

栄養塩類分析における測定値の補正について

近藤 健・田中咲絵

Correction of Measured Values in Nutrient Analysis

Ken KONDO and Sae TANAKA

I. はじめに

(地独)大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センターでは、栄養塩類の測定に全自動流れ分析装置(CFA方式)を用いている¹⁾。同装置は、栄養塩5項目(硝酸態・亜硝酸態窒素、リン酸態リン、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素及びケイ酸態ケイ素)を同時に測定することができる。栄養塩類のうち、硝酸態・亜硝酸態窒素、リン酸態リン及びケイ酸態ケイ素については、認証値が付与された海水標準物質を用いて、測定値を補正してきた。これは過去に栄養塩類のクロスチェックを実施した際に、当所の報告値と参加機関の平均値の間に差が生じ、その対策として信頼性の高い認証標準物質として、海水標準物質を用いたことによる。その補正方法は、検量線の作成に用いる標準液の設定濃度を補正係数(海水標準物質の測定値/認証値)で除し、その値を用いた検量線から、海水試料の測定値を算出する方法による。この方法はかたより(一定の傾向を持った差)を小さくすることに対しては有効だが、測定値のばらつきが大きいとき、標準物質や海水試料だけでなく海水標準物質の測定値もばらつきを含むことになるため必ずしも有効であるとはいえない。既報において硝酸態・亜硝酸態窒素は測定における不確かさが比較的大きく、海水標準物質による寄与が最も大きいことが明らかになった²⁾。この不確かさは測定値の標準偏差から求めたものであり、不確かさが大きいということは、ばらつきが大きく、この補正方法が有効でないことが考えられる。本報告書では、主に海水標準物質の認証値が与えられている硝酸態・亜硝酸態窒素、リン酸態リン及びケイ酸態ケイ素について、日内変動、日間変動などの測定値のばらつき、測定値のかたよりを評価し、海水標準物質による補正が有効かを検討した。

II. 材料および方法

1. 材料

標準液は、日本産業規格(JIS)³⁾及び海洋観測ガイドライン⁴⁾に基づき、硝酸カリウム、亜硝酸ナトリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸アンモニウム及びヘキサフルオロケイ酸カリウム(特級試薬)を110°Cで4~5時間乾燥させて放冷した後、超純水に溶解し表1の濃度に調製した。そのうち当センターの分析業務で使用しているCAL1~5及びCAL10を定量のための検量線の作成に用いた。繰り返し測定に用いた3 μ mol/L栄養塩5項目混合液についても同様に調製した。標準液の繰り返し測定にはCAL1~9を用いた。測定には、全自動流れ分析装置(CFA方式)SwAAt28(BL TEC社製)を用いた。海水標準物質は認証標準物質である栄養塩測定用海水標準物質(KANSOテクノス社製)の5瓶(CM-0360, CM-0377, CM-0420, CM-1594, CM-2480)⁵⁾を用いた。これらはいずれも同じ認証値が付与されている。海水標準物質の濃度(μ mol/L)は、海水標準物質の塩分と測定時の平均室温を用いて海洋観測常用表から σ_t を求め、 σ_t から算出した海水密度と認証値(μ mol/kg)とから算出した⁶⁾。その濃度を表2に示す。

表 1 標準液の設定濃度 ($\mu\text{mol/L}$)

	$\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{PO}_4\text{-P}$	$\text{NH}_4\text{-N}$	$\text{SiO}_2\text{-Si}$
CAL1	30	25	5	5	30	100
CAL2	24	20	4	4	24	80
CAL3	18	15	3	3	18	60
CAL4	12	10	2	2	12	40
CAL5	6	5	1	1	6	20
CAL6	3	2.5	0.5	0.5	3	10
CAL7	1.5	1.25	0.25	0.25	1.5	5
CAL8	0.6	0.5	0.1	0.1	0.6	2
CAL9	0.3	0.25	0.05	0.05	0.3	1
CAL10	0	0	0	0	0	0

表 2 密度と認証値から求めた海水標準物質の濃度 ($\mu\text{mol/L}$)

$\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{PO}_4\text{-P}$	$\text{SiO}_2\text{-Si}$
34.0	0.018	2.44	103

