

7-2 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—

伊藤浩平¹, 小塚健志², 秋元里乃³, 坂井田里子², 大島舞弓², 中村信仁², 白井裕治²

キーワード クロピラリド, 堆肥, 汚泥発酵肥料, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計, 微量試験法, 共同試験

1. はじめに

クロピラリドはカルボキシル基を有するピリジン系の農薬であり(Fig. 1), クロピラリドに汚染された堆肥等を利用した場合, 植物種により生育障害等が発現することが知られている¹⁾. 平成 28 年度に行われた調査によると, 国内で生産されている牛ふん堆肥中にもクロピラリドが含まれることが確認されている²⁾. また, 牛ふん堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの分析法としては, 平成 21 年度から平成 28 年度において八木, 顯谷, 小塚らにより液体クロマトグラフタンデム型質量分析(LC-MS/MS)法が開発および妥当性の確認がなされ^{3~5)}, 定量下限が 10 µg/kg の試験方法として肥料等試験法に収載されている⁶⁾. しかしながら, 土壌中のクロピラリド濃度が 1 µg/kg 程度の低濃度においても作物によっては生育障害を引き起こす場合があることから⁷⁾より低含有量のクロピラリドを測定可能な分析法が必要とされ, 平成 29 年度に国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構において定量下限 2 µg/kg 以下の「牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法」(参考法)が開発された⁸⁾. また, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)では, この試験法について, 牛ふん以外の畜ふん由来堆肥等への適用範囲拡大を検討し, 単一試験室の妥当性確認のための試験を実施した⁹⁾.

更に, この方法の性能評価(試験室間の再現精度)のため, 共通試料を用いて複数試験室による妥当性確認を実施したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料

流通されている堆肥を 4 種類(牛ふん堆肥 2 種類, 豚ふん堆肥及び鶏ふん堆肥各 1 種類)及び汚泥発酵肥料 1 種類を 40 °C で一昼夜風乾した後, 目開き 500 µm のスクリーンを通過するまで粉碎し, よく混合して共同試験用試料とした. このうち豚ふん堆肥と 2 種類の牛ふん堆肥はクロピラリドの含有が認められ, その他の試料は対象成分の含有が認められない試料であった. そのため, 共同試験参加試験室において含有しない対象成分を添加して共同試験を実施することとした.

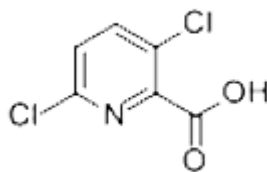
共同試験用試料は約 9 g をポリエチレン袋に入れ密封して, それぞれ 40 袋を調製した. 一対のブラインド試

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部(現)農薬検査部

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部(現)農林水産省 関東農政局

料を提供するため、それぞれの共同試験用試料の袋にはランダムな番号を付し、参加試験室に配付した。



Clopyralid

CAS No: 1702-17-6

Fig. 1 Chemical structure of clopyralid

2. 材料及び方法

2) 添加用標準液

市販されているクロピラリドをアセトニトリルに溶解した各標準液のそれぞれ一定量を混合し、アセトニトリルで希釈して2種類の濃度の添加用標準液を用意した。

添加用標準液は約1.5 mLをガラスバイアルに入れ、一対のブラインド試料を提供するため、1)の2種類の共同試験用試料と共通した番号をバイアルに付し、参加試験室に配付した。

3) 装置及び器具

各試験室に設置している LC-MS/MS, 振とう機, 遠心分離機, 高速遠心分離機, ロータリーエバポレーター, マニホールド, 試験管ミキサーを使用した。

4) クロピラリドの測定

(1) 抽出

分析試料 5.00 g を量ってねじ口遠心沈殿管 100 mL に入れ、水酸化ナトリウム溶液 (40 g/L) -メタノール [1 + 99] を 50 mL 加え、振とう機で 30 分間振り混ぜた。その後、遠心力約 $1700 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を三角フラスコ 100 mL に移した。残留物に水酸化ナトリウム溶液 (40 g/L) -メタノール [1 + 99] を 40 mL 加え、振とう機で 30 分間振り混ぜた後、遠心力約 $1700 \times g$ で 5 分間遠心分離した。太首全量フラスコ 100 mL を受器として上記上澄み液をガラス繊維ろ紙をのせた桐山ロートで吸引ろ過し、続いて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] で数回洗浄した洗液を同様に吸引ろ過した。標線まで水酸化ナトリウム溶液 (40 g/L) -メタノール [1 + 99] を加えて抽出液とした。

