

## 8.2 クロピラリド及びその関連物質

## 8.2.a 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法

## (1) 概要

この試験法(記号: 8.2.a-2017、CLP.a-1)は堆肥及び汚泥発酵肥料に適用する。

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

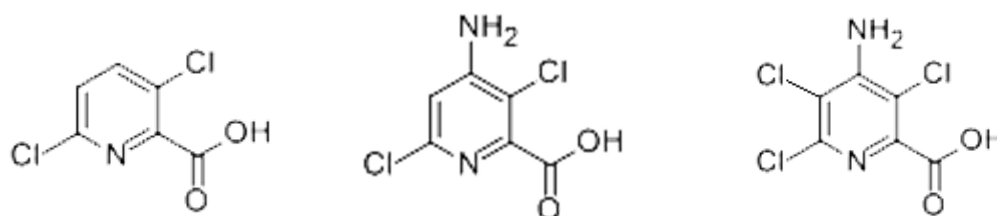


図1 クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式

(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、LC-MS/MS に導入する溶離液については A4 の水を使用する。
- b) **アセトニトリル**: JIS K 8039 に規定する残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- d) **メタノール**: LC-MS/MS の溶離液に使用するメタノールは LC-MS 用又は同等の品質の試薬。
- e) **水酸化ナトリウム**: JIS K 8576 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- f) **塩酸**: JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- g) **アンモニア水**: JIS K 8085 に規定する 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和光純薬工業、関東化学及び林純薬工業より販売されている。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

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

1) **高速液体クロマトグラフ**:

① カラム槽: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。

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

2) **質量分析計**:

① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

② イオン検出方式: 選択反応検出法

b) **振とう機**

c) **マニホールド**

d) **遠心分離機**: 1700×g で遠心分離可能なもの。

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

f) **濃縮器**: 40 °C±2 °C に調節できるエバポレーター

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

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

**備考 4.** コポリマーカートリッジは Oasis HLB 6cc(200 mg)、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>、振とう機で約 30 分間振り混ぜる。

c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。

d) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(4)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**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>(5)</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>(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)c)の流出液を 40 °C 以下の水浴上で 5 mL 以下まで減圧濃縮した後、塩酸(1+11)3 mL を加える。
- c) 濃縮した流出液をカートリッジカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- d) なすフラスコを塩酸(1+120)約 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カートリッジに加える。
- e) 次に、塩酸(1+120)－アセトニトリル[9+1]約 5 mL 及び水約 5 mL を順次カートリッジ加えて流出させる。
- 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) ポリプロピレン製等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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L を **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  $\mu$ g/kg、400  $\mu$ g/kg 及び 40  $\mu$ g/kg の添加レベルで平均回収率が 78.1 %～90.0 %、81.0 %～117.6 %及び 71.2 %～101.3 %であった。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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$s_r$ <sup>3)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$RSD_r$ <sup>4)</sup> (%)	$s_R$ <sup>5)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$RSD_R$ <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 $\times$ 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) 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)

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

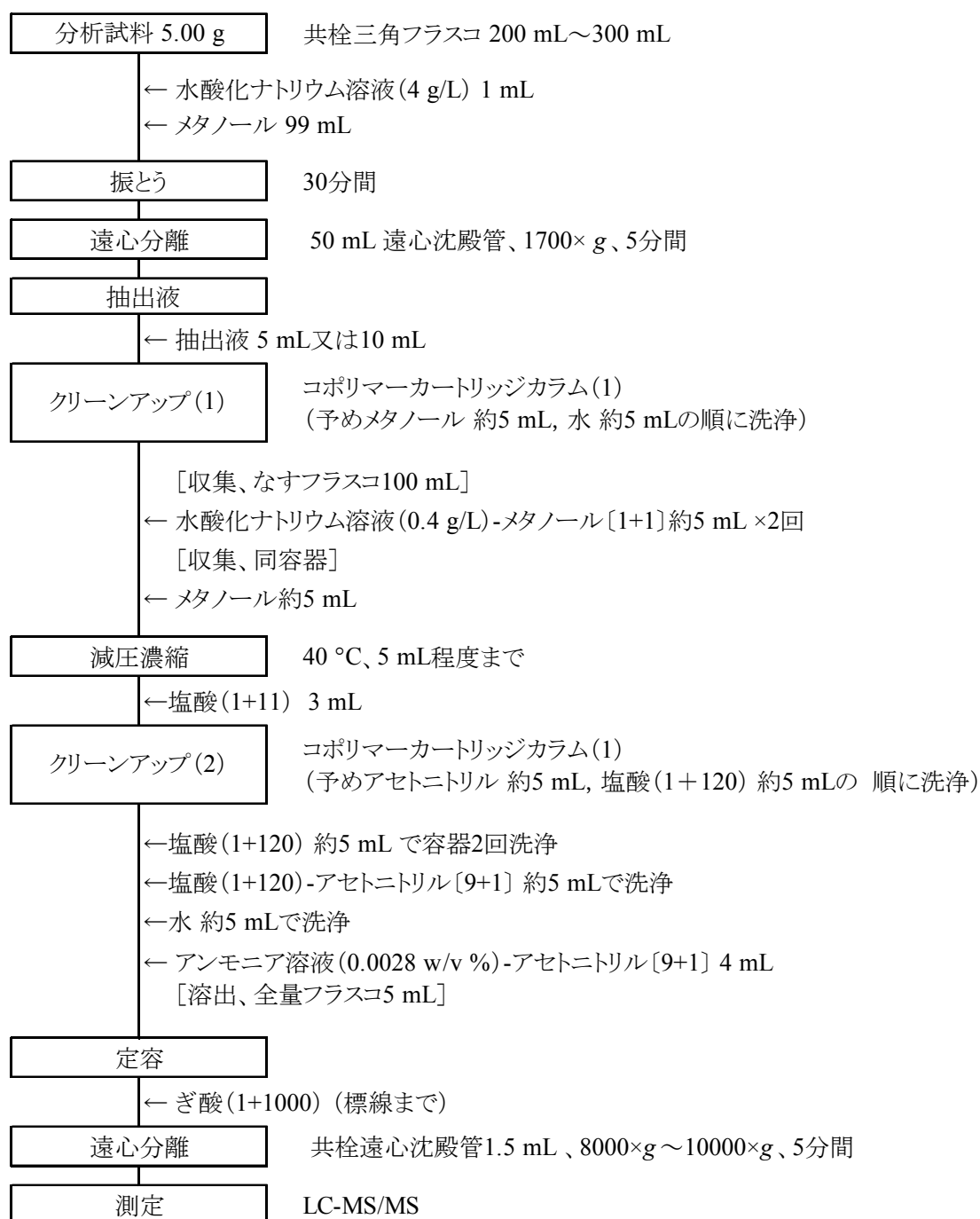
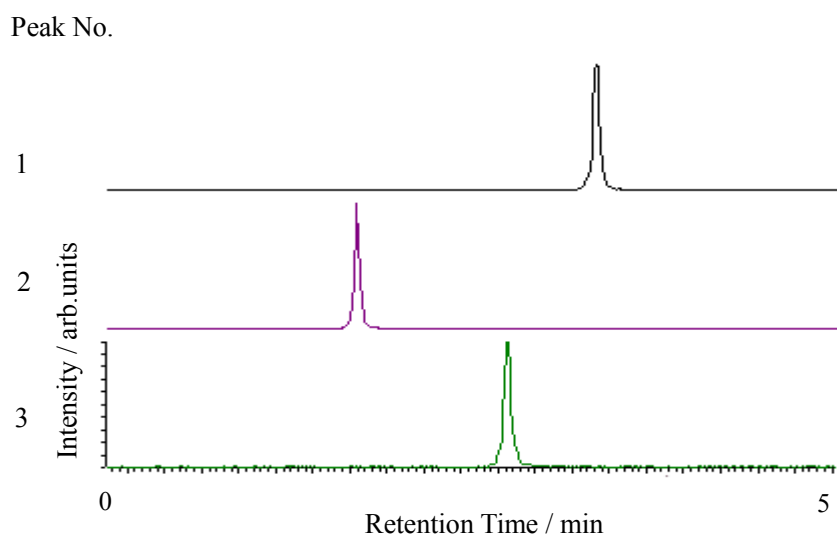


