン等の感度の変動が確認された場合は、次の **a)** 又は **b)** の方法により測定を行う。

- a)** (4.3)c)1) の操作で試料溶液を GC/MS に一定回数注入した後、(4.3)b)4) ~ 6) に従って操作し検量線を修正する。
- b)** 内標準物質として 2,6-ジアミノ-4-クロロピリミジン(0.5  $\mu$ g 相当量)を標準液及び試料溶液に加え、(4.2)c) ~ d)、(4.3)b)4) ~ 6) 及び c)1) と同様の操作をする。ただし、各測定対象物質と内標準物質の定量用イオン( $m/z$ )のピーク面積比又は高さ比から検量線の作成及び分析試料中の各測定対象物質濃度を算出する。

表1 測定対象物質のフラグメントイオン

測定対象物質	測定フラグメントイオン( $m/z$ )				
	定量用	確認用	確認用	確認用	確認用
メラミン	342	344	327	285	213
アンメリン	328	345	343	285	214
アンメリド	344	346	329	214	198
シアヌル酸	345	347	330	215	188
DACP (I.S.)	288	289	290	273	275

**備考 8.** 大豆油かす、魚粉、魚廃物加工肥料、混合有機質肥料、配合肥料及び化成肥料におけるメラミン等の回収試験の結果は、10 % (質量分率) 及び 0.2 % (質量分率) の添加レベルで平均回収率が 92.1 % ~ 102.9 % 及び 90.3 % ~ 102.2 % であった。

なお、この試験法のメラミン等の定量下限はそれぞれ 0.01 % (質量分率) 程度である。

## 参考文献

- 1) 白井裕治, 大木 純: ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) 法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定, 肥料研究報告, **1**, 114~121 (2008)

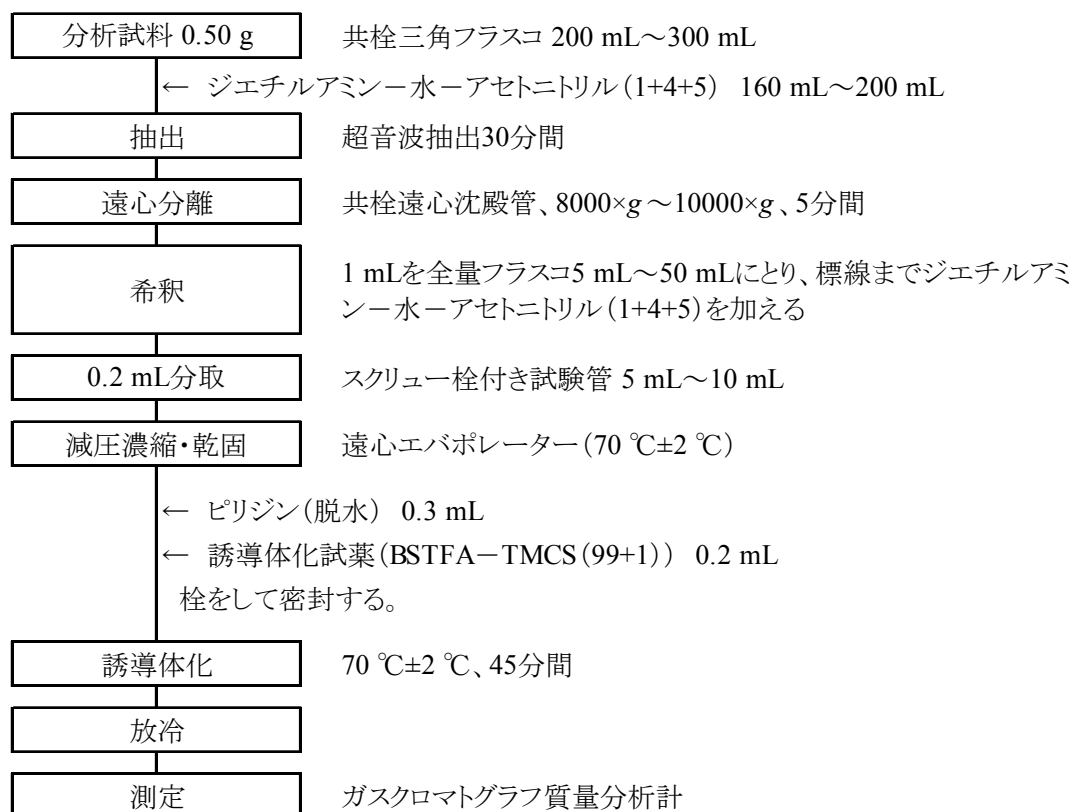
(5) **メラミン等の試験法フローシート** 肥料中のメラミン等の試験法のフローシートを次に示す。

図2 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート

**参考** メラミン等の検量線用混合標準液の GC/MS の全イオンのクロマトグラム(TIC)を次に示す。

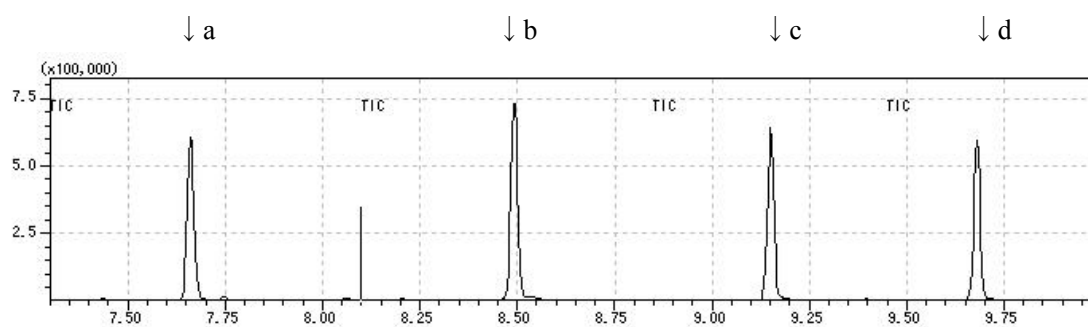


図3 メラミン及びその関連物質の GC/MS の全イオンのクロマトグラム(TIC)

GC/MS の測定条件

キャピラリーカラム: Rtx-5ms(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu$ m)

その他の条件は(4.3) a) ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件の例示のとおり

各全イオンクロマトグラムのピーク名

- |          |          |
|----------|----------|
| a) シアヌル酸 | b) アンメリド |
| c) アンメリン | d) メラミン  |

GC/MS に導入した試料及び導入量

導入した試料: メラミン及びその関連物質の検量線用混合標準液(各 2  $\mu$ g/mL 相当量)

導入量: 1  $\mu$ L(メラミン及びその関連物質各 2 ng 相当量)

**8.1.b** (欠番)

## 8.1.c 高速液体クロマトグラフ法(有機物を含まない肥料)

## (1) 概要

有機物を含まない肥料に適用する。

塩酸(1+15)を分析試料に加えてメラミン及びその関連物質(以下、「メラミン等」という。)を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラムで分離し、波長 214 nm で測定し、分析試料中のメラミン等を求める。なお、この試験法の性能は備考 4 に示す。

## (2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級又は同等の品質の試薬。なお、HPLC の溶離液には HPLC 用試薬を使用。
- c) 塩酸: 特級又は同等の品質の試薬。
- d) リン酸塩緩衝液<sup>(1)</sup>: JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 0.237 g 及び JIS K 9009 に規定するりん酸二水素ナトリウム二水和物 0.520 g を水に溶かして 1000 mL とする<sup>(2)</sup>。HPLC の溶離液に使用する場合は、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 µm 以下)でろ過する。
- e) メラミン等標準液(0.5 mg/mL): メラミン[C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>]<sup>(3)</sup>、アンメリン[C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>(3)</sup>、アンメリド[C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>(3)</sup>及びシアヌル酸[C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>(3)</sup>約 0.05 g をそれぞれひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の塩酸(1+15)で溶かし、それぞれ全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶液を加える。
- f) 混合標準液(50 µg/mL)<sup>(1)</sup>: 各メラミン等標準液(0.5 mg/mL) 5 mL を全量フラスコに 50 mL とり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加える。
- g) 検量線用混合標準液(1 µg/mL~5 µg/mL): 使用時に混合標準液(50 µg/mL)の 1 mL~5 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加える。
- h) 検量線用混合標準液(0.05 µg/mL~0.5 µg/mL): 使用時に混合標準液(1 µg/mL)の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加える。

注 (1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) リン酸塩緩衝液は pH 6.7±pH 0.2 となる。

(3) メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸としてそれぞれ標準試薬が市販されている。

備考 1. メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸の標準試薬は和光純薬工業、関東化学、林純薬工業及び東京化成工業より販売されている。

## (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にカルバモイル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 40 °C±1 °Cで調節できるもの。
  - 3) 検出部: 吸光光度検出器で波長 214 nm 付近で測定できるもの。
- b) 超音波発生器: 超音波洗浄機を用いることができる。
- c) 遠心分離機: 1700×g で遠心分離可能なもの。

d) **高速遠心分離機**:  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で遠心分離可能なもの。

**備考 2.** カラムは TSKgel Amide-80 等の名称で市販されている。メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸を完全に分離できることが確認されたカラムを使用すること。

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 0.50 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 塩酸(1+15) 100 mL を加え、超音波発生器を用いて約 30 分間超音波処理する。
- c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。
- d) 遠心力約  $1700 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(4)</sup>、上澄み液を抽出液とする。
- e) 抽出液 5 mL<sup>(5)</sup>を全量フラスコ 50 mL にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加えて希釈する。
- f) 希釈液を共栓遠心沈殿管<sup>(6)</sup> 1.5 mL にとる。
- g) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(7)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (4)** 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力  $1700 \times g$  程度となる。

(5) 試料溶液中のメラミン等の濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、上澄み液の分取量 1 mL $\sim$ 2.5 mL とする。

(6) ポリプロピレン製等の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(7) 回転半径 7.2 cm $\sim$ 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

**備考 3.** (4.1) f)  $\sim$  g) の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu$ m 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件**: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。
  - 1) **カラム**: カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm $\sim$ 6 mm、長さ 150 mm $\sim$ 250 mm、粒径 5  $\mu$ m)
  - 2) **カラム槽温度**:  $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
  - 3) **溶離液**: アセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)
  - 4) **流量**: 1 mL/min
  - 5) **検出器**: 吸光光度検出器、測定波長 214 nm
- b) **検量線の作成**
  - 1) 各検量線用混合標準液 10  $\mu$ L を HPLC に注入し、波長 214 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
  - 2) 各検量線用混合標準液の濃度と波長 214 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。
- c) **試料の測定**



- 1) 試料溶液を 10  $\mu$ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から各メラミン等の量を求め、分析試料中の各メラミン等を算出する。

**備考 4.** 石灰窒素 3 銘柄、石灰窒素入り化成肥料 1 銘柄、石灰窒素を含まない化成肥料 2 銘柄、硫安 1 銘柄及び尿素 1 銘柄を用いて回収試験を実施した結果、メラミン等として 4 % (質量分率) 及び 0.1 % (質量分率) の濃度レベルでの回収率は 90.5 % ~ 106.3 % 及び 92.2 % ~ 107.0 % であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表に示す。

なお、この試験法の定量下限はメラミン、シアヌル酸で 0.02 % (質量分率) 程度、アンメリン、アンメリドで 0.01 % (質量分率) 程度であるが、アンメリド及びシアヌル酸については、アンメリドで 0.188 % ~ 1.10 % の範囲で、シアヌル酸で 0.105 % ~ 1.15 % の範囲で十分な室間再現精度を有していた。

表1 メラミン及びその関連物質試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

農薬名	試料名	試験 室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> (%) <sup>7)</sup>	$s_r$ <sup>3)</sup> (%) <sup>7)</sup>	$RSD_r$ <sup>4)</sup> (%)	$s_R$ <sup>5)</sup> (%) <sup>7)</sup>	$RSD_R$ <sup>6)</sup> (%)
メラミン	石灰窒素1	9	2.83	0.04	1.4	0.12	4.3
	石灰窒素2	10	0.391	0.003	0.8	0.023	5.8
	石灰窒素入り化成肥料	9	0.845	0.019	2.2	0.036	4.2
	化成肥料	11	0.198	0.005	2.6	0.012	6.2
	硫酸アンモニア	10	0.0343	0.0015	4.5	0.0040	11.6
アンメリン	石灰窒素1	9	1.60	0.02	1.3	0.06	3.8
	石灰窒素2	10	0.105	0.001	1.3	0.002	2.3
	石灰窒素入り化成肥料	9	0.629	0.027	4.3	0.023	3.7
	化成肥料	11	0.195	0.004	2.1	0.009	4.5
	硫酸アンモニア	10	0.0346	0.0013	3.7	0.0024	6.9
アンメリド	石灰窒素1	9	1.10	0.02	2.1	0.08	7.6
	石灰窒素2	11	0.361	0.008	2.2	0.023	6.5
	石灰窒素入り化成肥料	9	0.188	0.004	2.2	0.014	7.5
	化成肥料	11	0.718	0.028	3.9	0.052	7.2
	硫酸アンモニア	11	0.0345	0.0031	8.9	0.0056	16.1
シアヌル酸	石灰窒素1	9	1.15	0.06	4.8	0.09	7.7
	石灰窒素2	10	0.390	0.018	4.5	0.029	7.4
	石灰窒素入り化成肥料	9	0.105	0.003	2.9	0.014	13.2
	化成肥料	9	0.788	0.026	3.2	0.054	6.8
	硫酸アンモニア	10	0.0365	0.0015	4.2	0.0067	18.3

1) 解析に用いた試験室数

2) 総平均値 ( $n$  = 試験室数  $\times$  繰返し数 (2))

3) 併行標準偏差

4) 併行相対標準偏差

5) 室間再現標準偏差

6) 室間再現相対標準偏差

7) 質量分率

## 参考文献

- 1) 坂東悦子, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による肥料中のメラミン及びその関連物質

の同時測定, 肥料研究報告, 6, 27~35 (2013)

- 2) 坂東悦子, 甲斐茂浩: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定 - 共同試験 -, 肥料研究報告, 7, 10~21 (2014)