(2) 精製1

カートリッジカラムを予めメタノール 5 mL 及び水 5 mL で速やかに洗浄した。なす形フラスコ 100 mL をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 10 mL をカートリッジカラムに正確に加え、速やかに液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。さらに水酸化ナトリウム溶液 (0.4 g/L) -メタノール [1+1] 5 mL を2回カートリッジカラムに加え、同様に流出させた。

(3) 精製2

新たなカートリッジカラムを予めアセトニトリル 5 mL 及び塩酸(1+120)5 mL で速やかに洗浄した。流出液を 40 °C 以下の水浴で 5 mL 以下まで減圧濃縮した後、塩酸(1+11)3 mL を加えた。その後、濃縮した流出液をカートリッジカラムに負荷させ、速やかに液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。なす形フラスコ 100 mL を塩酸(1+120)5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カートリッジに加え、次に塩酸(1+120)－アセトニトリル[9+1]5 mL 及び水 5 mL を順次カートリッジに加えて速やかに流出させた。ねじ口円錐型遠心沈殿管 10 mL をカートリッジカラムの下に置き、アンモニア溶液(0.0025 w/v%)－アセトニトリル(9+1)4 mL をカートリッジカラムに正確に加え、クロピラリドを速やかに溶出させた。

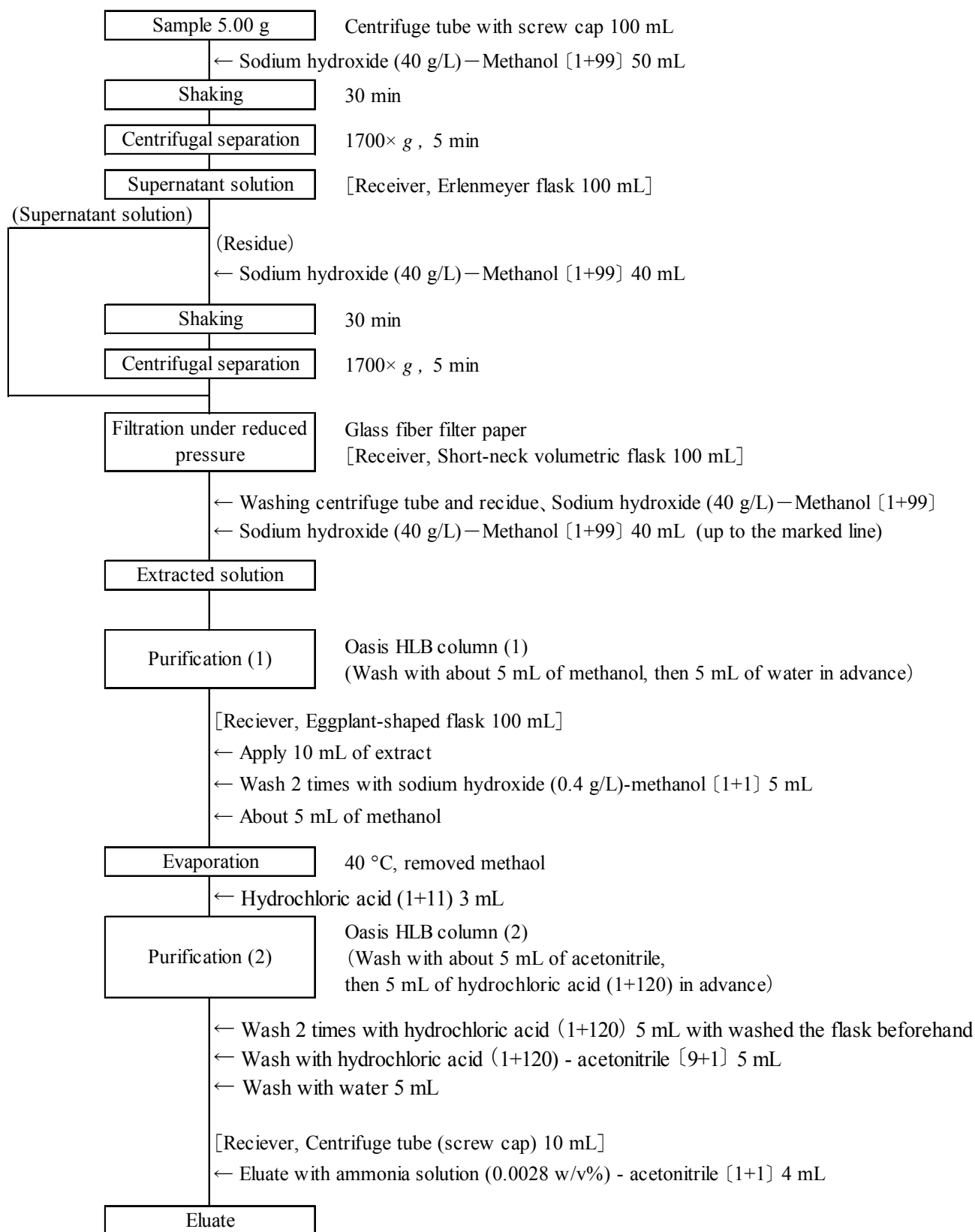
(4) 精製3