図2 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート

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



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

参考図 各農薬の SRM クロマトグラム  
 混合標準液(各農薬として 200 pg 相当量)

LC-MS/MS の測定条件

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

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

### 8.3 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(記号: 8.3.1.a-2017、AG-C.a-1)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。

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

(3) **試薬等** 試薬及び水は、次による。

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



- 注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。  
 (2) 標準試薬が市販されている。

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

- (4) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。
- a) **高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)**: JIS K 0136 に規定する LC-MS/MS で次の要件を満たすもの。
- 1) **高速液体クロマトグラフ**:
- ① カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - ② カラム: 内径 2 mm~3 mm, 長さ 50 mm~150 mm, 粒径 1.6 μm~3.0 μm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。質量分析計仕様のもの<sup>(3)</sup>。
- 2) **質量分析計**:
- ① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法
  - ② イオン検出方式: 選択反応検出法
- b) **超音波発生器**: 超音波洗浄器を用いることができる。
- c) **濃縮器**: 40 °C まで調節できるエバポレーター
- d) **多孔性けいそう土カートリッジカラム**: 多孔性けいそう土を充てんしたもの(保持容量 5 mL)<sup>(4)</sup>
- e) **グラファイトカーボン-NH<sub>2</sub> 積層カートリッジカラム**: グラファイトカーボン 500 mg 及びアミノプロピルシリル化シリカゲル 500 mg を注射筒 6 mL に積層したもの<sup>(5)</sup>

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

(4) Chem Elut (5 mL)等の名称で市販されている。

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

## (5) 試験操作

(5.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 5.00 mL<sup>(6)</sup>を、全量フラスコ 10 mL に入れる。
- b) アセトニトリル 3 mL を同全量フラスコに加え、標線まで水を加えてよく振り混ぜる。
- c) 超音波発生器を用いて 5 分間超音波処理をし<sup>(7)</sup>、抽出液とする。

注(6) 試料の比重を量り測定終了後、分析試料中の対象物質濃度を算出する。

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

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

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

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

**注(8)** 試験導入前には溶出確認をすること。

(9) 乾固させすぎると農薬が揮散する恐れがある。

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

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

**注(10)** 乾固させすぎると農薬が揮散する恐れがある。

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

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

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

**1) 高速液体クロマトグラフ:**

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

**2) 質量分析計:**

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

- ④ イオン源温度: 120 °C
- ⑤ デソルベーション温度: 400 °C
- ⑥ コーン電圧: 表1 のとおり
- ⑦ コリジョンエネルギー: 表1 のとおり
- ⑧ モニターイオン: 表1 のとおり

表1 各農薬のモニターイオン条件等

農薬名	プレカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	プロダクト イオン (定量用) ( <i>m/z</i> )	プロダクト イオン (確認用) ( <i>m/z</i> )	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
アバメクチンB1a	891	305	567	20	25
イベルメクチンB1a	893	307	551	25	25
エプリノメクチン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 μL を LC-MS/MS に注入し、測定対象物質の定量用イオン (*m/z*) 及び確認用イオン (*m/z*) のクロマトグラムを記録する。
- 2) 測定対象物質の定量用イオン (*m/z*) と確認用イオン (*m/z*) のピーク面積比又は高さ比を算出する。
- 3) 各検量線用混合標準液の測定対象物質濃度と定量用イオン (*m/z*) のピーク面積又は高さ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 μL を b) 2) ~ 3) と同様に操作する<sup>(12)</sup>。
- 2) ピーク面積又は高さから検量線より測定対象物質量を求め、分析試料中の測定対象物質を算出する。

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

#### (5.5) 計算

次の式によって分析試料中の各農薬濃度を算出する。

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

A: 検量線から求めた最終試料溶液中の各測定対象物質濃度 (ng/mL)

B: 検量線上限を超えたために最終試料溶液をさらに希釈した場合の希釈倍率

C: 分析試料における比重(密度)(g/mL)

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

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

なお、この試験法の各農薬の定量下限は 10 µg/kg 程度である。

表2 残留農薬多成分分析試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

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

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

表2 (続き)

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

### 参考文献

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

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

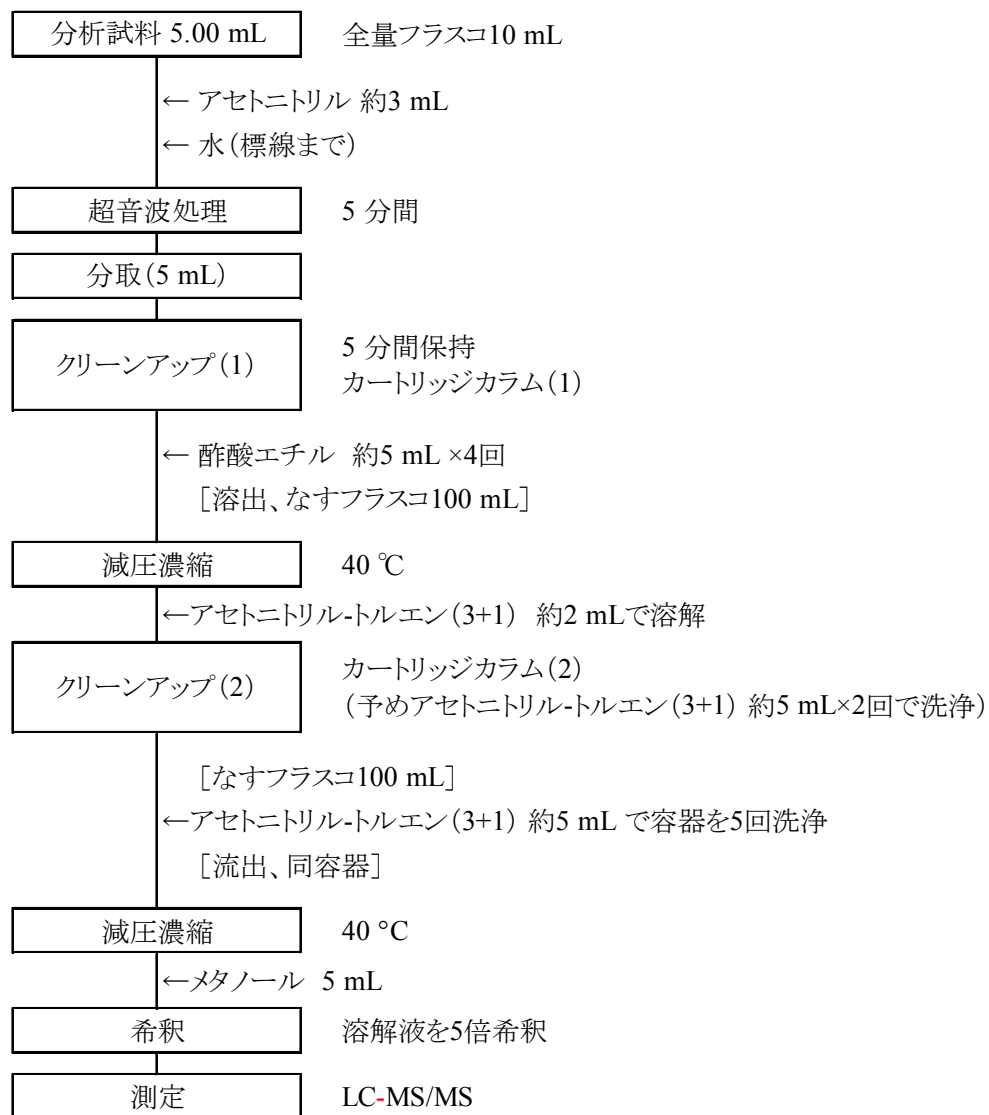
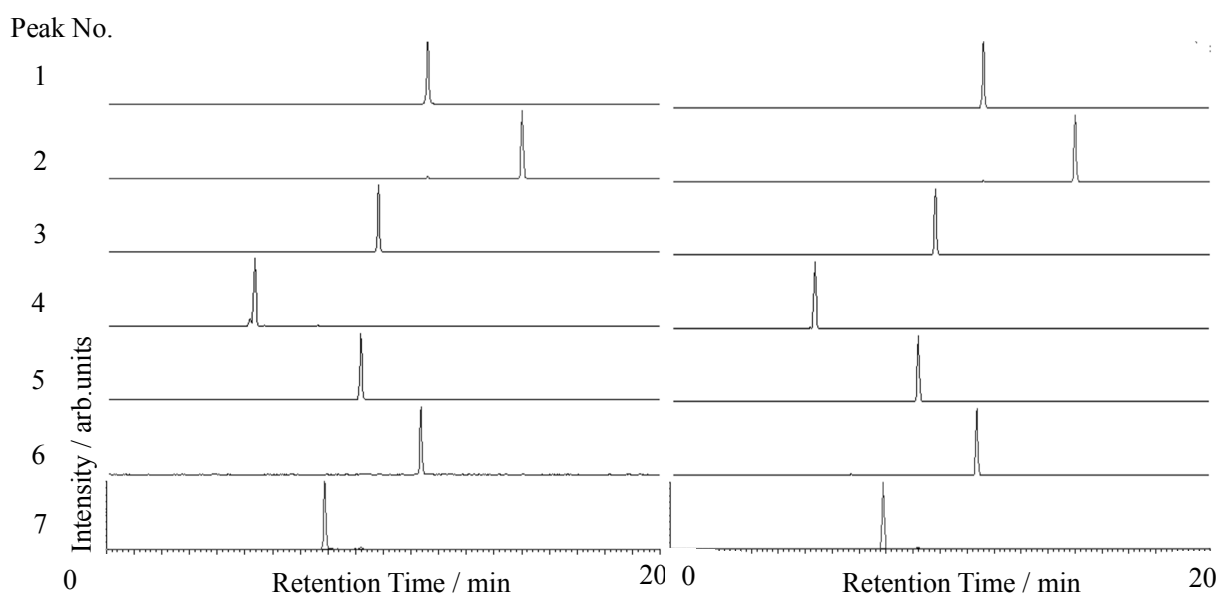


