

13 硝酸性窒素試験法の性能調査

—フェノール硫酸法—

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, 硝酸性窒素, フェノール硫酸法, 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, 硝酸性窒素(N-N)のフェノール硫酸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, 硝酸性窒素(N-N)として質量分率 0.2 %~3 %含有する試料を調製した. また, 試薬を水に溶かして硝酸性窒素(N-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
- (2) 分光光度計: 島津製作所 UV-1800
- (3) 水浴: ヤマト科学 BM-41

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
硝酸ナトリウム	JIS K8562 特級	硝酸ソーダ	硝酸ソーダ
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	
	N-N-3	N-N-1	N-N-0.2	N-N-0.02
硝酸ナトリウム	18.20	6.07	1.214	0.121
りん酸水素カルシウム二水和物	20.00	30.00	30.000	
りん酸二水素カリウム	20.00	5.00	10.000	2.500
りん酸水素二カリウム	10.00	5.00	20.000	
硫酸カリウム	10.00	5.00	20.000	2.500
塩化カリウム		5.00		
硫酸カルシウム二水和物	21.80	43.93	18.786	
水				94.879
N-N含有量	3.00	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) 硝酸塩標準液(N-N 5 mg/mL)：硝酸カリウム(純度 99.9%(質量分率)以上)を 110 °C で 1 時間以上加熱し、デシケーター中で放冷した後、36.09 g をひょう量皿にとった。少量の水で溶かし、全量フラスコ 1000 mL に移し入れ、標線まで水を加えた。
- (3) 硝酸塩標準液(N-N 0.1 mg/mL)：硝酸塩標準液(N-N 5 mg/mL)の一定量を水で希釈し、硝酸塩標準液(N-N 0.1 mg/mL)を調製した。
- (4) 硝酸塩標準液(N-N 0.05 mg/mL)：硝酸塩標準液(N-N 5 mg/mL)の一定量を水で希釈し、硝酸塩標準液(N-N 0.05 mg/mL)を調製した。
- (5) 硫酸銅－硫酸銀溶液：JIS K 8983 に規定する硫酸銅(II)五水和物 5 g を水 900 mL に溶かし、JIS K 8965 に規定する硫酸銀 4 g を加えて溶かした後、1,000 mL とした。
- (6) フェノール硫酸：JIS K 8798 に規定するフェノール 15 g を JIS K 8951 に規定する硫酸 100 mL に加温して溶かし、放冷した。
- (7) その他の試薬：肥料等試験法³⁾に従った。

4) 試験成分及び試験方法

硝酸性窒素(N-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
硝酸性窒素(N-N)	4.1.3.c フェノール硫酸法	(4.1) 硫酸銅-硫酸銀溶液回転振とう 水酸化カルシウム及び塩基性炭酸マグネシウム回転振とう