- (5) **メラミン等の試験法フローシート** 肥料中のメラミン等の試験法のフローシートを次に示す。

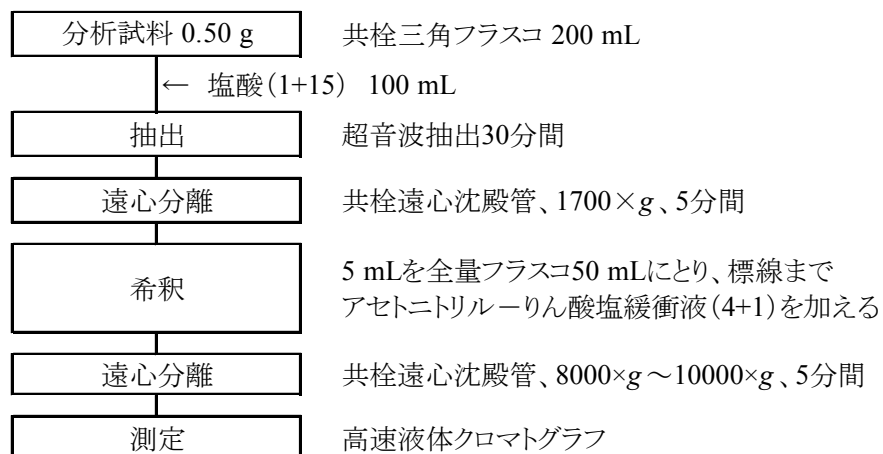
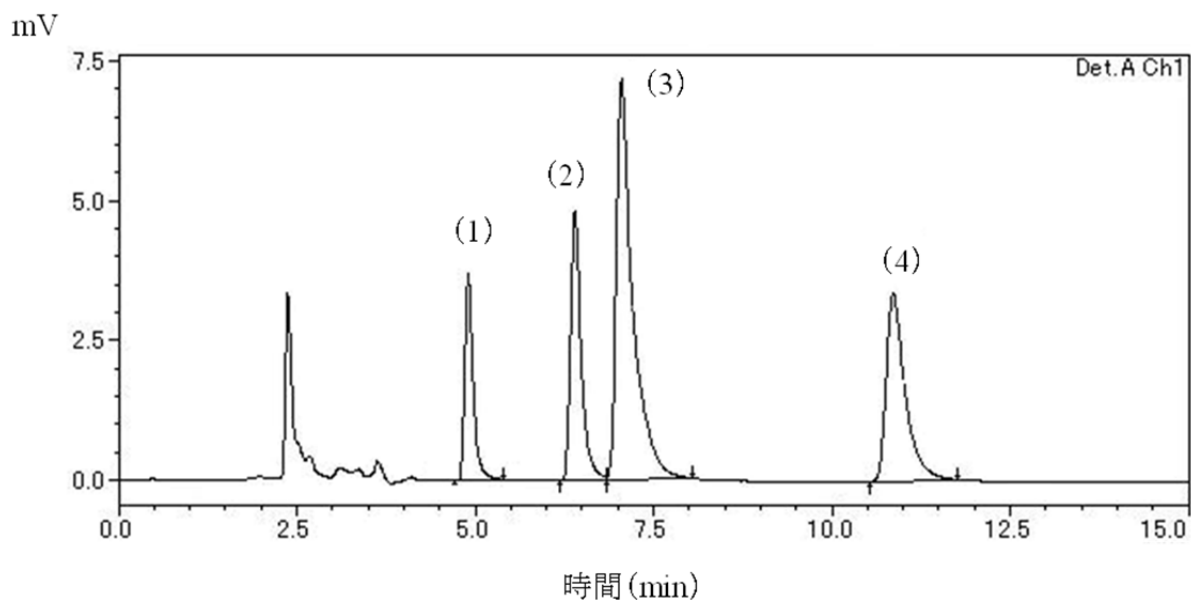


図 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート

**参考** メラミン等の検量線用混合標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 メラミン及びその関連物質の HPLC クロマトグラム

各ピークの物質名

(1) シアヌル酸 (2) アンメリド (3) メラミン (4) アンメリン

HPLC の測定条件

カラム: TSKgel Amide-80(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5  $\mu$ m)

メラミン及びその関連物質の検量線用混合標準液(各 10 ng 相当量(1  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ L))

その他の条件は(4.2 a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 8.1.d 高速液体クロマトグラフ法(有機物を含む肥料)

## (1) 概要

有機質肥料及び有機物を含む肥料に適用する。

水を分析試料に加えてメラミンを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラムで分離し、波長 214 nm で測定し、分析試料中のメラミンを求める。なお、ただし、メラミン関連物質であるシアヌル酸、アンメリド及びアンメリンは測定対象成分から除く。この方法の性能は備考 3 に示す。

## (2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級又は同等の品質の試薬。なお、HPLC の溶離液には HPLC 用試薬を使用。
- c) リン酸塩緩衝液<sup>(1)</sup>: JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 0.237 g 及び JIS K 9009 に規定するりん酸二水素ナトリウム二水和物 0.520 g を水に溶かして 1000 mL とする<sup>(2)</sup>。HPLC の溶離液に使用する場合は、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 µm 以下)でろ過する。
- d) メラミン標準液(0.5 mg/mL): メラミン[C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>]<sup>(3)</sup>約 0.05 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶液を加える。
- e) メラミン標準液(50 µg/mL)<sup>(1)</sup>: メラミン標準液(0.5 mg/mL) 5 mL を全量フラスコに 50 mL とり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)を加える。
- f) 検量線用メラミン標準液(1 µg/mL~5 µg/mL): 使用時にメラミン標準液(50 µg/mL)の 1 mL~5 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)を加える。
- g) 検量線用メラミン標準液(0.05 µg/mL~0.5 µg/mL): 使用時にメラミン標準液(1 µg/mL)の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)を加える。

注 (1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) リン酸塩緩衝液の pH は 6.7±0.2 となる。

(3) メラミンとして標準試薬が市販されている。

備考 1. メラミンの標準試薬は和光純薬工業、関東化学及び林純薬工業より販売されている。

## (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にカルバモイル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 40 °C±1 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出部: 吸光光度検出器で波長 214 nm 付近で測定できるもの。
- b) 超音波発生器: 超音波洗浄機を用いることができる。
- c) 遠心分離機: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- d) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

**備考 2.** カラムは TSKgel Amide-80 等の名称で市販されている。メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸を完全に分離できることが確認されたカラムを使用すること。

#### (4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 0.50 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、超音波発生器を用いて約 10 分間超音波処理する。
- c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。
- d) 遠心力  $1700 \times g$  で約 10 分間遠心分離<sup>(4)</sup>、上澄み液を抽出液とする。
- e) 抽出液 5 mL<sup>(5)</sup>を全量フラスコ 50 mL にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)を加えて希釈する。
- f) 希釈液を共栓遠心沈殿管<sup>(6)</sup> 1.5 mL にとる。
- g) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(7)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (4)** ローター半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力  $1700 \times g$  程度となる。

(5) 試料溶液中のメラミン等の濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、上澄み液の分取量 1 mL~2.5 mL とする。

(6) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの

(7) ローター半径 7.2 cm~8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

**備考 3.** (4.1)f)~g)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ )
- 2) **カラム槽温度:**  $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
- 3) **溶離液:** アセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)
- 4) **流量:** 1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 214 nm

#### b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用メラミン標準液 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し、波長 214 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用メラミン標準液の濃度と波長 214 nm のピーク面積又は高さの検量線を作成する。

#### c) 試料の測定

- 1) 試料溶液を 10 μL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線からメラミンの量を求め、分析試料中のメラミンを算出する。

**備考 3.** 真度の評価のため、なたね油かす、大豆油かす、石灰窒素有機入り化成肥料、有機入り化成肥料及び有機入り配合肥料(各 1 銘柄)を用いて添加回収試験を実施した結果、2 % (質量分率)、0.4 % (質量分率) 及び 0.1 % (質量分率) の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 94.6 % ~ 99.8 %、92.4 % ~ 98.5 % 及び 93.1 % ~ 98.4 % であった。

精度の評価のため、大豆油かす及び有機入り化成肥料を用いて日を変えての反復試験の試験成績について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を算出した結果を表に示す。

なお、この試験法の定量下限は 0.02 % (質量分率) 程度である。

表1 日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験		併行精度		中間精度	
	日数 $T^{1)}$	平均値 <sup>2)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$s_r^{4)}$ (%) <sup>3)</sup>	$RSD_r^{5)}$ (%)	$s_{I(T)}^{6)}$ (%) <sup>3)</sup>	$RSD_{I(T)}^{7)}$ (%)
大豆油かす	5	1.91	0.03	1.7	0.04	2.2
有機入り化成肥料	5	0.100	0.001	1.4	0.002	2.5

- |                                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| 1) 2点併行試験を実施した試験日数                | 4) 併行標準偏差   |
| 2) 平均値 (試験日数 ( $T$ ) × 併行試験数 (2)) | 5) 併行相対標準偏差 |
| 3) 質量分率                           | 6) 中間標準偏差   |
|                                   | 7) 中間相対標準偏差 |

(5) **メラミン等の試験法フローシート** 肥料中のメラミン等の試験法のフローシートを次に示す。

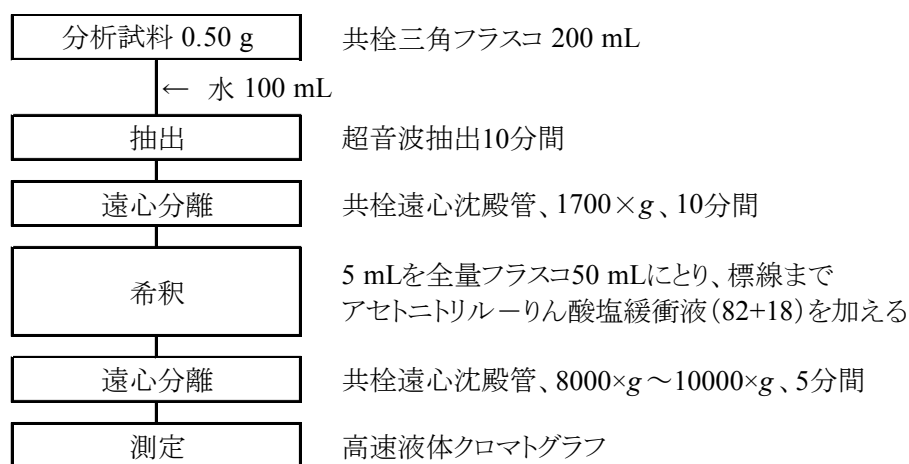
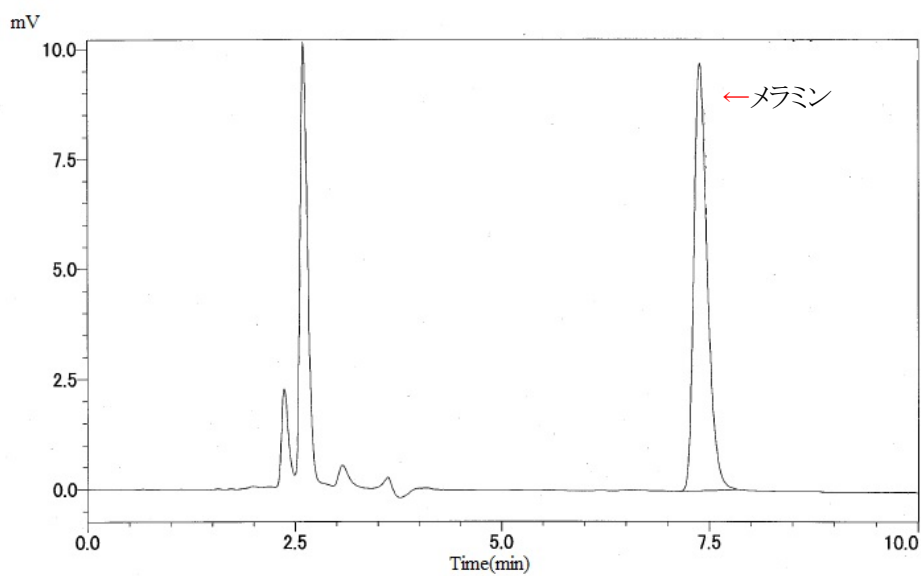


図 有機物を含む肥料中のメラミンの試験法フローシート

**参考** メラミンの検量線用標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 メラミンの HPLC クロマトグラム

#### HPLC の測定条件

カラム: TSKgel Amide-80(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5  $\mu$ m)

メラミンの検量線用標準液(各 10 ng 相当量(1  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ L))

その他の条件は(4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 8.2 クロピラリド及びその関連物質

## 8.2.a 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法

## (1) 概要

堆肥及び汚泥発酵肥料に適用する。

肥料中のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムをアルカリ性下でメタノール抽出し、酸性とアルカリ性で溶出挙動が変わることを利用して、クリーンアップカートリッジを用いて精製後、高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いて測定し、分析試料中のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムを求める。なお、この試験法の性能は備考7に示す。

**備考 1.** クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式は図1のとおりである。

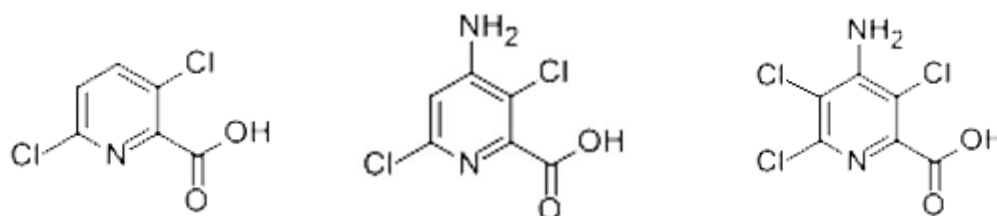


図1 クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式

(2) **試薬等** 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。ただし、LC-MS/MS に導入する溶離液については A4 の水を使用する。
- b) **アセトニトリル**: JIS K 8039 に規定する残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- d) **メタノール**: LC-MS/MS の溶離液に使用するメタノールは LC-MS 用又は同等の品質の試薬。
- e) **水酸化ナトリウム**: JIS K 8576 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- f) **塩酸**: JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- g) **アンモニア水**: JIS K 8085 に規定する 25 % (質量分率)の特級試薬又は同等の品質のもの。
- h) **ぎ酸**: JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- i) **アンモニア溶液(0.0025 % (質量分率))<sup>(1)</sup>**: アンモニア水 0.1 mL を水 1000 mL に加える。
- j) **各農薬標準液(0.1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: クロピラリド[C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>C<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>(2)</sup>、アミノピラリド[C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>C<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>(2)</sup>及びピクロラム[C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>C<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>(2)</sup>約 0.01 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のアセトニトリルで溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える。
- k) **混合標準液(250 ng/mL)<sup>(1)</sup>**: 各農薬標準液(0.1 mg/mL)の一定量をぎ酸(1+1000)で希釈し、混合標準液(250 ng/mL)を調製する。
- l) **検量線用混合標準液(5 ng/mL~50 ng/mL)<sup>(1)</sup>**: 使用時に混合標準液(100 ng/mL)の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加える。
- m) **検量線用混合標準液(0.5 ng/mL~5 ng/mL)<sup>(1)</sup>**: 使用時に検量線用混合標準液(10 ng/mL)の 2.5 mL



～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加える。

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 標準試薬が市販されている。

**備考 2.** クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの標準試薬は和光純薬工業、関東化学及び林純薬工業より販売されている。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)**: JIS K 0136 に規定する LC-MS/MS で次の要件を満たすもの。

1) **高速液体クロマトグラフ**:

