

## 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

この試験法は肥料に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.1.a-2017 又は Mel.a-1 とする。

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。

- 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) **ジエチルアミン**: 特級又は同等の品質の試薬。
- d) **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。
- e) **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)。
- f) **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。
- g) **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富士フィルム和光純薬、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 の溶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  $\mu\text{m}$  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 $\times g$ ~10000 $\times g$  で遠心分離可能なもの。

d) **濃縮器**: 70 $^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  に調節できる遠心エバポレーター

e) **水浴**: 70 $^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  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 $\times g$ ~10000 $\times g$  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 $\times g$ ~10000 $\times g$  程度となる。

**備考 5.** 500  $\mu\text{m}$  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 % (質量分率)~10 % (質量分率) となる。その定量範囲未達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 をスクリー栓付き試験管 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

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

**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との検量線を作成する。

**c) 試料の測定**

- 1) 試料溶液を1 µL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±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 µg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。

**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。

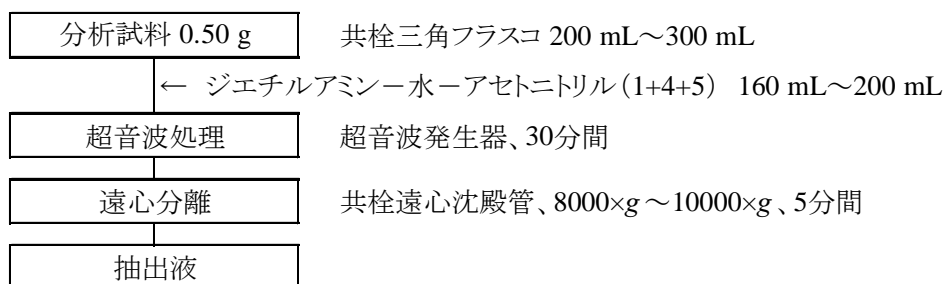


図1 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート(抽出操作)

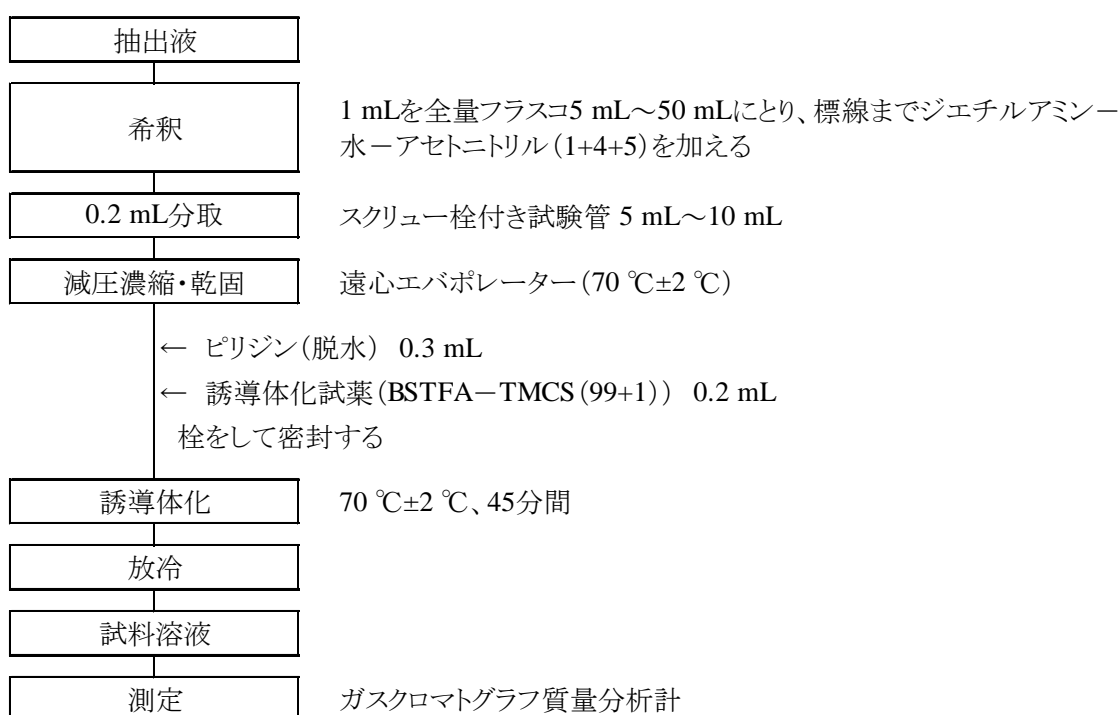


図2 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート(誘導体化及び測定操作)

**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) 例を次に示す。

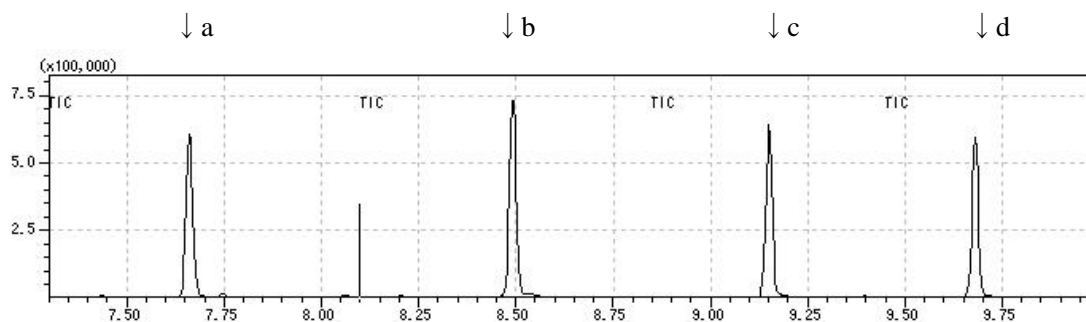


図3 メラミン及びその関連物質の GC/MS の全イオンのクロマトグラム(TIC)

**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 μm)

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 μg/mL 相当量)

導入量: 1 μL(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

この試験法は有機物を含まない肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.1.c-2017 又は Mel.c-1 とする。

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、高速液体クロマトグラフの溶離液には高速液体クロマトグラフ用試薬を使用。
- 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>。高速液体クロマトグラフ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>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富士フィルム和光純薬、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: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフ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**:  $1700 \times g$  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**: 高速液体クロマトグラフ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 を高速液体クロマトグラフに注入し、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と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、硫酸 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 1 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 % (質量分率) ~ 1.10 % (質量分率) の範囲で、シアヌル酸で 0.105 % (質量分率) ~ 1.15 % (質量分率) 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 ( $n = \text{試験室数} \times \text{繰返し数}(2)$ )

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。

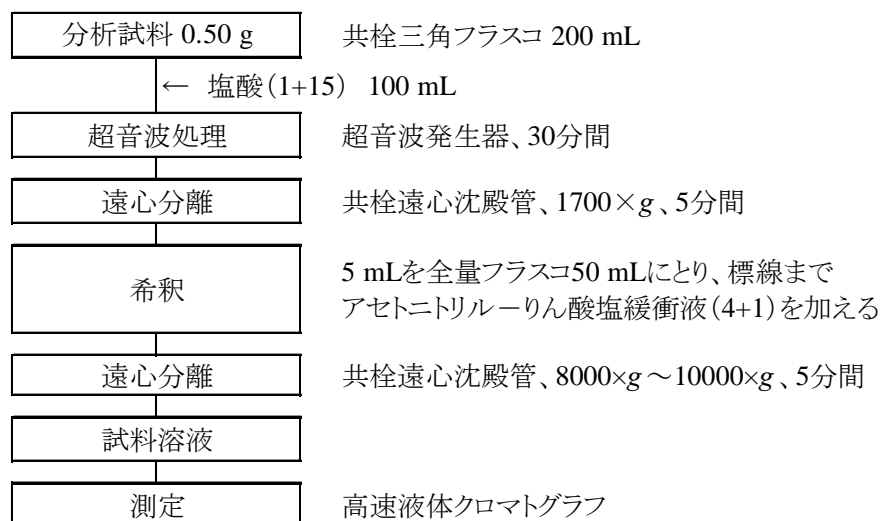
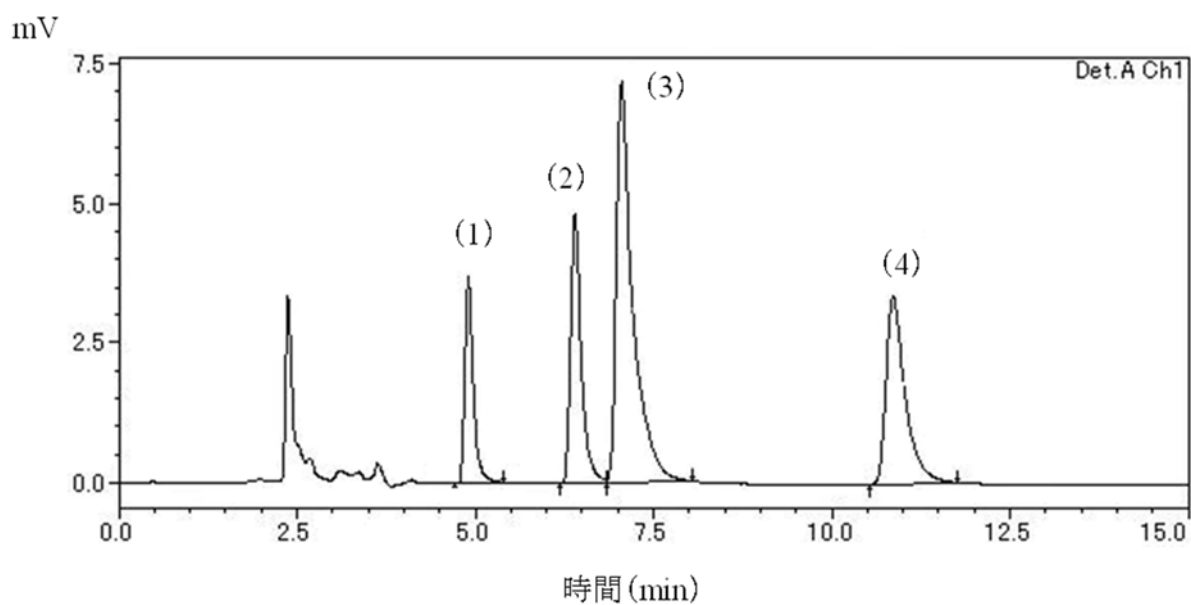


図 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート

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



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

この試験法は有機質肥料及び有機物を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.1.d-2017 又は Mel.d-1 とする。

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 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、高速液体クロマトグラフの溶離液には高速液体クロマトグラフ用試薬を使用。
- 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>。高速液体クロマトグラフ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) りん酸塩緩衝液の 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富士フィルム和光純薬、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: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフ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) 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 $\sim$ 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) ローター半径 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)~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**: 高速液体クロマトグラフ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(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  $\mu$ L を高速液体クロマトグラフに注入し、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と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 4.** 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 1 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 メラミンの日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験 日数( $T$ ) <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> (%)	$s_{I(T)}$ <sup>6)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_{I(T)}$ <sup>7)</sup> (%)
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

2) 平均値 (試験日数( $T$ ) $\times$ 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) 船水悦子：高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による有機質肥料及びそれを含む肥料中のメラミンの測定，肥料研究報告，**9**，33~42 (2016)

(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。

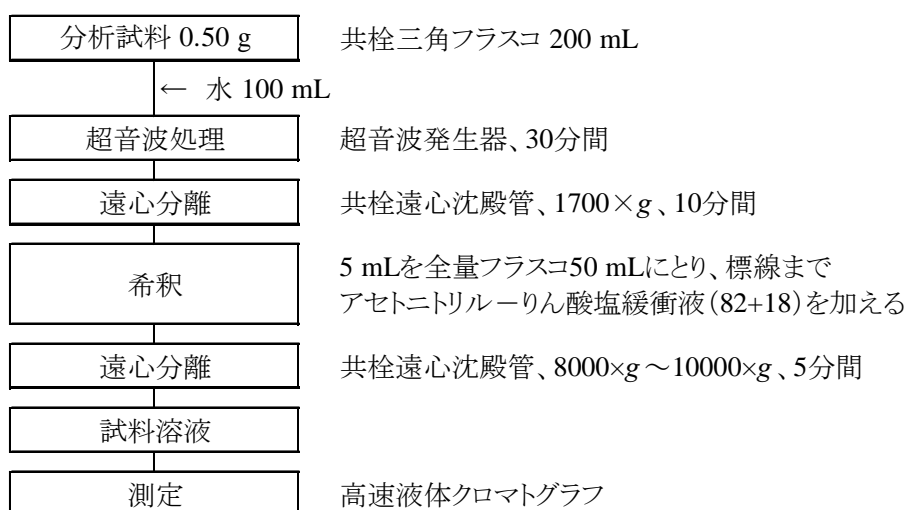
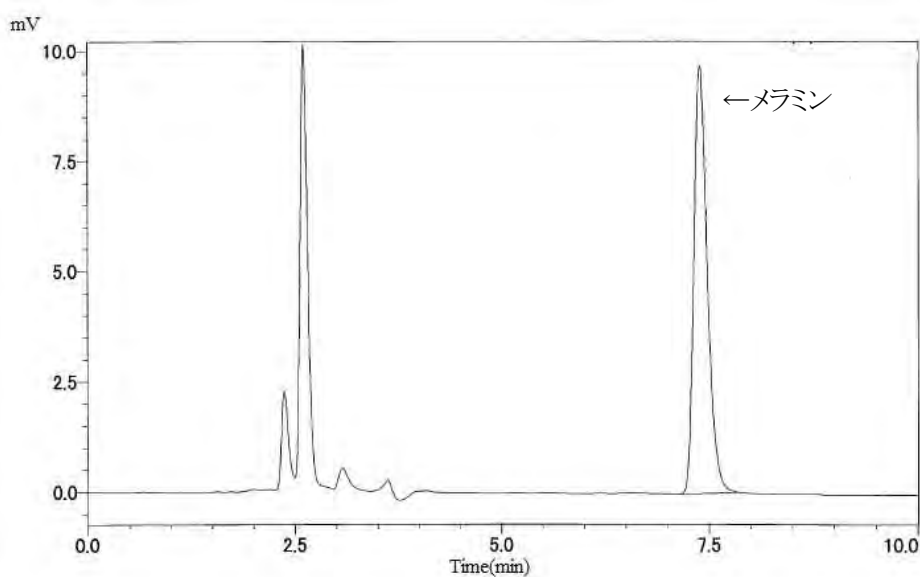


図 有機物を含む肥料中のメラミンの試験法フローシート

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



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 μm)

メラミンの検量線用標準液(各 10 ng 相当量(1 μg/mL, 10 μL))

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(クロピラリド等 3 成分同時分析法)

#### (1) 概要

この試験法は堆肥及び汚泥発酵肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.2.a-2017 又は CLP.a-1 とする。

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タンデム質量分析計(LC-MS/MS)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 6 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。

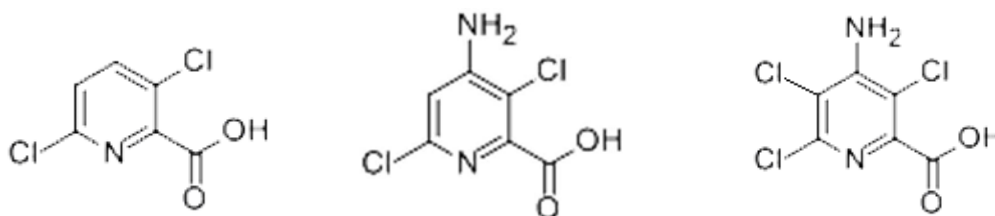


図1 クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式

(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、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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**: 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- d) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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 28 % (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(0.0028 % (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>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>(2)</sup>、アミノピラリド[C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</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>Cl<sub>3</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(100 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(100 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富士フィルム和光純薬、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**: JIS K 0136 に規定する高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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) **垂直往復振とう機**: フラスコ用アダプターを用いて全量フラスコ 250 mL を 300 往復/分(振幅 40 mm)で垂直往復振とうさせられるもの。