図 肥料中の6種農薬の一斉分析法フローシート

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



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

1) 混合標準液

2) 試料溶液

参考図 各農薬の選択反応検出クロマトグラム

- 1) 混合標準液(各農薬として 2,500 pg 相当量)  
 (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 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 の含量として 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、アルドリン、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(記号: 8.3.2.a-2017、AG-C.a-1)は堆肥及びその原料となる糞に適用する。

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: HPLC 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) [ $C_6H_6Cl_6$ ]<sup>(2)</sup>、 $\gamma$ -HCH ( $\gamma$ -BHC) [ $C_6H_6Cl_6$ ]<sup>(2)</sup>、*o,p'*-DDD [ $C_{14}H_{10}Cl_4$ ]<sup>(2)</sup>、*p,p'*-DDD [ $C_{14}H_{10}Cl_4$ ]<sup>(2)</sup>、*o,p'*-DDE [ $C_{14}H_8Cl_4$ ]<sup>(2)</sup>、*p,p'*-DDE [ $C_{14}H_8Cl_4$ ]<sup>(2)</sup>、*o,p'*-DDT [ $C_{14}H_9Cl_5$ ]<sup>(2)</sup>、*p,p'*-DDT [ $C_{14}H_9Cl_5$ ]<sup>(2)</sup>、アルドリン [ $C_{12}H_8Cl_6$ ]<sup>(2)</sup>、エンドリン [ $C_{12}H_8Cl_6O$ ]<sup>(2)</sup>、ディルドリン [ $C_{12}H_8Cl_6O$ ]<sup>(2)</sup>、*trans*-クロルデン [ $C_{10}H_8Cl_6$ ]<sup>(2)</sup>、*cis*-クロルデン [ $C_{10}H_8Cl_6$ ]<sup>(2)</sup>、*trans*-ノナクロル [ $C_{10}H_5Cl_9$ ]<sup>(2)</sup>、*cis*-ノナクロル [ $C_{10}H_5Cl_9$ ]<sup>(2)</sup>、ヘプタクロル [ $C_{10}H_5Cl_7$ ]<sup>(2)</sup>、ヘプタクロルエポキシド [ $C_{10}H_5Cl_7O$ ]<sup>(2)</sup> 及びヘキサクロロベンゼン [ $C_6Cl_6$ ]<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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/mL~0.2  $\mu$ g/mL)<sup>(1)</sup>: 使用時に混合標準液(1  $\mu$ g/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  $\mu$ g/mL~0.02  $\mu$ g/mL)<sup>(1)</sup>: 使用時に混合標準液(0.1  $\mu$ g/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和光純薬工業、関東化学及び林純薬工業等より販売されている。

(4) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **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 の溶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  $^{\circ}\text{C}$  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.** ゲル浸透クロマトグラフ(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、同様に減圧ろ過する。
- f) ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮する。
- g) 塩化ナトリウム飽和溶液 20 mL を加える。

(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) (5.1)g)の溶液を、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、約 5 分間放置させる。
- b) 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。
- c) 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。
- d) 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。
- e) 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恐れがある。

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

- a) (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(GPC)の操作条件:** ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)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熔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 日を変えての反復試験成績の解析結果

農薬名	反復試験		併行精度		中間精度	
	日数	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>
	$T$ <sup>1)</sup>	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	(%)	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	(%)
$\beta$ -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
ヘキサクロロベンゼン	5	15.3	1.4	9.3	2.5	16
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
ヘプタクロルエポキシド(2)	5	17.9	1.8	10.1	1.8	10
<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
<i>p,p'</i> -DDT	5	16.6	1.4	8.1	2.2	13

