

12 アンモニア性窒素試験法の性能調査

—ホルムアルデヒド法—

加藤公栄¹, 千田正樹¹, 渡部絵里菜¹

キーワード クライテリア・アプローチ, アンモニア性窒素, ホルムアルデヒド法, 肥料等試験法

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中、我が国においても ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2005)¹⁾の要求事項を参考にした試験成績の信頼性確保の考え方が重要視されている。ISO/IEC 17025 では、国際・国家規格等又は妥当性が確認された方法を選定することを要求している。一方、品質の評価に用いる分析法を規格、公定法等で指定するのではなく、一定の規準(criteria)を満たす分析法ならば、適用可能としている。この考え方はクライテリア・アプローチ(Criteria Approach)と呼ばれており、化学物質を客観的に測定する分析法の評価に適用できることがコーデックス委員会において合意されている。食品を対象としているコーデックス分析法の性能規準に関する数値設定のためのガイドライン²⁾には適用範囲、真度、精度、定量下限等が設定されている。

しかしながら、肥料の試験法に要求される性能規準は、食品とは異なるため、新たに設定する必要がある。近年、新たに開発された方法についてはこれらの性能を調査して肥料等試験法³⁾に順次収載している。ただし、肥料分析法(1992年版)⁴⁾の記載様式を書き替えた試験法には定量下限等が記載されていないため、それらの性能を調査する必要がある。このことから、筆者らは肥料等試験法に収載されている試験法のうち、主成分として規定されている^{5, 6)}窒素(N)について、アンモニア性窒素(A-N)のホルムアルデヒド法の精確さ等の性能を調査したので報告する。

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

流通している肥料原料の中には窒素が含まれているおそれがあることから、試料の調製にあたっては表 1 のとおり出来る限り各肥料原料の主成分に対応する JIS 規格に規定されている試薬特級を用いた。なお、粒状の試薬についてはミルを用いて粉碎した。流通している肥料の配合割合を参考に表 2 のとおり試薬を混合し、アンモニア性窒素(A-N)として質量分率 0.2%~10%含有する試料を調製した。また、試薬を水に溶かしてアンモニア性窒素(A-N)として質量分率 0.02%含有する試料を調製した。

2) 装置及び器具

- (1) 回転振り混ぜ機: 池田理化 EFN00-KT

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

表1 試料の調製に使用する試薬

使用する試薬		対応する原材料名	
名称	規格	名称又は種類名(材料)	慣用名
硫酸アンモニウム	JIS K8960 特級	硫酸アンモニア	硫安
りん酸水素カルシウム二水和物	特級	重過りん酸石灰	重過石
りん酸二水素カリウム	JIS K9007 特級	りん酸一加里	
りん酸水素二カリウム	JIS K9017 特級	りん酸二加里	
硫酸カリウム	JIS K8962 特級	硫酸加里	硫加
塩化カリウム	JIS K8121 特級	塩化加里	塩加
硫酸カルシウム二水和物	JIS K8963 特級	組成均一化促進材	石膏

表2 試験に用いた試料の配合割合 (質量分率:%)

使用する試薬	真度評価用試料		定量下限確認用試料	
	A-N-10	A-N-1	A-N-0.2	A-N-0.02
硫酸アンモニウム	47.17	4.72	0.944	0.094
りん酸水素カルシウム二水和物	20.00	10.00	25.000	
りん酸二水素カリウム	10.00	10.00		2.500
りん酸水素二カリウム		10.00	5.000	
硫酸カリウム	5.00	10.00	15.000	2.500
塩化カリウム		10.00	15.000	
硫酸カルシウム二水和物	17.83	45.28	39.056	
水				94.906
A-N含有量	10.00	1.00	0.200	0.020

3) 試薬の調製

- (1) 水: 水精製装置(日本ミリポア Milli-Q DIRECT8)を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 相当の水を使用した。
- (2) 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: 水約 30mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して 4~5 日間放置した後、その上澄み液 5.5~11mL を共栓保存容器にとり、炭酸を含まない水 1,000mL を加えた。

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

$$0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター (f)} \\ = (W \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1,000/V_3) \times (1/C)$$

W: 採取したアミド硫酸の質量 (g)

A: アミド硫酸の純度 (%)

- V_1 : 分取したアミド硫酸溶液の容量 (mL)
 V_2 : アミド硫酸溶液の定容量 (250 mL)
 V_3 : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量 (mL)
 C: 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度 (mol/L)