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)、Oasis PRiME HLB Plus Short Cartridge(225 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<sup>(3)</sup>、300 往復/分(振幅 40 mm)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>(4)</sup>、上澄み液を抽出液とする。

**注(3)** 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1+99] 100 mLを加えてもよい。

(4) 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。

**備考 5.** 目開き 500 μm のふるいを通して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)**<sup>(5)</sup> クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

- a) コポリマー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 で洗浄する。
- b) なすフラスコ 100 mL<sup>(6)</sup>をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 5 mL 又は 10 mL<sup>(7)</sup>を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) 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。
- d) メタノール 5 mL を加える。

**注(5)** (4.2) 及び(4.3)の操作は、必要に応じて減圧装置を用いる。

(6) 多検体の分析試料を前処理する場合は、液量 20 mL の溶液を入れることのできる自立形の容器を用いてもよい。この場合は、d)の操作に換えて、流出液をなす形フラスコ 100 mL に入れ、容器をメタノール 2.5 mL で 2 回洗浄し、洗浄液を先の流出液に加える。

(7) Oasis HLB 6cc(200 mg)を用いた場合、抽出液 5 mL を 2 回負荷する。

(4.3) **クリーンアップ(2)**<sup>(5)</sup> クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

- a) 新たなコポリマー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 で洗浄する。
- b) (4.2)d)の流出液を 40 °C 以下の水浴上で 5 mL 以下まで減圧濃縮する。
- c) 塩酸(1+11)3 mL を加え、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。
- 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カラムに加える。
- 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カラム加えて流出させる。
- 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(0.0028 % (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>(8)</sup>、共栓遠心沈殿管 1.5 mL<sup>(9)</sup>にとる。
- h) 遠心力 8000×g～10000×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(10)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(8)** 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。

(9) 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。

(10) 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。

(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タンデム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タンデム質量分析計の測定条件** 高速液体クロマトグラフタンデム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  $\mu\text{m}$ ~2.2  $\mu\text{m}$ )
- 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  $\mu\text{L}$

## 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 ( $m/z$ )	プロダクト イオン (定量用) ( $m/z$ )	プロダクト イオン (確認用) ( $m/z$ )	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  $\mu\text{L}$  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( $m/z$ )のピーク面積との検量線を作成する。

## c) 試料の測定

- 1) 試料溶液を 5  $\mu\text{L}$  を b) 2)~3)と同様に操作する<sup>(11)</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(11) 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 6.** 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 µg/kg、400 µg/kg 及び 40 µg/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。

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 µg/kg 程度である。

表2 クロピラリド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> (µg/kg)	$s_r$ <sup>3)</sup> (µg/kg)	$RSD_r$ <sup>4)</sup> (%)	$s_R$ <sup>5)</sup> (µg/kg)	$RSD_R$ <sup>6)</sup> (%)
クロピラリド	堆肥1	10	128	6	4.5	21	16.4
	堆肥2	10	835	41	4.9	100	11.9
	汚泥発酵肥料1	9	16.2	1.7	10.6	5.2	31.8
	汚泥発酵肥料2	10	89.6	11.3	12.6	11.3	12.6
	汚泥発酵肥料3	10	339	28	8.3	28	8.3
アミノピラリド	堆肥1	8	324	15	4.5	39	12.0
	堆肥2	8	21.2	5.2	24.7	6.4	30.3
	汚泥発酵肥料1	7	5.39	1.41	26.2	2.22	41.2
	汚泥発酵肥料2	10	701	146	20.8	263	37.6
	汚泥発酵肥料3	9	59.5	8.9	15.0	16.6	28.0
ピクロラム	堆肥1	10	840	50	5.9	175	20.8
	堆肥2	9	37.7	3.5	9.4	10.3	27.3
	汚泥発酵肥料1	9	90.2	11.1	12.3	30.3	33.5
	汚泥発酵肥料2	8	341	19	5.6	67	19.8
	汚泥発酵肥料3	8	182	16	8.6	56	31.0

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) 併行標準偏差

4) 併行相対標準偏差

5) 室間標準偏差

6) 室間再現標準偏差

## 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, アミノピラリド及びピクロラム測定, 肥料研究報告, **7**, 1~9 (2014)
- 3) 小塚健志, 大島舞弓, 橋本良美, 田丸直子, 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)法による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測定 —共同試験成績—, 肥料研究報告, **10**, 61~71 (2017)

(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。

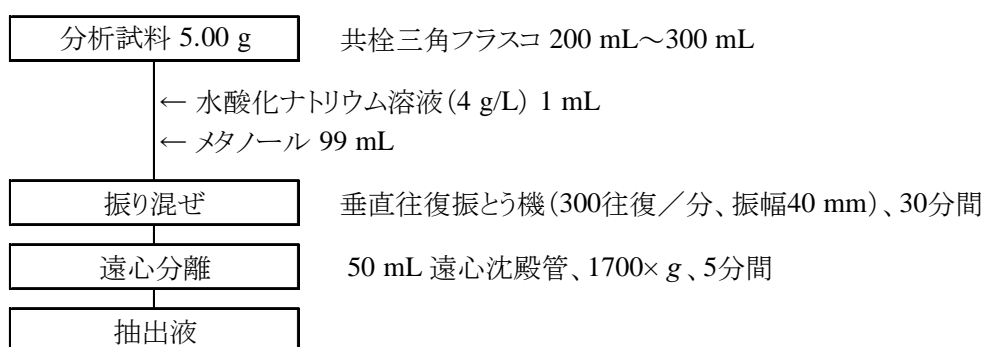


図1 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート (抽出操作)

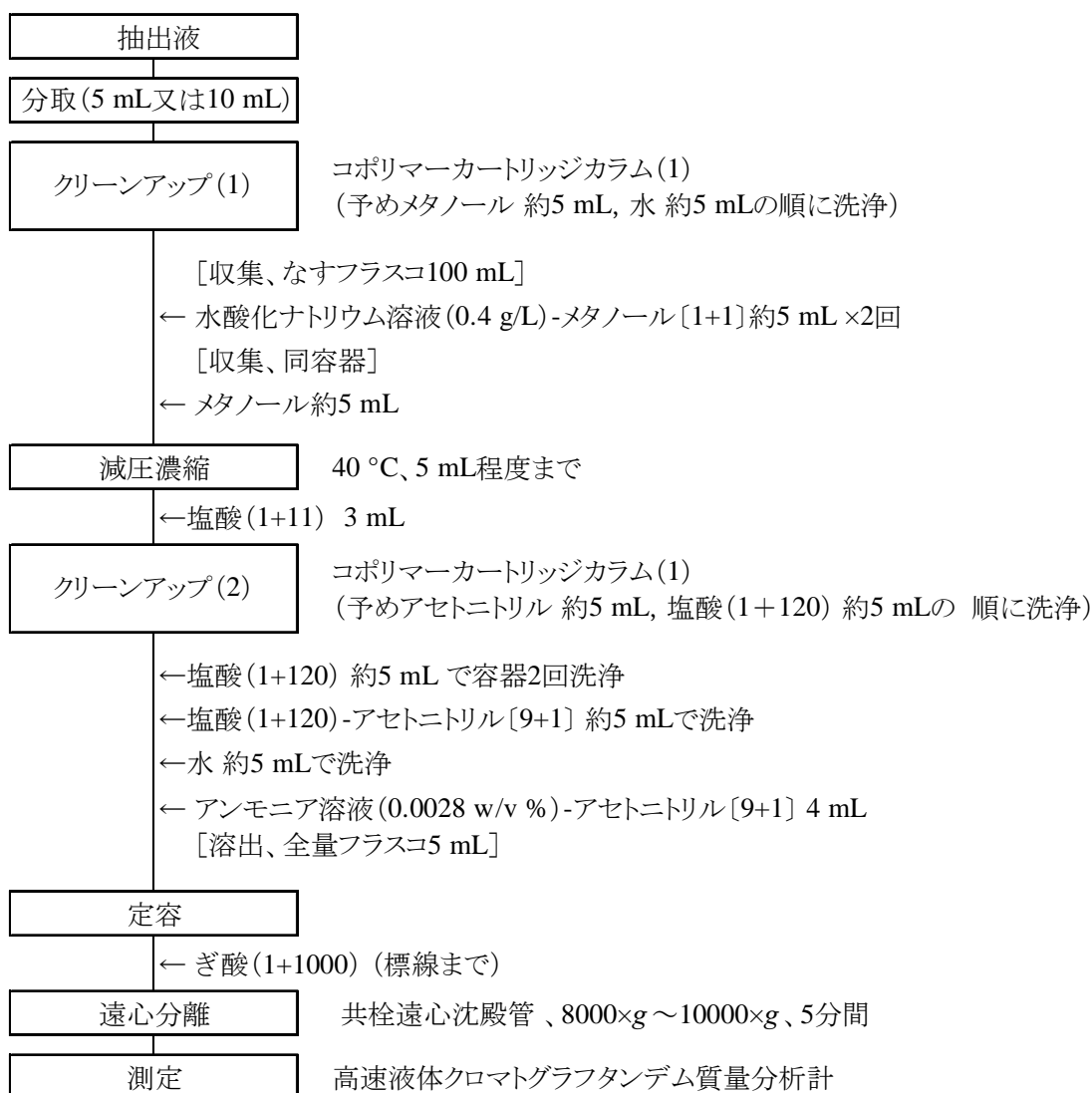
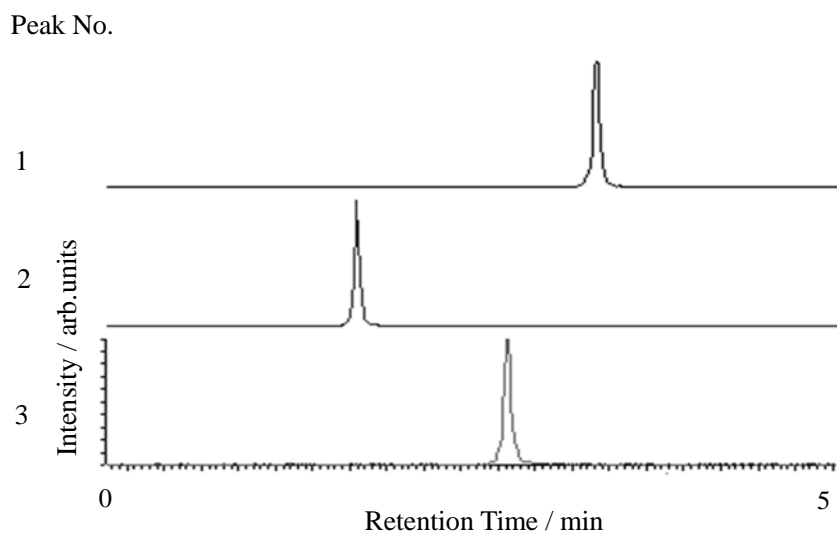


図2 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート (クリーンアップ(1)、クリーンアップ(2)及び測定操作)

**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例を次に示す。



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  $\mu\text{m}$ )

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

## 8.2.b 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法(微量クロピラリド分析法(1))

## (1) 概要

この試験法は堆肥および汚泥発酵肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.2.b-2018 又は CLP.b-1 とする。

堆肥および汚泥発酵肥料中のクロピラリド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及びジクロロメタンを用いて精製後、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いて測定し、分析試料中のクロピラリドを求める。なお、この試験法の性能は備考 8 に示す。

**備考 1.** クロピラリドの構造式は図 1 のとおりである。

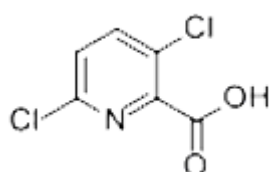


図 1 クロピラリドの構造式

(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、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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**: 残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- d) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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 28 % (質量分率)の特級試薬又は同等の品質のもの。
- h) **ギ酸**: JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- i) **ギ酸**: 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の溶離液に使用するギ酸は LC-MS 用又は同等の品質の試薬。
- j) **ジクロロメタン**: JIS K 8117 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。
- k) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- l) **アセトン**: JIS K 8040 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。
- m) **アンモニア溶液(0.0028 % (質量分率))<sup>(1)</sup>**: アンモニア水 0.1 mL を水 1000 mL に加える。
- n) **クロピラリド標準液(0.1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: クロピラリド[C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C<sub>12</sub>NO<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。
- o) **クロピラリド標準液(100 ng/mL)<sup>(1)</sup>**: クロピラリド標準液(0.1 mg/mL)の一定量をギ酸(1+1000)で希釈し、クロピラリド標準液(100 ng/mL)を調製する。



- p) 検量線用クロピラリド標準液(5 ng/mL~50 ng/mL)<sup>(1)</sup>: 使用時にクロピラリド標準液(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。
- q) 検量線用クロピラリド標準液(0.5 ng/mL~5 ng/mL)<sup>(1)</sup>: 使用時に検量線用クロピラリド標準液(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. クロピラリドの標準試薬は富士フィルム和光純薬、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: JIS K 0136に規定する高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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) 垂直往復振とう機: フラスコ用アダプターを用いて全量フラスコ 250 mLを 300 往復/分(振幅 40 mm)で垂直往復振とうさせられるもの。
- c) マニホールド
- d) 遠心分離機: 700×g~2000×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 又は 335 mg)
- h) ろ過器: 減圧ろ過用漏斗(適合ろ紙径 60 mm)。
- i) カラス繊維ろ紙: ガラス繊維製(ろ紙径 60 mm)で粒子径 0.8μmを保持できるもの。
- j) 試験管ミキサー: ボルテックスミキサー

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)、Oasis PRiME HLB Plus Short Cartridge(225 mg)等の名称で市販されている。

備考 5. 減圧ろ過用漏斗は桐山ロート SB-60、桐山ロート SU-60 等の名称で市販されている。

備考 6. ガラス繊維ろ紙はクラスファイバーろ紙 GFP-60 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、ねじ口遠心沈殿管 100 mL<sup>(3)</sup><sup>(4)</sup>に入れる。
- b) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1+99] 50 mL を加え、300 往復/分(振幅 40 mm) で約 30 分間振り混ぜる。
- c) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(5)</sup>、上澄み液を三角フラスコ 100 mL にとる。
- d) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1+99] 40 mL を残留物に加え、300 往復/分(振幅 40 mm) で約 30 分間振り混ぜる。
- e) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離する<sup>(5)</sup>。
- f) 太首全量フラスコ 100 mL を受器<sup>(6)</sup>とし、c) 及び e) の上澄み液をカラス繊維ろ紙を乗せたろ過器で減圧ろ過する。
- g) 容器及び残留物を少量の水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1+99]で数回洗浄し、洗液を先のろ過器に入れて減圧ろ過する。
- h) 標線まで水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1+99]を加えて抽出液とする。

**注(3)** 抽出操作に用いる容器はガラス製又はポリプロピレン製で振とう機及び遠心分離機での操作を行えるもの。

- (4) 共栓又はねじ口三角フラスコ 100 mL～200 mL を用いることもできるが、この場合 c) 及び e) の操作の前に懸濁液を共栓又はねじ口遠心沈殿管 50 mL に移し入れる操作を行う。
- (5) 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。
- (6) 三角フラスコ等を用いることもできるが、この場合 h) の操作の前にもろ液を全量フラスコ 100 mL に移し入れる操作を行う。