- 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

## (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。

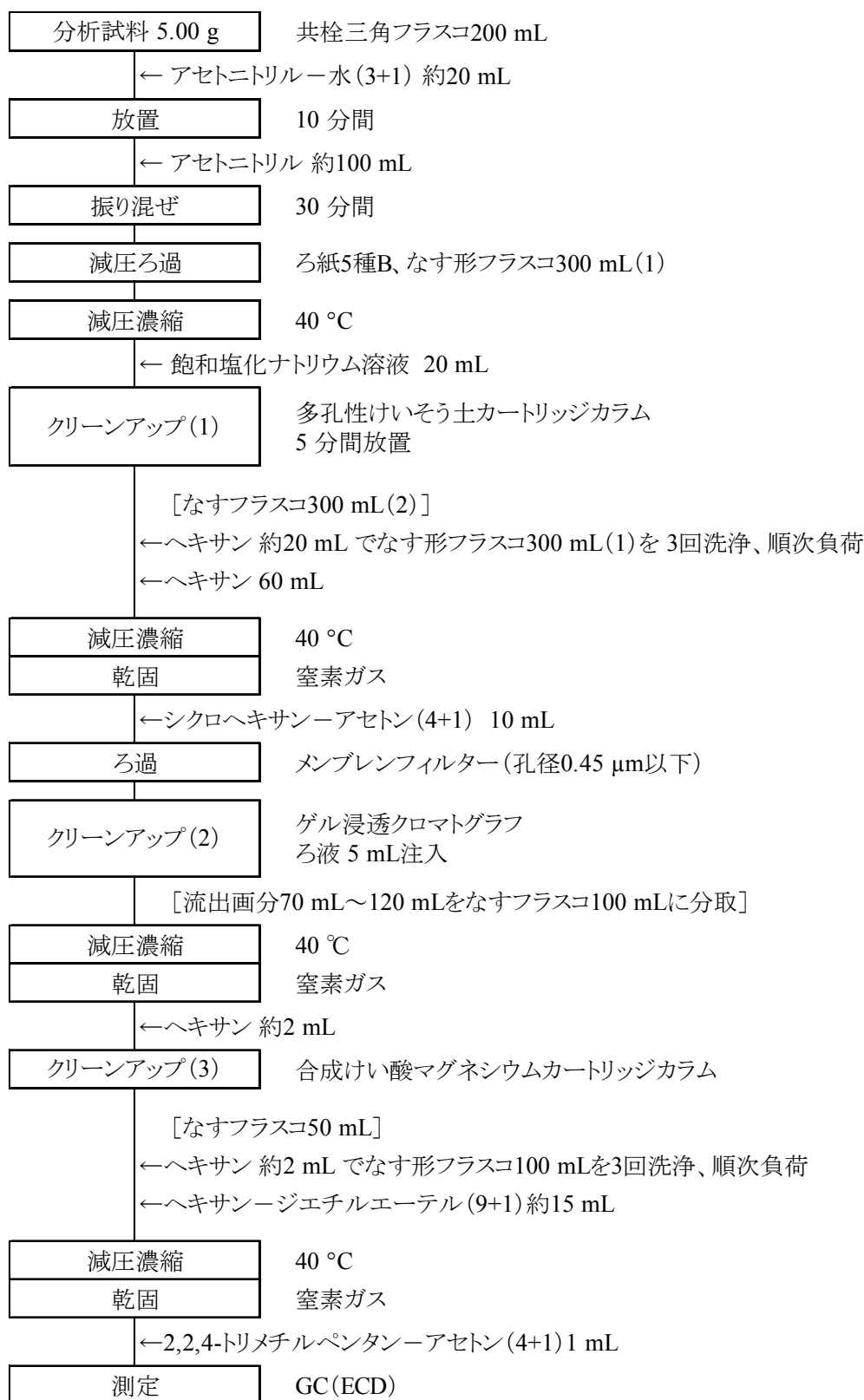


図 肥料中の塩素系農薬の一斉分析法フローシート

## 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(記号: 8.4.a-2017、Na.a-1)は有機物を含む肥料に適用する。

分析試料を灰化及び塩酸で前処理した後、アセチレン-空気フレーム中に噴霧し、ナトリウムによる原子吸光を波長 589.0 nm 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 8180 に規定する特級試薬又は同等の品質の試薬。
- b) **ナトリウム標準液(Na 1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: JIS K 8150 に規定する塩化ナトリウムを 600 °C±10 °C で約 1 時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、2.542 g をひょう量皿にはかりとる。少量の水で溶かし、全量フラスコ 1000 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- c) **ナトリウム標準液(Na 0.1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: ナトリウム標準液(Na 1 mg/mL)の 20 mL を全量フラスコ 200 mL にとり、標線まで塩酸(1+23)を加える。
- d) **検量線用ナトリウム標準液(Na 1 µg/mL～10 µg/mL)<sup>(2)</sup>**: ナトリウム標準液(Na 0.1 mg/mL)の 2.5 mL～25 mL を全量フラスコ 250 mL に段階的にとり、標線まで塩酸(1+23)を加える<sup>(2)</sup>。
- e) **検量線用空試験液**: d)の操作で使用した塩酸(1+23)<sup>(3)</sup>。

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

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

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

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

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

#### (4) 試験操作

##### (4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

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

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

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

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

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

b) **検量線の作成**

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

c) **試料の測定**

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

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

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

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

なお、この試験法の定量下限は 0.02 % (質量分率)程度である。

表1 日を変えての反復試験成績の解析結果

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

1) 2点併行試験を実施した試験日数

4) 併行標準偏差

2) 平均値(試験日数( $T$ )×併行試験数(2))

5) 併行相対標準偏差

3) 質量分率

6) 中間標準偏差

7) 中間相対標準偏差

### 参考文献

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

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

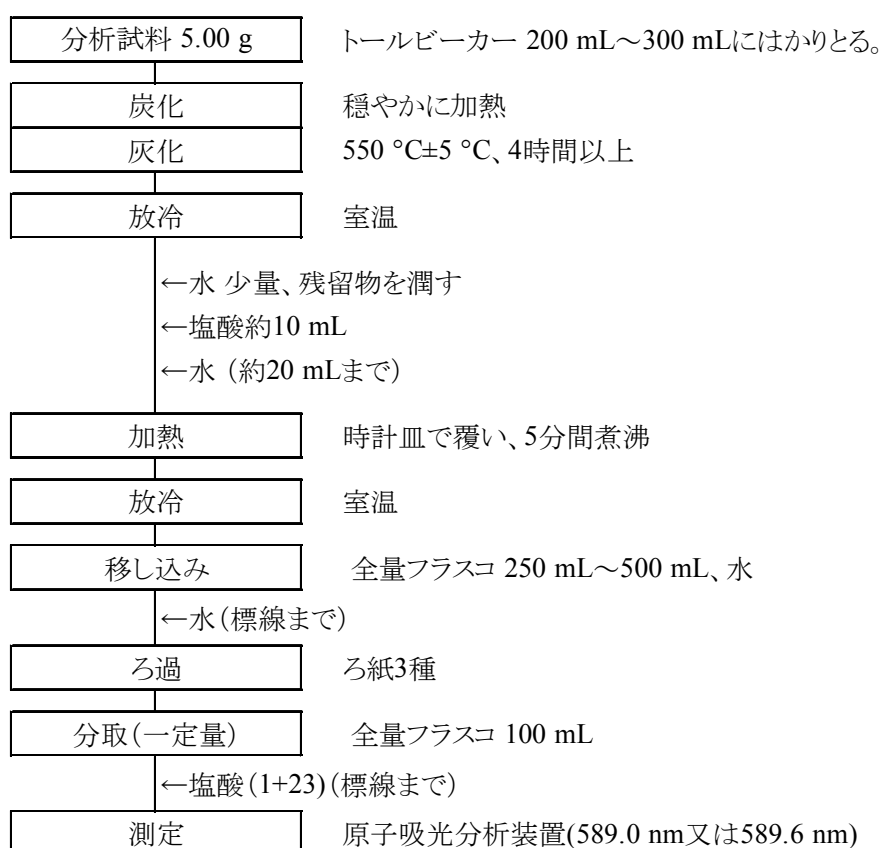


図 肥料中のナトリウム試験法フローシート



## 8.5 グアニル尿素性窒素

### 8.5.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法(記号: 8.5.a-2017、GU-N.a-1)は肥料に適用する。

分析試料に水を加えてグアニル尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、弱酸性イオン交換カラムで分離し、波長 190 nm で測定し、分析試料中のグアニル尿素性窒素(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(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
  - 1) カラム: 内径 7.5 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm~10 µm の弱酸性イオン交換樹脂を充てんしたもの。
  - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) 検出器: 吸光光度検出器で波長 190 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

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

**(4) 試験操作**

**(4.1) 抽出** 抽出は、次のとおり行う。

**(4.1.1) 粉状分析用試料**

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(3)</sup>を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10000 \times g$  で約 5 分間遠心分離し<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～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 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ ～10  $\mu\text{m}$ )
- 2) **カラム槽温度:** 40  $^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液<sup>(1)</sup>:** りん酸二水素カリウム 3.92 g 及びりん酸 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とする。親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過する。
- 4) **流量:** 0.6 mL/min
- 5) **注入量:** 10  $\mu\text{L}$
- 6) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

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

## b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク高さを求める。
- 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  $\mu\text{L}$  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 日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験		併行精度		中間精度	
	日数	平均値 <sup>2)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup>	$s_{I(T)}$ <sup>6)</sup>	$RSD_{I(T)}$ <sup>7)</sup>
	$T$ <sup>1)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%)	(%) <sup>3)</sup>	(%)
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 ( $T$ )  $\times$  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