① カラム槽: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。

② カラム: 内径 2 mm～3 mm、長さ 50 mm、～150 mm、粒径 1.6 μm～2.2 μm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。質量分析計仕様のもの。

2) **質量分析計**:

① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

② イオン検出方式: 選択反応検出法

b) **振とう機**

c) **マニホールド**

d) **遠心分離機**: 1700×g で遠心分離可能なもの。

e) **高速遠心分離機**: 8000×g～10000×g で遠心分離可能なもの。

f) **濃縮器**: 40 °C±2 °C に調節できるエバポレーター

g) **コポリマーカートリッジカラム**: ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム(200 mg)

**備考 3.** カラムは ACQUITY UPLC HSS C18 等の名称で市販されている。

**備考 4.** コポリマーカートリッジは Oasis HLB 6cc(200 mg) 等の名称で市販されている。

(4) **試験操作**

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料 5.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL～300 mL に入れる。

b) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L) 1 mL、メタノール 99 mL を加え、振とう機で約 30 分間振り混ぜる。

c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。

d) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(3)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(3)** 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3,000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。

**備考 5.** 目開き 500 μm のふるいを通過するまで粉砕して分析用試料を調製する。

(4.2) **クリーンアップ(1)** クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

- a) カートリッジカラムを予めメタノール約 5 mL 及び水約 5 mL で速やかに洗浄する。
- b) なすフラスコ 50 mL<sup>(4)</sup>をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 5 mL をカートリッジカラムに入れ、速やかに液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- c) 水酸化ナトリウム溶液(0.4 g/L)－メタノール[1+1]約 5 mL を 2 回カートリッジカラムに加え、同様に流出させる。

**注(4)** (4.3)b)の濃縮操作で泡立つおそれがある場合は、なすフラスコ 100 mL を用いてもよい。

**(4.3) クリーンアップ(2)** クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

- a) 新たなカートリッジカラムを予めアセトニトリル約 5 mL 及び塩酸(1+120)約 5 mL で速やかに洗浄する。
- b) (4.2)c)の流出液を 40 °C 以下の水浴上で 5 mL 以下まで減圧濃縮した後、塩酸(1+11)3 mL を加える。
- c) 濃縮した流出液をカートリッジカラムに入れ、速やかに液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- d) なすフラスコを塩酸(1+120)約 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カートリッジに加える。
- e) 次に、塩酸(1+120)－アセトニトリル[9+1]約 5 mL 及び水約 5 mL を順次カートリッジ加えて速やかに流出させる。
- f) 全量フラスコ 5 mL をカートリッジカラムの下に置き、アンモニア溶液(0.0025 % (質量分率))－アセトニトリル[9+1]4 mL をカートリッジカラムに加えてクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムを速やかに溶出させる。
- g) 標線までぎ酸(1+1000)を加え<sup>(5)</sup>、共栓遠心沈殿管 1.5 mL<sup>(6)</sup>にとる。
- h) 遠心力 8000×g～10000×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(7)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(5)** 試料溶液中のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラム濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、流出液の一定量をぎ酸(1+1000)で希釈する。

(6) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(7) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 8100×g～10000×g 程度となる。

**備考 6.** (4.2)及び(4.3)の操作は、吸引装置を用いて迅速に行う。

**(4.4) 測定** 測定は、JIS K 0136 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ質量分析計の操作方法による。

- a) **高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件** 高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

**1) 高速液体クロマトグラフ:**

- ① カラム: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 2 mm～3 mm, 長さ 50 mm～150 mm, 粒径 1.6 μm～2.2 μm)
- ② 流量: 0.2 mL/min～0.5 mL/min
- ③ 溶離液: A: ぎ酸(1+1000) B: メタノール
- ④ グラジエント: 0 min (5 %B)→5 min (60 %B)→6 min (95 %B)→7 min (5 %B)
- ⑤ カラム恒温槽: 40 °C
- ⑥ 注入量: 5 μL

**2) 質量分析計:**

- ① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法
- ② モード: ポジティブ
- ③ キャピラリー電圧: 1.0 kV
- ④ イオン源温度: 120 °C
- ⑤ デソルベーション温度: 400 °C
- ⑥ コーン電圧: 表1のとおり
- ⑦ コリジョンエネルギー: 表1のとおり
- ⑧ モニターイオン: 表1のとおり

表1 各農薬のモニターイオン条件等

農薬名	プレカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	プロダクト イオン (定量用) ( <i>m/z</i> )	プロダクト イオン (確認用) ( <i>m/z</i> )	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (定量用) (eV)	コリジョン エネルギー (確認用) (eV)
クロピラリド	192	146	110	20	20	30
アミノピラリド	207	161	189	22	22	16
ピロラム	241	195	223	28	22	16

#### b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用混合標準液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの定量用イオン(*m/z*)及び確認用イオン(*m/z*)のクロマトグラムを記録し、それぞれのピーク面積を求める。
- 2) クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの定量用イオン(*m/z*)と確認用イオン(*m/z*)のピーク面積比又は高さ比を算出する。
- 3) 各検量線用混合標準液の各農薬濃度と定量用イオン(*m/z*)のピーク面積の検量線を作成する。

#### c) 試料の測定

- 1) 試料溶液を 5  $\mu$ L を **b) 2)～3)**と同様に操作する<sup>(8)</sup>。
- 2) 検量線から測定対象物質濃度を求め、分析試料中の測定対象物質濃度を算出する。

**注(8)** 標準液のピーク面積比又は高さ比に対して $\pm 30$  %程度の範囲内であることを確認する。なお、ピーク面積比又は高さ比は濃度によって異なることがある。

**備考7.** 牛糞堆肥(2種類)、牛糞含有汚泥発酵肥料(2種類)及び豚糞含有汚泥発酵肥料(1種類)を用いたクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの添加回収試験の結果は、1000  $\mu$ g/kg、400  $\mu$ g/kg 及び 40  $\mu$ g/kg の添加レベルで平均回収率が 78.1 %～90.0 %、81.0 %～117.6 %及び 71.2 %～101.3 %であった。

なお、この試験法のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの定量下限は各 10  $\mu$ g/kg 程度である。

#### 参考文献

- 1) 八木寿治, 関根優子, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC/MS/MS)によるたい肥及び汚泥肥料中のクロピラリド測定, 肥料研究報告, **3**, 51～59 (2010)

2) 顯谷久典, 八木寿治, 橋本良美, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド, アミノピラミド及びピクロラム測定, 肥料研究報告, 7, 1~9 (2014)

(5) **クロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート** 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法のフローシートを次に示す。

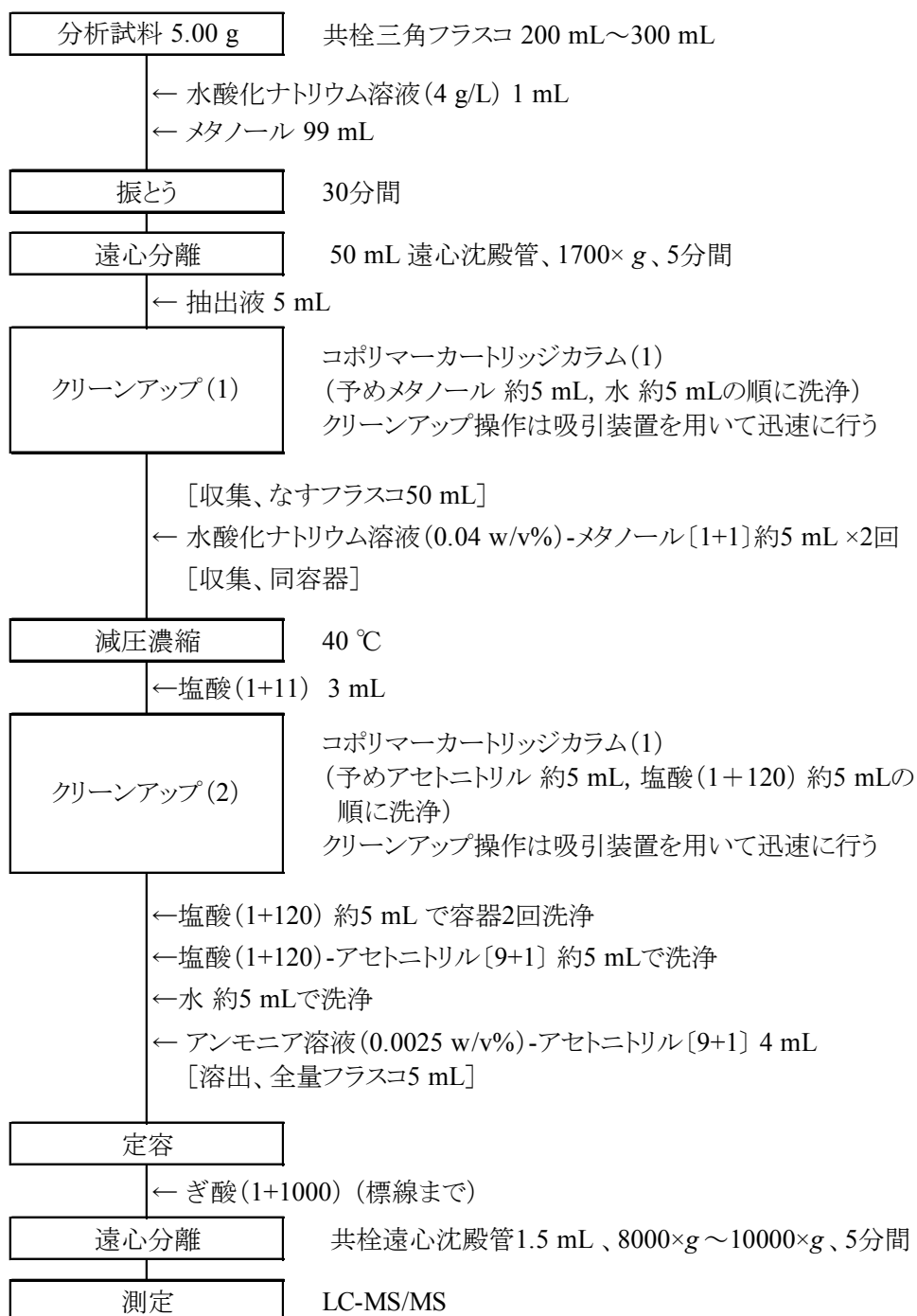
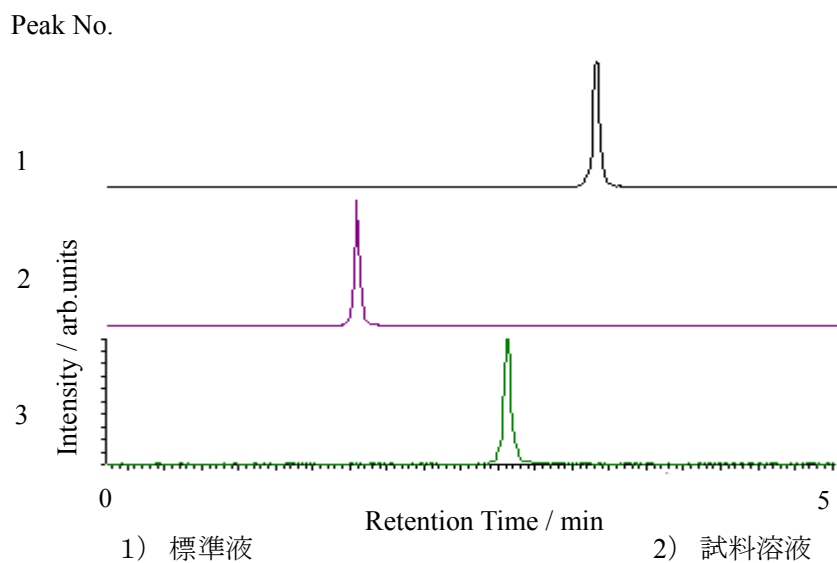


図2 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート

**参考** 検量線用混合標準液及び試料溶液(牛糞堆肥)の選択反応検出クロマトグラムを次に示す。



Peak No.1: ピクロラム  
 No.2: アミノピラリド  
 No.3: クロピラリド

参考図 各農薬の SRM クロマトグラム

混合標準液(各農薬として 200 pg 相当量)

LC-MS/MS の測定条件

カラム: ACQUITY UPLC HSS C18(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒径 1.8  $\mu$ m)

その他の条件は(4.4 a) LC-MS/MS の測定条件の例示のとおり

### 8.3 残留農薬多成分分析

#### 8.3.a 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法

(1) **分析対象化合物** アバメクチン: アバメクチン B1a、イベルメクチン: 22, 23-ジヒドロアベルメクチン B1a(別名イベルメクチン B1a)、エプリノメクチン: エプリノメクチン B1a、ロテノン: ロテノン、ピペロニルブトキシド: ピペロニルブトキシド、ピレトリン: ピレトリン I 及びピレトリン II

#### (2) 概要

液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料に適用する。

肥料中の各農薬をアセトニトリル及び水にて溶解・抽出し、二種類のクリーンアップカートリッジを用いて精製後、高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いて測定し、分析試料中の分析対象化合物を求める。なお、この試験法の性能は**備考 3**に示す。

(3) **試薬等** 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **アセトニトリル**: JIS K 8039 に規定する残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- d) **メタノール**: HPLC の溶離液に使用するメタノールは LC-MS 用又は同等の品質の試薬。
- e) **酢酸エチル**: JIS K 8361 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- f) **トルエン**: JIS K 8680 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- g) **ギ酸アンモニウム**: 特級(純度 95 % (質量分率) 以上) 又は同等の品質の試薬。
- h) **ギ酸アンモニウム溶液 (0.1 mol/L)**<sup>(1)</sup>: ギ酸アンモニウム 6.306 g を水 1000 mL に加える。
- i) **ギ酸アンモニウム溶液 (0.1 mmol/L)**<sup>(1)</sup>: ギ酸アンモニウム溶液 (0.1 mol/L) 1 mL を水 1000 mL に加える。
- j) **ギ酸**: JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- k) **ギ酸溶液 (0.1 v/v%)**<sup>(1)</sup>: ギ酸 1 mL を水 1000 mL に加える。
- l) **ギ酸アセトニトリル溶液 (0.1 v/v%)**<sup>(1)</sup>: ギ酸 1 mL をアセトニトリル 1000 mL に加える。
- m) **各農薬標準液 (0.1 mg/mL)**<sup>(1)</sup>: アバメクチン[C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>]<sup>(2)</sup>、イベルメクチン[C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>O<sub>14</sub>]<sup>(2)</sup>、エプリノメクチン[C<sub>50</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>14</sub>]<sup>(2)</sup>、ロテノン[C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>]<sup>(2)</sup>、ピペロニルブトキシド[C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>]<sup>(2)</sup> 及びピレトリン I :C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> 及びピレトリン II :C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>]<sup>(2)</sup> 約 0.01 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のメタノールで溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える(ただし、ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 0.1 mg/mL を含有する。)
- n) **混合標準液 (10 µg/mL)**: 各農薬標準液 10 mL を全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線までメタノールを加える。
- o) **混合標準液 (1000 ng/mL)**: 混合標準液 (10 µg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線までメタノールを加える。
- p) **検量線用混合標準液 (50 ng/mL~500 ng/mL)**: 使用時に混合標準液 (1000 ng/mL) の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- q) **検量線用混合標準液 (5 ng/mL~50 ng/mL)**: 使用時に混合標準液 (100 ng/mL) の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 標準試薬が市販されている。