**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)**<sup>(7)</sup> 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 で洗浄する。
- b) なすフラスコ 100 mL<sup>(8)</sup>をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 10 mL<sup>(9)</sup>を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) 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。
- d) メタノール 5 mL を加える。

**注(7)** (4.2) 及び(4.3)の操作は、必要に応じて減圧装置を用いる。

- (8) 多検体の分析試料を前処理する場合は、液量 20 mL の溶液を入れることのできる自立形の容器を用いてもよい。この場合は、d) の操作に換えて、流出液をなす形フラスコ 100 mL に入れ、容器をメタノール 2.5 mL で 2 回洗浄し、洗浄液を先の流出液に加える。
- (9) Oasis HLB 6cc (200 mg) を用いた場合、抽出液 5 mL を 2 回負荷する。

**(4.3) クリーンアップ(2)**<sup>(7)</sup> 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 で洗浄する。
- b) (4.2)d) の流出液を 40 °C 以下の水浴上で 5 mL 以下まで減圧濃縮する。

- c) 塩酸(1+11)3 mLを加え、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。
- d) なす形フラスコを塩酸(1+120)約5 mLで2回洗浄し、洗液を順次カートリッジカラムに加えて流出させる。
- 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カラムに加えて流出させる。
- f) ねじ口円錐型遠心沈殿管 10 mL<sup>(10)</sup>をカートリッジカラムの下に置き、アンモニア溶液(0.0028% (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を溶出させる。

**注(10)** 底から2 mL以下の部分が円錐の形状のもの

**(4.4) クリーンアップ(3)** クリーンアップ(3)は、次のとおり行う。

- a) (4.3)f)の溶出液に水酸化ナトリウム(40 g/L)0.1 mLを加え、試験管ミキサーで振り混ぜる。
- b) ジクロロメタン2 mLを加え、試験管ミキサーで30秒間振り混ぜる。
- c) 遠心力約740×gで約3分間遠心分離<sup>(11)</sup>、下層をパスツールピペット<sup>(12)</sup>又はシリンジで除く。
- d) b)～c)の操作を更に1回繰り返す。
- e) 硫酸(1+2)0.15 mLを加え、試験管ミキサーで振り混ぜる。
- f) ジクロロメタン2 mLを加え、試験管ミキサーで30秒間振り混ぜる<sup>(13)</sup>。
- g) 遠心力約740×gで約5分間遠心分離<sup>(11)</sup>、下層をパスツールピペット<sup>(14)</sup>又はシリンジでなす形フラスコ50 mLに入れる。
- h) f)～g)の操作を更に2回繰り返す。ただし、下層は同じなす形フラスコに加える。
- i) アセトン5 mLを加える。
- j) 40℃以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固させる。
- k) ぎ酸(1+1000)を1 mLを加え、共栓遠心沈殿管1.5 mL<sup>(15)</sup>に移し入れる。
- l) 遠心力8000×g～10000×gで約5分間遠心分離<sup>(16)</sup>、上澄み液を試料溶液とする<sup>(17)</sup>。

**注(11)** 回転半径16.5 cm及び回転数2000 rpmで遠心力740×g程度となる。なお、使用するねじ口円錐底遠心沈殿管10 mLの遠心力の許容範囲を確認すること。

(12) パスツールピペットを使用する場合は、c)～d)の一連操作を同じパスツールピペットを使用する。

(13) ジクロロメタンをよく分散させる。ジクロロメタン層が固まった状態での振り混ぜ操作ではクロピラリドの抽出効率が低下して、測定値に影響する。

(14) パスツールピペットを使用する場合は、g)～h)の一連操作を同じパスツールピペットを使用する。なお、注(12)で使用したパスツールピペットは使用しない。

(15) 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。

(16) 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。

(17) 試料溶液中のクロピラリド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ぎ酸(1+1000)で希釈する。

**備考 6.** (4.4)k)～l)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 μm以下)でろ過、または、遠心式フィルターユニット(Ultrafree-MC PVDF membrane(0.22 μm)等)を用いて遠心ろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**備考 7.** 定量下限を確保するために更に濃縮が必要な場合は、j)の操作の濃縮物をアセトンに加えて溶か

し、同溶媒で窒素濃縮管に移し入れ、窒素を送って乾固させ、ぎ酸(1+1000)を0.2 mLを加え、遠心式フィルターユニット(Ultrafree-MC PVDF membrane(0.22 μm)等)を用いて遠心ろ過してろ液を試料溶液とする。この場合、**i)**の操作は行わない。

**(4.5) 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: 20 V
- ⑦ コリジョンエネルギー: 定量用 20 eV、確認用 30 eV
- ⑧ モニターイオン: プリカーサーイオン  $m/z$  192  
プロダクトイオン 定量用  $m/z$  146、確認用  $m/z$  110

**b) 検量線の作成**

- 1) 各検量線用クロピラリド標準液 5 μL を高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に注入し、クロピラリドの定量用イオン( $m/z$ )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 μL を **b) 2)~3)**と同様に操作する<sup>(18)</sup>。
- 2) 検量線からクロピラリド量を求め、分析試料中のクロピラリド濃度を算出する。

**注(18)** 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。

**備考 8.** 牛ふん堆肥(1種類)、を用いたクロピラリドの添加回収試験の結果は、50 µg/kg、10 µg/kg 及び 2 µg/kg の添加レベルで平均回収率が 78.9 %、78.3 % 及び 71.5 % であった。また、豚ふん堆肥(1種類)、鶏ふん堆肥(1種類)及び汚泥発酵肥料(1種類)を用いたクロピラリドの添加回収試験の結果は、200µg/kg、2 µg/kg 及び 80µg/kg の添加レベルで平均回収率が 88.6 %、81.2 % 及び 94.2 % 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、この試験法のクロピラリドの定量下限は 2 µg/kg 程度である。

表1 クロピラリド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> (µg/kg)	$s_r$ <sup>3)</sup> (µg/kg)	$RSD_r$ <sup>4)</sup> (%)	$s_R$ <sup>5)</sup> (µg/kg)	$RSD_R$ <sup>6)</sup> (%)
牛ふん堆肥1	10	128	10	7.9	15	11.4
牛ふん堆肥2	10	2.28	0.35	15.3	0.40	17.6
豚ふん堆肥	9	22.5	2.3	10.3	3.4	15.3
鶏ふん堆肥	9	1.20	0.06	5.0	0.14	12.0
汚泥発酵肥料	9	48.1	1.2	2.5	5.6	11.6

1) 解析に用いた試験室数

2) 総平均値( $n$ =試験室数×繰り返し数(2))

3) 併行標準偏差

4) 併行相対標準偏差

5) 室間標準偏差

6) 室間再現標準偏差

## 参考文献

- 1) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター:牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法(参考法)  
<[http://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/pub2016\\_or\\_later/pamphlet/tech-pamph/078229.html](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078229.html)>
- 2) 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による堆肥等中のクロピラリドの測定 —微量試験法の適用範囲拡大—, 肥料研究報告, **11**, 63~74 (2018)
- 3) 伊藤浩平, 小塚健志, 秋元里乃, 坂井田里子, 大島舞弓, 中村信仁, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による堆肥等中のクロピラリドの測定 —微量試験法の共同試験成績—, 肥料研究報告, **11**, 75~85 (2018)

(5) クロピラリドの試験法フローシート 堆肥中のクロピラリドの試験法のフローシートを次に示す。

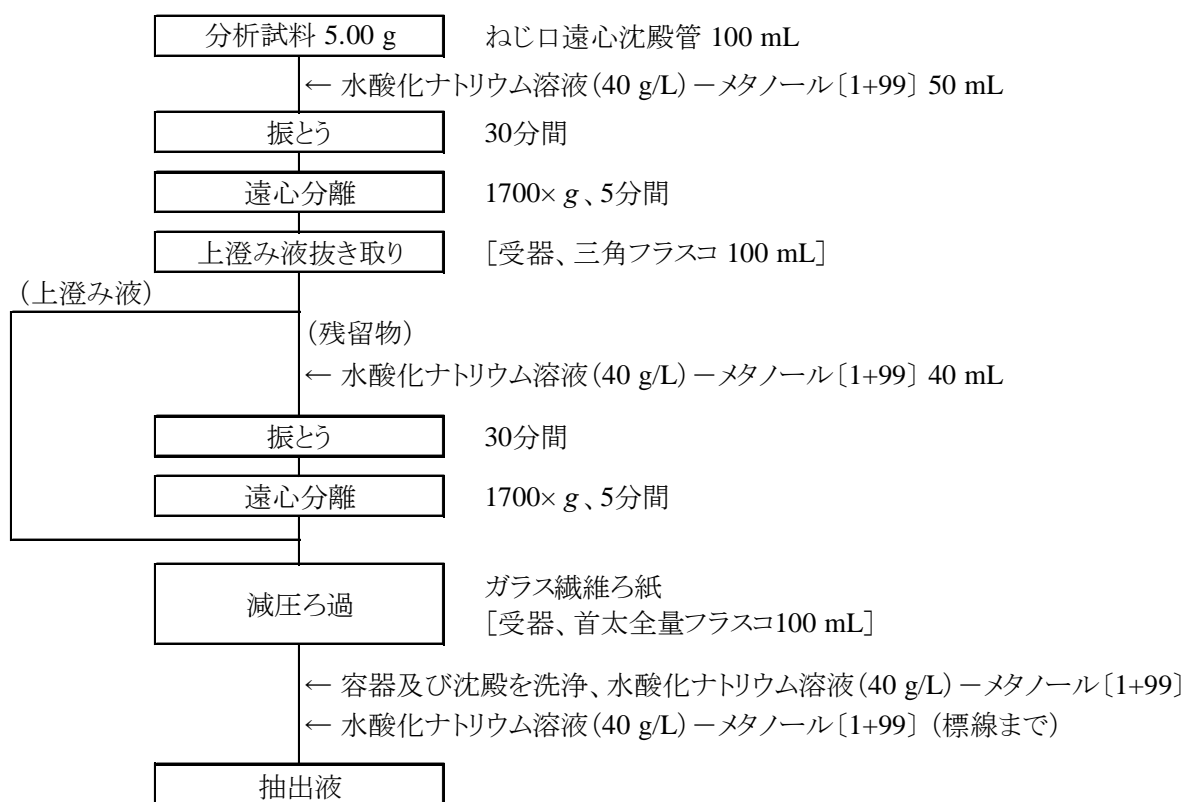


図1 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート(抽出操作)

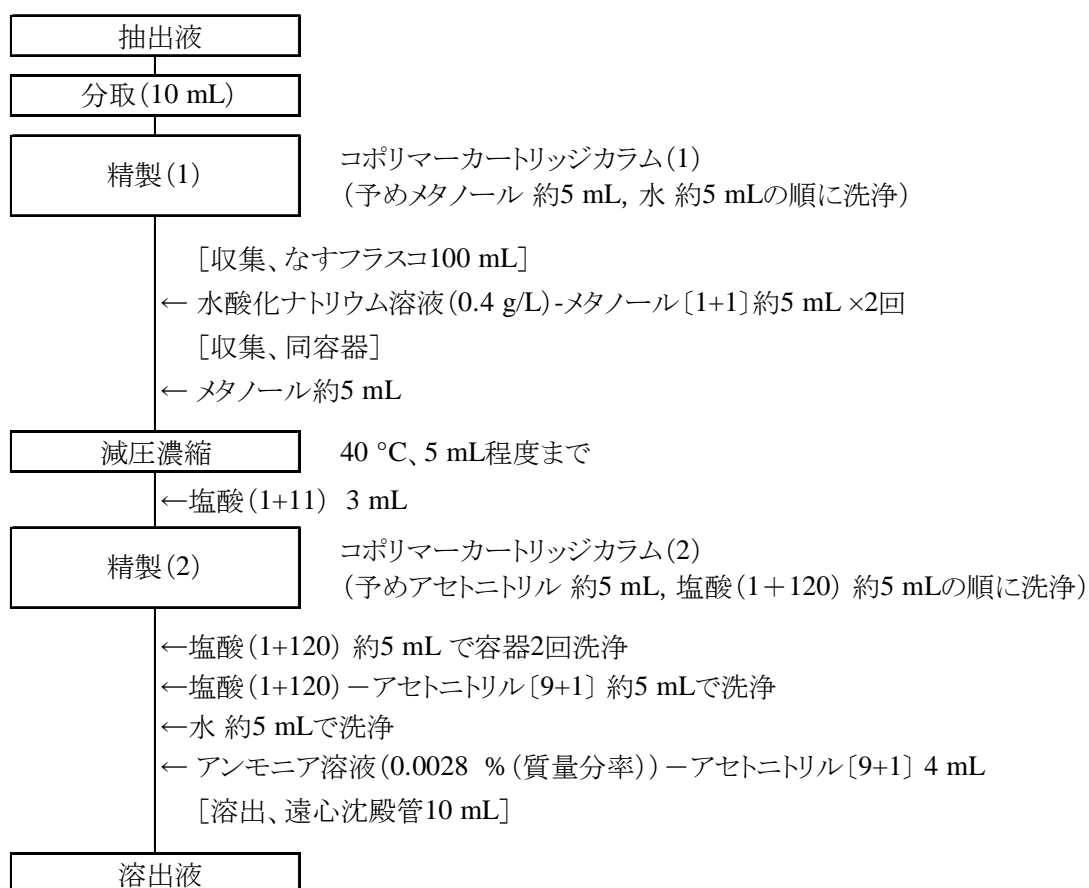


図2 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート  
(クリーンアップ(1)及びクリーンアップ(2)操作)