2. 方法

1) $3\mu\text{mol/L}$ 栄養塩溶液の繰り返し測定

各項目一定濃度での繰り返し精度を明らかにするため、調査業務で観測される値に近く、ピークの形状が安定していると考えられる $3\mu\text{mol/L}$ に調製した栄養塩溶液を繰り返し測定した ($n=5$)。硝酸態・亜硝酸態窒素については硝酸態窒素が $2.5\mu\text{mol/L}$ 、亜硝酸態窒素が $0.5\mu\text{mol/L}$ を含む。なお、測定は日間変動を排除するため同日内に行った。

2) 標準液、海水標準物質及び大阪湾海水の繰り返し測定

硝酸態・亜硝酸態窒素、リン酸態リン及びケイ酸態ケイ素について、これらの濃度と繰り返し精度との関係を明らかにするため、検量線の作成に用いた各濃度の標準液 (CAL1~10) を繰り返し測定した ($n=5$)。また、海水標準物質の繰り返し精度を評価するため、海水標準物質 5 瓶をそれぞれ繰り返し測定した ($n=3$)。さらに、海水標準物質と大阪湾で採取した海水との繰り返し精度を比較するため、大阪湾の海水を繰り返し測定した ($n=3$)。大阪湾の海水は、海水標準物質に比べて対象項目の濃度が低く、そのためにばらつきが大きくなることが懸念される。この影響を評価するため、海水標準物質の濃度に近づけるよう標準液を添加し (標準液を海水で 20 倍希釈し作成)、繰り返し測定した ($n=3$)。大阪湾の海水として用いた試料の濃度を表 3 に示す。なお、標準添加後の濃度は、海水の繰り返し測定の平均値と添加した標準液の設定値から算出した。海水マトリックスによる影響を評価するため、添加回収試験として、これらの濃度をもとに回収率を計算した。

表 3 大阪湾の海水及び標準液添加後の濃度 ($\mu\text{mol/L}$)

	$\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{PO}_4\text{-P}$	$\text{SiO}_2\text{-Si}$
海水の濃度	3.94	0.48	4.16
標準液添加後の濃度	33.7	2.44	104

3) 補正係数の推移

これまで分析値の算出に用いた補正值の傾向を把握するため、2020年4月～2021年1月の間の19回の測定データから補正值を算出し、統計量を求めた。

Ⅲ. 結果および考察

1. 3 $\mu\text{mol/L}$ 栄養塩溶液の繰り返し測定

測定結果を表4に示す。標準偏差は硝酸態・亜硝酸態窒素が0.072と最も大きく、亜硝酸態窒素が0.009と最も小さかった。硝酸態・亜硝酸態窒素の測定には、亜硝酸態窒素が含まれるにも関わらず、標準偏差が大きかった原因として、硝酸態窒素の測定の方がばらつきは生じやすく、硝酸態・亜硝酸態窒素の標準偏差の上昇に寄与したと考えられる。流れ分析では、硝酸態・硝酸態窒素と亜硝酸態窒素の測定は流路が一部異なり、前者が還元カラムを通るのに対し後者はそれを通らない。この前処理に係る流路の違いがばらつきの要因になっていることが推察される。

これらの繰り返し測定は、同日内に実施しており、検量線、室温、機器の状態等の測定環境の変化が少ない日内でもこの程度の変動が起こりうることを示すものである。補正を目的とした海水標準物質の測定も、通常に測定する試料と同様に同日内に測定するため、日内変動といったばらつきを含むことになり、補正を行うことで不確かさが大きくなることが懸念される。

表4 3 $\mu\text{mol/L}$ 栄養塩溶液の測定結果

	$\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{PO}_4\text{-P}$	$\text{NH}_4\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{SiO}_2\text{-Si}$
平均値($\mu\text{mol/L}$)	2.90	3.02	3.03	3.03	3.09
標準偏差	0.072	0.024	0.054	0.009	0.022
相対標準偏差 RSD(%)	2.5	0.81	1.8	0.30	0.72

2. 標準液、海水標準物質及び大阪湾海水の繰り返し測定

1) 硝酸態・亜硝酸態窒素

標準液各濃度(CAL1～9)の繰り返し測定結果から、それらのRSDと濃度の関係を示す近似曲線を作成し、海水標準物質、大阪湾の海水及び標準液を添加した大阪湾の海水をプロットしたものを図1に示す。海水標準物質において、RSDが最も低いものはCM-2480の0.68%、最も高いものはCM-0377の1.0%であった。平均値は0.79%であり、近似曲線よりやや高く分布した。