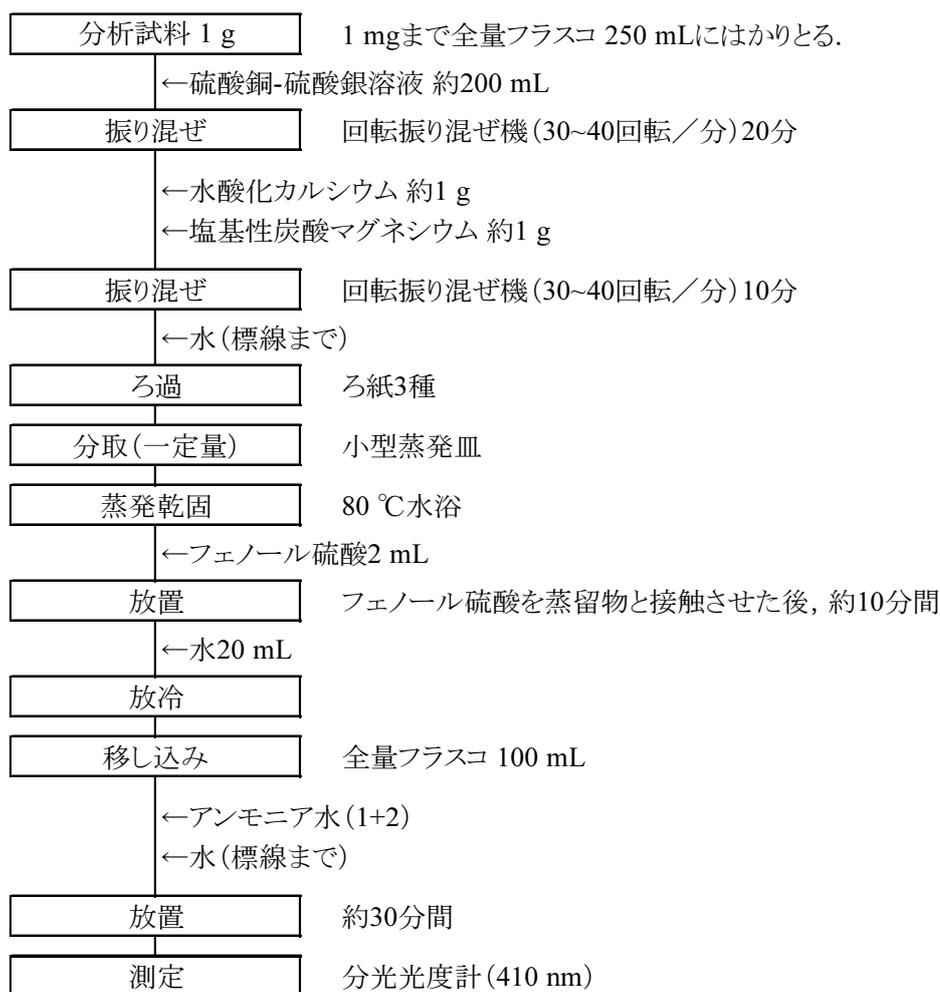


図1 肥料中の硝酸性窒素試験法フローシート

3. 結果及び考察

1) 試料の調製に用いた硝酸ナトリウムの窒素含有量

試料の調製に用いた硝酸ナトリウム中の窒素の含有量を肥料等試験法(硝酸性窒素:表3参照)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質量分率 103.4 %と試薬の表示値(min. 99 %)を満たしており, その相対標準偏差は 0.2 % と小さかった。なお, 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硝酸ナトリウム中の窒素の測定値

試料	理論値 ¹⁾ (%) ⁴⁾	平均値 ²⁾ (%) ⁴⁾	標準偏差 (%) ⁴⁾	理論値に 対する割合 ³⁾ (%)	相対標 準偏差 (%)
硝酸ナトリウム	16.48	17.04	0.04	103.4	0.2

- 1) 硝酸ナトリウム中の窒素(N)理論値
- 2) 硝酸性窒素(N-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 点併行で硝酸性窒素(N-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、硝酸性窒素(N-N)の設計値と当該試験法の測定値の差について算出した。硝酸性窒素(N-N)として質量分率 1 %~3 %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 0.01 %~0.03 %であり、設計値に対する回収率は 100.9 %~101.1 %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)の硝酸性窒素(N-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、AOAC⁸⁾における濃度レベルにおける回収率の許容範囲は質量分率 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硝酸性窒素(N-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 試料中の硝酸性窒素(N-N)の試験成績

試験成分	試料	設計値 A ¹⁾ (%) ²⁾	測定値 B ³⁾ (%) ²⁾	設計値と の差 C ⁴⁾ (%) ²⁾	差の割合 D ⁵⁾ (%)	回収率 E ⁶⁾ (%)	標準偏差 F ⁷⁾ (%) ²⁾	相対 標準偏差 G ⁸⁾ (%)
N-N	N-N-3	3.00	3.03	0.03	1.1	101.1	0.03	0.8
	N-N-1	1.00	1.01	0.01	0.9	100.9	0.01	1.2

- 1) 試料中の硝酸性窒素(NN)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)×100
- 6) E=(B/A)×100
- 7) 3点併行試験の標準偏差
- 8) G=(F/B)×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 点併行で硝酸性窒素(N-N)の試験を実施し、その成績を表 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⁹⁾.