備考 1. 各農薬の標準試薬は和光純薬工業、関東化学及び林純薬工業等より販売されている。

(4) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)**: JIS K 0136 に規定する LC-MS/MS で次の要件を満たすもの。

1) **高速液体クロマトグラフ**:

① カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。

② カラム: 内径 2 mm~3 mm, 長さ 50 mm~150 mm, 粒径 1.6 μm~3.0 μm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。質量分析計仕様のもの<sup>(3)</sup>。

2) **質量分析計**:

① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

② イオン検出方式: 選択反応検出法

b) **超音波発生器**: 超音波洗浄器を用いることができる。

c) **濃縮器**: 40 °C まで調節できるエバポレーター

d) **多孔性けいそう土カートリッジカラム**: 多孔性けいそう土を充てんしたもの(保持容量 5 mL)<sup>(4)</sup>

e) **グラファイトカーボン-NH<sub>2</sub> 積層カートリッジカラム**: グラファイトカーボン 500 mg 及びアミノプロピルシリル化シリカゲル 500 mg を注射筒 6 mL に積層したもの<sup>(5)</sup>

注(3) ACQUITY UPLC HSS C18 等の名称で市販されている。

(4) Chem Elut (5 mL)等の名称で市販されている。

(5) Envi-carb/LC-NH<sub>2</sub> (500 mg/500 mg, 6 mL)等の名称で市販されている。

(5) **試験操作**

(5.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料 5.00 mL<sup>(6)</sup>を、全量フラスコ 10 mL に入れる。

b) アセトニトリル 3 mL を同全量フラスコに加え、標線まで水を加えてよく振り混ぜる。

c) 超音波発生器を用いて 5 分間超音波処理をし<sup>(7)</sup>、抽出液とする。

注(6) 試料の比重を量り測定終了後、分析試料中の対象物質濃度を算出する。

(7) 超音波処理の結果、溶液の体積が膨張することがあるので注意する。膨張の際にはしばらく常温にて放置するとよい。

備考 2. 比重(密度)の測定は全量フラスコ 10 mL を電子天秤に乗せ、ゼロ合わせを行い、分析試料 5.00 mL を当該フラスコに入れ、秤量値を読み取り算出することができる。

(5.2) **クリーンアップ(1)** クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

a) 抽出液 5 mL を、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、約 5 分間保持させる。

- b) なすフラスコ 100 mL を同カートリッジカラムの下に置き、酢酸エチル約 5 mL を 4 回、順次同カートリッジカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで溶出させる<sup>(8)</sup>。
- c) 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し<sup>(9)</sup>、アセトニトリル-トルエン(3+1) 2 mL を加えて残留物を溶かす。

**注(8)** 試験導入前には溶出確認をすること。

(9) 乾固させすぎると農薬が揮散する恐れがある。

**(5.3) クリーンアップ(2)** クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

- a) グラファイトカーボン-NH<sub>2</sub> 積層カートリッジカラムを予めアセトニトリル-トルエン(3+1)約 10 mL で洗浄する。
- b) なすフラスコ 100 mL を同カートリッジカラムの下に置き、(5.2) c) の溶解液を同カートリッジカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- c) 容器をアセトニトリル-トルエン(3+1)約 5 mL で 5 回洗浄し、洗液を順次同カートリッジに加え流出させる。
- d) 流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し<sup>(10)</sup>、メタノール 5 mL<sup>(11)</sup>を加えて残留物を溶かす。溶解液の一定量を正確にとり、メタノールで正確に 5 倍に希釈し、当該溶液を試料溶液とする。

**注(10)** 乾固させすぎると農薬が揮散する恐れがある。

(11) 試料溶液中の各農薬濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、試料溶液の一定量をメタノールで希釈する。

**(5.4) 測定** 測定は、JIS K 0136 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ質量分析計の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件** 高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

**1) 高速液体クロマトグラフ:**

- ① カラム: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 2 mm~3 mm, 長さ 50 mm~150 mm, 粒径 1.6 μm~3.0 μm)
- ② 流量: 0.2 mL/min~0.5 mL/min
- ③ 溶離液: A: ぎ酸アンモニウム溶液(0.1 mmol/L) - ぎ酸溶液(0.1 v/v%) [1+1]  
B: ぎ酸アセトニトリル溶液(0.1 v/v%)
- ④ グラジエント: 0 min (50 %B) → 15 min (95 %B) → 20 min (98%B) → 30 min (50 %B)
- ⑤ カラム恒温槽: 40 °C
- ⑥ 注入量: 5 μL

**2) 質量分析計:**

- ① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法
- ② モード: ポジティブ
- ③ キャピラリー電圧: 3.0 kV
- ④ イオン源温度: 120 °C



- ⑤ デソルベーション温度: 400 °C
- ⑥ コーン電圧: 表1 のとおり
- ⑦ コリジョンエネルギー: 表1 のとおり
- ⑧ モニターイオン: 表1 のとおり

表1 各農薬のモニターイオン条件等

農薬名	プレカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	プロダクト イオン (定量用) ( <i>m/z</i> )	プロダクト イオン (確認用) ( <i>m/z</i> )	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
アバメクチンB1a	891	305	567	20	25
イベルメクチンB1a	893	307	551	25	25
エブリノメクチンB1a	915	186	298	20	20
ロテノン	395	213	192	35	25
ピペロニルブトキシド	356	177	147	20	15
ピレトリン I	329	161	133	20	10
ピレトリン II	373	161	133	20	10

#### b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用混合標準液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、測定対象物質の定量用イオン (*m/z*) 及び確認用イオン (*m/z*) のクロマトグラムを記録する。
- 2) 測定対象物質の定量用イオン (*m/z*) と確認用イオン (*m/z*) のピーク面積比又は高さ比を算出する。
- 3) 各検量線用混合標準液の測定対象物質濃度と定量用イオン (*m/z*) のピーク面積又は高さの検量線を作成する。検量線の作成は、試料の測定時に行う。

#### c) 試料の測定

- 1) 試料溶液を 5 μL を **b) 2) ~ 3)** と同様に操作する<sup>(12)</sup>。
- 2) ピーク面積又は高さから検量線より測定対象物質量を求め、分析試料中の測定対象物質を算出する。

**注(12)** 標準液のピーク面積比又は高さ比に対して ±30 % 程度の範囲内であることを確認する。なお、ピーク面積比又は高さ比は濃度によって異なることがある。

#### (5.5) 計算

次の式によって分析試料中の各農薬濃度を算出する。

$$\text{分析試料中の各農薬濃度 } (\mu\text{g/kg}) = (A \times B \times 10) / C$$

A: 検量線から求めた最終試料溶液中の各測定対象物質濃度 (ng/mL)

B: 検量線上限を超えたために最終試料溶液をさらに希釈した場合の希釈倍率

C: 分析試料における比重(密度) (g/mL)

**備考 3.** 液状の家庭園芸用複合肥料(3種類)、液状複合肥料(2種類)の回収試験の結果は、4000 µg/kg 及び 400 µg/kg(ただし、ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 4000 µg/kg 及び 400 µg/kg)の添加レベルで平均回収率が 77.0%~104.5%及び 85.6%~107.9%であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 2 に示す。

なお、この試験法の各農薬の定量下限は 10 µg/kg 程度である。

表2 残留農薬多成分分析試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

農薬名	試料名	試験 室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> (µg/kg)	添加量 (µg/kg)	回収率 (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>3)</sup> (%)	RSD <sub>R</sub> <sup>4)</sup> (%)
アバメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8	286.8	333.3	86.1	13.3	14.4
	家庭園芸用複合肥料2	8	358.9	416.7	86.1	13.4	14.8
	家庭園芸用複合肥料3	8	425.8	500.0	85.2	8.6	11.6
	液状複合肥料1	8	288.6	333.3	86.6	7.1	8.5
	液状複合肥料2	8	405.5	500.0	81.1	7.1	7.2
イベルメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8	298.9	333.3	89.7	14.9	15.0
	家庭園芸用複合肥料2	8	382.5	416.7	91.8	14.1	19.3
	家庭園芸用複合肥料3	8	431.1	500.0	86.2	9.8	10.9
	液状複合肥料1	8	298.8	333.3	89.6	10.1	12.8
	液状複合肥料2	8	405.2	500.0	81.0	3.8	5.8
エプリノメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8	293.5	333.3	88.1	7.0	10.4
	家庭園芸用複合肥料2	8	361.9	416.7	86.9	9.2	14.3
	家庭園芸用複合肥料3	8	425.3	500.0	85.1	7.0	10.0
	液状複合肥料1	8	277.3	333.3	83.2	9.0	12.0
	液状複合肥料2	8	398.2	500.0	79.6	7.5	11.6
ロテノン	家庭園芸用複合肥料1	8	276.8	333.3	83.1	5.7	7.8
	家庭園芸用複合肥料2	8	353.5	416.7	84.8	9.8	12.5
	家庭園芸用複合肥料3	8	426.6	500.0	85.3	6.6	8.5
	液状複合肥料1	8	263.5	333.3	79.1	11.0	12.3
	液状複合肥料2	8	385.2	500.0	77.0	5.7	12.1
ピペロニル プトキシド	家庭園芸用複合肥料肥料1	8	318.2	333.3	95.5	8.1	13.2
	家庭園芸用複合肥料肥料2	8	395.6	416.7	94.9	8.4	13.6
	家庭園芸用複合肥料肥料3	8	450.3	500.0	90.1	4.6	9.3
	液状複合肥料1	8	299.7	333.3	89.9	7.4	11.0
	液状複合肥料2	8	435.8	500.0	87.2	5.8	7.4

- 1) 解析に用いた試験室数
- 2) 総平均値( $n$ =試験室数×繰返し数(2))
- 3) 併行精度(相対標準偏差)
- 4) 室間再現精度(相対標準偏差)

表2 (続き)

農薬名	試料名	試験 室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	添加量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 (%)	$RSD_r$ <sup>3)</sup> (%)	$RSD_R$ <sup>4)</sup> (%)
ピレトリン I	家庭園芸用複合肥料1	8	160.7	186.0	86.4	9.3	11.9
	家庭園芸用複合肥料2	8	202.2	232.5	87.0	12.6	12.8
	家庭園芸用複合肥料3	8	228.6	279.0	81.9	5.4	8.8
	液状複合肥料1	8	158.2	186.0	85.1	6.8	10.4
	液状複合肥料2	8	223.1	279.0	80.0	8.5	9.1
ピレトリン II	家庭園芸用複合肥料肥料1	8	131.1	147.3	89.0	6.5	9.7
	家庭園芸用複合肥料肥料2	8	163.2	184.2	88.6	10.8	13.6
	家庭園芸用複合肥料肥料3	8	182.0	221.0	82.4	5.4	8.9
	液状複合肥料1	8	126.2	147.3	85.7	7.8	11.4
	液状複合肥料2	8	180.2	221.0	81.5	6.3	8.3

### 参考文献

- 1) 八木寿治, 山西正将, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC/MS/MS)による液状肥料中の農薬の同時測定, 肥料研究報告, **4**, 36~48 (2011)
- 2) 八木寿治, 山西正将, 白井裕治, 柴田政人: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による液状肥料中の6種農薬の同時測定 —共同試験成績—, 肥料研究報告, **5**, 48~59 (2012)

(6) 6種農薬一斉試験法フローシート 肥料中の6種農薬の一斉試験法のフローシートを次に示す。

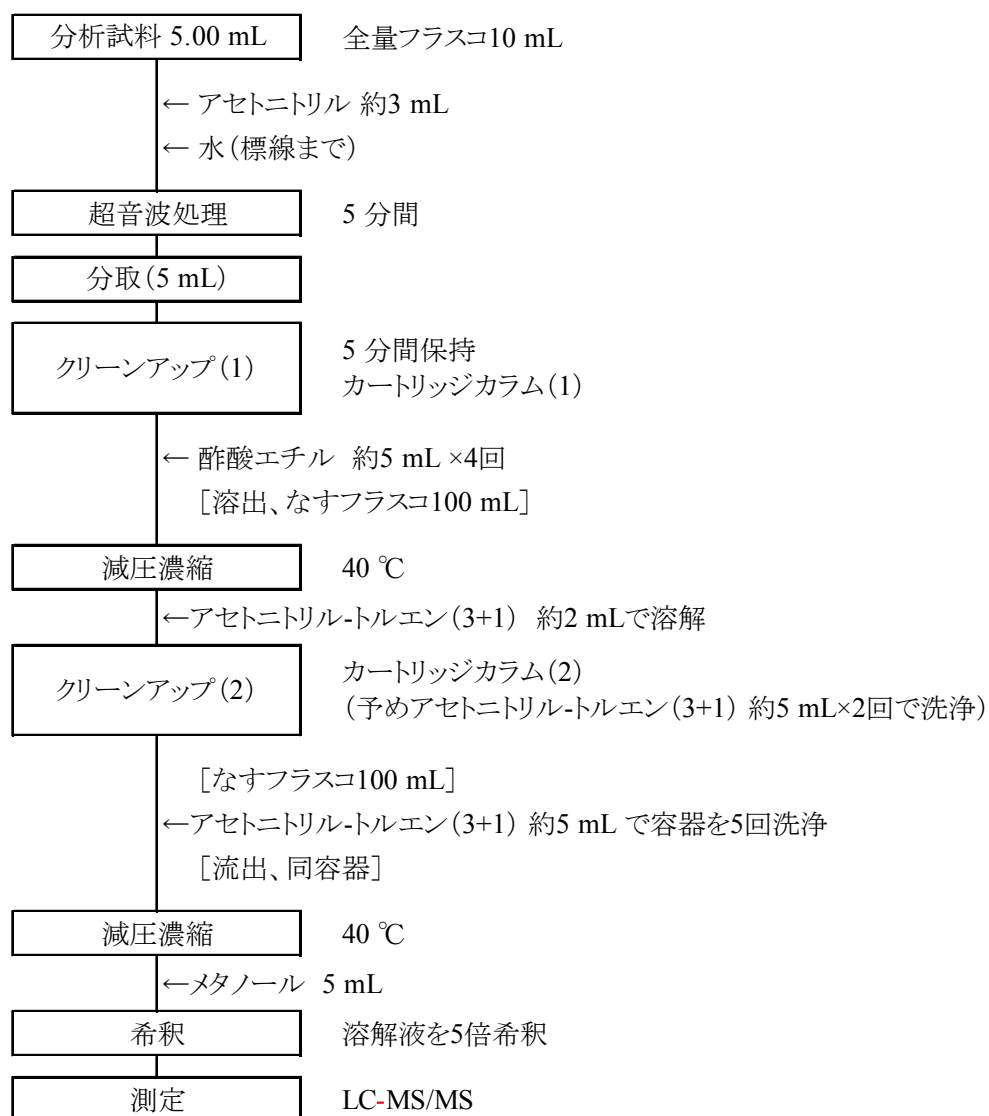
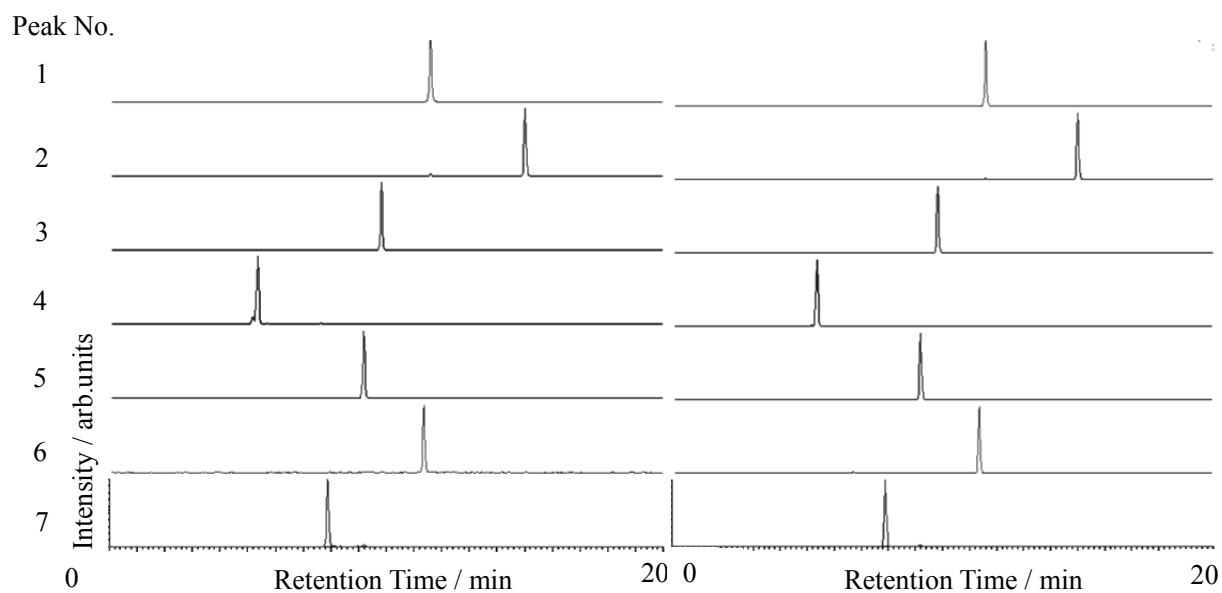