大阪湾海水のRSDは、0.47%と標準液の近似曲線よりも低かった。標準液を添加した大阪湾海水のRSDは1.0%と近似曲線より高かった。標準液を添加した大阪湾海水は、標準液の添加により0.05倍とわずかに海水が希釈されることにはなるが、海水標準物質と同等のRSDを示した。回収率は100%であり、海水マトリックスによる測定値の影響は認められなかった。また、測定値も概ね設定値通りであったことから、海水標準物質が特異的に測定を妨害することはないと考えられる。

海水標準物質の測定結果は、瓶間において33.2～36.2 $\mu\text{mol/L}$ 、平均値35.3 $\mu\text{mol/L}$ 、標準偏差0.357で分布した。海水標準物質の認証値から求めた濃度が34.0 $\mu\text{mol/L}$ で、瓶間の区間には含まれるものの、平均値の方が1.3 $\mu\text{mol/L}$ 高かった。有意差検定から有意水準5%で認証値と差があるといえた。測定値は正規分布すると考えた場合、その測定値の99.7%が含まれる区間とされる平均値 $\pm 3\sigma$ は、仮に σ を標本標準偏差とみなした場合35.3 \pm 1.1 $\mu\text{mol/L}$ となり、最も低い測定値の33.2 $\mu\text{mol/L}$ はその区間に含まれなかった。測定数を5瓶よりさらに増やせば標本標準偏差が母標準偏差に近づき、平均値 $\pm 3\sigma$ に収まる可能性が考えら

れる。海水標準物質はいずれも同一ロットで同一日に製造されたものであり、同一の認証値が付与されていることから、標準物質間での差は極めて小さいと考えられる。そして海水標準物質の測定は、5瓶の測定日がそれぞれ異なるため、測定値は検量線、室温、機器の状態等の測定環境の変化の影響を受ける日間変動を含むことになる。この日間変動がばらつきの要因の一つと考えられる。

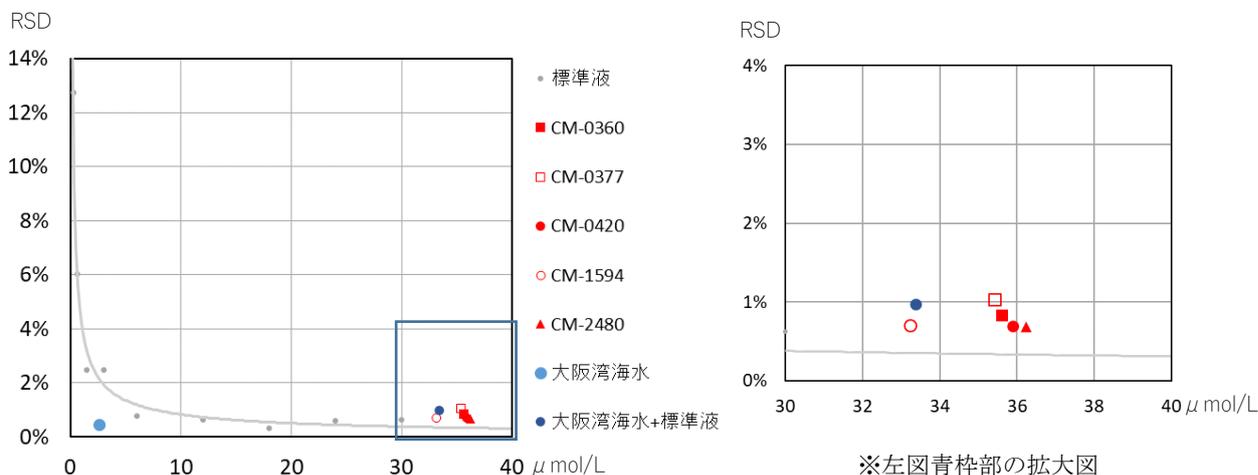


図 1 標準液、海水標準物質及び大阪湾海水の RSD と濃度の関係（硝酸態及び亜硝酸態窒素）

30 $\mu\text{mol/L}$ を超える高濃度の海水標準物質では、検量線を外挿することになり精確さを欠くことが懸念される。さらに高濃度の標準液を検量点として追加することも対策として考えられるが、実際の大阪湾の調査業務において、その濃度以上になることはまれで、湾奥部を除いた多くの調査地点では 5 $\mu\text{mol/L}$ 以下に収まることが多く、低濃度域での精度を欠くことにつながりかねない。また、海水標準物質は、いずれの測定結果も近似曲線の RSD を上回っていた。RSD には日内変動及び日間変動が含まれており、海水標準物質は近似曲線の作成に用いた標準液よりもこれらの変動が大きく、測定値のばらつきとして影響していることが推察される。