溶出液に水酸化ナトリウム(40 g/L)0.1 mL を加え、試験管ミキサーで混合した。その後、ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間混合し、遠心力 740×g で約 3 分間遠心分離し、下層(ジクロロメタン層)をパスツールピペットで除去する操作を 2 回繰り返した。残った水層に硫酸(1+2)0.15 mL を加え、試験管ミキサーで混合した。その後、ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間混合し、遠心力 740×g で 3 分間遠心分離し、下層(ジクロロメタン層)をパスツールピペットでなす形フラスコ 50 mL に入れる操作を 3 回繰り返した。繰り返しの操作において、下層は同じなす形フラスコ 50 mL に加えた。これにアセトン 5 mL を加え、40 °C 以下の水浴上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させた。これにぎ酸(1+1000)を 1 mL 加え、超音波洗浄機を用いて超音波処理により溶解した後、共栓遠心沈殿管 1.5 mL に移して遠心力 8100×g で 5 分間遠心分離した。上澄み溶液を LC-MS/MS の測定バイアルに移し試料溶液とした。

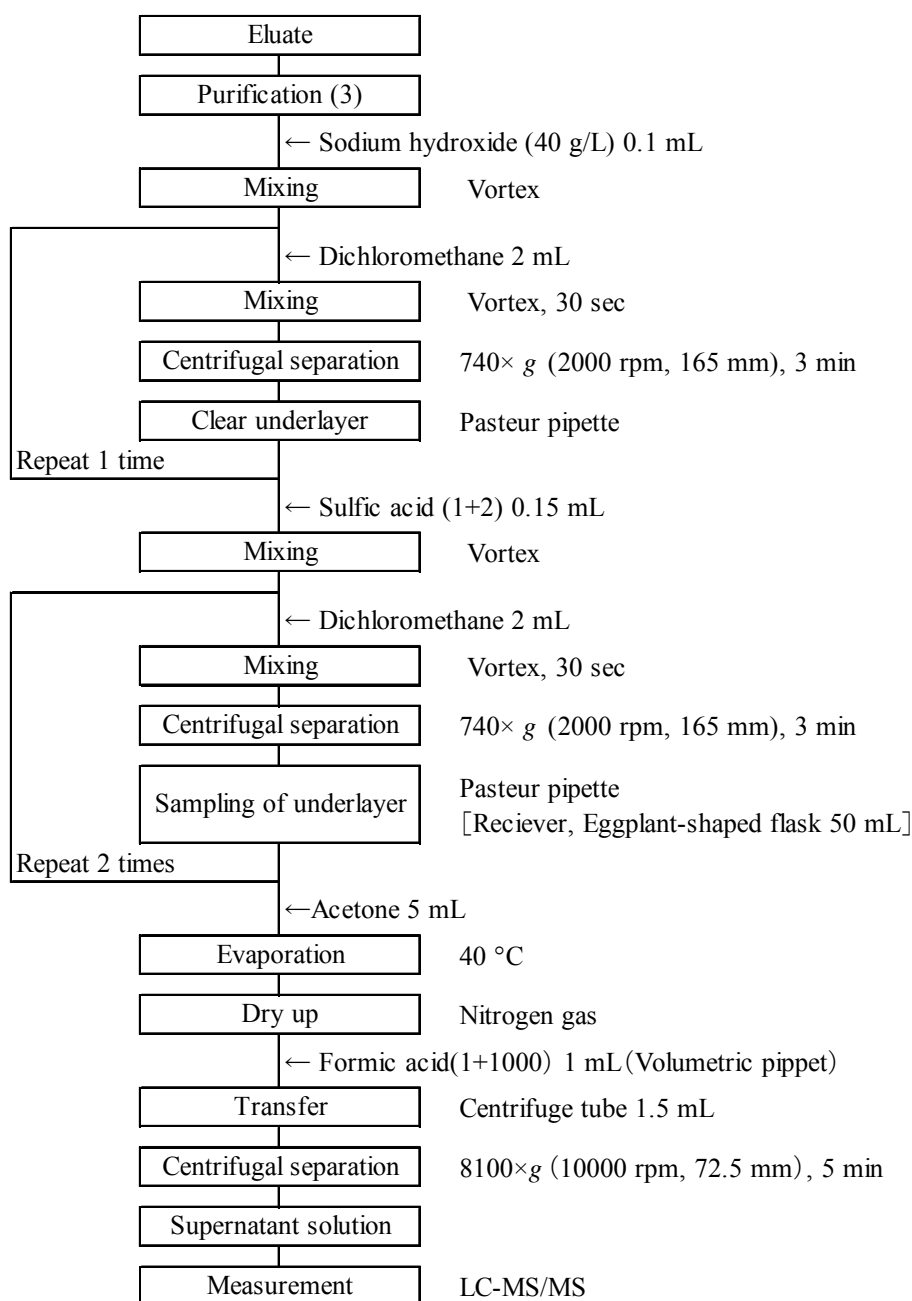
(5) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び検量線作成用混合標準液を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出(SRM)クロマトグラムを得た。得られた SRM クロマトグラムから各成分のピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料溶液中の各成分量を求め、分析試料中のクロピラリドの量を算出した。なお、測定にあたっては、肥料等試験法(2017)8.2,a 項を参照して各試験室の LC-MS/MS 操作方法に従った。