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

(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。

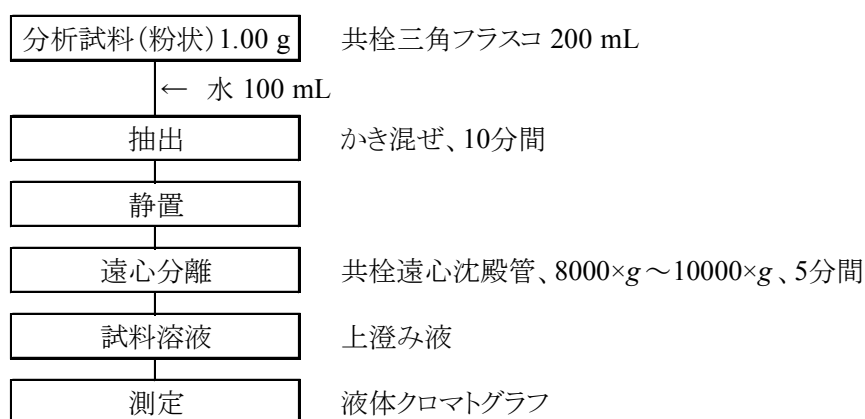


図1 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.1)及び測定)

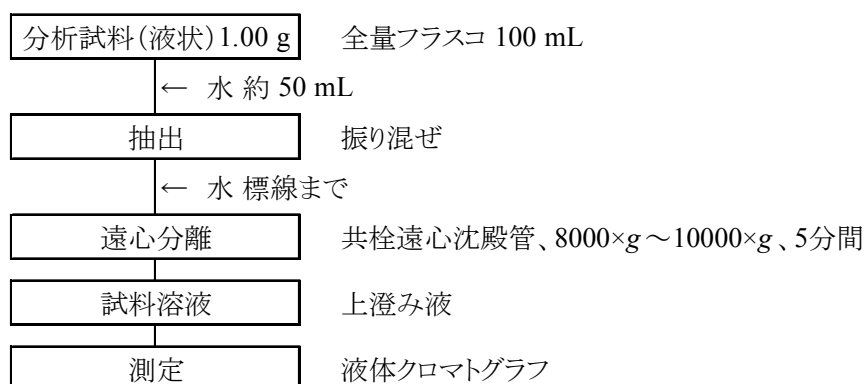
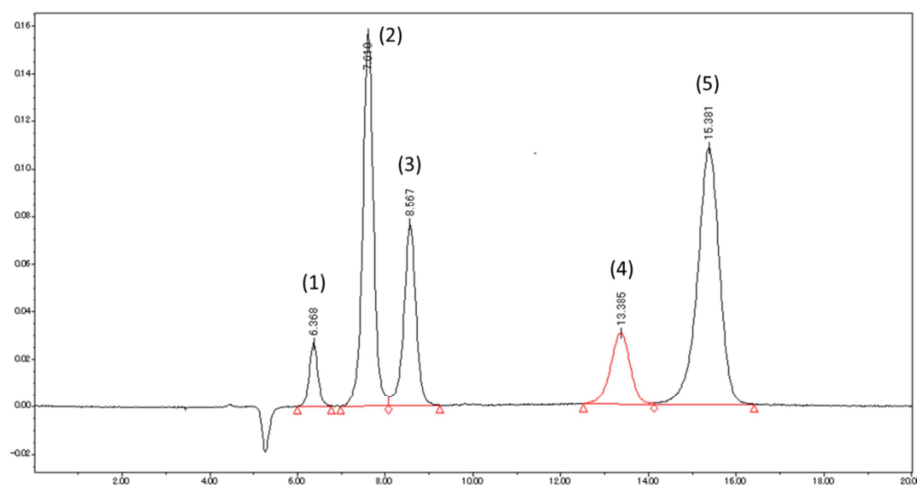


図2 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.2)及び測定)

**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

## 別添 試験法の妥当性確認の手順

### (1) 趣旨

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

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

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

### (2) 用語の定義

本項目において、用語の定義は次のとおりとする。

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

### 参考文献

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

### (3) 妥当性確認の方法

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

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

#### (3.1) 適用範囲

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

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

**(3.2) 選択性****(3.2.1) クロマトグラフ法の場合**

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

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

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

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

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

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

$t_1$ : ピーク1のリテンションタイム

$t_2$ : ピーク2のリテンションタイム

$W_1$ : ピーク1のピーク幅

$W_2$ : ピーク2のピーク幅

$W_{\frac{1}{2},1}$ : ピーク1の半値幅

$W_{\frac{1}{2},2}$ : ピーク2の半値幅

**(3.2.2) クロマトグラフ法以外<sup>(7)</sup>の場合**

ブランク試料について操作を行い、分析対象成分以外に由来した応答で、かつ定量値の正の誤差要因になり得る応答<sup>(8)</sup>がないことを確認する。

**注(7)** 吸光光度法、原子吸光法、滴定法等で測定機器において分離を行わない方法。

**(8)** 吸光度、滴定値等をいう。

**参考文献**

- 1) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 2) JIS K 0114: ガスクロマトグラフィー通則 (2012)
- 3) JIS K 0124: 高速液体クロマトグラフィー通則 (2011)
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知: 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について, 平成25年7月11日, 薬食審査発0711第1号 (2013)



**(3.3) 検量線**

6～8 水準の濃度又は含量<sup>(9)</sup>の各検量線用標準液を 2～3 回測定<sup>(10)</sup>し、得られたシグナル<sup>(11)</sup>を分析対象成分の濃度又は含量の関数としてプロットした図を用いて視覚的に直線性を評価する。

直線関係が認められる場合には、最小二乗法による回帰式の計算などの統計学的手法を用いて、検量線の傾き( $b$ )、切片( $a$ )及びその信頼区間及び決定係数( $r^2$ )を算出する。更に各水準における残差<sup>(12)</sup>をプロットする。

**注(9)** 検量線用空試験溶液を含めてもよい。

(10) 感度の変化等による非線形的混乱を避けるため、測定は反復測定ごとにランダムな順序で行う。

(11) 吸光度、蛍光強度、ピーク高さ、ピーク面積等。

(12) 測定によって得られたシグナルと回帰式より推定したシグナルの差

**備考 3.** 切片( $a$ )の 95 %信頼区間に原点(0)が含まれていることを推奨する。

**備考 4.** 決定係数( $r^2$ )が 0.99 以上であれば使用可能であるが、精密な分析には 0.999 以上であることを推奨する。決定係数( $r^2$ )が 0.99 未満である場合は、高次式を用いるか又は数値の変換を検討する。

**備考 5.** 残差の平均値は 0 であり、残差はランダムなパターンを示す。

**参考文献**

- 1) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K, Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 2) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem.* **74** (5), 835–855 (2002)
- 3) CLSI EP9 A2 Ed. 2, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples, Clinical and Laboratory Standards Institute (2002)

**(3.4) 真度**

真度を評価する方法として、①認証標準物質の利用(3.4.1)、②妥当性確認された方法による測定値との比較(3.4.2)、③回収試験(3.4.3)の順で推奨する。

なお、サロゲートを用いる場合は、その回収率がおよそ 40 %以上であることを推奨する。

**(3.4.1) 認証標準物質を利用する場合**

試験対象の肥料に似たマトリックスを持ち、測定レベルの濃度の測定対象成分を含む認証標準物質が利用できる成分においては、その認証標準物質を試験法に従って3点以上( $n$ )の併行試験を実施し、測定値の平均値が認証値(特性値)に対する警戒線以内であること、又は測定値の平均値と認証値(特性値)との差の絶対値が、測定値の平均値と認証値の各々の標準不確かさを合成した標準不確かさの 2 倍を超えないこと<sup>(13)</sup>。

