

肥料研究報告

第\$#号

201*年

Research Report of Fertilizer

Vol. 10
2017



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)

Saitama, Japan

はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)は肥料取締法に定められている肥料の登録及び仮登録の申請に関する業務、肥料事業者等への立入検査に関する業務、肥料公定規格の設定等に関する業務と、地力増進法に定められている土壌改良資材の立入検査業務等を行っております。

肥料は肥料取締法で定められた保証成分の適正な管理のため一定水準の分析の正確さが求められています。特に近年は肥料原料の高騰から汚泥など未利用資源の肥料への利用拡大が進んでおります。しかしながら、汚泥肥料には有害な重金属を含有する恐れがあるため、安全な肥料としての流通を確保するために検査・分析の比重がより高まっております。

「肥料研究報告」は、日進月歩する分析機器を導入して迅速・効率的な分析法の開発と妥当性の検証、既存の方法の性能調査、肥料由来の有害成分の土壌中での挙動や作物への吸収、全国肥料品質保全協議会と共同での精度管理試験など、日頃の業務の中から見いだされた課題に検討を加え、得られた知見を取り纏めたものです。今般、平成28年度に得られた成果を中心に収録した第10号を発行いたしましたので、関係各位の業務の参考にしていただくと共に、お気付きの点がありましたらご指摘いただければ幸いです。

2017年12月

独立行政法人農林水産消費安全技術センター
理事長 木村 真人

肥料研究報告 第10号

- 2017 -

目次

<試験法等の検討及び妥当性確認>

1 汎用的な機器を用いた固形肥料中の水溶性主成分の抽出方法	川口伸司	1
2 有機物を含まない肥料中のクロムの測定	廣井利明, 高津文香	9
3 ICP 発光分光分析法によるチタンの測定	青山恵介	29
4 ガスクロマトグラフ(質量分析計)(GC(-MS))法による堆肥等中の塩素系農薬の測定	野崎友春	41
5 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発酵肥料中のクロピ ラリド及びその関連物質の測定 -共同試験成績-	小塚健志, 大島舞弓, 橋本良美, 田丸直子, 白井裕治	61
6-1 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 -単 一試験室の妥当性確認- 惠智正宏, 木村康晴, 白井裕治	72
6-2 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 -共 同試験成績- 船木紀夫, 木村康晴	86

<調査・試験業務>

7 カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における汚泥肥料連用の影響(続報) -2015 年冬作・2016 年夏作- 八木寿治, 鈴木時也, 田中雄大, 阿部文浩, 橋本良美, 田丸直子, 阿部進	101
--	--	-----

<試験成績の信頼性確保関連>

8	2016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 伊藤浩平, 藤田敏史, 千田正樹, 鈴木孝一郎, 筒井久司, 松尾信吾, 八木啓二, 五十嵐総一, 白井裕治, 今川俊明	141
---	--	-----

9	2016年度 肥料認証標準物質の開発 -高度化成肥料 FAMIC-A-10, 普通化成肥料 FAMIC-B-10, 汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2, 高度化成肥料 FAMIC-A-13 及び普通化成肥料 FAMIC-B-14 の長期安定性評価- 稲葉茂幸, 木村康晴, 伊藤 潤, 松尾信吾, 青山恵介, 船木紀夫, 白井裕治	168
---	---	-----

<ノート>

10	尿素性窒素試験法(ウレアーゼ法)の性能調査 藤田敏文, 加藤公栄, 新見豊和, 木村康晴, 伊藤浩平, 白井裕治	195
----	---	-----

11	コマツナの生理障害 -亜鉛- 五十嵐総一, 平田絵理香, 添田英雄, 加島信一	208
----	--	-----

12	試験紙による肥料成分の検出 齋藤晴文, 五十嵐総一, 佐久間健太, 橋本良美, 田丸直子, 平田絵理香, 添田英雄, 白井裕治	242
----	---	-----