普通肥料の公定規格¹⁰⁾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硝酸性窒素(N-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硝酸性窒素(N-N)として質量分率 0.1 %と、肥料取締法施行規則¹¹⁾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硝酸性窒素(N-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硝酸性窒素(N-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、硝酸性窒素(N-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。

N-N-0.2 %の推定定量下限値は質量分率 0.01 %、推定検出下限値は質量分率 0.005 %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。)の硝酸性窒素(N-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、N-N-0.02 %の推定定量下限値は質量分率 0.002 %、推定検出下限値は質量分率 0.001 %であることから、表 3 に記載した試験法は、家庭園芸用複合肥料及び指定配合肥料(家庭園芸用肥料に限る。)の硝酸性窒素(N-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。

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⁾
N-N	N-N-0.2 ⁵⁾	0.2	0.197	0.001	0.01	0.005
	N-N-0.02 ⁶⁾	0.02	0.0205	0.0002	0.002	0.001

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)

5) 粉状試料

6) 液状試料

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¹²⁾のうち該当する試験法で実施された成績¹³⁾を適用することとし、それらの成績を表 7 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標準化された四分位範囲(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。

硝酸性窒素(N-N)の中央値が質量分率 3.62 %の範囲でそのロバスト標準偏差は質量分率 0.11 %、その相対標準偏差は 3.2 %であった。また、硝酸性窒素(N-N)の試験成績の HorRat 値は 0.96 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硝酸性窒素(N-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⁾
N-N	普通化成肥料	2009	123	3.62	0.11	3.2	3.30	0.96

- 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 $E = C/D$

4. まとめ

硝酸性窒素(N-N)のフェノール硫酸法の真度、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) 硝酸性窒素(N-N)として質量分率1%～3%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0.01%～0.03%であり、設計値に対する回収率は100.9%～101.1%であった。

(2) 粉状試料(N-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0.01%及び0.005%と推定された。また、液状試料(N-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0.002%及び0.001%程度と推定された。

(3) 外部精度管理試験より室間再現精度を調査したところ、中央値が質量分率3.62%でその室間再現標準偏差は質量分率0.11%、その相対標準偏差は3.2%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硝酸性窒素(N-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)
<ftp://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)
- 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, 最終改平成23年8月30日, 法律第105号(2011)

- 8) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002)
<http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf>
- 9) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
<www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>
- 10) 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 22 年 4 月 9 日, 農林省告示第 589 号 (2010)
- 11) 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 20 年 2 月 29 日, 農林水産省令第 11 号 (2008)
- 12) 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」)
- 13) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 井上智江, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2009 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, **3**, 73~94 (2010)

Verification of Performance Characteristics of Testing Method for Nitrate Nitrogen Content in Fertilizer by Phenol Sulfuric Acid 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 nitrate nitrogen (N-N) by phenol sulfuric acid method described in Testing Methods for Fertilizers. The accuracy of testing methods for nitrate nitrogen was assured from 3 replicate determinations of 2 fertilizer samples containing 1 % ~ 3 % nitrate nitrogen which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 100.9 % to 101.1 %. 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 0.01 % and 0.002 %, respectively. Reported in Research Report of Fertilizer, median, normalize interquartile range (NIQR) and relative standard deviation (RSD_R) for reproducibility of nitrate nitrogen obtained by proficiency testings were 3.62 %, 0.11 % and 3.2 %, respectively. These results indicated that these methods performance characteristics were available in establishing criteria for a phenol sulfuric acid method of nitrate nitrogen.

Key words criteria approach, nitrate nitrogen, phenol sulfuric acid method, Testing Methods for Fertilizers

(Research Report of Fertilizer, **6**, 148~155, 2013)