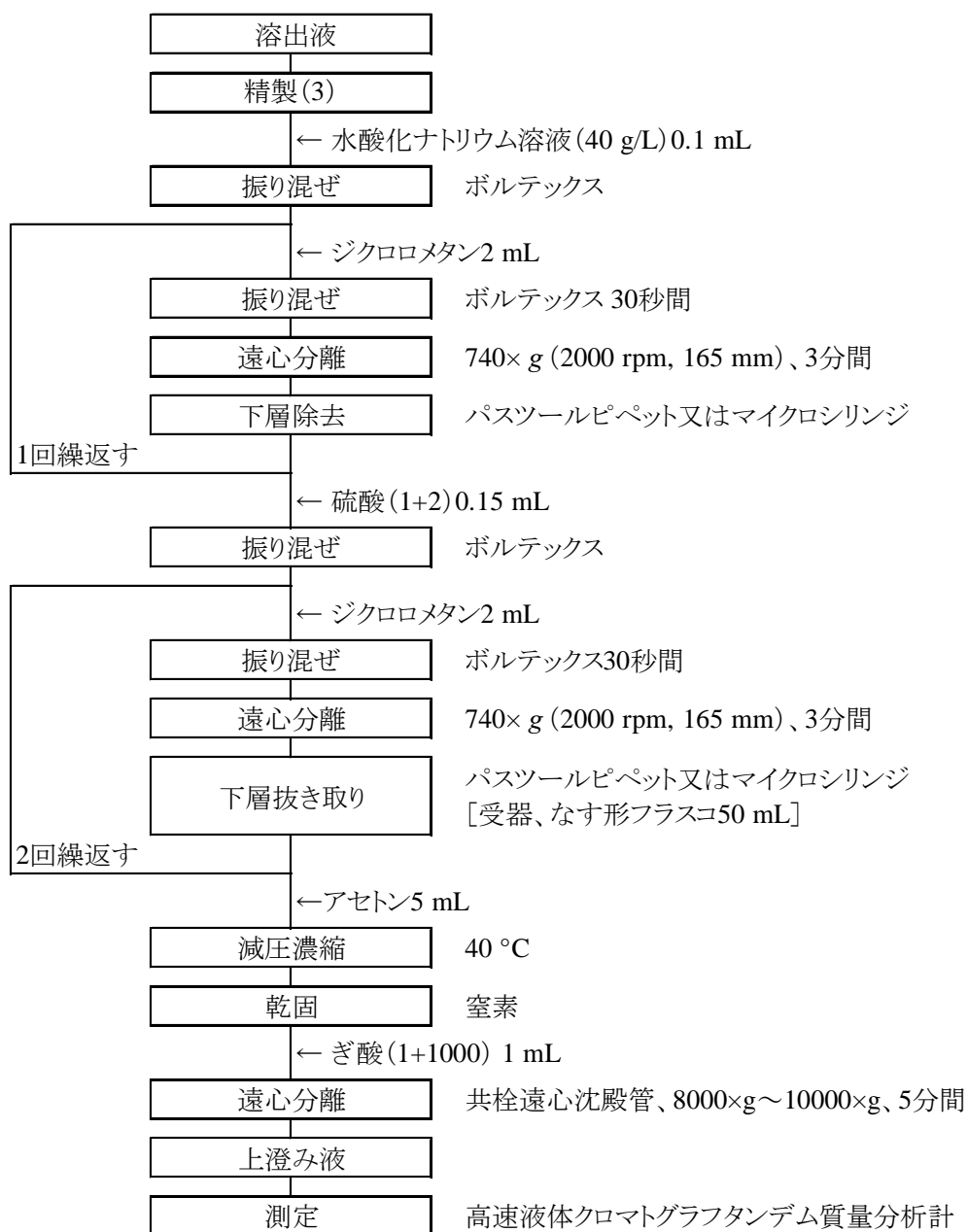
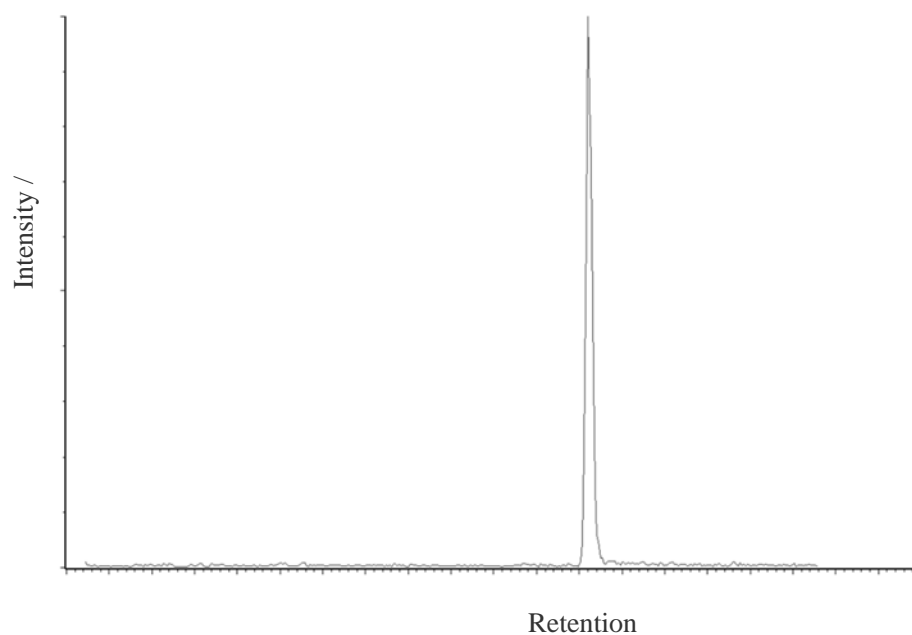


図3 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート  
(クリーンアップ(3)及び測定操作)



**参考** 検量線用クロピラリド標準液)の選択反応検出クロマトグラム例を次に示す。



参考図 クロピラリドの SRM クロマトグラム  
クロピラリド標準液(クロピラリドとして 100 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

## 8.2.c 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法(微量クロピラリド分析法(2))

## (1) 概要

堆肥及び汚泥発酵肥料に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.2.c-2019 又は CLP.c-1 とする。

堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド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、2 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タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて測定し、分析試料中のクロピラリドを求める。なお、この試験法の性能は備考 9 に示す。

**備考 1.** クロピラリドの構造式は図 1 のとおりである。

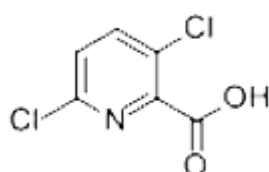


図 1 クロピラリドの構造式

(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、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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**: 残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。ただし、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の溶離液には LC-MS 用又は同等の品質のものを使用する。
- d) **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。
- e) **塩酸**: JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- f) **アンモニア水**: JIS K 8085 に規定する 28 % (質量分率)の特級試薬又は同等の品質のもの。
- g) **ぎ酸**: JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。ただし、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の溶離液には LC-MS 用又は同等の品質のものを使用する。
- h) **アンモニア溶液(0.0028 % (質量分率))<sup>(1)</sup>**: アンモニア水 0.1 mL を水 1000 mL に加える。
- i) **クロピラリド標準液(0.1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: クロピラリド[C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>NO<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。
- j) **クロピラリド標準液(100 ng/mL)<sup>(1)</sup>**: クロピラリド標準液(0.1 mg/mL)の一定量をぎ酸(1+1000)で希釈し、クロピラリド標準液(100 ng/mL)を調製する。
- k) **検量線用クロピラリド標準液(5 ng/mL~50 ng/mL)<sup>(1)</sup>**: 使用時にクロピラリド標準液(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。
- l) **検量線用クロピラリド標準液(0.5 ng/mL~5 ng/mL)<sup>(1)</sup>**: 使用時に検量線用クロピラリド標準液(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**: JIS K 0136 に規定する高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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) **垂直往復振とう機**: フラスコ用アダプターを用いて全量フラスコ 250 mL を 300 往復/分(振幅 40 mm)で垂直往復振とうさせられるもの。

c) **マニホールド**

d) **遠心分離機**: 700×g~2000×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 500 mg を注射筒 12 mL に充てんしたもの

h) **ジルコニアコートシリカゲルカートリッジカラム**: ジルコニア基を被覆したシリカゲル 500 mg 注射筒 6 mL に充てんしたもの

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カラムは Oasis HLB 12 cc (500 mg) 等の名称で市販されている。

備考 5. ジルコニアコートシリカゲルカートリッジカラムは HybrideSPE®-Phospholipid (500 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 2.00 g をはかりとり、ねじ口遠心沈殿管 50 mL<sup>(3)</sup>に入れる。

b) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L) -メタノール[1+99]25 mL を加え、300 往復/分(振幅 40 mm)で約 30 分間振り混ぜる。

c) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(4)</sup>、上澄み液を 200 mL なす形フラスコに移す。

d) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L) -メタノール[1+99] 10 mL を残留物に加え、振り混ぜる。

e) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離する<sup>(4)</sup>。

f) 上澄み液を c) の上澄み液に加える。

g) d)～f)の操作を2回実施し、得られた溶液を抽出液とする。

**注(3)** 抽出操作に用いる容器はガラス製又はポリプロピレン製で振とう機及び遠心分離機での操作を行えるもの。

(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。

**備考 6.** 目開き 500  $\mu\text{m}$  のふるいを通過するまで粉碎して分析用試料を調製する。

(4.2) **クリーンアップ(1)**<sup>(5)</sup> クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

- a) コポリマー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 で洗浄する。
- b) 抽出液を 40 °C 以下の水浴上で 3 mL 以下まで減圧濃縮する。
- c) 塩酸(1+11)3 mL を加え、カートリッジカラムに負荷<sup>(6)</sup>し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- d) なす形フラスコを塩酸(1+120)約 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カートリッジカラムに加えて流出させる。
- e) 次に、塩酸(1+120)－アセトニトリル[9+1]約 10 mL 及び水約 5 mL を順次カートリッジカラム加えて流出させる。
- f) 共栓試験管 10 mL をカートリッジカラムの下に置き、アンモニア溶液(0.0028 % (質量分率))－アセトニトリル[9+1]8 mL をカートリッジカラムに加えてクロピラリドを溶出させる。
- g) ぎ酸(1+1000)2 mL を抽出液に加え、混合する。

**備考 7.** (4.2)の操作において目詰まりによって溶液がカートリッジカラムを通過できなくなるおそれがある場合は、次の操作を実施する。

(4.2)c)の操作で「塩酸(1+11)3 mL を加えた後の溶液」を共栓遠心沈殿管 10 mL に移し入れ、遠心力約  $740 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(7)</sup>、上澄み液をカートリッジカラムに入れ、以下同様に操作する。更に、(4.2)d)の操作の「洗液」を先の共栓遠心沈殿管に加え、試験管ミキサー(ボルテックスミキサー)で振り混ぜ、遠心力約  $740 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(7)</sup>、上澄み液をカートリッジカラムに加え、以下同様に操作する。

**注(5)** (4.2)及び(4.3)は必要に応じて減圧装置を用いる。

**注(6)** 使用したパスツールピペット等は、一連の操作で同じものを使用する。

**注(7)** 回転半径 16.5 cm 及び回転数 2000 rpm で遠心力  $740 \times g$  程度となる。なお、使用する共栓遠心沈殿管 10 mL の遠心力の許容範囲を確認すること。

(4.3) **クリーンアップ(2)**<sup>(5)</sup> クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

- a) ジルコニアコートシリカゲルカートリッジカラムを予めアセトニトリル約 5 mL 及びぎ酸(1+1000)約 5 mL で洗浄する。
- b) (4.2)f)の溶液をカートリッジカラムに負荷<sup>(6)</sup>し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- c) 共栓試験管をアセトニトリル 5 mL で洗浄し、洗液を同じカラムに負荷し充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- d) なす形フラスコ 50 mL<sup>(8)</sup>をカートリッジカラムの下に置き、ぎ酸－アセトニトリル[2+98]<sup>(9)</sup>10 mL をカートリッジカラムに加えて溶出させる。

- e) 溶出液を 40 °C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固させる。
- f) ぎ酸(1+1000) 5 mL を加え、一定量を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管にとる<sup>(10)</sup>。
- g) 遠心力 8000×g~10000×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(11)</sup>、上澄み液を試料溶液とする<sup>(12)</sup>。

**注(8)** 多検体の分析試料を前処理する場合は、試験管 10 mL を用いてもよい。この場合は、溶出液を e) の操作の前に溶出液をなす形フラスコ 50 mL に入れ、先の試験管をアセトニトリル 2.5 mL で 2 回洗浄し、洗浄液を先の溶出液に加える。

(9) 用事調製すること。1 日経過したものを使用すると測定結果に影響を及ぼす。

(10) 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。

(11) 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。

(12) 試料溶液中のクロピラリド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ぎ酸(1+1000)で希釈する。

**備考 8.** (4.3) 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 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

**(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: 20 V
- ⑦ コリジョンエネルギー: 定量用 20 eV、確認用 30 eV
- ⑧ モニターイオン: プリカーサーイオン m/z 192

プロダクトイオン 定量用 m/z 146、確認用 m/z 110

**b) 検量線の作成**

- 1) 各検量線用クロピラリド標準液 5 μL を高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に注入し、クロピラリド

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<sup>(13)</sup>。

- 2) クロピラリドの定量用イオン( $m/z$ )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) 各検量線用クロピラリド標準液の各クロピラリド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  $\mu\text{L}$  を **b) 1)～2)**と同様に操作する<sup>(14)</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(13)** 装置の感度によっては、定量用イオンを確認用イオンとし、確認用イオンを定量用イオンとしても差し支えない。

**注(14)** 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 9.** 真度評価のため、牛ふん堆肥(5点)、馬ふん堆肥(2点)、豚ふん堆肥(4点)、鶏ふん堆肥(4点)及び汚泥発酵肥料(5点)を用いて微量クロピラリド分析法(2)の測定値( $y_i$ : 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～88.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )及び微量クロピラリド分析法(1)の測定値( $x_i$ )を比較した結果、回帰式は  $y = -0.43 + 1.005x$  であり、その相関係数( $r$ )は 0.996 であった。

精度評価のため、堆肥及び汚泥発酵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 1 に示す。

なお、この試験法のクロピラリドの定量下限は 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  程度である。

表1 クロピラリドの日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験	平均値 <sup>2)</sup>	$s_r$ <sup>3)</sup>	$RSD_r$ <sup>4)</sup>	$s_{I(T)}$ <sup>5)</sup>	$RSD_{I(T)}$ <sup>6)</sup>
	日数( $T$ ) <sup>1)</sup>	( $\text{mg}/\text{kg}$ )	( $\text{mg}/\text{kg}$ )	(%)	( $\text{mg}/\text{kg}$ )	(%)
牛ふん堆肥	5	87.2	3.6	4.1	3.6	4.1
豚ふん堆肥	5	2.79	0.29	10.3	0.29	10.3
鶏ふん堆肥	5	20.5	0.8	3.8	3.2	15.8
汚泥発酵肥料	5	6.27	0.36	5.8	0.46	7.3

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値(試験日数( $T$ ) $\times$ 併行試験数(2))

3) 併行標準偏差

4) 併行相対標準偏差

5) 中間標準偏差

6) 中間相対標準偏差

### 参考文献

- 1) 中村信仁, 小塚健志, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による堆肥等中のクロピラリドの測定方法の改良, 肥料研究報告, **12**, 69~83 (2019)

(5) クロピラリドの試験法フローシート 堆肥及び汚泥発酵中のクロピラリドの試験法のフローシートを次に示す。

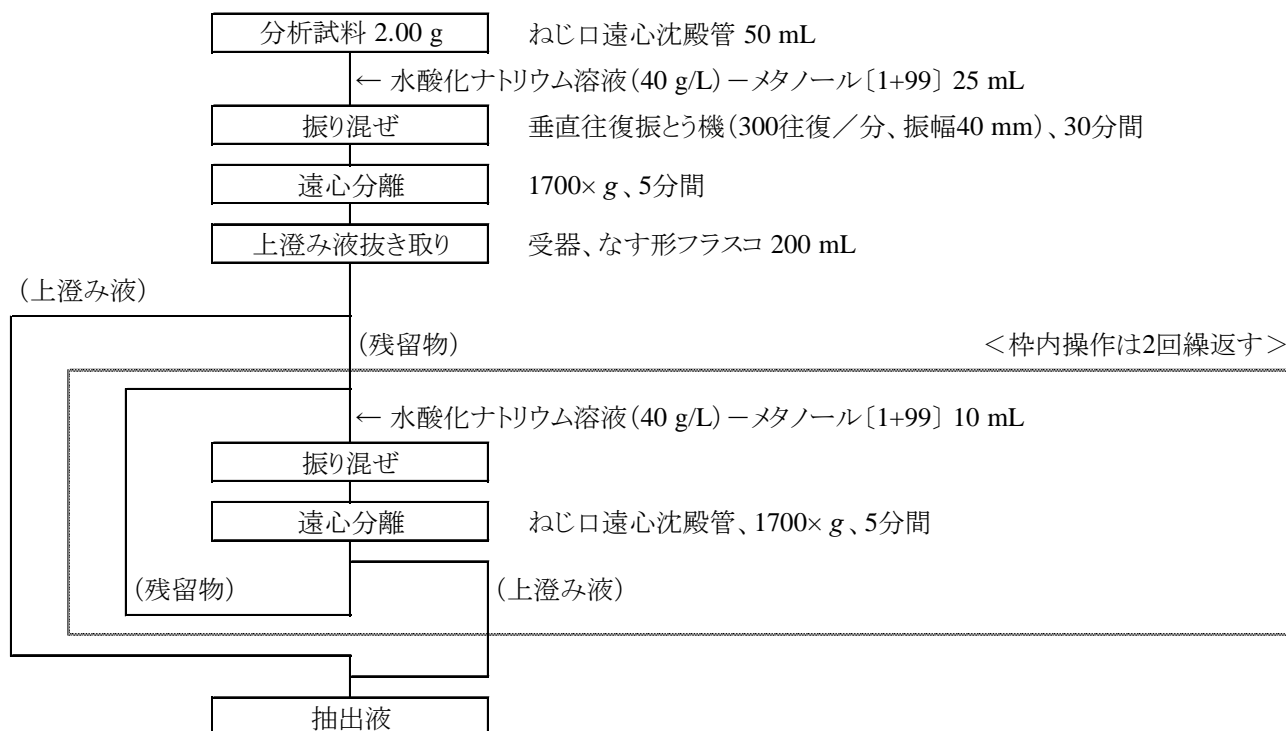


図2-1 堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド試験法フローシート(抽出操作)