図 肥料中の6種農薬の一斉分析法フローシート

**参考** 検量線用混合標準液及び試料溶液(液状の家庭園芸用複合肥料)の選択反応検出クロマトグラムを次に示す。



Peak No.1: アバメクチン B1a  
 No.2: イベルメクチン B1a  
 No.3: エプリノメクチン B1a  
 No.4: ロテノン  
 No.5: ピペロニルブトキシド  
 No.6: ピレトリン I  
 No.7: ピレトリン II

1) 混合標準液

2) 試料溶液

参考図 各農薬の選択反応検出クロマトグラム

- 1) 混合標準液(各農薬として 2,500 pg 相当量)  
 (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の合量として 2,500 pg 相当量)
- 2) 試料溶液(液状の家庭園芸用複合肥料, 試料中 400 µg/kg 相当量添加)  
 (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の合量として 400 µg/kg 相当量)

LC-MS/MS の測定条件

カラム: ACQUITY UPLC HSS C18(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒径 1.8 µm)

流量: 0.2 mL/min

その他の条件は(5.4 a) LC-MS/MS の測定条件の例示のとおり

## 8.4 ナトリウム

### 8.4.a フレーム原子吸光法

#### (1) 概要

この試験法は有機物を含む肥料に適用する。

分析試料を灰化及び塩酸で前処理した後、アセチレン-空気フレーム中に噴霧し、ナトリウムによる原子吸光を波長 589.0 nm で測定し、分析試料中のナトリウム(Na)を求める。なお、この試験法の性能は**備考 3**に示す。

#### (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **塩酸**: JIS 8180 に規定する特級試薬又は同等の品質の試薬。
- b) **ナトリウム標準液(Na 1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: JIS K 8150 に規定する塩化ナトリウムを 600 °C±10 °Cで約1時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、2.542 g をひょう量皿にはかりとる。少量の水で溶かし、全量フラスコ 1000 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- c) **ナトリウム標準液(Na 0.1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: ナトリウム標準液(Na 1 mg/mL)の 20 mL を全量フラスコ 200 mL にとり、標線まで塩酸(1+23)を加える。
- d) **検量線用ナトリウム標準液(Na 1 µg/mL～10 µg/mL)<sup>(2)</sup>**: ナトリウム標準液(Na 0.1 mg/mL)の 2.5 mL～25 mL を全量フラスコ 250 mL に段階的にとり、標線まで塩酸(1+23)を加える<sup>(2)</sup>。
- e) **検量線用空試験液**: d)の操作で使用した塩酸(1+23)<sup>(3)</sup>。

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

- (2) バーナーヘッドを傾け感度を落とす操作ができない機種にあっては、その機種にあった希釈を行う。  
(例として 0.1～4 µg/mL)
- (3) 保存する場合は、ナトリウムが溶出しにくいポリプロピレン、PTFE 等の材質で密閉できる容器を用いる。

**備考 1.** (2)b)のナトリウム標準液に換えて、国家計量標準にトレーサブルな原子吸光用のナトリウム標準液(Na 0.1 mg/mL、1 mg/mL 又は 10 mg/mL)を用いることもできる。

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **フレーム原子吸光分析装置**: JIS K 0121 に規定する原子吸光分析装置。
  - 1) **光源部**: ナトリウム中空陰極ランプ
  - 2) **ガス**: フレーム加熱用ガス
    - ① 燃料ガス: アセチレン
    - ② 助燃ガス: 粉じん及び水分を十分に除去した空気
- b) **電気炉**: 550 °C±5 °Cに調節できるもの。
- c) **ホットプレート又は砂浴**: ホットプレートは表面温度 250 °Cまで調節できるもの。砂浴は、ガス量及びけい砂の量を調整し、砂浴温度を 250 °Cにできるようにしたもの。

#### (4) 試験操作

##### (4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 5.00 g をはかりとり、トールビーカー 200 mL～300 mL に入れる。
- b) トールビーカーを電気炉に入れ、穏やかに加熱して炭化させる<sup>(4)</sup>。
- c) 550 °C±5 °C で 4 時間以上強熱して灰化させる。
- d) 放冷後、少量の水で残留物を潤し、塩酸約 10 mL を徐々に加え、更に水を加えて約 20 mL とする。
- e) トールビーカーを時計皿で覆い、ホットプレート又は砂浴上で加熱し、約 5 分間煮沸する。
- f) 放冷後、水で全量フラスコ 250 mL～500 mL に移す。
- g) 標線まで水を加える。
- h) ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とする。

**注(4)** 炭化操作例：煙が出なくなるまで約 250 °C で加熱する。

**備考 2.** (4.1) の操作は、4.2.1.a の(4.1.2)と同様の操作である。

**(4.2) 測定** 測定は、JIS K 0121 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する原子吸光分析装置の操作方法による。

a) **原子吸光分析装置の測定条件** 原子吸光分析装置の測定条件は、以下を参考にして設定する。  
分析線波長：589.0 nm 又は 589.6 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 検量線用ナトリウム標準液及び検量線用空試験液をフレーム中に噴霧し、波長 589.0 nm 又 589.6 nm の指示値を読み取る。
- 2) 検量線用ナトリウム標準液及び検量線用空試験液のナトリウム濃度と指示値との検量線を作成する。

c) **試料の測定**

- 1) 試料溶液の一定量(Naとして 0.1 mg～1 mg 相当量)<sup>(5)</sup>を全量フラスコ 100 mL にとる。
- 2) 標線まで塩酸(1+23)を加える。
- 3) b)1)と同様に操作して指示値を読み取る。
- 4) 検量線からナトリウム量を求め、分析試料中のナトリウム(Na)を算出する。

**注(5)** 注(2)の機種については、その機種に応じた一定量を採取する。

**備考 3.** 魚かす粉末、魚廃物加工肥料、なたね油かす及びその粉末、汚泥発酵肥料及び堆肥を用いて 3 点併行で添加回収試験を実施した結果、ナトリウムの添加濃度が 1 % (質量分率)～10 % (質量分率)の範囲で平均回収率は 97 %～103 %であった。

精度の評価のため、魚かす粉末(塩化ナトリウム添加した試料)及び堆肥を用いて日を変えての反復試験の試験成績を一元配置分散分析により解析し、得られた中間精度及び併行精度を表 1 に示す。

なお、この試験法の定量下限は 0.02 % (質量分率)程度である。

表1 日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験		併行精度		中間精度	
	日数	平均値 <sup>2)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup>	$s_{I(T)}$ <sup>6)</sup>	$RSD_{I(T)}$ <sup>7)</sup>
	$T$ <sup>1)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%)	(%) <sup>3)</sup>	(%)
魚かす粉末	5	9.08	0.06	0.6	0.09	1.0
堆肥	5	0.0973	0.0019	2.0	0.0037	3.8

1) 2点併行試験を実施した試験日数

4) 併行標準偏差

2) 平均値(試験日数( $T$ )×併行試験数(2))

5) 併行相対標準偏差

3) 質量分率

6) 中間標準偏差

7) 中間相対標準偏差

### 参考文献

- 1) 加藤公栄, 千田正樹, 藤田敏文: 原子吸光分析法による肥料中のナトリウムの測定, 肥料研究報告, **8**, 61~69 (2015)

- (5) **ナトリウム試験法フローシート** 肥料中のナトリウム全量試験法のフローシートを次に示す。

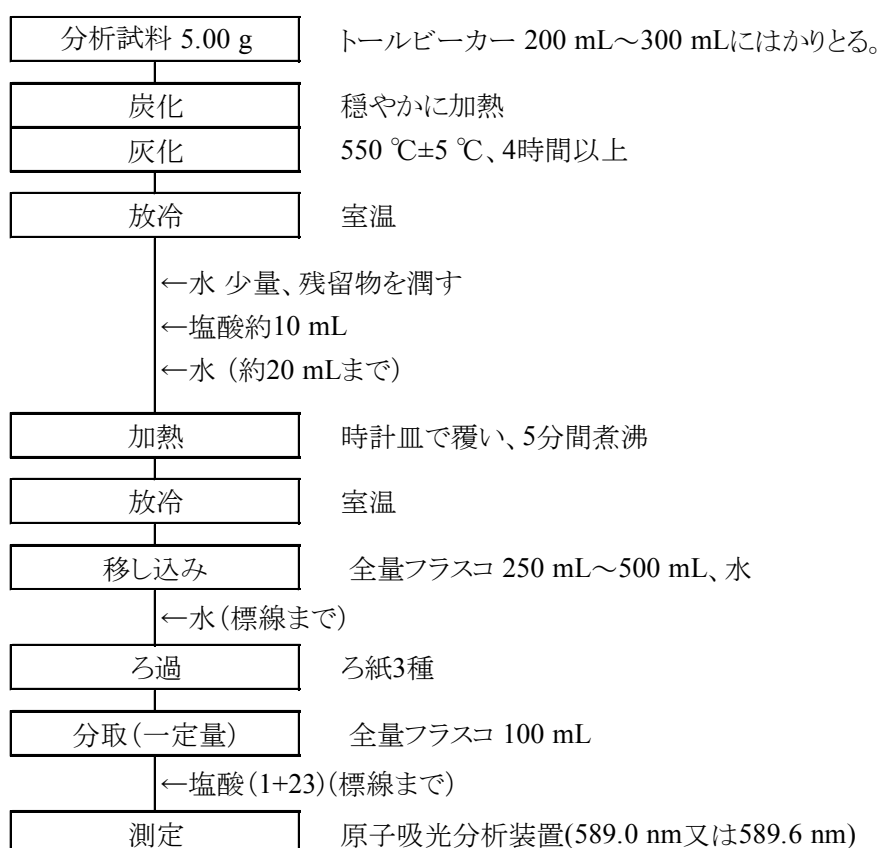


図 肥料中のナトリウム試験法フローシート



## 8.5 グアニル尿素性窒素

### 8.5.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法は肥料に適用する。

分析試料に水を加えてグアニル尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、弱酸性イオン交換カラムで分離し、波長 190 nm で測定し、分析試料中のグアニル尿素性窒素(Gy-N)を求める。

この方法によって、ピウレット性窒素(B-N)、ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、尿素性窒素(U-N)及びグアニジン性窒素(Gu-N)が同時に測定できる(備考5参照)。

#### (2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) リン酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- c) リン酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- d) グアニル尿素性窒素標準液(Gy-N 2 mg/mL)<sup>(1)</sup>: グアニル尿素硫酸塩[C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup> 0.540 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- e) グアニル尿素性窒素標準液(Gy-N 200 µg/mL): グアニル尿素性窒素標準液(Gy-N 2 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- f) 検量線用グアニル尿素性窒素標準液(Gy-N 50 µg/mL~100 µg/mL): グアニル尿素性窒素標準液(Gy-N 200 µg/mL) 25 mL~50 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用グアニル尿素性窒素標準液(Gy-N 1 µg/mL~50 µg/mL): 使用時にグアニル尿素性窒素標準液(Gy-N 100 µg/mL)を 1 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) グアニル尿素硫酸塩として 98%(質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. グアニル尿素硫酸塩は関東化学及び東京化成工業より市販されている。

#### (3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 7.5 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm~10 µm の弱酸性イオン交換樹脂を充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出器: 吸光光度検出器で波長 190 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Asahipak ES-502C 7C の名称で市販されている。

**(4) 試験操作**

**(4.1) 抽出** 抽出は、次のとおり行う。

**(4.1.1) 粉状分析用試料**

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(3)</sup>を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (3)** 試料溶液中のグアニル尿素性窒素(Gy-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力  $8100 \times g \sim 10000 \times g$  程度となる。

**(4.1.2) 液状分析用試料**

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れる。
- b) 水約 50 mL を加えて、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え<sup>(6)</sup>、共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**備考 3.** (4.1.1)c)～d) 又は(4.1.2)c)～d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**(4.2) 測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