なお、定量法の概要を Scheme 1-1 及び Scheme 1-2 に示した。



Scheme 1-1 Analytical procedure for clopyralid in fertilizer



Scheme 1-2 Analytical procedure for clopyralid in fertilizer

5) 共同試験用試料の均質性試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル¹⁰⁾の均質性試験に従い、クロピラリドの含有が認められた共同試験用試料(牛ふん堆肥 1, 牛ふん堆肥 2 及び豚ふん堆肥)から 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 4) に従って分析した。なお、ねじ口遠心沈殿管に計り入れる分析試料は牛ふん堆肥 1 は 4.00 g, その他は 4.50 g とした。

6) 共同試験

試験に参加した 10 試験室と使用した LC-MS/MS は以下の通りであり、それぞれの試験室において送付した 10 試料について 4) に従って分析した。

なお、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 1 に示した。

- ・ 一般財団法人材料科学技術振興財団分析評価部 KB
- ・ 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター
- ・ 一般財団法人日本食品検査関西事業所
- ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所
- ・ 株式会社食環境衛生研究所
- ・ 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
有害化学物質研究領域
- ・ ジーエルサイエンス株式会社総合技術本部カスタマーサポートセンター
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部肥料鑑定課
- ・ 日本環境科学株式会社事業部分析グループ
- ・ 三浦工業株式会社環境事業本部科学分析センター

(50 音順)

Table 1 Instruments used in the collaborative study

LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
LC: 1200series, Agilent Technologies MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	L-column2 ODS, CERI (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)
LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: MICROMASS Quattro micro API, Waters	ACQUITY UPLC HSS T3, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)
LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: Agilent 1200 Infinity Series MS/MS: Agilent 6460 Triple Quad LC/MS	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: Prominence UFLC, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	L-column2 ODS, CERI (2.1 mm×150 mm, 5.0 μm)
LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: API 4000 QTRAP, AB SCIEX	InertSustain AQ-C18, GL Science (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro Premier XE, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: Nexera XR, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (3.0 mm×50 mm, 2.0 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQ, Waters	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 2.0 μm)

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の試験成績について、Cochran 検定による外れ値を除外し、一元配置分散分析から得られた統計量を Table 2 に示した。いずれの試料においても、併行相対標準偏差 (RSD_r) は肥料等試験法⁶⁾の妥当性確

認の手順に示している各濃度のレベルにおける併行精度の目安 ($CRSD_r$) 以内であり, F 値が F 境界値を下回ったことから, 有意水準 5 % において試料間に有意な差は認められなかった. これらのことから, 各試料は共同試験に用いることができる均質性を有していることを確認した.