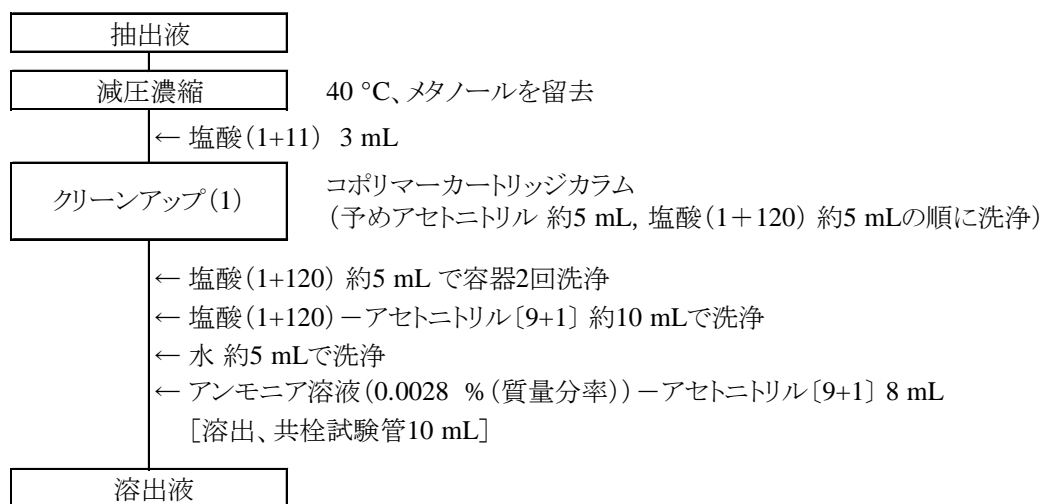


図2-2 堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド試験法フローシート(クリーンアップ(1)操作)

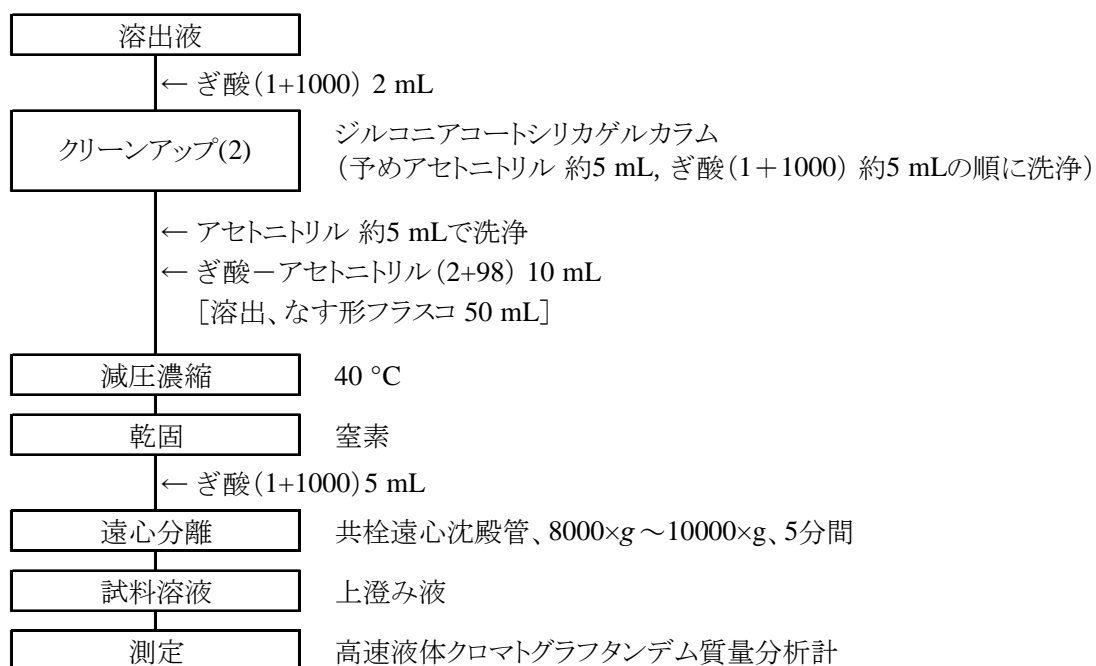
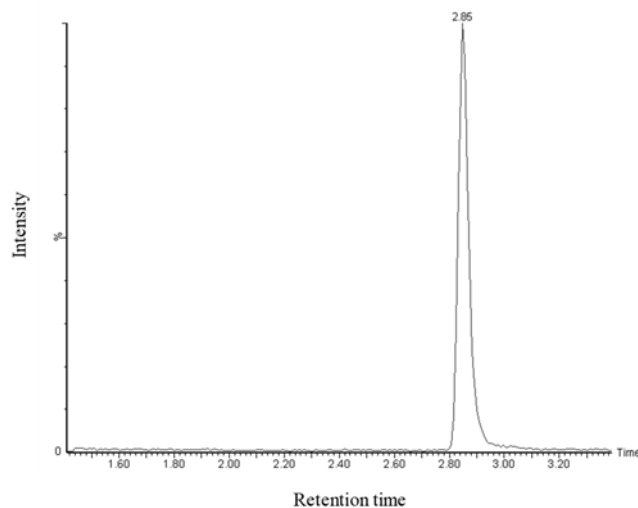


図2-3 堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド試験法フローシート  
(クリーンアップ(2)操作及び測定操作)

**参考** 検量線用クロピラリド標準液の選択反応検出クロマトグラム例を次に示す。



参考図 クロピラリドの SRM クロマトグラム  
クロピラリド標準液(クロピラリドとして 50 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 μm)  
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)

#### 8.3.1 残留農薬多成分分析(その1)

##### 8.3.1.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

この試験法は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。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.3.1.a-2017 又は AG-C-1.a-1 とする。

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タンデム質量分析計(LC-MS/MS)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**: 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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[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富士フィルム和光純薬、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**: JIS K 0136 に規定する高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計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おそれがある。

**(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おそれがある。

(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
エプリノメクチン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  $\mu$ L を高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に注入し、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と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  $\mu$ L 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 $\pm 30$  %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。

#### (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
エブリノメクチン 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

- 1) 解析に用いた試験室数
- 2) 総平均値 ( $n = \text{試験室数} \times \text{繰返し数}$ )
- 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	平均値 <sup>2)</sup>	添加量	回収率	$RSD_r$ <sup>3)</sup>	$RSD_R$ <sup>4)</sup>
		室数 <sup>1)</sup>	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	(%)	(%)	(%)
ピペロニル	家庭園芸用複合肥料肥料1	8	318.2	333.3	95.5	8.1	13.2
プトキシド	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
	家庭園芸用複合肥料1	8	160.7	186.0	86.4	9.3	11.9
ピレトリン I	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
	家庭園芸用複合肥料肥料1	8	131.1	147.3	89.0	6.5	9.7
ピレトリン II	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。

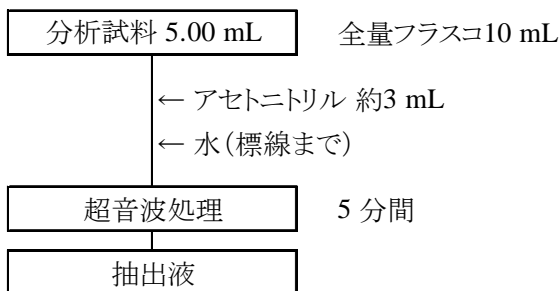


図1 肥料中の残留農薬多成分分析(その1:6種農薬の一斉試験法)フローシート  
(抽出操作)

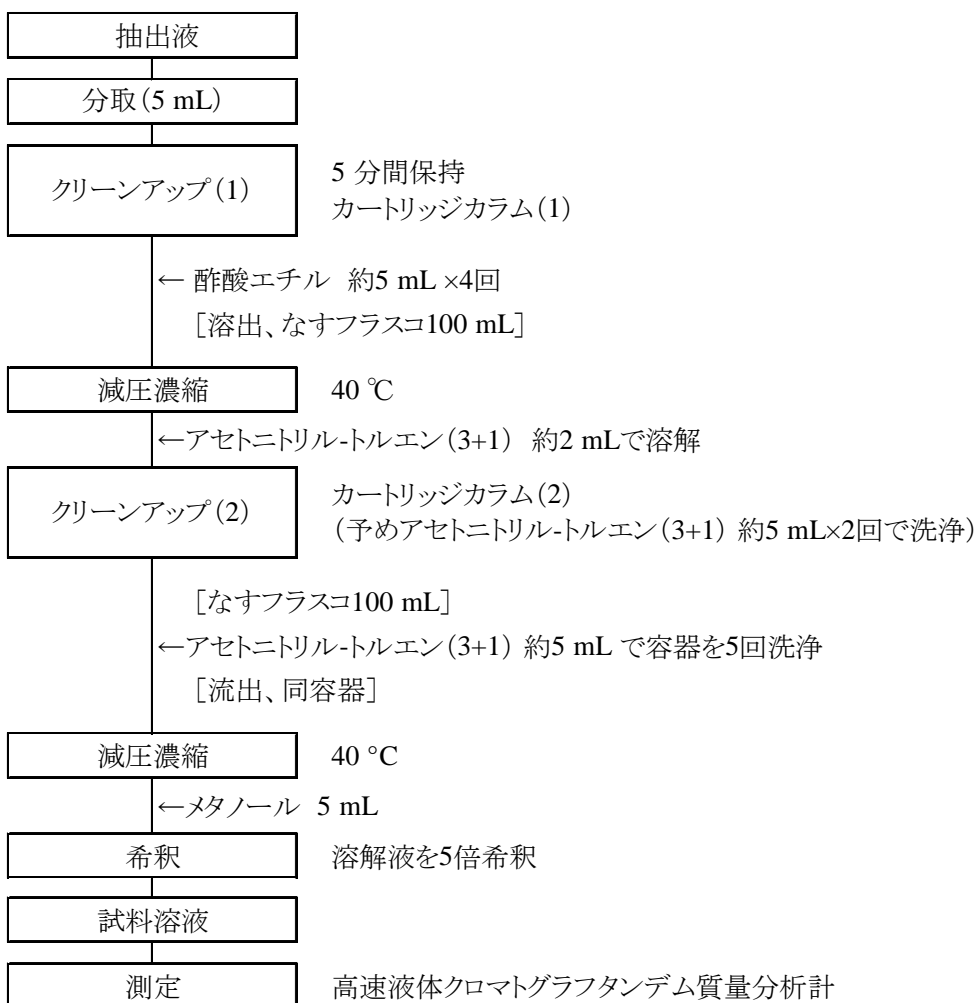
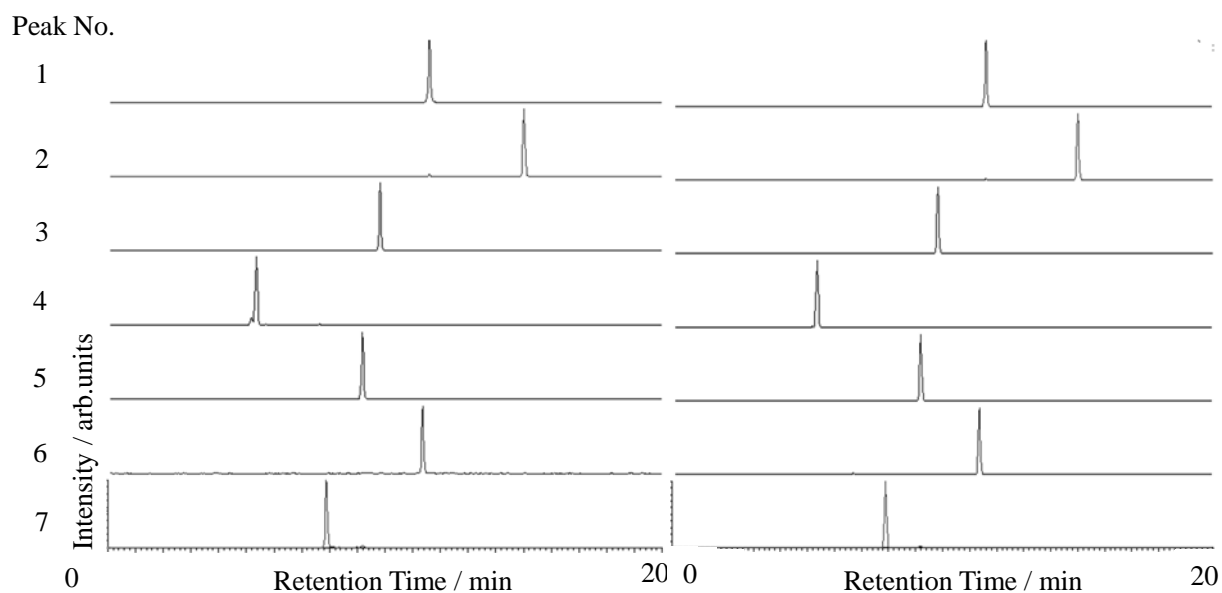


図2 肥料中の残留農薬多成分分析(その1:6種農薬の一斉試験法)フローシート  
(クリーンアップ(1)、クリーンアップ(2)及び測定操作)

**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例を次に示す。



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



## 8.3.2 残留農薬多成分分析(その2)

## 8.3.2.a ガスクロマトグラフ法

(1) **分析対象化合物**  $\beta$ -HCH( $\beta$ -BHC)、 $\gamma$ -HCH( $\gamma$ -BHC)、*o,p'*-DDD、*p,p'*-DDD、*o,p'*-DDE、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、アルドリノ、エンドリン、ディルドリン、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド及びヘキサクロロベンゼン

## (2) 概要

この試験法は堆肥及びその原料となる糞に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.3.2.a-2017 又は AG-C-2.a-1 とする。