**a) 高速液体クロマトグラフの測定条件:** 測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** 弱酸性イオン交換樹脂カラム(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ ～10  $\mu\text{m}$ )
- 2) **カラム槽温度:** 40  $^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液<sup>(1)</sup>:** りん酸二水素カリウム 3.92 g 及びりん酸 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とする。親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過する。
- 4) **流量:** 0.6 mL/min
- 5) **注入量:** 10  $\mu\text{L}$
- 6) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

**備考 4.** 溶離液は、りん酸二水素カリウム 19.6 g 及びりん酸 0.584 g を水に溶かして 500 mL とし、冷蔵保存し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過して調製してもよい。

**b) 検量線の作成**

- 1) 各検量線用標準液 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。

- 2) 各検量線用標準液のグアニル尿素性窒素(Gy-N)濃度と波長 190 nm のピーク面積の検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μL を b) 1) と同様に操作する。  
 2) ピーク面積から検量線よりグアニル尿素性窒素(Gy-N)量を求め、分析試料中のグアニル尿素性窒素(Gy-N)を算出する。

**備考 5.** この試験法ではビウレット性窒素(B-N)、尿素性窒素(U-N)、ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、グアニジン性窒素(Gu-N)及びグアニル尿素性窒素標準液(Gy-N)の同時測定が可能である。その場合は、5.10.a 備考 5 を参照のこと。

- (5) 試験法フローシート 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシートを次に示す。

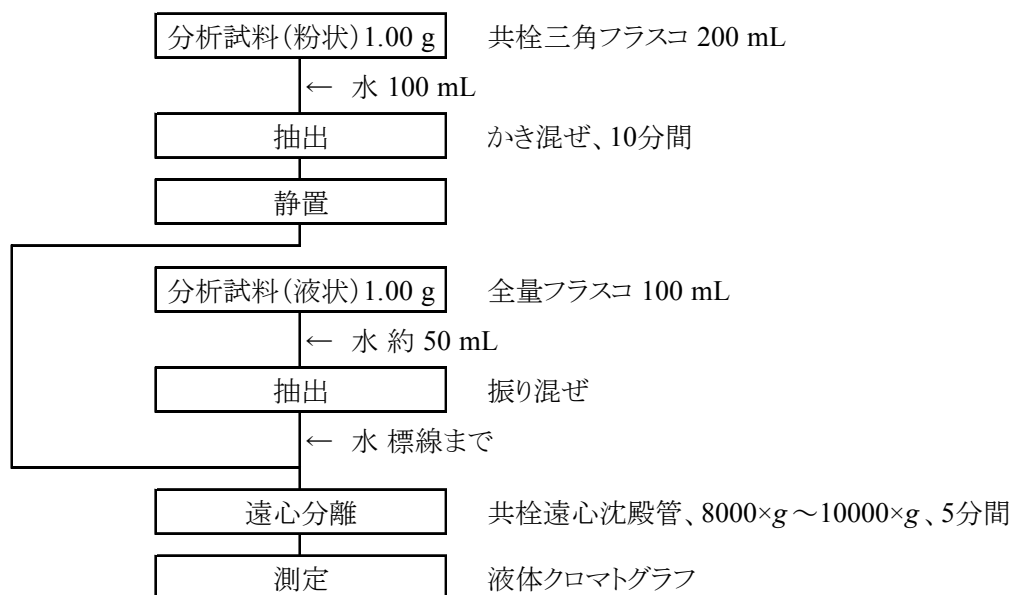


図 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシート

## 別添 試験法の妥当性確認の手順

### (1) 趣旨

本項は、肥料等試験法に収載しようとする試験法の妥当性を確認するための手順を示すものである。なお、肥料等試験法以外の方法によって試験を実施しようとする各試験機関がその試験法の妥当性を評価するための手順も本項に規定する方法に準じる。

なお、この項目は化学的試験法を対象とする。ただし、粉末試料中及び固形肥料中の有効態(可溶性、く溶性及び水溶性)の成分の抽出方法は、本項を適用しないものとする。

**備考 1.** 有効態(可溶性、く溶性及び水溶性)の成分は農林水産省告示において規定されている。また、抽出温度等の抽出条件を変更することにより測定値に影響することがある。よって、粉末肥料及び固形肥料においての有効態の成分の抽出方法の変更は当面実施せず、測定方法(抽出液の精製等も含む)の変更に限定して本項を適用するものとする。

### (2) 用語の定義

本項目において、用語の定義は次のとおりとする。

- a) **選択性** 試料中に存在すると考えられる物質の存在下で、分析対象成分を正確に測定する能力。
- b) **真度** 複数の測定結果から得られた平均値と、真の値<sup>(1)</sup>との一致の程度。
- c) **精度** 定められた条件の下で繰返された独立な測定結果の間の一致の程度。
- d) **併行精度** 同一と見なされる分析試料の測定において、同じ方法を用い、同じ試験室で、同じオペレータが、同じ装置を用いて、短時間のうちに独立な測定結果を得る条件(併行条件)による測定結果の精度。
- e) **中間精度** 同一と見なされる分析試料の測定において、同じ方法を用い、同じ試験室で、異なる要因(異なる時間、異なるオペレータ等)において独立した試験結果を得る条件(中間条件)による測定結果の精度。
- f) **室間再現精度** 同一と見なされる分析試料の測定において、同じ方法を用い、異なる試験室で、異なるオペレータが、異なる装置を用いて独立した測定結果を得る測定条件(室間再現条件)による測定結果の精度。
- g) **定量下限(LOQ)** 試料に含まれる分析対象成分の定量可能な最低量又は最小濃度。
- h) **検出下限(LOD)** 試料に含まれる分析対象成分の検出可能な最低量又は最小濃度。
- i) **標準物質** 一つ以上の規定特性について、十分均質、かつ、安定であり、測定プロセスでの使用目的に適するように作成された物質。
- j) **認証標準物質** 一つ以上の規定特性について、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、規定特性の値及びその不確かさ、並びに計量学的トレーサビリティを記載した認証書がついている標準物質。
- k) **ブランク試料** 分析対象成分を含まない分析用試料<sup>(2)</sup>。
- l) **添加試料** 分析対象成分含有量既知の分析用試料又は標準物質を添加<sup>(3)</sup><sup>(4)</sup>若しくは調合<sup>(3)</sup>した分析用試料。
- m) **自然汚染試料** 有害成分等の分析対象成分を自然に含有している肥料から調製した分析用試料。
- n) **流通試料** 肥料生産工場等で製造された肥料<sup>(5)</sup>から調製した分析用試料。
- o) **サロゲート** 試料の前処理操作、分析操作の各段階における収率の補正、回収率の確認などのために添加される、目的成分と化学構造が同じ、又は類似した物質。

p) **SN比** 分析目的に由来する信号(応答値)Sと、それ以外の要因に基づく信号(通常はノイズ)Nとの強度比。

**注(1)** 現実には認証標準物質の認証値、化合物の化学的組成、標準物質等の添加量等。

(2) 回収試験、定量下限の確認等のためのブランク試料に用いる流通肥料がない場合は、目的とするマトリックスを含有している試薬等を用いてもよい。

(3) 乳鉢等で混合し、分析対象成分を十分に均質にする。

(4) 標準液を添加した場合は、1夜放置する等の措置を実施して溶媒を十分に揮散させる。

(5) 化学的又は物理的(造粒工程等)工程により、生成又は形態が変化した分析対象成分を含む肥料など。

### 参考文献

- 1) JIS K 0211:分析化学用語(基礎部門) (2013)
- 2) JIS K 0214:分析化学用語(クロマトグラフィー部門) (2013)
- 3) JIS Q 0035:標準物質—認証のための一般的及び統計的な原則 (2008)
- 4) JIS Z 8101-2:統計—用語と記号—第2部:統計的品質管理用語 (1999)
- 5) JIS Z 8402-1:測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度)—第1部:一般的な原理及び定義(1999)
- 6) ALINORM 09/32/23 Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Report of the Thirtieth Session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Codex Alimentarius Commission Thirty-second Session (2009)
- 7) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)

### (3) 妥当性確認の方法

(3.1)～(3.8)の必要な項目を計画的に試験し、得られた結果から試験の性能パラメータを推定する。

推定した性能パラメータの値が、それぞれの目標値(性能規準)に適合しているかを確認して、適合している場合は妥当性確認された試験法として評価する。

#### (3.1) 適用範囲

単一試験室の妥当性確認試験及び共同試験を実施し、室間再現精度まで適合した試験法は、試験に用いた肥料の種類及び濃度範囲において妥当性確認された試験法とする。よって、当該試験を実施する試験室は、内部品質管理等を実施することにより妥当性確認された方法としてその性能(再現精度等)を用いることができる。

単一試験室の妥当性確認試験を実施し、真度、併行精度、中間精度等が適合した試験法は、その試験を実施した試験室及び試験に用いた肥料の種類、濃度範囲に限定し、妥当性確認された試験法とする。よって、この試験法を導入したい他の試験室は、試験法の単一試験室の妥当性確認を新たに実施する必要がある。

#### (3.2) 選択性

**(3.2.1) クロマトグラフ法の場合**

ブランク試料について操作を行い、分析対象成分の定量に影響するピーク(妨害ピーク)がないこと<sup>(6)</sup>を確認する。また、多成分同時測定の場合は隣接するピークが十分に分離すること<sup>(6)</sup>を確認する。

**注(6)** 分離度( $R$ )は、1.5以上が望ましいが、最低1.0以上であること。

**備考 2.** ピークの分離指標として分離度( $R$ )が用いられる。分離度( $R$ )1.5以上であれば、近接する二つのピークは十分に分離しており、ピーク高さ及びピーク面積いずれを用いても定量に影響しない。分離度( $R$ )1.0以上であれば、近接する二つのピークはいくらか重なりはあるものの、ピーク高さを用いる方法で定量する場合問題とならない。

分離度( $R$ )は、ピーク幅を用いて、(1a)式によって求められる。なお、ピークが正規分布であれば、ピーク半値幅を用いて、(1b)式によって求められる。クロマトグラフのデータ処理装置では、分離度( $R$ )に(1b)式が用いられている場合が多い。

$$\text{分離度}(R) = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2} \times (W_1 + W_2)} \quad \dots (1a)$$

$$\text{分離度}(R) = \frac{1.18 \times (t_2 - t_1)}{\left(W_{\frac{1}{2},1} + W_{\frac{1}{2},2}\right)} \quad \dots (1b)$$

$t_1$ : ピーク1のリテンションタイム

$t_2$ : ピーク2のリテンションタイム

$W_1$ : ピーク1のピーク幅

$W_2$ : ピーク2のピーク幅

$W_{\frac{1}{2},1}$ : ピーク1の半値幅

$W_{\frac{1}{2},2}$ : ピーク2の半値幅

**(3.2.2) クロマトグラフ法以外<sup>(7)</sup>の場合**

ブランク試料について操作を行い、分析対象成分以外に由来した応答で、かつ定量値の正の誤差要因になり得る応答<sup>(8)</sup>がないことを確認する。

**注(7)** 吸光光度法、原子吸光法、滴定法等で測定機器において分離を行わない方法。

**(8)** 吸光度、滴定値等をいう。

**参考文献**

- 1) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 2) JIS K 0114:ガスクロマトグラフィー通則 (2012)
- 3) JIS K 0124:高速液体クロマトグラフィー通則 (2011)
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知:「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について、平成25年7月11日、薬食審査発0711第1号 (2013)

**(3.3) 検量線**

6~8 水準の濃度又は含量<sup>(9)</sup>の各検量線用標準液を 2~3 回測定<sup>(10)</sup>し、得られたシグナル<sup>(11)</sup>を分析対象成分の濃度又は含量の関数としてプロットした図を用いて視覚的に直線性を評価する。

直線関係が認められる場合には、最小二乗法による回帰式の計算などの統計学的手法を用いて、検量線の傾き( $b$ )、切片( $a$ )及びその信頼区間及び決定係数( $r^2$ )を算出する。更に各水準における残差<sup>(12)</sup>をプロットする。

**注(9)** 検量線用空試験溶液を含めてもよい。

**(10)** 感度の変化等による非線形的混乱を避けるため、測定は反復測定ごとにランダムな順序で行う。

**(11)** 吸光度、蛍光強度、ピーク高さ、ピーク面積等。

**(12)** 測定によって得られたシグナルと回帰式より推定したシグナルの差

**備考 3.** 切片( $a$ )の 95 %信頼区間に原点(0)が含まれていることを推奨する。

**備考 4.** 決定係数( $r^2$ )が 0.99 以上であれば使用可能であるが、精密な分析には 0.999 以上であることを推奨する。決定係数( $r^2$ )が 0.99 未満である場合は、高次式を用いるか又は数値の変換を検討する。

**備考 5.** 残差の平均値は 0 であり、残差はランダムなパターンを示す。

**参考文献**

- 1) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K, Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 2) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem.* **74** (5), 835–855 (2002)
- 3) CLSI EP9 A2 Ed. 2, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples, Clinical and Laboratory Standards Institute (2002)

**(3.4) 真度**

真度を評価する方法として、①認証標準物質の利用(3.4.1)、②妥当性確認された方法による測定値との比較(3.4.2)、③回収試験(3.4.3)の順で推奨する。

なお、サロゲートを用いる場合は、その回収率がおよそ 40 %以上であることを推奨する。

**(3.4.1) 認証標準物質を利用する場合**

試験対象の肥料に似たマトリックスを持ち、測定レベルの濃度の測定対象成分を含む認証標準物質が利用できる成分においては、その認証標準物質を試験法に従って3点以上( $n$ )の併行試験を実施し、測定値の平均値が認証値(特性値)に対する警戒線以内であること、又は測定値の平均値と認証値(特性値)との差の絶対値が、測定値の平均値と認証値の各々の標準不確かさを合成した標準不確かさの 2 倍を超えないこと<sup>(13)</sup>。

**備考 6.** 警戒線は認証標準物質の値付けのための共同試験より得られた(2)式によって求められる。

認証値( $\mu$ )に対する警戒線

$$= \mu \pm 2 \times \sqrt{(s_R^2 - s_r^2) + \frac{s_r^2}{n}} = \mu \pm 2 \times \sqrt{s_L^2 + \frac{s_r^2}{n}} \quad \dots(2)$$

$\mu$ : 認証値

$s_R$ : 共同試験における室間再現標準偏差

$s_r$ : 共同試験における併行標準偏差<sup>(14)</sup>

$n$ : 併行試験の試験点数

$s_L$ : 共同試験における純粋な室間標準偏差

**注(13)** 測定の結果と認証値(特性値)との差の評価手順は**参考 1 測定値と認証値との比較の手順**に示した。

(14) 室内標準偏差( $s_W$ )と表記されている場合がある。

### (3.4.2) 妥当性確認された試験法が別にある場合

認証標準物質が利用できず、かつ、妥当性の確認された試験法(以下「標準試験法」という。)が別にある成分においては、**a)** 又は **b)** の条件を満足することを確認する。