**備考 6.** 警戒線は認証標準物質の値付けのための共同試験より得られた(2)式によって求められる。

認証値( $\mu$ )に対する警戒線

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

$\mu$ : 認証値

$s_R$ : 共同試験における室間再現標準偏差

$s_r$ : 共同試験における併行標準偏差<sup>(14)</sup>

$n$ : 併行試験の試験点数

$s_L$ : 共同試験における純粋な室間標準偏差

**注(13)** 測定の結果と認証値(特性値)との差の評価手順は**参考 1 測定値と認証値との比較の手順**に示した。

(14) 室内標準偏差( $s_W$ )と表記されている場合がある。

### (3.4.2) 妥当性確認された試験法が別にある場合

認証標準物質が利用できず、かつ、妥当性の確認された試験法(以下「標準試験法」という。)が別にある成分においては、**a)** 又は **b)** の条件を満足することを確認する。

**a) 試料数が 12 点以上ある場合** 12 点以上の添加試料、自然汚染試料又は流通試料を新たな試験法及び標準試験法に従ってそれぞれ試験を実施し、各試料の 2 方法の測定値の相関図を作成し、回帰直線の傾き( $b$ )、切片( $a$ )及び相関係数( $r$ )を算出し、更に予測区間を確認する。

ただし、測定値の最小値と最大値の幅が小さい場合は、対応のある  $t$  検定を実施して有意な差が認められないことを確認する。

**備考 7.** 傾き( $b$ )の 95 %信頼区間に 1 が含まれ、切片( $a$ )の 95 %信頼区間に原点(0)が含まれ、相関係数( $r$ )が 0.99 以上であることを推奨する。

**b) 試料数が少ない場合** 異なる 3 濃度以上の分析用試料について、新たな試験法及び標準試験法に従ってそれぞれ 4 点併行で添加試験を実施し、2 群の成績の等分散性を確認し、濃度毎に  $t$  検定を実施して両側有意水準 5 %で有意な差が認められないことを確認する。

### (3.4.3) 認証標準物質がなく、妥当性確認された試験法が別でない場合

異なる 3 濃度以上の試料について、それぞれ 3 点併行で試験を実施し得られた測定値の平均値を用いて回収率を求め、評価する。真度の目安は**別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安**に示した。

### 参考文献

- 1) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 2) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.,: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem.* **74** (5), 835–855 (2002)
- 3) Linsinger, T.,: Comparison of a measurement result with the certified value, European Reference Materials' application note 1, European Commission - Joint Research Centre Institute for Reference Materials and

Measurements (IRMM) (2010)

- 4) Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Procedural manual Twenty-second edition, Codex Alimentarius Commission (2013)
- 5) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)

### (3.5) 精度

共同試験(3.5.1)により室間再現精度及び併行精度を評価する。又は、単一試験室において日を変えての反復試験(3.5.2)により中間精度及び併行精度を評価する。

#### (3.5.1) 共同試験による室間再現精度及び併行精度

有効データを得る試験室数は8以上<sup>(15)</sup>とし、濃度の異なる5種類以上の試料について、非明示の2点併行により共同試験を実施する。得られた測定値から室間再現精度及び併行精度を求め<sup>(16)</sup>、評価する。

これらの精度を評価するための目安は別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安に示した。

注(15) 必要な設備・機器を所有している試験室が限定されている場合は5以上。

(16) 算出方法は参考2 室間再現精度又は値中間精度及び併行精度の算出に示した。

#### (3.5.2) 単一試験室において日を変えての反復試験による中間精度及び併行精度

規定する範囲を含む異なる2濃度の分析用試料を用いて、1試験日につき2点併行で5～7日間試験<sup>(17)</sup>を実施する<sup>(18)</sup>。得られた測定値から中間精度及び併行精度を求め<sup>(19)</sup>、評価する。

これらの精度を評価するための目安は別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安に示した。

注(17) 内部品質管理のデータを用いることができる。

(18) 同一の試験者が5～7日間通して試験を実施する必要はない。

(19) 算出方法は参考2 室間再現精度又は値中間精度及び併行精度の算出に示した。

### 参考文献

- 1) AOAC Official Methods of Analysis Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)
- 2) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.,: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem.* **74** (5), 835–855 (2002)
- 3) AOAC Official Methods of Analysis Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)
- 4) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331–343 (1995)

### (3.6) 定量下限(LOQ)

(3.6.1)～(3.6.3)に従って定量下限(LOQ)を推定する。必要に応じて、推定された定量下限付近の濃度を含

む分析用試料を段階的に調製し、それぞれ 3 点併行で試験を実施し、得られた測定値の平均値が真度の目標値に適合する濃度を定量下限とする。

**備考 8.** 有害成分、制限成分等の定量下限 (LOQ) は、含有許容量及びそれに準ずる水準が 1.0 mg/kg 以上の場合ではその 1/5 以下であり、1.0 mg/kg 未満の場合ではその 2/5 以下であること。また、主成分・主要な成分及び材料の成分の定量下限 (LOQ) は、含有すべき最小量及び流通肥料中の含有最小量の 1/5 以下であることを推奨する。なお、定量下限 (LOQ) がそれらの最小量の 1/5 を超える場合は、上記の併行試験を実施して定量下限を確認し、試験法の適用範囲にその旨を明記する。

**備考 9.** 定量下限を推定するにはいくつかの方法があり、測定方法が機器分析であるか否か、使用する測定機器によって方法が異なる。(3.6.1)～(3.6.3)に示す方法とは異なる方法を用いても差し支えないが、その方法及びその方法における定量下限の定義を明記する。

### (3.6.1) 併行試験により推定する方法

定量下限付近の濃度の分析用試料について、それぞれ 7～10 点併行で試験を実施し、併行標準偏差を求め、(3)式によって試料中の定量下限 (LOQ) を推定する。

$$\text{試料中の定量下限(LOQ)の推定値} = 10 \times s_r \quad \dots (3)$$

$s_r$ : 併行標準偏差

### (3.6.2) 検量線を用いて推定する方法

検量線が直線の場合は、検量線の残差又は推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差と検量線の傾きを用いて、(4)式によって試料中の定量下限 (LOQ) を推定する。

$$\text{試料中の定量下限(LOQ)の推定値} = \frac{10 \times s}{b} \quad \dots (4)$$

$s$ : 残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差

$b$ : 検量線の傾き

### (3.6.3) SN 比により推定する方法

クロマトグラフ法等のベースラインノイズを伴う試験法においては、SN 比が 10:1 のピークの試料溶液中の濃度より算出して、試料中の定量下限 (LOQ) を推定する。

## 参考文献

- 1) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)
- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知: 分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について, 平成 9 年 10 月 28 日, 医薬審第 338 号 (1997)

**(3.7) 検出下限(LOD)**

(3.7.1)～(3.7.3)に従って検出下限(LOD)を推定する。

**備考 10.** 検出下限を推定するにはいくつかの方法があり、測定方法が機器分析であるか否か、使用する測定機器によって方法が異なる。(3.7.1)～(3.7.3)に示す方法とは異なる方法を用いても差し支えないが、その方法及びその方法における検出下限の定義を明記する。

**(3.7.1) 併行試験により推定する方法**

定量下限付近の濃度の分析用試料又はブランク試料について、それぞれ7～10点併行で試験を実施し、併行標準偏差を求め、(5)式によって試料中の検出下限(LOD)を推定する。

$$\text{試料中の検出下限(LOD)の推定値} = 2 \times t(n-1, 0.05) \times s_r \quad \dots (5)$$

$s_r$ : 併行標準偏差

$t(n-1, 0.05)$ : 危険率片側5%の学生t値<sup>(20)</sup>

$n$ : 併行試験の併行点数

**注(20)** 併行試験7点併行の場合は1.94であり、10点併行の場合は1.83である。

**(3.7.2) 検量線を用いて推定する方法**

検量線が直線の場合は、検量線の残差又は推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差と検量線の傾き( $b$ )を用いて、(6)式によって試料中の検出下限(LOD)を推定する。

$$\text{試料中の検出下限(LOD)の推定値} = \frac{2 \times t(n-2, 0.05) \times s}{b} \quad \dots (6)$$