肥料又は原料中の各農薬をアセトニトリル及び水で抽出し、多孔性けいそう土カラム、ゲル浸透クロマトグラフ及び合成けい酸マグネシウムカートリッジカラムを用いて精製後、電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフを用いて測定し、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 7 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) **ヘキサン**: JIS K 8825 に規定する(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- d) **塩化ナトリウム**: 残留農薬・PCB 試験用又は同等の品質の試薬。
- e) **シクロヘキサン**: 残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- f) **アセトン**: JIS K 8040 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。
- g) **ジエチルエーテル**: JIS K 8357 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。
- h) **2,2,4-トリメチルペンタン**: 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- i) **各農薬標準液(0.2 mg/mL)<sup>(1)</sup>**:  $\beta$ -HCH( $\beta$ -BHC) [C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>]<sup>(2)</sup>、 $\gamma$ -HCH( $\gamma$ -BHC) [C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>]<sup>(2)</sup>、*o,p'*-DDD [C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup>、*p,p'*-DDD [C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup>、*o,p'*-DDE [C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup>、*p,p'*-DDE [C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup>、*o,p'*-DDT [C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub>]<sup>(2)</sup>、*p,p'*-DDT [C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub>]<sup>(2)</sup>、アルドリノ [C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>6</sub>]<sup>(2)</sup>、エンドリン [C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>6</sub>O]<sup>(2)</sup>、ディルドリン [C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>6</sub>O]<sup>(2)</sup>、*trans*-クロルデン [C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>6</sub>]<sup>(2)</sup>、*cis*-クロルデン [C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>6</sub>]<sup>(2)</sup>、*trans*-ノナクロル [C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>9</sub>]<sup>(2)</sup>、*cis*-ノナクロル [C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>9</sub>]<sup>(2)</sup>、ヘプタクロル [C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>7</sub>]<sup>(2)</sup>、ヘプタクロルエポキシド [C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>7</sub>O]<sup>(2)</sup> 及びヘキサクロロベンゼン [C<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>]<sup>(2)</sup> 約 0.02 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。アセトン 20 mL 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 2,2,4-トリメチルペンタンを加える。
- j) **混合標準液(1 µg/mL)<sup>(1)</sup>**: 各農薬標準液 1 mL を全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1)を加える。
- k) **検量線用混合標準液(0.02 µg/mL~0.2 µg/mL)<sup>(1)</sup>**: 使用時に混合標準液(1 µg/mL)の 1 mL~10 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1)を加える。
- l) **検量線用混合標準液(0.005 µg/mL~0.02 µg/mL)<sup>(1)</sup>**: 使用時に混合標準液(0.1 µg/mL)の 2.5 mL~10 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(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) 標準試薬が市販されている。

**備考 1.** 各農薬の標準試薬は富士フイルム和光純薬、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) **ガスクロマトグラフ(GC):** JIS K 0114 に規定する GC で次の要件を満たすもの。

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、長さ 30 m の熔融シリカ製のキャピラリーカラム。14 %シアノプロピルフェニル-86 %ジメチルポリシロキサンを 0.25  $\mu\text{m}$  厚さでキャピラリーカラム内表面へ化学結合したもの。

3) **検出器:** 電子捕獲検出器(ECD)

b) **ゲル浸透クロマトグラフ(GPC):** JIS K 0135 に規定する分取液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。なお、検出器は必要としない。

1) **試料導入部:** 試料溶液を 5 mL を注入できるもの。

2) **カラム:** 内径 20 mm、長さ 300 mm のステンレス鋼のカラム管にスチレンジビニルベンゼン共重合対系ハードゲルを充てんしたもの。

3) **ガードカラム:** 内径 20 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管にスチレンジビニルベンゼン共重合対系ハードゲルを充てんしたもの。

4) **分画部:** 農薬成分が溶出する画分を設定できるフラクションコレクター

c) **振とう機**

d) **濃縮器:** 40 °C まで調節できるエバポレーター

e) **ろ過器:** 減圧ろ過用漏斗(適合ろ紙径 60 mm)。

f) **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 20 mL)。

g) **合成けい酸マグネシウムカートリッジカラム:** 合成けい酸マグネシウム 910 mg を充てんしたもの。

h) **メンブレンフィルター:** PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)。

**備考 2.** GC 用カラムは DB-1701、Rtx-1701、SPB-1701 等の名称で市販されている。分析対象化合物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。

**備考 3.** GPC は、物質の分子の大きさにより GPC 用カラムの充てん剤でふるい分けられ分離した測定対象物質の画分をフラクションコレクターで収集する分取液体クロマトグラフである。GPC 用カラムは Shodex CLNpak EV-2000 AC 等の名称で市販されている。また、GPC 用ガードカラムは Shodex CLNpak EV-G AC 等の名称で市販されている。

**備考 4.** 減圧ろ過用漏斗は桐山漏斗 SB-60、桐山漏斗 SU-60 等の名称で市販されている。

**備考 5.** 多孔性けいそう土カートリッジは Chem Elut (20 mL) 等の名称で市販されている。

**備考 6.** 合成けい酸マグネシウムは Sep-Pak Florisil Plus Long Cartridge (910 mg) 等の名称で市販されている。

**備考 7.** メンブレンフィルターは HLC-DISK 25 溶媒系(孔径 0.45  $\mu\text{m}$ )、DISMIC 25JP050、Millex FH(直径 25 mm、孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ) 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 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。

- b) アセトニトリル-水(3+1) 20 mL を加えて潤す。
- c) 10 分間放置後、更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜる。
- d) 300 mL のなす形フラスコをろ過器の下に置き、抽出液をろ紙(5 種 B)で減圧ろ過する。
- e) 先の三角フラスコ及び残留物を順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に減圧ろ過し、d) のろ液と合わせて抽出液とする。

**(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) 抽出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮する。
- b) 塩化ナトリウム飽和溶液 20 mL を加え、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、約 5 分間放置させる。
- c) なすフラスコ 300 mL を同カートリッジカラムの下に置き、容器をヘキサン約 20 mL で 3 回洗浄し、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。
- d) 更にヘキサン約 60 mL を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。
- e) 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>(3)</sup>、シクロヘキサン-アセトン(4+1) 10 mL を加えて残留物を溶かす。
- f) メンブランフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過する。

**注 (3)** 乾固させすぎると農薬が揮散するおそれがある。

**(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) (5.2)e) のろ液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、b) の操作条件により定量する各農薬が溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取する。
- b) **ゲル浸透クロマトグラフの操作条件:** ゲル浸透クロマトグラフの操作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:** スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム(内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 μm)
  - 2) **ガードカラム:** スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム(内径 20 mm、長さ 100 mm、粒径 15 μm)
  - 3) **溶離液:** シクロヘキサン-アセトン(4+1)
  - 4) **流量:** 5 mL/min
  - 5) **分取画分:** 70 mL~120 mL
- 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>(3)</sup>、ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かす。

**(5.4) クリーンアップ(3)** クリーンアップ(3)は、次のとおり行う。

- a) 合成けい酸マグネシウムカートリッジカラム(910 mg)をヘキサン約 5 mL で洗浄する。
- b) なすフラスコ 50 mL を同カートリッジカラムの下に置き、(5.3)c) の溶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) 容器をヘキサン約 2 mL で 2 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) 更に、ヘキサノジエチルエーテル(9+1) 15 mL を同カートリッジに加えて各測定対象物質を溶出させる。
- e) 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>(3)</sup>、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1) 1 mL<sup>(4)</sup>を加えて残留物を溶かし、試料溶液とする。

注(4) 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2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1)で希釈する。

(5.4) 測定 測定は、JIS K 0114 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の操作方法による。

a) **ガスクロマトグラフの測定条件** ガスクロマトグラフ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) **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**: 250 °C
- 3) **キャピラリーカラム**: 14 %シアノプロピルフェニル-86 %ジ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、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)
- 4) **カラム槽温度**: 60 °C(1 min)→(20 °C/min)→180 °C→(2 °C/min)→260 °C→(5 °C/min)→275 °C(1 min)
- 5) **キャリアーガス**: ヘリウム、**流量**: 1.5 mL/min
- 6) **付加ガス**: 窒素、**流量**: 60 mL/min
- 7) **検出器**: 電子捕獲検出器(ECD)
- 8) **検出器温度**: 280 °C

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用混合標準液 1 μL を GC に注入し、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ピーク面積又は高さと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 1 μL を b) 1) と同様に操作する。
- 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。

**備考 8.** 堆肥中の分析対象化合物の回収試験の結果は、20 μg/kg 及び 50 μg/kg の添加レベルで平均回収率が 82.1 %～118.1 % 及び 62.5 %～120.2 % であった。精度の評価のため、堆肥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、同時に検討した α-HCH(α-BHC)、δ-HCH(δ-BHC)、オキシクロルデンは満足する回収率が得られなかったので分析対象化合物から外した。

なお、この試験法の各農薬の定量下限は 20 μg/kg 以下である。

表1 残留農薬多成分分析日を変えての反復試験成績の解析結果

農薬名	反復試験 日数( $T$ ) <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$s_r$ <sup>3)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$RSD_r$ <sup>4)</sup> (%)	$s_{I(T)}$ <sup>5)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$RSD_{I(T)}$ <sup>6)</sup> (%)
$\beta$ -BHC	5	15.7	1.3	8.3	2.0	12.8
$\gamma$ -BHC	5	14.7	1.3	8.6	1.6	10.9
ヘキサクロベンゼン	5	15.3	1.4	9.3	2.5	16.0
ヘプタクロル	5	16.9	1.1	6.7	2.4	14.3
アルドリン	5	12.8	1.0	7.8	3.4	26.4
ヘプタクロルエポキシド(1)	5	17.8	2.0	11.1	1.6	9.0
ヘプタクロルエポキシド(2)	5	17.9	1.8	10.1	1.8	10.0
<i>trans</i> -クロルデン	5	17.6	1.7	9.9	1.9	10.8
<i>cis</i> -クロルデン	5	17.8	1.3	7.2	2.0	11.3
<i>trans</i> -ノナクロル	5	15.9	1.3	8.3	1.5	9.6
<i>cis</i> -ノナクロル	5	16.7	1.5	8.8	2.1	12.4
ディルドリン	5	16.6	1.4	8.5	2.0	11.9
エンドリン	5	17.8	1.4	7.9	1.7	9.5
<i>o,p'</i> -DDE	5	18.7	2.7	14.4	2.7	14.6
<i>p,p'</i> -DDE	5	16.8	1.6	9.8	1.8	10.9
<i>o,p'</i> -DDD	5	16.9	1.2	7.3	1.3	7.8
<i>p,p'</i> -DDD	5	16.3	1.7	10.7	1.8	10.9
<i>o,p'</i> -DDT	5	17.9	1.4	7.8	2.2	12.0
<i>p,p'</i> -DDT	5	16.6	1.4	8.1	2.2	13.0

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値(試験日( $T$ ) $\times$ 併行試験数(2))

3) 併行標準偏差

4) 併行相対標準偏差

5) 中間標準偏差

6) 中間相対標準偏差

## 参考文献

- 野崎友春: ガスクロマトグラフ(質量分析計)(GC(-MS))法による堆肥等中の塩素系農薬の測定, 肥料研究報告, **10**, 41~60 (2017)

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

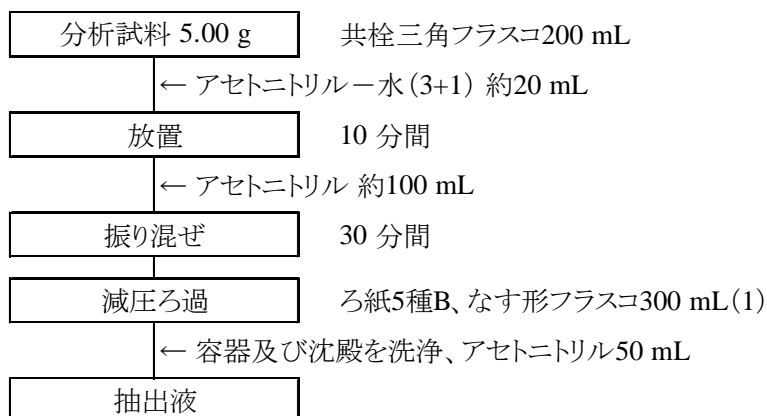


図1 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート  
(抽出操作)

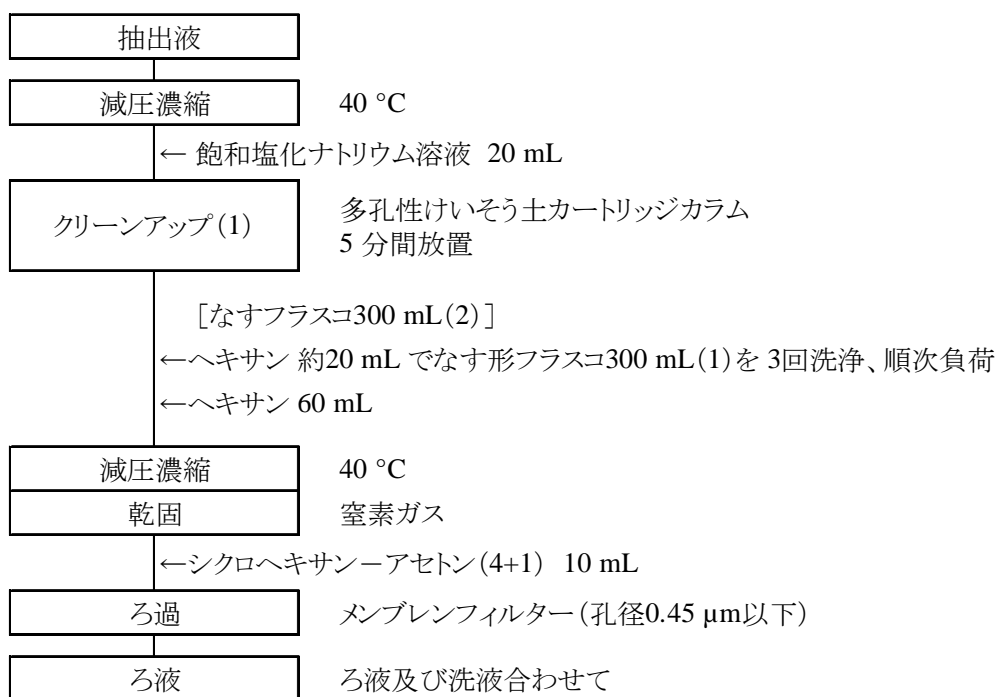


図2 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート  
(クリーンアップ(1)操作)

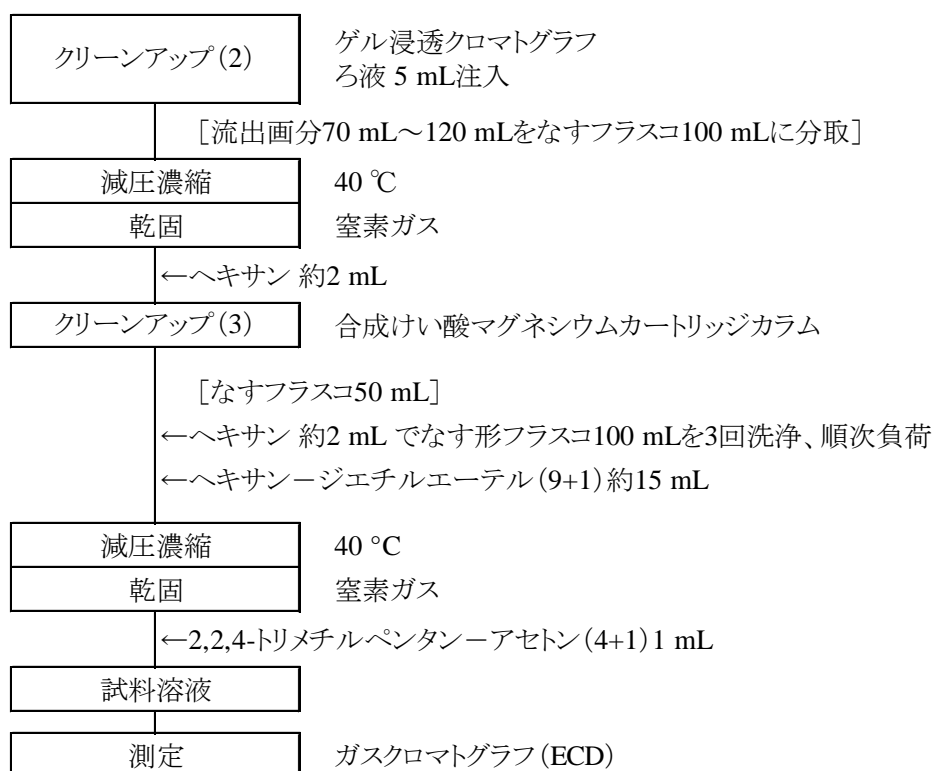


図3 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート  
(クリーンアップ(2)、クリーンアップ(3)及び測定操作)