**a) 試料数が 12 点以上ある場合** 12 点以上の添加試料、自然汚染試料又は流通試料を新たな試験法及び標準試験法に従ってそれぞれ試験を実施し、各試料の 2 方法の測定値の相関図を作成し、回帰直線の傾き( $b$ )、切片( $a$ )及び相関係数( $r$ )を算出し、更に予測区間を確認する。

ただし、測定値の最小値と最大値の幅が小さい場合は、対応のある  $t$  検定を実施して有意な差が認められないことを確認する。

**備考 7.** 傾き( $b$ )の 95 %信頼区間に 1 が含まれ、切片( $a$ )の 95 %信頼区間に原点(0)が含まれ、相関係数( $r$ )が 0.99 以上であることを推奨する。

**b) 試料数が少ない場合** 異なる 3 濃度以上の分析用試料について、新たな試験法及び標準試験法に従ってそれぞれ 4 点併行で添加試験を実施し、2 群の成績の等分散性を確認し、濃度毎に  $t$  検定を実施して両側有意水準 5 %で有意な差が認められないことを確認する。

### (3.4.3) 認証標準物質がなく、妥当性確認された試験法が別でない場合

異なる 3 濃度以上の試料について、それぞれ 3 点併行で試験を実施し得られた測定値の平均値を用いて回収率を求め、評価する。真度の目安は**別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安**に示した。

### 参考文献

- 1) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 2) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.,: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem.* **74** (5), 835–855 (2002)
- 3) Linsinger, T.,: Comparison of a measurement result with the certified value, European Reference Materials' application note 1, European Commission - Joint Research Centre Institute for Reference Materials and



Measurements (IRMM) (2010)

- 4) Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Procedural manual Twenty-second edition, Codex Alimentarius Commission (2013)
- 5) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)

### (3.5) 精度

共同試験(3.5.1)により室間再現精度及び併行精度を評価する。又は、単一試験室において日を変えての反復試験(3.5.2)により中間精度及び併行精度を評価する。

#### (3.5.1) 共同試験による室間再現精度及び併行精度

有効データを得る試験室数は8以上<sup>(15)</sup>とし、濃度の異なる5種類以上の試料について、非明示の2点併行により共同試験を実施する。得られた測定値から室間再現精度及び併行精度を求め<sup>(16)</sup>、評価する。

これらの精度を評価するための目安は別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安に示した。

注(15) 必要な設備・機器を所有している試験室が限定されている場合は5以上。

(16) 算出方法は参考2 室間再現精度又は値中間精度及び併行精度の算出に示した。

#### (3.5.2) 単一試験室において日を変えての反復試験による中間精度及び併行精度

規定する範囲を含む異なる2濃度の分析用試料を用いて、1試験日につき2点併行で5～7日間試験<sup>(17)</sup>を実施する<sup>(18)</sup>。得られた測定値から中間精度及び併行精度を求め<sup>(19)</sup>、評価する。

これらの精度を評価するための目安は別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安に示した。

注(17) 内部品質管理のデータを用いることができる。

(18) 同一の試験者が5～7日間通して試験を実施する必要はない。

(19) 算出方法は参考2 室間再現精度又は値中間精度及び併行精度の算出に示した。

### 参考文献

- 1) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 2) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.,: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem.* **74** (5), 835–855 (2002)
- 3) AOAC Official Methods of Analysis Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)
- 4) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331～343 (1995)

### (3.6) 定量下限(LOQ)

(3.6.1)～(3.6.3)に従って定量下限(LOQ)を推定する。必要に応じて、推定された定量下限付近の濃度を含

む分析用試料を段階的に調製し、それぞれ 3 点併行で試験を実施し、得られた測定値の平均値が真度の目標値に適合する濃度を定量下限とする。

**備考 8.** 有害成分、制限成分等の定量下限 (LOQ) は、含有許容量及びそれに準ずる水準が 1.0 mg/kg 以上の場合ではその 1/5 以下であり、1.0 mg/kg 未満の場合ではその 2/5 以下であること。また、主成分・主要な成分及び材料の成分の定量下限 (LOQ) は、含有すべき最小量及び流通肥料中の含有最小量の 1/5 以下であることを推奨する。なお、定量下限 (LOQ) がそれらの最小量の 1/5 を超える場合は、上記の併行試験を実施して定量下限を確認し、試験法の適用範囲にその旨を明記する。

**備考 9.** 定量下限を推定するにはいくつかの方法があり、測定方法が機器分析であるか否か、使用する測定機器によって方法が異なる。(3.6.1)～(3.6.3)に示す方法とは異なる方法を用いても差し支えないが、その方法及びその方法における定量下限の定義を明記する。

### (3.6.1) 併行試験により推定する方法

定量下限付近の濃度の分析用試料について、それぞれ 7～10 点併行で試験を実施し、併行標準偏差を求め、(3)式によって試料中の定量下限 (LOQ) を推定する。

$$\text{試料中の定量下限(LOQ)の推定値} = 10 \times s_r \quad \dots (3)$$

$s_r$ : 併行標準偏差

### (3.6.2) 検量線を用いて推定する方法

検量線が直線の場合は、検量線の残差又は推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差と検量線の傾きを用いて、(4)式によって試料中の定量下限 (LOQ) を推定する。

$$\text{試料中の定量下限(LOQ)の推定値} = \frac{10 \times s}{b} \quad \dots (4)$$

$s$ : 残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差

$b$ : 検量線の傾き

### (3.6.3) SN 比により推定する方法

クロマトグラフ法等のベースラインノイズを伴う試験法においては、SN 比が 10:1 のピークの試料溶液中の濃度より算出して、試料中の定量下限 (LOQ) を推定する。

## 参考文献

- 1) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)
- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知:分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について,平成9年10月28日,医薬審第338号(1997)

**(3.7) 検出下限(LOD)**

(3.7.1)～(3.7.3)に従って検出下限(LOD)を推定する。

**備考 10.** 検出下限を推定するにはいくつかの方法があり、測定方法が機器分析であるか否か、使用する測定機器によって方法が異なる。(3.7.1)～(3.7.3)に示す方法とは異なる方法を用いても差し支えないが、その方法及びその方法における検出下限の定義を明記する。

**(3.7.1) 併行試験により推定する方法**

定量下限付近の濃度の分析用試料又はブランク試料について、それぞれ7～10点併行で試験を実施し、併行標準偏差を求め、(5)式によって試料中の検出下限(LOD)を推定する。

$$\text{試料中の検出下限(LOD)の推定値} = 2 \times t(n-1, 0.05) \times s_r \quad \dots (5)$$

$s_r$ : 併行標準偏差

$t(n-1, 0.05)$ : 危険率片側5%の学生t値<sup>(20)</sup>

$n$ : 併行試験の併行点数

**注(20)** 併行試験7点併行の場合は1.94であり、10点併行の場合は1.83である。

**(3.7.2) 検量線を用いて推定する方法**

検量線が直線の場合は、検量線の残差又は推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差と検量線の傾き( $b$ )を用いて、(6)式によって試料中の検出下限(LOD)を推定する。

$$\text{試料中の検出下限(LOD)の推定値} = \frac{2 \times t(n-2, 0.05) \times s}{b} \quad \dots (6)$$

$s$ : 残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差

$b$ : 検量線の傾き

$t(n-2, 0.05)$ : 危険率片側5%の学生t値

$n$ : 検量線の測定ポイント数

**(3.7.3) SN比により推定する方法**

クロマトグラフ法等のベースラインノイズを伴う試験法においては、SN比が3:1のピークの試料溶液中の濃度より算出して、試料中の検出下限(LOD)を推定する。

**参考文献**

- 1) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)

- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知:分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について,平成9年10月28日,医薬審第338号(1997)

### (3.8) 頑健性

頑健性は、分析法を開発する段階において検討しておくべきであり、その評価方法は開発しようとする分析法のタイプに依存する。頑健性は、分析条件を故意に変動させたときの分析法の信頼性を表す。もし、測定値が分析条件の変動の影響を受け易いようであれば、分析条件を適切に制御する方法を考慮するか、あるいは、そのことを分析法の中に注意事項として盛り込む必要がある。頑健性を評価することによってシステム適合性に関する一連のパラメータ(例えば、分離度)を確立することができよう。これらのパラメータを確認することによって、日常的分析において分析法の妥当性が維持されていることを保証できる。

代表的な変動因子は、次のとおりである。

(3.8.1) **共通する変動因子** 種々の試験法に共通する代表的な変動因子は、次のものがある。

- a) 抽出時間、抽出温度
- b) 各段階の試験溶液の安定性
- c) 試薬のグレード

(3.8.2) **クロマトグラフ法等における変動因子** クロマトグラフ法による測定又は固相抽出による精製の代表的な変動因子は、次のものがある。

- a) カラム又はカートリッジの変更(異なるロット又は異なる銘柄)
- b) 溶離液又は洗浄液の pH 及び組成の変動の影響
- c) 温度
- d) 流速
- e) マトリックスの影響及び希釈の効果

### 参考文献

- 1) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)
- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知:分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について,平成9年10月28日,医薬審第338号(1997)
- 3) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem.* **74** (5), 835–855 (2002)

### 参考 1 測定値と認証値との比較の手順

(R1.1)式により併行試験成績の総平均値( $m$ )及び認証値( $\mu$ )とそれらの差の絶対値( $\Delta_m$ )を求める。次に、(R1.2)式より認証標準物質の認証値の標準不確かさ( $u_{CRM}$ )及び(R1.3)式より総平均値の標準不確かさ( $u_m$ )を求める。得られた $u_m$ 及び $u_{CRM}$ を用いて(R1.4)式より $\Delta_m$ の合成標準不確かさ( $u_{C(\Delta_m)}$ )を算出し、更に包含係数( $k = 2$ )を用いて(R1.5)式より拡張不確かさ( $U_{\Delta_m}$ )を算出する。

$\Delta_m$ と $U_{\Delta_m}$ を比較して判定式((R1.6)式)に適合しているか、すなわち $\Delta_m$ が $U_{\Delta_m}$ 以下であることを確認する。

$$\text{併行試験成績の総平均値と認証値の差の絶対値}(\Delta_m) = |m - \mu| \quad \cdots \text{(R1.1)}$$

$$\text{認証値の標準不確かさ}(u_{CRM}) = \frac{U_{95\%}}{k_{CRM}} \quad \cdots \text{(R1.2)}$$

$$\text{総平均値の測定の標準不確かさ}(u_m) = \frac{s_r}{\sqrt{n}} \quad \cdots \text{(R1.3)}$$

$$\Delta_m \text{の合成標準不確かさ}(u_{C(\Delta_m)}) = \sqrt{u_m^2 + u_{CRM}^2} \quad \cdots \text{(R1.4)}$$

$$\Delta_m \text{の拡張不確かさ}(U_{\Delta_m}) = k_{C(\Delta_m)} \times u_{C(\Delta_m)} = 2 \times u_{C(\Delta_m)} \quad \cdots \text{(R1.5)}$$

$$\text{判定式} \quad \Delta_m \leq U_{\Delta_m} \quad \cdots \text{(R1.6)}$$

$m$ : 測定値の総平均値

$\mu$ : 認証値

$U_{95\%}$ : 認証値の拡張不確かさ

$k_{CRM}$ : 認証標準物質の拡張不確かさの包含係数

$s_r$ : 併行標準偏差

$n$ : 併行試験点数

$k_{C(\Delta_m)}$ :  $\Delta_m$ の拡張不確かさの包含係数( $k_{C(\Delta_m)} = 2$ )

参考2 空間再現精度又は中間精度及び併行精度の算出

(1) 測定値の構造

表1の測定値( $x_{ij}$ )は、(R2.1)式のとおり、真値( $\mu$ )、要因による変動( $\beta$ )及び併行条件下の偶然誤差(以下、「偶然誤差」という)による変動( $e$ )から成り立っている。 $p$ 試験室がそれぞれ  $n$  点併行で測定する共同試験を実施したとき、 $\beta$ の分布は純粋な室間変動による  $N(0, \sigma_L^2)$ 、 $e$ の分布は偶然誤差による  $N(0, \sigma_r^2)$ と仮定すると、(R2.2)式が導かれる。また、同一試験室において  $p$  日間それぞれ  $n$  点併行で測定する反復試験を実施したとき、 $\beta$ の分布は日間変動(要因  $T$ )による  $N(0, \sigma_{(T)}^2)$ 、 $e$ の分布は偶然誤差による  $N(0, \sigma_r^2)$ と仮定すると、(R2.3)式が導かれる。

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + \beta_i + e_{ij} \quad \dots \text{(R2.1)}$$

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + N(0, \sigma_L^2) + N(0, \sigma_r^2) \quad \dots \text{(R2.2)}$$

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + N(0, \sigma_{(T)}^2) + N(0, \sigma_r^2) \quad \dots \text{(R2.3)}$$

$\mu$ : 真値

$\beta_i$ : 要因における変動

$e_{ij}$ : 偶然誤差

$N(0, \sigma_L^2)$ : 平均 0、標準偏差  $\sigma_L$  の  $\beta_i$  の正規分布     $N(0, \sigma_r^2)$ : 平均 0、標準偏差  $\sigma_r$  の  $e_{ij}$  の正規分布

$\sigma_L^2$ : 純粋な室間分散

$\sigma_r^2$ : 併行分散

$N(0, \sigma_{(T)}^2)$ : 平均 0、標準偏差  $\sigma_{(T)}$  の  $\beta_i$  の正規分布

$\sigma_{(T)}^2$ : 日間分散

表1 共同試験又は日を変えた反復試験の試験成績

試験室又は試験日 (要因)	分析試料番号						
	1	2	3	...	$j$	...	$n$
1	$x_{11}$	$x_{12}$	$x_{13}$	...	$x_{1j}$	...	$x_{1n}$
2	$x_{21}$	$x_{22}$	$x_{23}$	...	$x_{2j}$	...	$x_{2n}$
3	$x_{31}$	$x_{32}$	$x_{33}$	...	$x_{3j}$	...	$x_{3n}$
...	...	...	...	...	...	...	...
$i$	$x_{i1}$	$x_{i2}$	$x_{i3}$	...	$x_{ij}$	...	$x_{in}$
...	...	...	...	...	...	...	...
$p$	$x_{p1}$	$x_{p2}$	$x_{p3}$	...	$x_{pj}$	...	$x_{pn}$

表1 共同試験又は日を変えた反復試験の試験成績

試験室又は試験日 (要因)	分析試料番号						
	1	2	3	...	$j$	...	$n$
1	$x_{11}$	$x_{12}$	$x_{13}$	...	$x_{1j}$	...	$x_{1n}$
2	$x_{21}$	$x_{22}$	$x_{23}$	...	$x_{2j}$	...	$x_{2n}$
3	$x_{31}$	$x_{32}$	$x_{33}$	...	$x_{3j}$	...	$x_{3n}$
...	...	...	...	...	...	...	...
$i$	$x_{i1}$	$x_{i2}$	$x_{i3}$	...	$x_{ij}$	...	$x_{in}$
...	...	...	...	...	...	...	...
$p$	$x_{p1}$	$x_{p2}$	$x_{p3}$	...	$x_{pj}$	...	$x_{pn}$