2) リン酸態リン

1) と同様に標準液の RSD と濃度の関係を示す近似曲線を作成し、海水標準物質、大阪湾海水及び標準液を添加した大阪湾海水をプロットしたものを図 2 に示す。海水標準物質において、RSD の最も低いものは CM-0420 の 0.11% で、最も高いものは CM-1594 で 0.98% であった。平均値は 0.57% で、近似曲線の前後に分布した。

大阪湾海水の RSD は 1.3% で、標準液を添加した大阪湾海水の RSD は 0.62% と近似曲線と同様の傾向を示した。硝酸態・亜硝酸態窒素と同様に、標準液を添加した大阪湾海水は海水標準物質と同等の RSD を示し、測定値も設定値通りであったことから、海水標準物質が特異的に測定を妨害することはないと考えられる。回収率は 100% であり、海水マトリックスによる測定値の影響は認められなかった。

海水標準物質の測定結果は、瓶間において 2.41~2.48 $\mu\text{mol/L}$ 、平均値 2.44 $\mu\text{mol/L}$ 、標準偏差 0.033 $\mu\text{mol/L}$ であった。海水標準物質の認証値から求めた濃度が 2.44 $\mu\text{mol/L}$ で平均値と同じであった。平均値 $\pm 3\sigma$ は 2.44 ± 0.10 $\mu\text{mol/L}$ となり、全ての測定値がこの区間に含まれた。精度、真度ともに良好で、精確な測定ができていると考えられた。

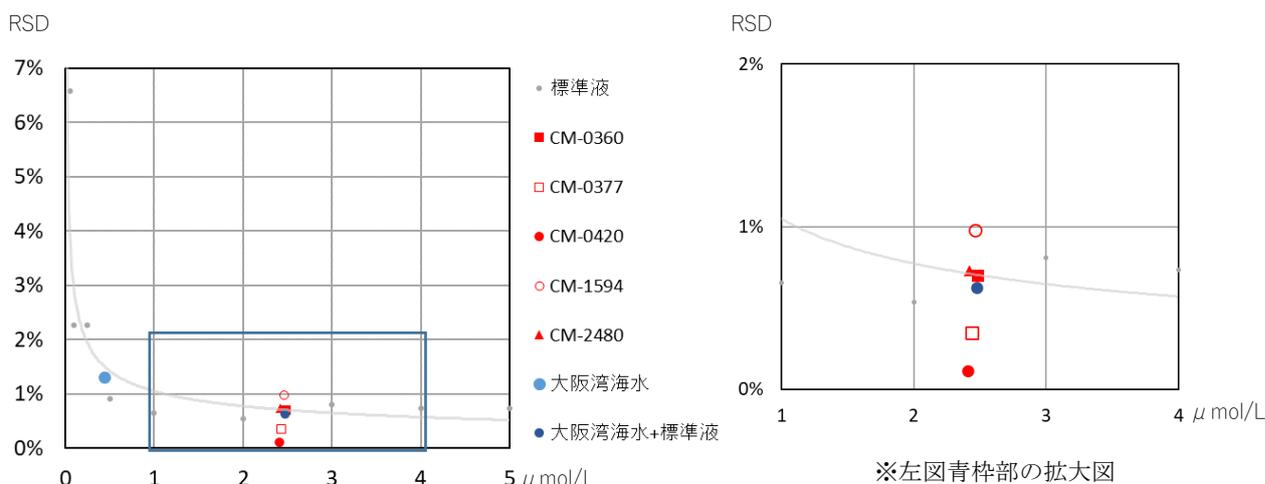


図2 標準液，海水標準物質及び大阪湾海水のRSDと濃度の関係（リン酸態リン）

3) ケイ酸態ケイ素

1)と同様に標準液のRSDと濃度の関係を示す近似曲線を作成し，海水標準物質，大阪湾の海水及び標準液を添加した大阪湾の海水をプロットしたものを図3に示す．海水標準物質において，RSDの最も低いものはCM-0377の0.02%で，最も高いものはCM-1594で0.14%であった．平均値は0.09%で，近似曲線付近に分布した．