## 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。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.4.a-2017 又は Na.a-1 とする。

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 又は 589.6 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 K 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<sup>(4)</sup>。
- 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 に移し入れる。
- 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)** 炭化及び灰化操作例：室温から約 250 °C まで 30 分間～1 時間で昇温した後 1 時間程度加熱し、更に 550 °C まで 1 時間～2 時間で昇温する。

**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 ナトリウムの日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験 日数( $T$ ) <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> (%)	$s_{I(T)}$ <sup>6)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_{I(T)}$ <sup>7)</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

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) 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試験法のフローシートを次に示す。

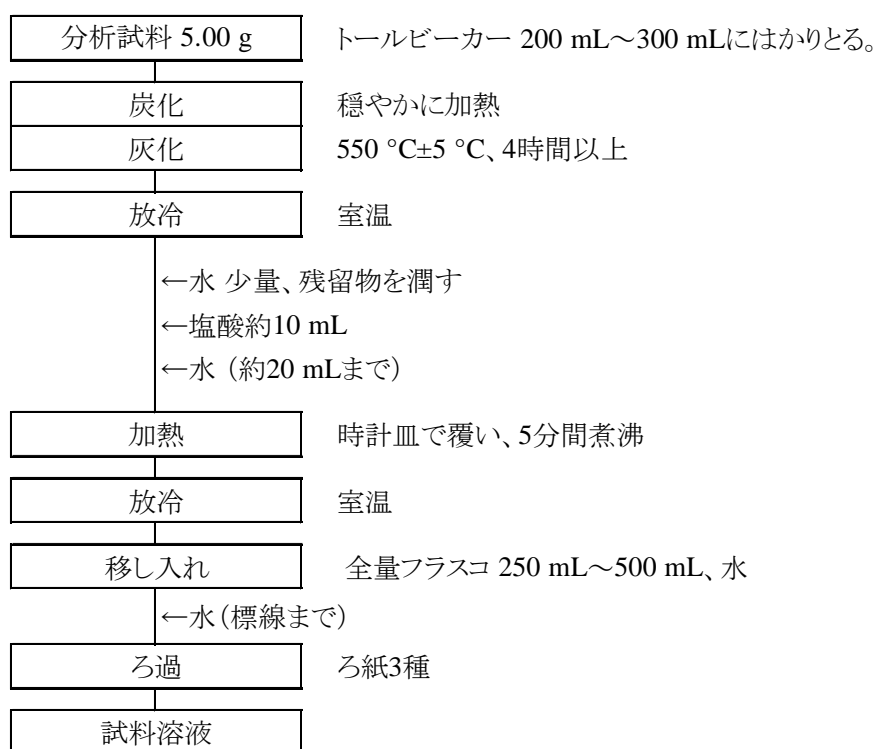


図1 肥料中のナトリウム試験法フローシート (抽出操作)

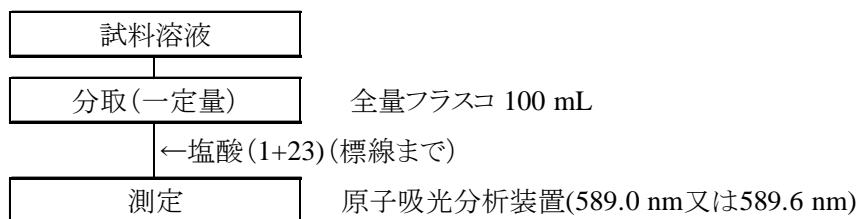


図2 肥料中のナトリウム試験法フローシート(測定操作)

## 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。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.5.a-2017 又は GU-N.a-1 とする。

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(GU-N)を求める。この方法の性能は備考 6 に示す。

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(Gd-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(GU-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(GU-N 200 µg/mL): グアニル尿素性窒素標準液(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) 検量線用グアニル尿素性窒素標準液(GU-N 50 µg/mL～100 µg/mL): グアニル尿素性窒素標準液(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) 検量線用グアニル尿素性窒素標準液(GU-N 1 µg/mL～50 µg/mL): 使用時にグアニル尿素性窒素標準液(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: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフ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 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。

##### (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 分間遠心分離し<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(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 $\sim$ 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>(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 分間遠心分離し<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ル尿素性窒素(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 4.0 mm $\sim$ 7.5 mm、長さ 100 mm $\sim$ 150 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$  $\sim$ 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 μm 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 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク高さを求める。
- 2) 各検量線用標準液のグアニル尿素性窒素(GU-N)濃度と波長 190 nm のピーク高さと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) ピーク高さから検量線よりグアニル尿素性窒素(GU-N)量を求め、分析試料中のグアニル尿素性窒素(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(Gd-N)及びグアニル尿素性窒素標準液(GU-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。

**備考 6.** 真度の評価のため、グアニル尿素肥料様調製試料 1 銘柄を用いて添加回収試験を実施した結果、36.7 % (質量分率)、35.2 % (質量分率)及び 33.4 % (質量分率)の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 103.8 %、104.6 %及び 105.6 %であった。

精度の評価のため、グアニル尿素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 1 に示す。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、この試験法の定量下限は 0.006 % (質量分率)程度である。

表1 グアニル尿素性窒素の日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験	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>
	日数(T) <sup>1)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%)	(%) <sup>3)</sup>	(%)
グアニル尿素肥料	5	37.0	0.3	0.7	0.3	0.8

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

表2 グアニル尿素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> (%)
化成肥料1	12	2.20	0.09	4.2	0.17	7.7
化成肥料2	11	4.38	0.07	1.5	0.19	4.3
化成肥料3	11	5.83	0.08	1.4	0.52	8.9
化成肥料4	12	7.43	0.43	5.7	0.78	10.5
グアニル尿素肥料	12	30.3	0.4	1.5	1.1	3.6

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) 恵智正宏, 木村康晴, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 - 単一試験室の妥当性確認 -, 肥料研究報告, **10**, 72~85 (2017)
- 2) 船木紀夫, 木村康晴: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 - 共同試験成績 -, 肥料研究報告, **10**, 86~100 (2017)

(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。

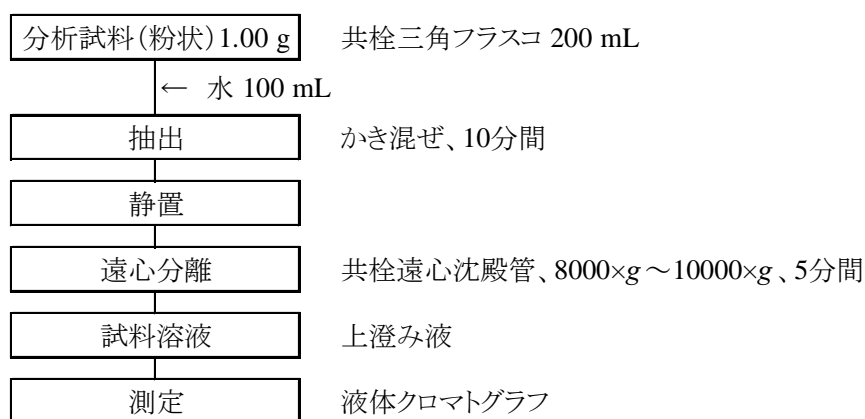


図1 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.1)及び測定)

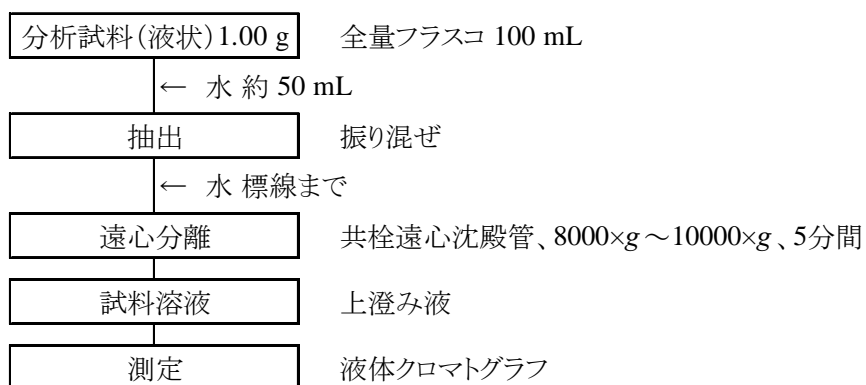
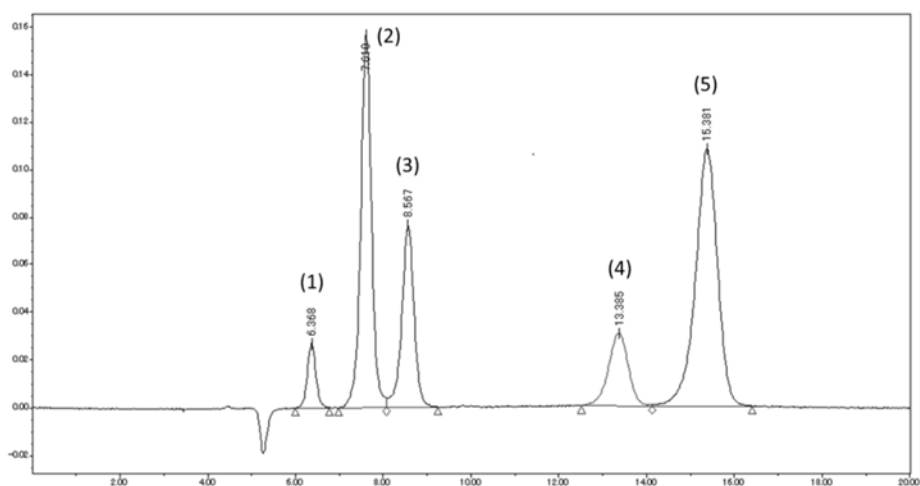


図2 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.2)及び測定)

**参考** グアニル尿素性窒素の検量線用標準液のクロマトグラム例を次に示す。



参考図 検量線用混合標準液(各 10 mg/L)の HPLC クロマトグラム

ピーク名

- (1) 尿素性窒素 (2) ビウレット性窒素 (3) ジシアンジアミド性窒素  
 (4) グアニジン性窒素 (5) グアニル尿素性窒素

HPLC の測定条件

カラム: Asahipak ES-502C 7C(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 9 μm)

その他の条件は(4.2) a) HPLC 測定条件の例示のとおり



## 8.6 尿酸

### 8.6.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。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.6.a-2018 又は U-acid.a-1 とする。

分析試料にりん酸塩溶液(pH 8)を加えて尿酸を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、マルチモード ODS(逆相+強アニオン交換+強カチオン交換+順相)カラムで分離し、波長 290 nm で測定し、分析試料中の尿酸(U-acid)を求める。この方法の性能は備考 5 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。ただし、高速液体クロマトグラフに導入する溶離液については同 A4 の水を使用する。
- b) **りん酸二水素カリウム**: JIS K 9007 に規定する試薬又は同等の品質のもの。
- c) **りん酸水素二ナトリウム**: JIS K 9020 に規定する試薬又は同等の品質のもの。
- d) **りん酸塩溶液**: りん酸二水素カリウム 9.073 g を水に溶かして 1000 mL としたもの、及びりん酸水素二ナトリウム 9.464 g を水に溶かして 1000 mL としたものを、pH 8.0±0.1 になるよう混合したものを。
- e) **炭酸リチウム溶液**: 純度 99 % (質量分率)以上の炭酸リチウム(Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)0.739 g を水に溶かして 1000 mL としたもの。
- f) **尿酸標準液(U-acid 1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: 尿酸 0.100 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。少量の炭酸リチウム溶液に溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで炭酸リチウム溶液を加える。
- g) **検量線用尿酸標準液(U-acid 100 µg/mL)**: 尿酸標準液(U-acid 1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までりん酸塩溶液を加える。
- h) **検量線用尿酸標準液(U-acid 10 µg/mL~50 µg/mL)**: 尿素性窒素標準液(U-acid 100 µg/mL) 10 mL~50 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までりん酸塩溶液を加える。
- i) **検量線用尿酸標準液(U-acid 0.1 µg/mL~5 µg/mL)**: 使用時に尿酸標準液(U-acid 10 µg/mL) 1 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までりん酸塩溶液を加える。
- j) **酢酸アンモニウム**: JIS K 8359 に規定する試薬又は同等の品質のもの
- k) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフ用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。

#### (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**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4.6 mm、長さ 250 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 3 µm のオクタデシル基、強酸性用イオン交換基及び強塩基性陰イオン交換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) **検出器**: 吸光光度検出器で波長 290 nm 付近で測定できるもの。
- b) **水浴**: 60 °C±2 °C に調節できるもの。
- c) **マグネチックスターラー**

- 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。

**備考 1.** カラムは Scherzo SS-C18 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) リン酸塩溶液 100 mL を加え<sup>(2)</sup>、60 °C±2 °C の水浴中で 10 分ごとに振り混ぜながら<sup>(3)</sup> 30 分間加熱する。  
 c) 直ちにマグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。  
 d) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 15 mL 又は 50 mL にとり、遠心力 1700×g で約 10 分間遠心分離する<sup>(5)</sup>。  
 e) 上澄み液<sup>(6)</sup>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 分間遠心分離し<sup>(7)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (2)** 溶液を加熱するため、ガラス栓に替えてシリコン栓を用いる。

(3) 蒸気でシリコン栓が飛び易いので指で軽くシリコン栓を上から押さえながら、フラスコ内壁の水滴をできるだけ落とすように振る。なお、加熱操作前後にもこの操作を行う。

(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 3000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。

(6) 試料溶液中の尿酸(U-acid)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リン酸塩溶液で希釈する。

(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 2.** (4.1)e)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 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**：オクタデシル基、強酸性用イオン交換基及び強塩基性陰イオン交換基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 3 μm)
- 2) **カラム槽温度**：40 °C
- 3) **溶離液**<sup>(1)</sup>：酢酸アンモニウム 1.54 g を水に溶かして 1000 mL としたものを 900 mL とり、メタノール 100 mL と混合する。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。
- 4) **流量**：0.4 mL/min
- 5) **注入量**：10 μL
- 6) **検出器**：吸光光度検出器、測定波長 290 nm

**備考 3.** 溶離液は、酢酸アンモニウム 15.4 g を水に溶かして 1000 mL として冷蔵保存し、使用時にそ

の一定量を 10 倍に希釈し、体積比で 1/9 のメタノールと混合後、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  $\mu\text{L}$  を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 290 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積または高さを求める。
- 2) 各検量線用標準液の尿酸(U-acid)濃度と波長 290 nm のピーク面積または高さの検量線を作成する。

#### c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10  $\mu\text{L}$  を b) 1) と同様に操作する。
- 2) ピーク面積または高さから検量線より尿酸(U-A)量を求め、分析試料中の尿酸(U-A)を算出する。

**備考 4.** この測定方法(Scherzo SS-C18 カラムを用いた場合)では、尿酸に加えアラントイン及びアラントイン酸を同時に測定することができる。なお、アラントイン及びアラントイン酸の検出波長は 210 nm である。

**備考 5.** 真度の評価のため、化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 銘柄を用いて添加回収試験を実施した結果、0.1 % (質量分率)、0.01 % (質量分率)及び 0.005 % (質量分率)の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 92.4 % ~ 101.8 %、85.3 % ~ 105.0 % 及び 92.5 % ~ 114.1 % であった。

精度の評価のため、化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 銘柄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 0.0008 % (質量分率)程度である。