$s$ : 残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差

$b$ : 検量線の傾き

$t(n-2, 0.05)$ : 危険率片側5%の学生t値

$n$ : 検量線の測定ポイント数

**(3.7.3) SN比により推定する方法**

クロマトグラフ法等のベースラインノイズを伴う試験法においては、SN比が3:1のピークの試料溶液中の濃度より算出して、試料中の検出下限(LOD)を推定する。

**参考文献**

- 1) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)

- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知：分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について，平成9年10月28日，医薬審第338号(1997)

### (3.8) 頑健性

頑健性は、分析法を開発する段階において検討しておくべきであり、その評価方法は開発しようとする分析法のタイプに依存する。頑健性は、分析条件を故意に変動させたときの分析法の信頼性を表す。もし、測定値が分析条件の変動の影響を受け易いようであれば、分析条件を適切に制御する方法を考慮するか、あるいは、そのことを分析法の中に注意事項として盛り込む必要がある。頑健性を評価することによってシステム適合性に関する一連のパラメータ(例えば、分離度)を確立することができよう。これらのパラメータを確認することによって、日常的分析において分析法の妥当性が維持されていることを保証できる。

代表的な変動因子は、次のとおりである。

(3.8.1) **共通する変動因子** 種々の試験法に共通する代表的な変動因子は、次のものがある。

- a) 抽出時間、抽出温度
- b) 各段階の試験溶液の安定性
- c) 試薬のグレード

(3.8.2) **クロマトグラフ法等における変動因子** クロマトグラフ法による測定又は固相抽出による精製の代表的な変動因子は、次のものがある。

- a) カラム又はカートリッジの変更(異なるロット又は異なる銘柄)
- b) 溶離液又は洗浄液の pH 及び組成の変動の影響
- c) 温度
- d) 流速
- e) マトリックスの影響及び希釈の効果

### 参考文献

- 1) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)
- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知：分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について，平成9年10月28日，医薬審第338号(1997)
- 3) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem.* **74** (5), 835–855 (2002)

### 参考1 測定値と認証値との比較の手順

(R1.1)式により併行試験成績の総平均値( $m$ )及び認証値( $\mu$ )とそれらの差の絶対値( $\Delta_m$ )を求める。次に、(R1.2)式より認証標準物質の認証値の標準不確かさ( $u_{CRM}$ )及び(R1.3)式より総平均値の標準不確かさ( $u_m$ )を求める。得られた $u_m$ 及び $u_{CRM}$ を用いて(R1.4)式より $\Delta_m$ の合成標準不確かさ( $u_{C(\Delta_m)}$ )を算出し、更に包含係数( $k = 2$ )を用いて(R1.5)式より拡張不確かさ( $U_{\Delta_m}$ )を算出する。

$\Delta_m$ と $U_{\Delta_m}$ を比較して判定式((R1.6)式)に適合しているか、すなわち $\Delta_m$ が $U_{\Delta_m}$ 以下であることを確認する。

$$\text{併行試験成績の総平均値と認証値の差の絶対値}(\Delta_m) = |m - \mu| \quad \cdots (R1.1)$$

$$\text{認証値の標準不確かさ}(u_{CRM}) = \frac{U_{95\%}}{k_{CRM}} \quad \cdots (R1.2)$$

$$\text{総平均値の測定の標準不確かさ}(u_m) = \frac{s_r}{\sqrt{n}} \quad \cdots (R1.3)$$

$$\Delta_m \text{の合成標準不確かさ}(u_{C(\Delta_m)}) = \sqrt{u_m^2 + u_{CRM}^2} \quad \cdots (R1.4)$$

$$\Delta_m \text{の拡張不確かさ}(U_{\Delta_m}) = k_{C(\Delta_m)} \times u_{C(\Delta_m)} = 2 \times u_{C(\Delta_m)} \quad \cdots (R1.5)$$

$$\text{判定式} \quad \Delta_m \leq U_{\Delta_m} \quad \cdots (R1.6)$$

$m$ : 測定値の総平均値

$\mu$ : 認証値

$U_{95\%}$ : 認証値の拡張不確かさ

$k_{CRM}$ : 認証標準物質の拡張不確かさの包含係数

$s_r$ : 併行標準偏差

$n$ : 併行試験点数

$k_{C(\Delta_m)}$ :  $\Delta_m$ の拡張不確かさの包含係数( $k_{C(\Delta_m)} = 2$ )

参考2 空間再現精度又は中間精度及び併行精度の算出

(1) 測定値の構造

表1の測定値( $x_{ij}$ )は、(R2.1)式のとおり、真値( $\mu$ )、要因による変動( $\beta$ )及び併行条件下の偶然誤差(以下、「偶然誤差」という)による変動( $e$ )から成り立っている。 $p$ 試験室がそれぞれ  $n$  点併行で測定する共同試験を実施したとき、 $\beta$ の分布は純粋な室間変動による  $N(0, \sigma_L^2)$ 、 $e$ の分布は偶然誤差による  $N(0, \sigma_r^2)$ と仮定すると、(R2.2)式が導かれる。また、同一試験室において  $p$  日間それぞれ  $n$  点併行で測定する反復試験を実施したとき、 $\beta$ の分布は日間変動(要因  $T$ )による  $N(0, \sigma_{(T)}^2)$ 、 $e$ の分布は偶然誤差による  $N(0, \sigma_r^2)$ と仮定すると、(R2.3)式が導かれる。

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

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

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

$\mu$ : 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	自由度	不偏分散 ( $V$ )	分散の期待値 $E(V)$
試験室間 ( $L$ )	$SS_L$	$p - 1$	$V_L$	$\sigma_r^2 + n \times \sigma_L^2$
偶然誤差 ( $e$ )	$SS_r$	$p \times (n - 1)$	$V_r$	$\sigma_r^2$

**備考 1.** 一元配置分散分析は、市販の統計ソフトや表計算ソフトのツールを用いて容易に行える。この場合、用語が異なることがあるので留意すること。(試験室間 ( $L$ ) → グループ間、偶然誤差 ( $e$ ) → グループ内、平方和 → 変動 等)

**備考 2.** 不偏分散 ( $V$ ) は平方和 / 自由度によって算出される。

### (2.3) 室間再現精度及び併行精度の算出

表 2 の各変動要因の分散の期待値  $E(V)$  の関係が成り立つことから、(R2.4) 式及び (R2.5) 式によって併行分散 ( $s_r^2$ ) 及び純粋な室間分散 ( $s_L^2$ ) を算出し、更に (R2.6) 式によって室間再現分散 ( $s_R^2$ ) を算出する<sup>(1)(2)</sup>。

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

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

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

$V_r$ : 一元配置分散分析表(表 2)の変動要因(偶然誤差( $e$ ))の不偏分散

$V_L$ : 一元配置分散分析表(表 2)の変動要因(試験室間( $L$ ))の不偏分散

得られた併行分散及び室間再現分散から、(R2.7) 式及び (R2.8) 式によって併行標準偏差 ( $s_r$ ) 及び室間再現標準偏差 ( $s_R$ ) を算出し、更に (R2.9) 式及び (R2.10) 式によって併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) を算出する<sup>(2)(3)</sup>。

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

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

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

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

$m$ : 共同試験成績の有効データの総平均値

- 注(1)  $V_L < V_r$  の場合は、 $V_L = V_r$  (すなわち、(R2.5)式の純粋な室間分散( $s_L^2 = 0$ )と見なし、(R2.6)式では $s_R^2 = s_r^2$ とおく。
- (2) 計算途中においては数値の丸めを実施しない。
- (3) 平均値及び標準偏差は測定値の桁に丸めて表記する。相対標準偏差は小数第一位に丸めて表記する。