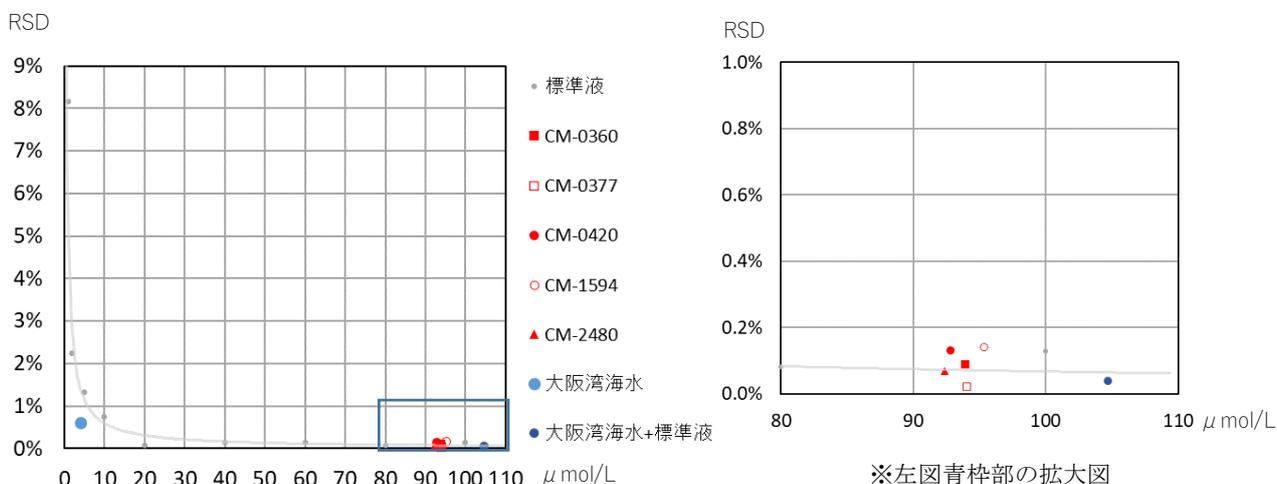


図3 標準液，海水標準物質及び大阪湾海水のRSDと濃度の関係（ケイ酸態ケイ素）

大阪湾海水のRSDは0.61%で，標準液を添加した大阪湾海水のRSDは0.04%と近似曲線より低い傾向を示した．

海水標準物質の測定結果は，瓶間において92.3~95.4 μmol/L，平均値93.7 μmol/L，標準偏差1.19 μmol/Lであった．平均値±3σは93.7±3.6 μmol/Lとなり，この区間にすべての測定値が含まれた．一定の精度は得られていると考えられる．しかし，海水標準物質の認証値から求めた濃度が103 μmol/Lであり，それに比べ平均値は10%低かった．一方で，標準液を添加した大阪湾海水の測定値は105 μmol/Lであり，設定値の104 μmol/Lに対し概ね設定値通りで，回収率は101%であった．測定値が10%低下する現象は見られなかった．測定方法や妨害物質など何らかの要因が，海水標準物質の測定にのみ10%低くする影響を及ぼす

ことが推察される．このような状態で海水標準物質を用いてケイ酸態ケイ素を補正すると，検量線の設定値は10%高くなり，それを基準に定量する検体の測定値が相対的に低くなる．

3. 補正係数の平均値と不確かさの推定から算出した補正係数の比較によるかたよりの評価

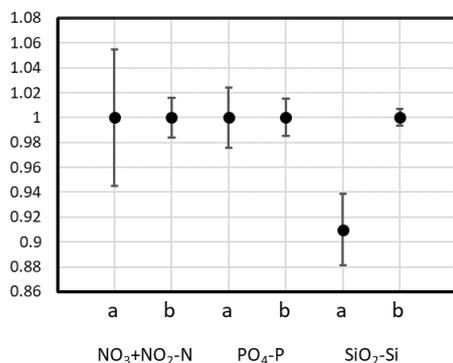
2020年4月～2021年1月の間の19回の測定データから，それぞれの測定ごとに補正係数を計算し，平均値と標準偏差を算出した．また，そのかたよりを把握するため，不確かさの推定から算出した補正係数の区間に真値が含まれるものとみなし，それと比較した．なお，不確かさの推定から算出した補正係数は，田中が算出した値を用いた³⁾．その結果を図4に示す．