表1 尿酸の日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験	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>
	日数( $T$ ) <sup>1)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%)	(%) <sup>3)</sup>	(%)
化成肥料	7	0.0989	0.0006	0.6	0.0015	1.6
	7	0.0102	0.0001	0.7	0.00042	4.2
汚泥発酵肥料	7	0.0932	0.0004	0.5	0.0016	1.7
	7	0.00938	0.00009	0.9	0.00031	3.3
混合堆肥複合肥料	7	0.0924	0.0004	0.4	0.0015	1.7
	7	0.00921	0.00005	0.6	0.00032	3.5
堆肥	7	0.101	0.001	1.3	0.0029	2.8
	7	0.00966	0.00018	1.8	0.00049	5.0

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値 (試験日数( $T$ ) $\times$ 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

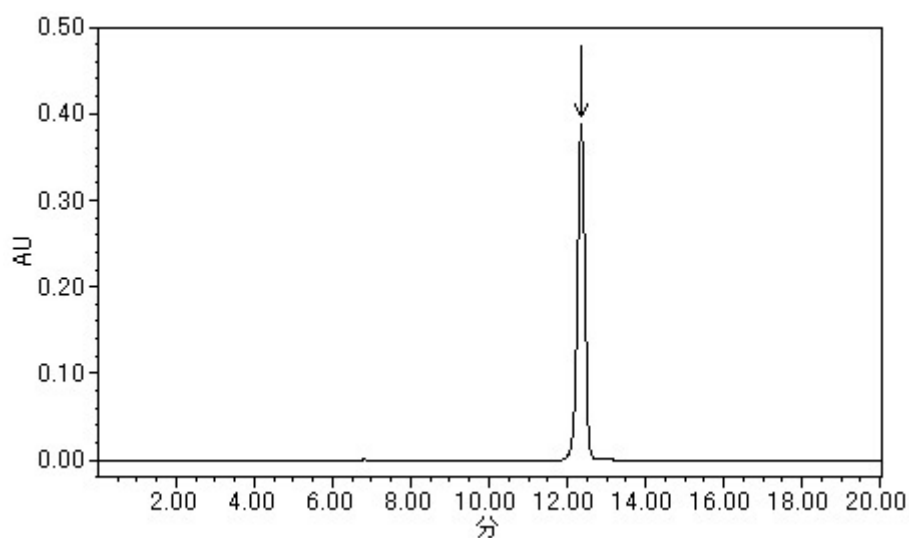
- 1) 船木紀夫: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿酸の測定, 肥料研究報告, 11, 86~105

(2018)

(5) **試験法フローシート** 肥料中の尿酸試験法のフローシートを次に示す。

分析試料(粉状) 1.00 g	共栓三角フラスコ 200 mL
	← リン酸塩溶液 100 mL
加熱	60 °C±2 °C、10分間ごとにふり混ぜながら30分間
抽出	かき混ぜ、10分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、1700×g、10分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、8000×g～10000×g、5分間
試料溶液	上澄み液
測定	液体クロマトグラフ

図 肥料中の尿酸試験法のフローシート

**参考** 尿酸の検量線用標準液のクロマトグラム例を次に示す。

参考図 検量線用尿酸標準液(50 µg/mL)の HPLC クロマトグラム

ピーク名 (↓) 尿酸

HPLC の測定条件

カラム: Scherzo SS-C18(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 3 µm)

その他の条件は(4.2) a) HPLC 測定条件の例示のとおり

## 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 1、2、3、4、5、6、7)

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の条件(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、測定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。

### (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<sup>8, 9, 10, 11)</sup>

##### (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。

### (3.3) 検量線<sup>8, 12, 13)</sup>

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。

### (3.4) 真度<sup>7, 8, 12, 14, 15)</sup>

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)に対する警戒限界以内であること、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.** 警戒限界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( $\mu$ )に対する警戒限界

$$= \mu \pm 2 \times \sqrt{(s_R^2 - s_r^2) + \frac{s_r^2}{n}} = \mu \pm 2 \times \sqrt{s_L^2 + \frac{s_r^2}{n}} \quad \cdots(2)$$

$\mu$ : 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。

### (3.5) 精度 8、12、16、17)

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。

### (3.6) 定量下限(LOQ)<sup>7、11)</sup>

(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。

### (3.7) 検出下限(LOD)<sup>7,11)</sup>

(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 % のスチューデント値<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 % のスチューデント値

$n$ : 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。

### (3.8) 頑健性<sup>7, 11, 12)</sup>

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) 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)
- 8) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 9) JIS K 0114: ガスクロマトグラフィー通則 (2012)
- 10) JIS K 0124: 高速液体クロマトグラフィー通則 (2011)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) CLSI EP9 A2 Ed. 2, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples, Clinical and Laboratory Standards Institute (2002)
- 14) 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)
- 15) Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Procedural manual Twenty-second edition, Codex Alimentarius Commission (2013)
- 16) AOAC Official Methods of Analysis Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)
- 17) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)

### 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。

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + \beta_i + e_{ij} \quad \cdots \text{(R2.1)}$$

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + N(0, \sigma_L^2) + N(0, \sigma_r^2) \quad \cdots \text{(R2.2)}$$

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + N(0, \sigma_{(T)}^2) + N(0, \sigma_r^2) \quad \cdots \text{(R2.3)}$$

$\mu$ : 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	$x_{31}$	$x_{32}$	$x_{33}$	...	$x_{3j}$	...	$x_{3n}$
...	...	...	...	...	...	...	...
$i$	$x_{i1}$	$x_{i2}$	$x_{i3}$	...	$x_{ij}$	...	$x_{in}$
...	...	...	...	...	...	...	...
$p$	$x_{p1}$	$x_{p2}$	$x_{p3}$	...	$x_{pj}$	...	$x_{pn}$

(2) 共同試験成績による空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( $S$ )	自由度( $\phi$ )	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>。

$$\text{併行分散}(s_r^2) = V_r \quad \cdots \text{(R2.4)}$$

$$\text{純粋な室間分散}(s_L^2) = \frac{V_L - V_r}{n} \quad \cdots \text{(R2.5)}$$

$$\text{室間再現分散}(s_R^2) = s_L^2 + s_r^2 \quad \cdots \text{(R2.6)}$$

$V_r$ : 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>。

$$\text{併行標準偏差}(s_r) = \sqrt{s_r^2} \quad \cdots \text{(R2.7)}$$

$$\text{室間再現標準偏差}(s_R) = \sqrt{s_R^2} \quad \cdots \text{(R2.8)}$$

$$\text{併行相対標準偏差}(RSD_r, \%) = \frac{s_r}{m} \times 100 \quad \cdots \text{(R2.9)}$$

$$\text{室間再現相対標準偏差}(RSD_R, \%) = \frac{s_R}{m} \times 100 \quad \cdots \text{(R2.10)}$$

$m$ : 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に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( $S$ )	自由度( $\phi$ )	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>。

$$\text{併行分散}(s_r^2) = V_r \quad \dots \quad (\text{R2.11})$$

$$\text{日間分散}(s_{(T)}^2) = \frac{V_T - V_r}{n} \quad \dots \quad (\text{R2.12})$$

$$\text{中間分散}(s_{I(T)}^2) = s_{(T)}^2 + s_r^2 \quad \dots \quad (\text{R2.13})$$

$V_r$ : 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>。

$$\text{併行標準偏差}(s_r) = \sqrt{s_r^2} \quad \dots \quad (\text{R2.14})$$

$$\text{中間標準偏差}(s_{I(T)}) = \sqrt{s_{I(T)}^2} \quad \dots \quad (\text{R2.15})$$

$$\text{併行相対標準偏差}(RSD_r, \%) = \frac{s_r}{m} \times 100 \quad \dots \quad (\text{R2.16})$$

$$\text{中間相対標準偏差}(RSD_{I(T)}, \%) = \frac{s_{I(T)}}{m} \times 100 \quad \dots \quad (\text{R2.17})$$

$m$ : 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( $S$ )	自由度( $\varphi$ )	不偏分散( $V$ )	分散の期待値( $E(V)$ )
試料1	日間( $T$ )	1.0570	6	0.17616	$\sigma_r^2 + n \times \sigma_{I(T)}^2$
	偶然誤差( $e$ )	0.1253	7	0.01789	$\sigma_r^2$
試料2	日間( $T$ )	0.0478	6	0.00797	$\sigma_r^2 + n \times \sigma_{I(T)}^2$
	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	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>	$= \sqrt{s_r^2}$	$= \sqrt{0.01789}$	0.13 (%) <sup>4)</sup>
併行相対標準偏差( $RSD_r$ ) <sup>3)</sup>	$= (s_r/m) \times 100$	$= (0.1338/51.38) \times 100$	0.3 (%)
日間分散( $s_{(T)}^2$ )	$= (V_T - V_r)/n$	$= (0.17616 - 0.01789)/2$	0.07914
中間(日間)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>	$= \sqrt{s_{I(T)}^2}$	$= \sqrt{0.09703}$	0.31 (%) <sup>4)</sup>
中間相対標準偏差( $RSD_{I(T)}$ ) <sup>3)</sup>	$= (s_{I(T)}/m) \times 100$	$= (0.3115/51.38) \times 100$	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。
- 4) 質量分率

表6-2 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	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>	$= \sqrt{s_r^2}$	$= \sqrt{0.00640}$	0.08 (%) <sup>4)</sup>
併行相対標準偏差( $RSD_r$ ) <sup>3)</sup>	$= (s_r/m) \times 100$	$= (0.0800/5.10) \times 100$	1.6 (%)
日間分散( $s_{(T)}^2$ )	$= (V_T - V_r)/n$	$= (0.00797 - 0.00640)/2$	0.00078
中間(日間)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>	$= \sqrt{s_{I(T)}^2}$	$= \sqrt{0.00718}$	0.08 (%) <sup>4)</sup>
中間相対標準偏差( $RSD_{I(T)}$ ) <sup>3)</sup>	$= (s_{I(T)}/m) \times 100$	$= (0.0848/5.10) \times 100$	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の各相対標準偏差の2.0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		
	室間再現相対標準偏差	中間相対標準偏差	併行相対標準偏差	室間再現相対標準偏差	中間相対標準偏差	併行相対標準偏差
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
≥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、各相対標準偏差の2.0倍まで許容する。

## 肥料等試験法(2020)の解説

農林水産省農業環境技術研究所(現在の「国立研究開発機構農業・食品産業技術総合研究機構」)が定めた「肥料分析法」は、肥料の品質又は表示方法を規定している農林水産省告示(「肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格等を定める等の件」等)に採用され、肥料の品質保全と安全性の確保に貢献して貢献してきた。2020年2月28日、これらの農林水産省告示の改正により、有効成分、有害成分等の分析法として独立行政法人農林水産消費安全技術センター(以下、「FAMIC」)が定める「肥料等試験法」が採用された。

「肥料等試験法」は、「肥料分析法」に加えて新しい分析機器を用いた簡便な試験法並びに新たな成分及び肥料に対応する試験法の性能を確認した結果をとりまとめ、FAMIC に設置した肥料等技術検討会において有識者及び農林水産省の担当官からの意見を踏まえて編集され、FAMIC において公表してきた。

「肥料等試験法」の編集にあたっては、使用する試薬、機器等を JIS 規格等で規定することにより明確にし、認証された標準液及び滴定液を利用できるように改正し、試験法ごとに操作のフローシートを追加記載して、分析者が作業しやすいよう工夫するなど、より分かり易い記載となるよう心懸けた。また、各試験法について妥当性確認のレベルによって分類されたタイプ(く溶性りん酸 4.2.3.a 例:Type B)、改定年又は改訂履歴がわかる試験法(く溶性りん酸 4.2.3.a 例:4.2.3.a-2018 又は C-P.a-2)の記号を、適用範囲に記載した。また、妥当性確認を実施された試験法については真度、精度等の成績を備考に記載した。

「肥料等試験法(2020)」では、FAMIC の調査研究課題として①2019年度に新たに検討した試験法を追加し、②共同試験を実施して複数試験室による妥当性を確認した試験法の分類を Type B に改正した。また、③サンプリング方法に関する記述、肥料等技術検討会において指摘を受けた試験操作の記述等を改正した。

### ① 新しく追加された試験法

- 4.5.3 く溶性石灰 4.5.3.a フレーム原子吸光法
- 4.5.3 く溶性石灰 4.5.3.b ICP 発光分光分析法
- 6.10.1 硫酸イオン 6.10.1.a イオンクロマトグラフ法

### ② 試験法の分類が Type B に変わった試験法

- 4.2.4 水溶性りん酸 4.2.4.d ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.3.3 水溶性加里 4.3.3.d ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.4.1 可溶性けい酸 4.4.1.a ふっ化カリウム法
- 4.5.4 水溶性カルシウム 4.5.4.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.6.1 苦土全量 4.6.1.a フレーム原子吸光法
- 4.6.2 可溶性苦土 4.6.2.a フレーム原子吸光法
- 4.6.3 く溶性苦土 4.6.3.a フレーム原子吸光法
- 4.6.4 水溶性苦土 4.6.4.a フレーム原子吸光法
- 4.6.4 水溶性苦土 4.6.4.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.7.2 く溶性マンガン 4.7.2.a フレーム原子吸光法
- 4.7.3 水溶性マンガン 4.7.3.a フレーム原子吸光法
- 4.7.3 水溶性マンガン 4.7.3.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.8.1 く溶性ほう素 4.8.1.a アゾメチン H 法

- 4.8.2 水溶性ほう素 4.8.2.a アゾメチン H 法
- 4.8.2 水溶性ほう素 4.8.2.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.9.2 水溶性亜鉛 4.9.2.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.10.2 水溶性銅 4.10.2.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.13.1 水溶性鉄 4.13.1.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.14.1 水溶性モリブデン 4.14.1.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)
- 4.15.1 水溶性コバルト 4.15.1.b ICP 発光分光分析法(液状肥料)

③ 改正した記述

- ・ 2.1 サンプルングでは、「肥料分析法(1992年版)による。」を、新設された「肥料のサンプルング方法(2020)」を参照する。」に改正した。
- ・ 「ICP 発光分光分析法」において装置の機構・型式で影響を受ける測定条件の設定に関する留意事項(備考)をより明確な記述に改正した。
- ・ 「ICP 発光分光分析法」を用いて他成分同時分析を実施する場合の検量線用標準液の調製及び分析線波長の一覧表を 4.2.3 く溶性りん酸 4.2.3.d ICP 発光分光分析法の備考 7 及び 4.2.4 水溶性りん酸 4.2.4.d ICP 発光分光分析法の備考 7 に記述した。
- ・ 各試験法の妥当性確認成績など情報が記載された文献を追加した。

また、「肥料等試験法(2020)」と「肥料分析法(1992年版)」の整合性及び改訂内容などの情報を「肥料等試験法(2020)の性能評価と肥料分析法(1992年版)との比較」(参考資料)にとりまとめた。

本試験法は、FAMIC の検査又は調査に用いられるが、肥料等の生産・品質管理、商品検査などに携わる方々にとって、品質の確保等の一助となることを期待される。

「肥料等試験法(2020)」の作成にあたり、肥料等技術検討会検討部会の検討委員の皆様には、技術的な内容についてのご指導を賜り厚く感謝の意を表します。

**2019年度肥料等技術検討会 検討委員**

(敬称略、五十音順、所属は2020年2月当時)

相崎万裕美	公益財団法人 肥料科学研究所
伊佐川 聡	一般財団法人 日本食品分析センター
今川俊明	公益財団法人 日本肥糧検定協会
川崎 晃	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
黒岩貴芳	国立研究開発法人 産業技術総合研究所
野口 章	学校法人 日本大学
藤森英治	環境省 環境調査研修所
矢島和幸	一般社団法人 新潟県環境衛生中央研究所
安井明美	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
渡邊敬浩	国立医薬品食品衛生研究所