Table 2 Homogeneity test result of clopyralid

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_r ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_{b+r} ^{g)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	F value ^{i,j)}
Cattle manure compost 1	10(0)	180.31	11.88	6.6	11	2.02	12.05	6.7	1.06
Cattle manure compost 2	10(0)	2.70	0.28	10.4	11	0	0.28	10.4	0.43
Pig manure compost	9(1)	31.92	1.50	4.7	11	1.58	2.18	6.8	3.23

a) Number of the samples used for analysis; (0): Number of outliers

b) Grand mean value ($n=20=10 \times \text{number of repetition (2)}$)

c) Standard deviation of repeatability

d) Relative standard deviation of repeatability

e) Rough standard of relative standard deviation of repeatability in Testing Methods for Fertilizers

f) Standard deviation of sample-to-sample

g) Standard deviation of sample-to-sample including repeatability $s_{b+r} = \sqrt{s_{bb}^2 + s_r^2}$

h) Relative standard deviation of sample-to-sample including repeatability

i) F value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

j) F critical value: $F(9, 10; 0.05) = 3.02$

2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験成績を Table 3 に示した. 各系列の分析試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル¹¹⁾に従って統計処理した. 外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施した. その結果, 10 試験室の試験成績のうち, 3 種類の試料で各 1 試験室が外れ値として判定された.

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した試験成績より算出した平均値, 併行標準偏差 (s_r), 併行相対標準偏差 (RSD_r) 値及び肥料等試験法⁶⁾における併行相対標準偏差 ($CRSD_r$) の目安並びに室間再現標準偏差 (s_R), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) 及び肥料等試験法¹¹⁾における室間再現相対標準偏差 ($CRSD_R$) の目安を Table 4 に示した.

クロピラリドの平均値は $1.20 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 128 \mu\text{g}/\text{kg}$ であり, その併行標準偏差は $0.06 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 併行相対標準偏差は 2.5 % \sim 15.3 %, 室間再現標準偏差は $0.14 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 14.6 \mu\text{g}/\text{kg}$, 室間再現相対標準偏差は 11.4 % \sim 17.6 % であった.

いずれの併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) も肥料等試験法⁶⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の目安の 2 倍以内であったことから, 本法の精度は同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることを確認した.

Table 3 Individual result of clopyralid ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Lab ID ^{a)}	Cattle manure compost 1		Cattle manure compost 2		Pig manure compost	
	A	91.6	91.2	1.34	1.14	16.6
B	129	128	2.52	2.50	26.6	27.8
C	113	146	2.45	1.88	10.1 ^{c)}	26.5 ^{c)}
D	166	157	2.18	2.45	26.0	33.2
E	115	121	3.38	2.14	22.3	19.5
F	138 ^{b)}	161 ^{b)}	2.63 ^{b)}	2.89 ^{b)}	30.0 ^{b)}	28.9 ^{b)}
G	100	85.0	1.48	2.00	15.6	12.0
H	129	134	2.45	2.69	23.1	22.8
I	153	155	2.16	2.17	20.5	23.8
J	127	121	2.72	2.44	21.7	19.5

Lab ID ^{a)}	Poultry manure compost		Composted sludge fertilizer	
	A	0.896	0.856	35.9
B	1.07	0.971	53.5	54.8
C	1.05	1.00	35.4 ^{c)}	53.0 ^{c)}
D	0.992	0.967	56.7	55.0
E	1.29	1.36	33	35.0
F	1.49 ^{b)}	1.52 ^{b)}	62.7 ^{b)}	61.1 ^{b)}
G	0.413 ^{c)}	0.765 ^{c)}	35.2	33.4
H	1.12	1.13	42.0	42.5
I	1.23	1.14	54.3	56.8
J	1.65	1.84	60.9	59.3