- (3) 塩化カリウム溶液 (1 mol/L): JIS K 8121 に規定する塩化カリウム75 g を水に溶かして1,000 mL とした.
- (4) 塩化アルミニウム溶液 (1 mol/L): JIS K 8114 に規定する塩化アルミニウム240 g を水に溶かして 1,000 mL とした.
- (5) 水酸化カリウム溶液 (170 g/L): 水酸化カリウム170 g を水に溶かして1,000 mL とした.
- (6) ホルムアルデヒド溶液: JIS K 8872 に規定する36% (質量分率)~38% (質量分率)ホルムアルデヒド液1 容量に対し, 水1 容量を加えた.
- (7) 塩酸: JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬.
- (8) ブロモチモールブルー溶液 (0.1 g/100 mL): JIS K 8842 に規定するブロモチモールブルー0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール (95) 20 mL で溶かし, 水で100 mL とした.
- (9) メチルレッド溶液 (0.1 g/100 mL): JIS K 8896 に規定するメチルレッド0.1 g をJIS K 8102 に規定するエタノール (95) 100 mL に溶かした.
- (10) チモールブルー溶液 (1 g/100 mL): チモールブルー (ナトリウム塩) 1 g をJIS K 8102 に規定するエタノール (95) 20 mLで溶かし, 水で100 mLとした.

4) 試験成分及び試験方法

アンモニア性窒素 (A-N) の抽出及び測定は表3 のとおり肥料等試験法³⁾の試験方法を用いた. なお, 参考のため, 試験法のフローシート (図 1) を示した.

表3 試験成分及び試験方法

試験成分	肥料等試験法の項目	試料溶液の抽出方法
アンモニア性窒素 (A-N)	4.1.2.b ホルムアルデヒド法	塩化カリウム溶液 (1 mol/L) 回転振とう