(2) 共同試験成績による室間再現精度及び併行精度の算出手順

(2.1) 真値及び分散の推定

実際の統計解析では、真値( $\mu$ )、真の純粋な室間分散( $\sigma_L^2$ )及び真の併行分散( $\sigma_r^2$ )は未知であり、共同試験成績から得られる推定値に置き換えて、それぞれ平均値( $m$ )、純粋な室間分散( $s_L^2$ )及び併行分散( $s_r^2$ )と表記する。

(2.2) 一元配置分散分析

共同試験に参加した試験室からの報告値のうち、プロトコルからの逸脱、機器の不調など客観的な理由が明らかである有効でない測定値を除外し、更に Cochran 検定及び Grubbs 検定を実施して外れ値を除く。外れ値を除いた成績について一元配置分散分析を実施し、表 2 の各変動要因の不偏分散( $V$ )を求める。

表 2 一元配置分散分析表

変動要因	平方和	自由度	不偏分散 ( $V$ )	分散の期待値 $E(V)$
試験室間 ( $L$ )	$SS_L$	$p - 1$	$V_L$	$\sigma_r^2 + n \times \sigma_L^2$
偶然誤差 ( $e$ )	$SS_r$	$p \times (n - 1)$	$V_r$	$\sigma_r^2$

**備考 1.** 一元配置分散分析は、市販の統計ソフトや表計算ソフトのツールを用いて容易に行える。この場合、用語が異なることがあるので留意すること。(試験室間 ( $L$ ) → グループ間、偶然誤差 ( $e$ ) → グループ内、平方和 → 変動 等)

**備考 2.** 不偏分散 ( $V$ ) は平方和 / 自由度によって算出される。

(2.3) 室間再現精度及び併行精度の算出

表 2 の各変動要因の分散の期待値  $E(V)$  の関係が成り立つことから、(R2.4) 式及び (R2.5) 式によって併行分散 ( $s_r^2$ ) 及び純粋な室間分散 ( $s_L^2$ ) を算出し、更に (R2.6) 式によって室間再現分散 ( $s_R^2$ ) を算出する<sup>(1)(2)</sup>。

$$\text{併行分散}(s_r^2) = V_r \quad \dots \quad (\text{R2.4})$$

$$\text{純粋な室間分散}(s_L^2) = \frac{V_L - V_r}{n} \quad \dots \quad (\text{R2.5})$$

$$\text{室間再現分散}(s_R^2) = s_L^2 + s_r^2 \quad \cdots \quad (\text{R2.6})$$

$V_r$ : 一元配置分散分析表(表 2)の変動要因(偶然誤差( $e$ ))の不偏分散

$V_L$ : 一元配置分散分析表(表 2)の変動要因(試験室間( $L$ ))の不偏分散

得られた併行分散及び室間再現分散から、(R2.7)式及び(R2.8)式によって併行標準偏差( $s_r$ )及び室間再現標準偏差( $s_R$ )を算出し、更に(R2.9)式及び(R2.10)式によって併行相対標準偏差( $RSD_r$ )及び室間再現相対標準偏差( $RSD_R$ )を算出する<sup>(2)(3)</sup>。

$$\text{併行標準偏差}(s_r) = \sqrt{s_r^2} \quad \cdots \quad (\text{R2.7})$$

$$\text{室間再現標準偏差}(s_R) = \sqrt{s_R^2} \quad \cdots \quad (\text{R2.8})$$

$$\text{併行相対標準偏差}(RSD_r, \%) = \frac{s_r}{m} \times 100 \quad \cdots \quad (\text{R2.9})$$

$$\text{室間再現相対標準偏差}(RSD_R, \%) = \frac{s_R}{m} \times 100 \quad \cdots \quad (\text{R2.10})$$

$m$ : 共同試験成績の有効データの総平均値

**注(1)**  $V_L < V_r$  の場合は、 $V_L = V_r$  (すなわち、(R2.5)式の純粋な室間分散( $s_L^2 = 0$ )と見なし、(R2.6)式では $s_R^2 = s_r^2$ とおく。

(2) 計算途中においては数値の丸めを実施しない。

(3) 平均値及び標準偏差は測定値の桁に丸めて表記する。相対標準偏差は小数第一位に丸めて表記する。

### (3) 日を変えての反復試験成績により中間精度及び併行精度の算出手順

#### (3.1) 真値及び分散の推定

実際の統計解析では、真値( $\mu$ )、真の日間分散( $\sigma_{(T)}^2$ )及び真の併行分散( $\sigma_r^2$ )は未知であり、日を変えての反復成績から得られる推定値に置き換えて、それぞれ平均値( $m$ )、日間分散( $s_{(T)}^2$ )及び併行分散( $s_r^2$ )と表記する。

#### (3.2) 一元配置分散分析

日を変えての反復試験の試験成績ついて一元配置分散分析を実施し、表 3 の各変動要因の不偏分散( $V$ )を求める。

表 3 一元配置分散分析表

変動要因	平方和	自由度	不偏分散 ( $V$ )	分散の期待値 $E(V)$
日間 ( $T$ )	$SS_T$	$p - 1$	$V_T$	$\sigma_r^2 + n \times \sigma_{(T)}^2$
偶然誤差 ( $e$ )	$SS_r$	$p \times (n - 1)$	$V_r$	$\sigma_r^2$



**備考 3.** 一元配置分散分析は、市販の統計ソフトや表計算ソフトのツールを用いて容易に行える。この場合、用語が異なることがあるので留意すること。(日間( $T$ )→グループ間、偶然誤差( $e$ )→グループ内、平方和→変動 等)

**備考 4.** 不偏分散( $V$ )は平方和/自由度によって算出される。

### (3.3) 中間精度及び併行精度の算出

表 3 の各変動要因の分散の期待値  $E(V)$  の関係が成り立つことから、(R2.11)式及び(R2.12)式によって併行分散( $s_r^2$ )及び日間分散( $s_{(T)}^2$ )を算出し、更に(R2.13)式によって中間分散( $s_{I(T)}^2$ )を算出する<sup>(2)(4)</sup>。

$$\text{併行分散}(s_r^2) = V_r \quad \cdots \quad (\text{R2.11})$$

$$\text{日間分散}(s_{(T)}^2) = \frac{V_T - V_r}{n} \quad \cdots \quad (\text{R2.12})$$

$$\text{中間分散}(s_{I(T)}^2) = s_{(T)}^2 + s_r^2 \quad \cdots \quad (\text{R2.13})$$

$V_r$ : 一元配置分散分析表(表 3)の変動要因(偶然誤差( $e$ ))の不偏分散

$V_T$ : 一元配置分散分析表(表 3)の変動要因(日間( $T$ ))の不偏分散

得られた併行分散の推定値及び中間分散の推定値から、(R2.14)式及び(R2.15)式によって併行標準偏差( $s_r$ )及び中間標準偏差( $s_{I(T)}$ )を算出し、更に(R2.16)式及び(R2.17)式によって併行相対標準偏差( $RSD_r$ )及び中間相対標準偏差( $RSD_{I(T)}$ )を算出する<sup>(2)(3)</sup>。

$$\text{併行標準偏差}(s_r) = \sqrt{s_r^2} \quad \cdots \quad (\text{R2.14})$$

$$\text{中間標準偏差}(s_{I(T)}) = \sqrt{s_{I(T)}^2} \quad \cdots \quad (\text{R2.15})$$

$$\text{併行相対標準偏差}(RSD_r, \%) = \frac{s_r}{m} \times 100 \quad \cdots \quad (\text{R2.16})$$

$$\text{中間相対標準偏差}(RSD_{I(T)}, \%) = \frac{s_{I(T)}}{m} \times 100 \quad \cdots \quad (\text{R2.17})$$

$m$ : 日を変えての反復試験成績の総平均値

**注(4)**  $V_T < V_r$  場合は、 $V_T = V_r$  (すなわち、(R2.12)式の日間分散( $s_{(T)}^2 = 0$ )と見なし、(R2.13)式では  $s_{I(T)}^2 = s_r^2$  とおく。

### (4) 日を変えての反復試験成績により中間精度及び併行精度の算出例

亜りん酸塩を含む試料 1 及び試料 2 を用い、く溶性りん酸の日を変えての反復試験を実施した成績例を表 4 に示す。各試料の試験成績についてそれぞれ一元配置分散分析を実施し、各変動要因の不偏分散( $V$ )を求める(表 5)。

(R2.11)式～(R2.17)式により、試料 1 及び試料 2 の中間精度並びに併行精度を算出した例を表 6-1 及び表

6-2 に示す。なお、各標準偏差の結果は測定値の桁まで表記し、各相対標準偏差の結果は小数第一位まで表記する。

表4 日を変えた反復試験の試験成績例

(質量分率(%))

試料No	試験日(要因)							総平均 値( $m$ ) <sup>1)</sup>
	1	2	3	4	5	6	7	
試料1	51.20	52.15	51.00	51.35	51.35	51.38	51.28	51.38
	51.45	51.85	51.09	51.28	51.10	51.38	51.43	
試料2	5.18	4.90	5.01	5.15	5.14	5.13	5.21	5.10
	5.00	5.12	5.06	5.14	5.07	5.11	5.18	

1) 平均値は測定値の桁に丸めて表記する。

表 5 一元配置分散分析表

試料 No	変動要因	平方和	自由度	不偏分散 (V)	分散の期待値 E(V)
試料 1	日間 (T)	1.0570	6	0.17616	$\sigma_r^2 + 2 \times \sigma_{(T)}^2$
	偶然誤差 (e)	0.1253	7	0.01789	$\sigma_r^2$
試料 2	日間 (T)	0.0478	6	0.00797	$\sigma_r^2 + 2 \times \sigma_{(T)}^2$
	偶然誤差 (e)	0.0448	7	0.00640	$\sigma_r^2$

表 6-1 日を変えた反復試験の試料 1 の成績からの中間精度及び併行精度の算出<sup>1)</sup>

変動要因	単位	計算式	計算	結果
併行分散( $s_r^2$ )		$= V_r$	$= 0.01789$	0.01789
併行標準偏差( $s_r$ ) <sup>2)</sup>	質量分率 (%)	$= \sqrt{s_r^2}$	$= \sqrt{0.01789}$	0.13
併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) <sup>3)</sup>	%	$= \frac{s_r}{m} \times 100$	$= \frac{0.1338}{51.38} \times 100$	0.3
日間分散( $s_{(T)}^2$ )		$= \frac{V_T - V_r}{n}$	$= \frac{0.17616 - 0.01789}{2}$	0.07914
中間分散( $s_{I(T)}^2$ )		$= s_{(T)}^2 + s_r^2$	$= 0.07914 + 0.01789$	0.09703
中間標準偏差( $s_{I(T)}$ ) <sup>2)</sup>	質量分率 (%)	$= \sqrt{s_{I(T)}^2}$	$= \sqrt{0.09703}$	0.31
中間相対標準偏差 ( $RSD_{I(T)}$ ) <sup>3)</sup>	%	$= \frac{s_{I(T)}}{m} \times 100$	$= \frac{0.3115}{51.38} \times 100$	0.6

- 1) 計算途中においては数値の丸めを実施しない。
- 2) 標準偏差は測定値の桁に丸めて表記する。
- 3) 相対標準偏差は小数第一位に丸めて表記する。

表 6-2 日を変えた反復試験の試料 2 の成績からの中間精度及び併行精度の算出<sup>1)</sup>

変動要因	単位	計算式	計算	結果
併行分散( $s_r^2$ )		$= V_r$	$= 0.00640$	0.00640
併行標準偏差( $s_r$ ) <sup>2)</sup>	質量分率 (%)	$= \sqrt{s_r^2}$	$= \sqrt{0.00640}$	0.08
併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) <sup>3)</sup>	%	$= \frac{s_r}{m} \times 100$	$= \frac{0.0800}{5.10} \times 100$	1.6
日間分散( $s_{(T)}^2$ )		$= \frac{V_T - V_r}{n}$	$= \frac{0.00797 - 0.00640}{2}$	0.00078
中間分散( $s_{I(T)}^2$ )		$= s_{(T)}^2 + s_r^2$	$= 0.00078 + 0.00640$	0.00718
中間標準偏差( $s_{I(T)}$ ) <sup>2)</sup>	質量分率 (%)	$= \sqrt{s_{I(T)}^2}$	$= \sqrt{0.00718}$	0.08
中間相対標準偏差 ( $RSD_{I(T)}$ ) <sup>3)</sup>	%	$= \frac{s_{I(T)}}{m} \times 100$	$= \frac{0.0848}{5.10} \times 100$	1.7

脚注は表 6-1 を参照

## 別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安

クロマトグラフ法<sup>1)</sup>並びにクロマトグラフ法以外の試験法の評価のための各濃度レベルにおける真度(回収率)の目標及び精度の目安は表1及び表2に示した。真度は、概ね表1の回収率以内であることを目標とする。精度は、表2の各相対標準偏差以内であることを推奨するが、それらの1.5倍まで許容する。

注(1) ガスクロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ質量分析法、高速液体クロマトグラフ法、高速液体クロマトグラフ(タンデム)質量分析法、イオンクロマトグラフ法等をいう。

表1 各濃度レベルにおける真度の目標

濃度レベル	クロマトグラフ法	クロマトグラフ法以外の試験法
	回収率 (%)	回収率 (%)
≥25%(質量分率)	90~108	98~102
≥10%(質量分率)	90~108	97~103
≥1%(質量分率)	85~110	96~104
≥0.1%(質量分率)	85~110	94~106
≥100 mg/kg	80~115	92~108
≥10 mg/kg	70~120	90~110
≥1 mg/kg	70~120	85~115
≥100 µg/kg	70~120	85~115
≥10 µg/kg	70~120	80~120
<10 µg/kg	60~125	75~125

表2 各濃度レベルにおける精度<sup>1)</sup>の目安

濃度レベル	クロマトグラフ法			クロマトグラフ法以外の試験法		
	室間再現相対	中間相対	併行相対	室間再現相対	中間相対	併行相対
	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
≥25%(質量分率)	8	6.5	4	2.5	2	1
≥10%(質量分率)	8	6.5	4	3	2.5	1.5
≥1%(質量分率)	8	6.5	4	4	3.5	2
≥0.1%(質量分率)	8	6.5	4	6	4.5	3
≥100 mg/kg	8	6.5	4	8	6.5	4
≥10 mg/kg	11	9	6	11	9	6
≥1 mg/kg	16	13	8	16	13	8
≥100 µg/kg	22	18	11	22	18	11
≥10 µg/kg	22	18	11	22	18	11
<10 µg/kg	22	18	11	22	18	11

1) 精度は、各相対標準偏差以内であることを推奨するが、それらの1.5倍まで許容する。