a) Laboratory identification

b) Calculated value using m/z 110 for quantification

c) Outlier of Cochran test

Table 4 Statistical analysis of collaborative study results for clopyralid

Sample	Labs ^{a)}	Mean ^{b)}	s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	s_R ^{f)}	RSD_R ^{g)}	$CRSD_R$ ^{h)}
	$p(q)$	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	(%)
Cattle manure compost 1	10(0)	128	10.1	7.9	11	14.6	11.4	22
Cattle manure compost 2	10(0)	2.28	0.35	15.3	11	0.40	17.6	22
Pig manure compost	9(1)	22.5	2.31	10.3	11	3.43	15.3	22
Poultry manure compost	9(1)	1.20	0.06	5.0	11	0.14	12.0	22
Composted sludge fertilizer	9(1)	48.1	1.21	2.5	11	5.60	11.6	22

- a) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier removed and (q) =number of outlier
- b) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retained after outlier removed ($n=p \times$ number of samples (2))
- c) Standard deviation of repeatability
- d) Relative standard deviation of repeatability
- e) Rough standard of relative standard deviation of repeatability in Testing Methods for Fertilizers
- f) Standard deviation of reproducibility
- g) Relative standard deviation of reproducibility
- h) Rough standard of relative standard deviation of reproducibility in Testing Methods for Fertilizers

4. まとめ

10 試験室において 5 種類(10 点)の堆肥及び汚泥発酵肥料を用いて共同試験を実施し、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の測定について室間再現性の評価を行った。その結果、クロピラリドの平均値 $1.20 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 128 \mu\text{g}/\text{kg}$ において、室間再現相対標準偏差は $11.4 \% \sim 17.6 \%$ であった。いずれの室間再現相対標準偏差 (RSD_R) も肥料等試験法⁶⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の目安の範囲内であることから、本法の精度は同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることが確認された。

謝 辞

共同試験にご協力頂きました一般財団法人材料科学技術振興財団分析評価部 KB、一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター、一般財団法人日本食品検査関西事業所、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、株式会社食環境衛生研究所、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有害化学物質研究領域、ジューエルサイエンス株式会社総合技術本部カスタマーサポートセンター、日本環境科学株式会社事業部分分析グループ及び三浦工業株式会社環境事業本部科学分析センターの各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 飼料及び堆肥に残留する除草剤の簡易判別法と被害軽減対策マニュアル, 筑波印刷情報サービスセンター協同組合
- 2) 農林水産省: 輸入飼料中及び堆肥中に含まれるクロピラリドの調査結果について
<<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-18.pdf>>
- 3) 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発酵肥料中のクロピラリド測定, 肥料研究報告, **3**, 51~59(2010)
- 4) 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)法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の測定, 肥料研究報告, **7**, 1~9 (2014)
- 5) 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肥料中のクロピラリド及び関連物質の測定ー共同試験成績ー, 平成28年度肥料等技術検討会資料
- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC): 肥料等試験法
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 7) 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: 土壌中クロピラリドのトマト, サヤエンドウ, スイートピーの初期成育に及ぼす影響・データ集
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078226.html>
- 8) 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>
- 9) 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井裕治: 12 LC-MS/MS 法による堆肥等中のクロピラリドの測定ー適用範囲拡大ー, 平成29年度肥料等技術検討会資料
- 10) Thompson, M., L. R. Ellison S., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145~196 (2006)
- 12) Horwitz W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)

Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS): A Collaborative Study

Kohei ITO¹, Kenji KOZUKA², Satono AKIMOTO³, Satoko SAKAIDA¹, Mayu OSHIMA¹,
Nobuhito NAKAMURA¹ and Yuji SHIRAI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kanto Regional Agricultural Administration Office

A collaborative study was conducted to evaluate LC-MS/MS for determination of clopyralid, in compost and composted sludge fertilizer. Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. The extract was purified by retention and elution with a cleanup cartridge and by extraction with dichloromethane. These purification took advantage of characteristics that the behavior of elution varies between acidity and alkaline. The clopyralid, was analyzed by LC-MS/MS. Five samples, respectively, were sent to 10 collaborators. These samples were analyzed as blind duplicates. The mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) for clopyralid were 1.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 128 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 11.4 % ~ 17.6 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of clopyralid,

Key words clopyralid, compost, composted sludge fertilizer, LC-MS/MS, microanalysis method, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **11**, 75~85, 2018)