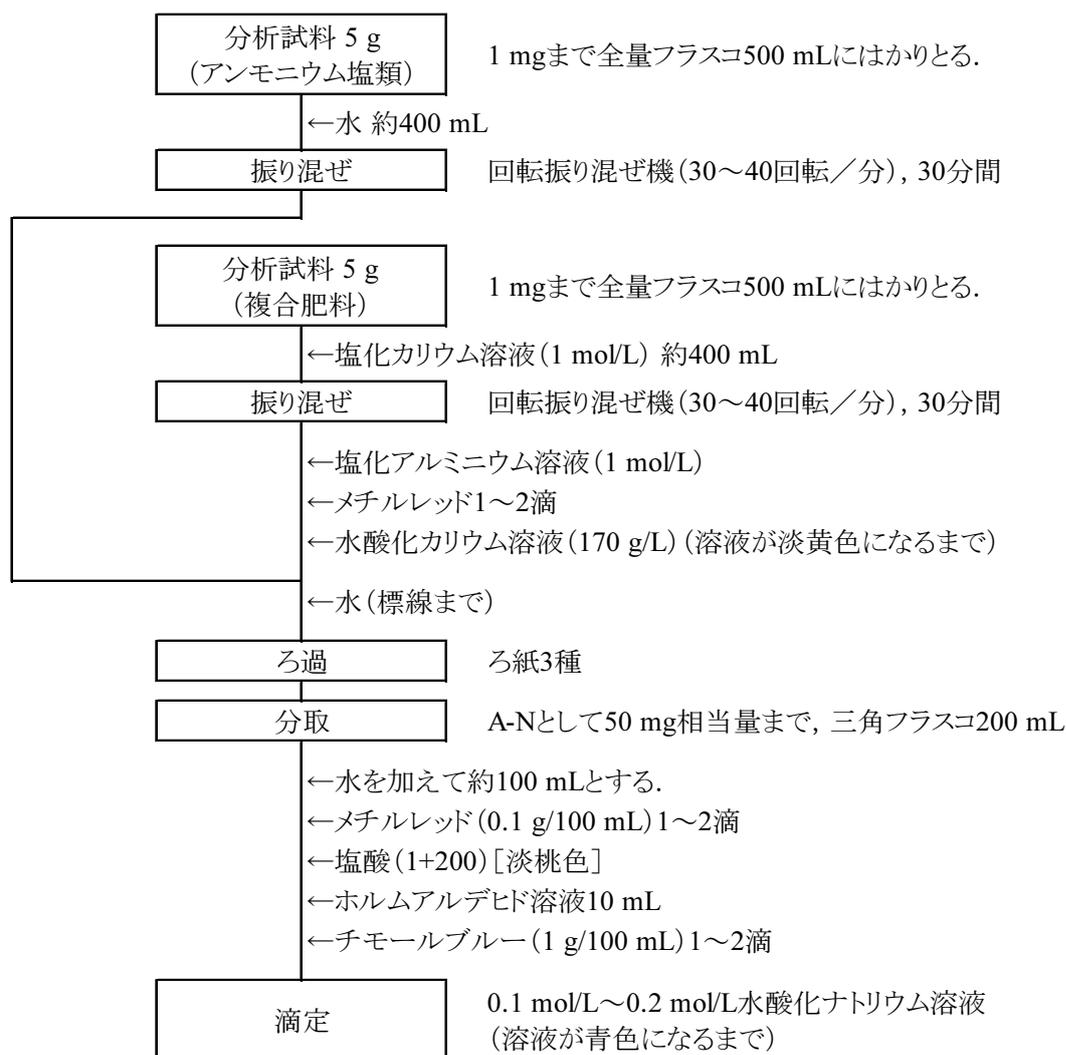


図1 肥料中のアンモニア性窒素試験法フローシート

3. 結果および考察

1) 試料の調製に用いた硫酸アンモニウム中の窒素の含有量

試料の調製に用いた硫酸アンモニウムの窒素の含有量を肥料等試験法(アンモニア性窒素:表3)により3点併行で測定した結果を表4に示した. 平均値より算出した理論値に対する割合は100.4%と試薬の表示値(min. 99.5%)を満たしており, その相対標準偏差は0.1%と小さかった. このことから, 試料の調製では理論値を用いて配合設計を行った.

表4 試料の調製に用いた硫酸アンモニウム中の窒素の測定値

試料	理論値 ¹⁾	平均値 ²⁾	標準偏差	理論値に 対する割合 ³⁾	相対標 準偏差
	(%) ⁴⁾	(%) ⁴⁾	(%) ⁴⁾	(%)	(%)
硫酸アンモニウム	21.20	21.28	0.01	100.4	0.1

- 1) 硫酸アンモニウム中の窒素(N)理論値
- 2) アンモニア性窒素(A-N)の3点併行試験の平均値
- 3) (平均値/理論値)×100
- 4) 質量分率

2) 真度評価結果

真度評価用試料(表2)を用いて3点併行でアンモニア性窒素(A-N)の試験を実施した成績を表5に示した。

肥料取締法⁷⁾において、保証成分量(含有する主成分の最小量)を生産業者保証票又は輸入業者保証票(以下、「保証票」という)に記載することを普通肥料(污泥肥料等を除く)の生産又は輸入した業者(以下、「生産業者等」という)に義務づけている。よって、アンモニア性窒素(A-N)の設計値と試験法の測定値の差について算出した。アンモニア性窒素(A-N)として質量分率1%~10%含有する試料について当該試験法で測定したところ、設計値と測定値との差は質量分率0.00%~0.10%であり、設計値に対する回収率は、100.1%~101.0%であった。このことから、この試験法は、普通肥料(指定配合肥料を含む)のアンモニア性窒素(A-N)の保証成分量の評価を得るに十分な正確さを有していたことが確認された。

なお、AOAC⁹⁾における濃度レベルにおける回収率の許容範囲内は質量分率100%で98%~101%、質量分率10%で95%~102%及び質量分率1%で92%~105%であり、参考のため比較したところアンモニア性窒素(A-N)のいずれの回収率もこれらの許容範囲内であった。

表5 試料中のアンモニア性窒素(A-N)の試験成績

試験成分	試料	設計値	測定値	設計値と の差	差の割合	回収率	標準偏差	相対 標準偏差
		A ¹⁾ (%) ²⁾	B ³⁾ (%) ²⁾	C ⁴⁾ (%) ²⁾	D ⁵⁾ (%)	E ⁶⁾ (%)	F ⁷⁾ (%) ²⁾	G ⁸⁾ (%)
A-N	A-N-10	10.00	10.10	0.10	1.0	101.0	0.01	0.1
	A-N-1	1.00	1.00	0.00	0.1	100.1	0.00	0.4

- 1) 試料中のアンモニア性窒素(AN)の含有量(設計値)
- 2) 質量分率
- 3) 3点併行試験の平均値
- 4) $C=B-A$
- 5) $D=(C/A) \times 100$
- 6) $E=(B/A) \times 100$
- 7) 3点併行試験の標準偏差
- 8) $G=(F/B) \times 100$

3) 検出下限及び定量下限

定量下限確認用試料(表2)を用いて7点併行でアンモニア性窒素(A-N)の試験を実施し、その結果を表6に示した。なお、定量下限は(標準偏差)×10式、また、検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)式を用いて算出した¹⁰⁾。