硝酸態・亜硝酸態窒素の補正係数の平均値は1.00，標準偏差は0.055であり，標準偏差は最も大きかった．ばらつきは大きいものの，平均すると海水標準物質の既定濃度で測定できていると考えられた．標準偏差を2倍した値(2s)と，不確かさの推定から算出した区間推定値(u)を比較すると， $u(1\pm 0.016)$ に比べ，2sの方が区間が大きかった．これは，日間変動など，不確かさの推定では評価しきれなかったばらつきの要素を含むため，2sの方が大きくなっていることに起因すると考えられる．また，2sは真値を含むと推定されるuの区間を包含しており，かたよりは認められないといえる．

リン酸態リンは平均値が1.00，標準偏差は0.024と標準偏差が最も小さかった．硝酸態・亜硝酸態窒素と同様の理由により， $u(1\pm 0.015)$ と比べ，2sの区間がわずかに大きくなったと考えられる．また，2sはuの区間を包含しており，かたよりは認められなかった．

ケイ酸態ケイ素は平均値が0.908，標準偏差は0.029であり，平均値は低かった．2sは $u(1\pm 0.007)$ の区間を包含していない．つまり平均値と真値の推定値に差があるといえることから，測定に一定のかたよりが生じていると考えられた．

補正係数



a: 2020年4月～2021年1月の間の補正係数の平均値(n=19)

エラーバーは標準偏差を2倍したもの

b: 不確かさの推定から算出された補正係数

エラーバーは範囲推定値(k=2, 信頼性水準95%)

図4 補正係数の平均値と不確かさから算出した補正係数

IV. 摘要

これまでの結果から，硝酸態・亜硝酸態窒素の測定は，既報においてその測定の不確かさからも日内変動が高いことがわかっていたが³⁾，今回の結果から日内変動や日間変動を含んだばらつきが生じやすいことが確認された．なお，補正係数の平均値と不確かさの推定から算出した補正係数の比較から，かたよりは認められなかった．測定回数を増やし平均することで，これらのばらつきの影響を軽減できることが示唆される．リン酸態リンの測定は日内変動，日間変動ともに低く，かたよりも認められなかった．ケイ酸態ケイ素の測定は日内変動，日間変動ともに低かった．しかし，特定の条件下でかたよりが生じることが考えられた．これまでクロスチェックの平均値との乖離を補正する目的で海水標準物質を用いた補正を行ってきたが，検討の結果，3項目いずれの項目においても海水標準物質による補正の必要性は認められないと考えられた．

今回，海水標準物質の補正を目的とした使用には適していないと結論付けたが，硝酸態・亜硝酸態窒素，リン酸態リンは測定に対する妨害を受けていないことがわかった．これらの項目については，海水標準物質

を使用した品質管理方法が可能であると考えられる。例えば、定期的に海水標準物質を測定し、測定値を経時的に記録を続ける。そのデータを使用し、平均値やばらつきを管理し測定値の異常を検出できるようなx-R管理図による評価を行うことで、よりよい品質管理を行うことができると考えられる。また、今後ケイ酸態ケイ素について、海水標準物質の測定でかたよりが生じた要因を明らかにしていく必要がある。

V. 引用文献

- 1) 気象庁 (1999). 海洋観測指針.
- 2) 田中咲絵・近藤健 (2021). 不確かさの推定による分析値補正の妥当性について. 令和3年度大阪府立環境農林水産総合研究所研究報告第7号(1). 1-8
- 3) JISK0102.42.6:2016 アンモニウムイオン, JISK0102.43.1.3:2016 亜硝酸イオン及び硝酸イオン, JISK0102.46.1.4:2016 リン酸イオン
- 4) 青山道夫 (2015). ガス分画連続流れ方式の分析装置を用いた高精度で相互比較可能な海水中の溶存栄養塩類 (N, P, Si). 海洋観測ガイドライン. G302JP:001-017. 日本海洋学会
- 5) KANSO テクノス. 栄養塩測定用海水標準物質.
<http://www.kanso.co.jp/environment/oceanicSurvey/oceanicSurvey04.html> (2021年8月20日アクセス確認)
- 6) 日本気象協会 (1994). 海洋観測常用表.