### (3) 日を変えての反復試験成績により中間精度及び併行精度の算出手順

#### (3.1) 真値及び分散の推定

実際の統計解析では、真値( $\mu$ )、真の日間分散( $\sigma_{(T)}^2$ )及び真の併行分散( $\sigma_r^2$ )は未知であり、日を変えての反復成績から得られる推定値に置き換えて、それぞれ平均値( $m$ )、日間分散( $s_{(T)}^2$ )及び併行分散( $s_r^2$ )と表記する。

#### (3.2) 一元配置分散分析

日を変えての反復試験の試験成績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	自由度	不偏分散 ( $V$ )	分散の期待値 $E(V)$
日間 ( $T$ )	$SS_T$	$p - 1$	$V_T$	$\sigma_r^2 + n \times \sigma_{(T)}^2$
偶然誤差 ( $e$ )	$SS_r$	$p \times (n - 1)$	$V_r$	$\sigma_r^2$

**備考 3.** 一元配置分散分析は、市販の統計ソフトや表計算ソフトのツールを用いて容易に行える。この場合、用語が異なることがあるので留意すること。(日間( $T$ )→グループ間、偶然誤差( $e$ )→グループ内、平方和→変動 等)

**備考 4.** 不偏分散( $V$ )は平方和/自由度によって算出される。

#### (3.3) 中間精度及び併行精度の算出

表3の各変動要因の分散の期待値 $E(V)$ の関係が成り立つことから、(R2.11)式及び(R2.12)式によって併行分散( $s_r^2$ )及び日間分散( $s_{(T)}^2$ )を算出し、更に(R2.13)式によって中間分散( $s_{I(T)}^2$ )を算出する<sup>(2)(4)</sup>。

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

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

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

$V_r$ : 一元配置分散分析表(表3)の変動要因(偶然誤差( $e$ ))の不偏分散

$V_T$ : 一元配置分散分析表(表3)の変動要因(日間( $T$ ))の不偏分散

得られた併行分散の推定値及び中間分散の推定値から、(R2.14)式及び(R2.15)式によって併行標準偏差( $s_r$ )及び中間標準偏差( $s_{I(T)}$ )を算出し、更に(R2.16)式及び(R2.17)式によって併行相対標準偏差( $RSD_r$ )及

び中間相対標準偏差( $RSD_{I(T)}$ )を算出する<sup>(2)(3)</sup>。

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

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

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

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

$m$ : 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	自由度	不偏分散 (V)	分散の期待値 E(V)
試料 1	日間 (T)	1.0570	6	0.17616	$\sigma_r^2 + 2 \times \sigma_{(T)}^2$
	偶然誤差 (e)	0.1253	7	0.01789	$\sigma_r^2$
試料 2	日間 (T)	0.0478	6	0.00797	$\sigma_r^2 + 2 \times \sigma_{(T)}^2$
	偶然誤差 (e)	0.0448	7	0.00640	$\sigma_r^2$

表 6-1 日を変えた反復試験の試料 1 の成績からの中間精度及び併行精度の算出<sup>1)</sup>

変動要因	単位	計算式	計算	結果
併行分散( $s_r^2$ )		$= V_r$	$= 0.01789$	0.01789
併行標準偏差( $s_r$ ) <sup>2)</sup>	質量分率 (%)	$= \sqrt{s_r^2}$	$= \sqrt{0.01789}$	0.13
併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) <sup>3)</sup>	%	$= \frac{s_r}{m} \times 100$	$= \frac{0.1338}{51.38} \times 100$	0.3
日間分散( $s_{(T)}^2$ )		$= \frac{V_T - V_r}{n}$	$= \frac{0.17616 - 0.01789}{2}$	0.07914
中間分散( $s_{I(T)}^2$ )		$= s_{(T)}^2 + s_r^2$	$= 0.07914 + 0.01789$	0.09703
中間標準偏差( $s_{I(T)}$ ) <sup>2)</sup>	質量分率 (%)	$= \sqrt{s_{I(T)}^2}$	$= \sqrt{0.09703}$	0.31
中間相対標準偏差 ( $RSD_{I(T)}$ ) <sup>3)</sup>	%	$= \frac{s_{I(T)}}{m} \times 100$	$= \frac{0.3115}{51.38} \times 100$	0.6

- 1) 計算途中においては数値の丸めを実施しない。
- 2) 標準偏差は測定値の桁に丸めて表記する。
- 3) 相対標準偏差は小数第一位に丸めて表記する。

表 6-2 日を変えた反復試験の試料 2 の成績からの中間精度及び併行精度の算出<sup>1)</sup>

変動要因	単位	計算式	計算	結果
併行分散( $s_r^2$ )		$= V_r$	$= 0.00640$	0.00640
併行標準偏差( $s_r$ ) <sup>2)</sup>	質量分率 (%)	$= \sqrt{s_r^2}$	$= \sqrt{0.00640}$	0.08
併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) <sup>3)</sup>	%	$= \frac{s_r}{m} \times 100$	$= \frac{0.0800}{5.10} \times 100$	1.6
日間分散( $s_{(T)}^2$ )		$= \frac{V_T - V_r}{n}$	$= \frac{0.00797 - 0.00640}{2}$	0.00078
中間分散( $s_{I(T)}^2$ )		$= s_{(T)}^2 + s_r^2$	$= 0.00078 + 0.00640$	0.00718
中間標準偏差( $s_{I(T)}$ ) <sup>2)</sup>	質量分率 (%)	$= \sqrt{s_{I(T)}^2}$	$= \sqrt{0.00718}$	0.08
中間相対標準偏差 ( $RSD_{I(T)}$ ) <sup>3)</sup>	%	$= \frac{s_{I(T)}}{m} \times 100$	$= \frac{0.0848}{5.10} \times 100$	1.7

脚注は表 6-1 を参照

## 別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安

クロマトグラフ法<sup>1)</sup>並びにクロマトグラフ法以外の試験法の評価のための各濃度レベルにおける真度(回収率)の目標及び精度の目安は表1及び表2に示した。真度は、概ね表1の回収率以内であることを目標とする。精度は、表2の各相対標準偏差以内であることを推奨するが、それらの1.5倍まで許容する。

注(1) ガスクロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ質量分析法、高速液体クロマトグラフ法、高速液体クロマトグラフ(タンデム)質量分析法、イオンクロマトグラフ法等をいう。

表1 各濃度レベルにおける真度の目標

濃度レベル	クロマトグラフ法	クロマトグラフ法以外の試験法
	回収率 (%)	回収率 (%)
≥25%(質量分率)	90~108	98~102
≥10%(質量分率)	90~108	97~103
≥1%(質量分率)	85~110	96~104
≥0.1%(質量分率)	85~110	94~106
≥100 mg/kg	80~115	92~108
≥10 mg/kg	70~120	90~110
≥1 mg/kg	70~120	85~115
≥100 µg/kg	70~120	85~115
≥10 µg/kg	70~120	80~120
<10 µg/kg	60~125	75~125

表2 各濃度レベルにおける精度<sup>1)</sup>の目安

濃度レベル	クロマトグラフ法			クロマトグラフ法以外の試験法		
	室間再現相対	中間相対	併行相対	室間再現相対	中間相対	併行相対
	標準偏差 (%)	標準偏差 (%)	標準偏差 (%)	標準偏差 (%)	標準偏差 (%)	標準偏差 (%)
≥25%(質量分率)	8	6.5	4	2.5	2	1
≥10%(質量分率)	8	6.5	4	3	2.5	1.5
≥1%(質量分率)	8	6.5	4	4	3.5	2
≥0.1%(質量分率)	8	6.5	4	6	4.5	3
≥100 mg/kg	8	6.5	4	8	6.5	4
≥10 mg/kg	11	9	6	11	9	6
≥1 mg/kg	16	13	8	16	13	8
≥100 µg/kg	22	18	11	22	18	11
≥10 µg/kg	22	18	11	22	18	11
<10 µg/kg	22	18	11	22	18	11

1) 精度は、各相対標準偏差以内であることを推奨するが、それらの1.5倍まで許容する。