普通肥料の公定規格¹¹⁾において、普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く。以下同じ。)の含有すべき主成分の最小量はアンモニア性窒素(A-N)として質量分率 1.0 %と家庭園芸用複合肥料の含有すべき主成分の最小量はアンモニア性窒素(A-N)として質量分率 0.1 %と肥料取締法施行規則¹²⁾

においては、指定配合肥料(家庭園芸用肥料を除く。)の保証成分量の最小値はアンモニア性窒素(A-N)として質量分率 1.0 %と、指定配合肥料(家庭園芸用肥料に限る。)の保証成分量の最小値はアンモニア性窒素(A-N)として質量分率 0.1 %とそれぞれ規定されている。さらに、アンモニア性窒素(A-N)の保証成分量が質量分率 0.1 %~0.5 %として登録されている家庭園芸用複合肥料の多くが液状肥料である。

A-N-0.2 %の推定定量下限値は質量分率 0.03 %、推定検出下限値は質量分率 0.01 %であることから、表 3 に記載した試験法は、公定規格における普通肥料、指定配合肥料(家庭園芸用肥料を除く。)のアンモニア性窒素(A-N)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していることが確認された。

また、A-N-0.02 %の推定定量下限値は質量分率 0.02 %、推定検出下限値は質量分率 0.009 %であることが確認された。

表6 定量下限確認試験の成績 (質量分率:%)

試験成分	試料	設計値 ¹⁾	平均値 ²⁾	標準偏差	推定定量 下限値 ³⁾	推定検出 下限値 ⁴⁾
A-N	A-N-0.2	0.2	0.204	0.003	0.03	0.01
	A-N-0.02	0.02	0.0228	0.0024	0.02	0.009

1) 試料中の窒素(N)の含有量(設計値)

2) 7点併行試験の平均値

3) 標準偏差×10

4) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4) 室間再現精度

クライテリア・アプローチにおける性能規準では室間再現精度が要求されるが、試験法の妥当性確認のための共同試験の実施には大きな労力がかかる。このことから、既報の外部精度管理試験¹³⁾のうち該当する試験法で実施された成績^{14, 15)}及び認証標準物質の値付けのための共同試験¹⁶⁾の成績¹⁷⁾を適用することとし、それらの成績を表 7 及び表 8 に示した。なお、外部精度管理試験では、ロバスト法を用いて報告値の中央値及びロバスト標準偏差(NIQR)が算出されている。中央値及び NIQR は正規分布において平均値及び標準偏差に一致する。

アンモニア性窒素(A-N)の中央値又は平均値が質量分率 10.66 %~11.53 %の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.10 %~0.18 %、その相対標準偏差は 0.9 %~1.6 %であった。また、アンモニア性窒素(A-N)の試験成績の HorRat 値は 0.33~0.56 であった。

なお、AOAC(OMA)⁸⁾における濃度レベルにおける室間再現精度の目安は濃度 100 %で 2 %、濃度 10 %で 3 %、濃度 1 %で 4 %及び濃度 0.1 %で 6 %であり、参考のため比較したところアンモニア性窒素(A-N)の室間再現標準偏差はこれらの目安を下回った。

表7 外部精度管理試験成績

試験成分	試料の種類	試験 年度	試験 室数	中央値 A ¹⁾ (%) ²⁾	NIQR B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	PRSD D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
A-N	普通化成肥料	2006	150	11.46	0.10	0.9	2.8	0.33
	高度化成肥料	2010	128	11.53	0.18	1.6	2.8	0.56

- 1) 中央値
- 2) 質量分率
- 3) ロバスト標準偏差
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = C/D$

表8 肥料認証標準物質の値付けのための共同試験成績

試験成分	試料の種類	試験 年度	試験 室数	平均値 A ¹⁾ (%) ²⁾	SD _R B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	PRSD D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
A-N	高度化成肥料	2010	10	10.66	0.16	1.5	2.8	0.55

- 1) 認証値
- 2) 質量分率
- 3) 室間再現標準偏差
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = C/D$

4. まとめ

アンモニア性窒素(A-N)について、ホルムアルデヒド法の真度、定量・検出下限及び室間再現精度を調査したところ、次の結果を得た。

(1) アンモニア性窒素(A-N)として質量分率 1 %～10 %含有する試料について測定したところ、設計値と測定値との差は質量分率 0.00 %～0.10 %であった。また、設計値に対する回収率は 100.1 %～101.0 %であった。

(2) 粉状試料(A-Nとして質量分率 0.2 %)を用いて定量下限及び検出下限を確認したところ、質量分率 0.03 %及び0.01 %と推察された。また、液状試料(A-Nとして質量分率 0.02 %)の定量下限及び検出下限はそれぞれ質量分率 0.02 %及び 0.009 %程度と推定された。

(3) 外部精度管理試験及び肥料認証標準物質の値付けのための共同試験より室間再現精度を調査したところ、アンモニア性窒素(A-N)は、中央値又は平均値が質量分率 10.66 %～11.53 %の範囲でその室間再現標準偏差は質量分率 0.10 %～0.18 %、その相対標準偏差は 0.9 %～1.6 %であった。

(1)～(3)の成績は、肥料等試験法に記載された試験法が主要な成分としてのアンモニア性窒素(A-N)の含有量を評価することができる性能を有していると示しており、クライテリア・アプローチにおける試験法の性能規準の資料に適用できると考えられる。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition, (2011)
<http://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>
- 3) 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>>
- 4) 農林水産省農業環境技術研究所: 肥料分析法 (1992 年版), 日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 5) 肥料取締法施行令, 昭和 25 年 6 月 20 日, 政令第 198 号, 最終改正平成 18 年 3 月 23 日, 政令第 51 号 (2006)
- 6) 農林水産省告示: 肥料取締法施行令第一条の二の規定に基づき農林水産大臣の指定する有効石灰等を指定する件, 昭和 59 年 3 月 16 日, 農林水産省告示第 695 号, 最終改正平成 11 年 5 月 13 日, 農林水産省告示第 704 号 (1999)
- 7) 肥料取締法: 昭和 25 年 5 月 1 日, 法律第 127 号, 最終改正平成 23 年 8 月 30 日, 法律第 105 号 (2011)
- 8) 農林水産省告示: 特殊肥料の品質表示基準, 平成 12 年 8 月 31 日, 農林水産省告示第 1163 号, 最終改正平成 17 年 2 月 28 日, 農林水産省告示第 364 号 (2005)
- 9) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix E: Laboratory Quality Assurance, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 10) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
- 11) 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を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日, 農林水産省告示第 284 号, 最終改正平成 24 年 8 月 8 日, 農林省告示第 1985 号 (2012)
- 12) 農林水産省令: 肥料取締法施行規則, 昭和 25 年 6 月 20 日, 農林水産省令第 64 号, 最終改正平成 24 年 8 月 8 日, 農林水産省令第 44 号 (2012)
- 13) ISO 13528 (2005): “Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons” (JIS Z 8405: 2008, 「試験所間比較による技能試験のための統計的方法」)
- 14) 杉村 靖, 加藤公栄, 齊木雅一, 阿部文浩, 伊藤 潤, 内山 丈, 白井裕治, 引地典雄, 杉原 進: 2006 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **1**, 138~151 (2008)
- 15) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 福中理絵, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志: 2010 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **4**, 85~106 (2011)
- 16) ISO Guide 35 (2006): “Reference materials—General and statistical principles for certification” (JIS Q 0035 : 2008, 「標準物質—認証のための一般的及び統計学的な原則」)
- 17) 高橋佐貴子, 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 山西正将, 秋元里乃, 白井裕治, 柴田政人: 2010 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **4**, 107~120 (2011)

Verification of Performance Characteristics of Testing Method for Ammonia Nitrogen Content in Fertilizer by Formaldehyde Method

Kimie KATO¹, Masaki CHIDA¹ and Erina WATANABE¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

We verified performance characteristics of testing methods for ammonia nitrogen (A-N) by formaldehyde method described in Testing Methods for Fertilizers. The accuracy of testing methods for ammonia nitrogen was assured from 3 replicate determinations of 2 fertilizer samples containing 1 % ~ 10 % ammonia nitrogen which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 100.1 % to 101.0 %. On the basis of 7 replicate measurements of each testing method of a solid sample and a liquid sample, the limit of quantitative value (LOQ) was estimated at 0.03 % and 0.02 %, respectively. Reported in Research Report of Fertilizer, medians, normalize interquartile ranges (NIQR) and relative standard deviations (RSD_R) for reproducibility of ammonia nitrogen obtained by proficiency testings were 10.66 % ~ 11.53 %, 0.10 % ~ 0.18 % and 0.9 % ~ 1.6 %, respectively. And mean values, standard deviations (SD_R) for reproducibility and RSD_R of ammonia nitrogen obtained by collaborative studies were 10.66 %, 0.16 % and 1.5 %, respectively. These results indicated that these methods performance characteristics were available in establishing criteria for a formaldehyde method of ammonia nitrogen.

Key words criteria approach, ammonia nitrogen, formaldehyde method, Testing Methods for Fertilizers

(Research Report of Fertilizer, **6**, 139~147, 2013)