Research Report of Fertilizer Volume 10

– 2017–

Index

<Development and Validation for Determination Methods>

1	Extraction Method for the Water-soluble Principal Ingredients in the Solid Fertilizer using a General-purpose EquipmentShinji KAWAGUCHI	1
2	Evaluation of Digest Method for Determination of Chromium in Inorganic Fertilizer by Atomic Absorption SpectrometryToshiaki HIROI, Fumika TAKATSU	9
3	Determination of Titanium in Fertilizer using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) Keisuke AOYAMA	29
4	Determination of Organic Chloride Pesticides in Composts using Gas Chromatography-Electron Capture Detector (GC-ECD) Tomoharu NOZAKI	41
5	Determination of Clopyralid, Aminopyralid and Picloram in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS): A Collaborative Study Kenji KOZUKA, Mayu OSHIMA, Yoshimi HASHIMOTO, Naoko TAMARU, and Yuji SHIRAI	61
6-1	Determination of Urea Nitrogen, Biuret Nitrogen, Dicyandiamide Nitrogen, Guanidine Nitrogen and Guanyl urea Nitrogen in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography: A Single-Laboratory Validation Masahiro ECHI, Yasuharu KIMURA and Yuji SHIRAI	72
6-2	Determination of Urea Nitrogen, Biuret Nitrogen, Dicyandiamide Nitrogen, Guanidine Nitrogen and Guanyl urea Nitrogen in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Collaborative Study Norio FUNAKI and Yasuharu KIMURA	86

<Investigation and Research>

- 7 Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued Report) - Winter 2015 and Summer 2016 -
... Toshiharu YAGI, Tokiya SUZUKI, Yudai TANAKA, Fumihiko ABE,
Yoshimi HASHIMOTO, Naoko TAMARU and Shin ABE 101

<Assurance Practices for Reliable Analytical Data>

- 8 Result of Proficiency Testing for Determination of Major Components and Harmful Elements in Ground Fertilizers Conducted in Fiscal Year 2016
..... Kohei ITO, Toshifumi FUJITA, Masaki CHIDA, Koichiro SUZUKI,
Hisashi TSUTSUI, Shingo MATSUO, Keiji YAGI, Souichi IGARASHI,
Yuji SHIRAI and Toshiaki IMAGAWA 141
- 9 Long-term Stability Evaluation of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-10) and Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-10) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-12-2) and High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-13) and Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-14)
..... Shigeyuki INABA, Yasuharu KIMURA, Jun ITO, Shingo MATSUO,
Keisuke AOYAMA, Norio FUNAKI and Yuji SHIRAI 168

<Note>

- 10 Determination Method for Urea Nitrogen in Fertilizer by Urease
..... Toshifumi FUJITA, Kimie KATO, Toyokazu NIIMI, Yasuharu KIMURA,
Kohei ITO and Yuji SHIRAI 195
- 11 Physiological Disorder of Komatsuna - Zinc -
..... Souichi IGARASHI, Erika HIRATA, Hideo SOETA, Takako ARISUMI
and Shinichi KASHIMA 208
- 12 The Qualitative Test by Means of Test Paper
..... Harufumi SAITO, Souichi IGARASHI, Kenta SAKUMA, Yoshimi HASHIMOTO,
Naoko TAMARU, Erika HIRATA, Hideo SOETA, and Yuji SHIRAI 242

1 汎用的な機器を用いた固形肥料中の水溶性主成分の抽出方法

川口伸司¹

キーワード 垂直往復振とう機, 水溶性主成分, 固形肥料, 単一試験室の妥当性確認

1. はじめに

肥料等試験法¹⁾及び肥料分析法²⁾に定められている上下転倒式回転振り混ぜ機による抽出方法は肥料以外の分析法には用いられてはいないこと, 更に恒温式上下転倒式回転振り混ぜ機は特注品であることから, 近年, 各方面からこれらの装置を用いない抽出方法の確立について要望が寄せられている. これらの抽出装置は水溶性主成分, 可溶性主成分, 可溶性けい酸及び水溶性効果発現促進材に用いられており, 順次汎用的な機器を用いた抽出方法を検討することとした.

今回は, 固形肥料中の水溶性りん酸(W-P₂O₅), 水溶性加里(W-K₂O)及び水溶性マンガン(W-MnO)を対象として垂直往復振とう機を用いた抽出方法を検討したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

分析用試料として, いずれも流通している混合りん酸肥料, 化成肥料, 配合肥料, 硫酸マンガン肥料, 混合微量要素肥料及び指定配合肥料を, 目開き 500 µm のふるいを全通するまで粉砕したものをを用いた.

2) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水を使用した.
- (2) 塩酸: JIS K 8180 に規定する試薬.
- (3) 硝酸: JIS K 8541 に規定する試薬.
- (4) アンモニア水: JIS K 8085 に規定する試薬.
- (5) フェノールフタレイン溶液: JIS K 8799 に規定するフェノールフタレイン 1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かした.
- (6) りん酸標準液(P₂O₅ 10 mg/mL): JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウムを 105 °C ± 2 °C で約 2 時間加熱し, デシケーター中で放冷した後, 19.17 g をひょう量皿にはかりとった. 少量の水で溶かし, 全量フラスコ 1000 mL に移し入れ, 硝酸 2~3 mL を加え, 標線まで水を加えた.
- (7) りん酸標準液(P₂O₅ 0.5 mg/mL): りん酸標準液(P₂O₅ 10 mg/mL) 50 mL を全量フラスコ 1000 mL にとり, 硝酸 2 mL~3 mL を加え, 標線まで水を加えた.
- (8) カリウム標準液(K₂O 1mg/mL): カリウム標準液(K: 1000 mg/L) (関東化学;JCSS)を使用した.
- (9) マンガン標準液(MnO 1 mg/mL): マンガン標準液(Mn: 100 mg/L) (関東化学;JCSS)を使用した.
- (10) 発色試薬溶液: JIS K 8747 に規定するバナジン(V)酸アンモニウム 1.12 g を水に溶かし, 硝酸 250 mL を加えた後, JIS K 8905 に規定するセモリブデン酸六アンモニウム四水和物 27 g を水に溶かして加え, 更に水を加えて 1000 mL とした.

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター (現)神戸センター

(11) 干渉抑制剤溶液(加里測定用): JIS K 8617に規定する炭酸カルシウム 12.5 gをビーカー2000 mLにはかりとり, 少量の水を加え, 塩酸 105 mLを徐々に加え, 少時加熱し, 放冷後, 水を加えて 1000 mLとした. この干渉抑制剤溶液は加里の分析に用いた.

(12) 干渉抑制剤溶液(マンガン測定用): JIS K 8132に規定する塩化ストロンチウム六水和物 152.1 gをビーカー2000 mLにはかりとり, 少量の水を加えた後, 塩酸 420 mLを徐々に加えて溶かし, 更に水を加えて 1000 mLとした. この干渉抑制剤溶液はマンガンの分析に用いた.

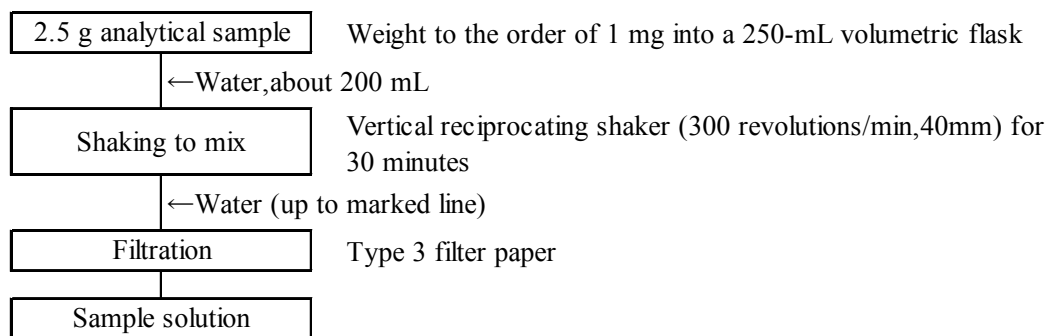
3) 器具及び装置

- (1) 電子天びん: sartorius CPA423S
- (2) 上下転倒式恒温回転振り混ぜ機: 三喜製作所 RS-12
- (3) 垂直往復振とう機: タイテック SR-2w(フラスコ用アダプターを用い全量フラスコ 250 mLを固定した.)
- (4) ホットプレート: 柴田科学 NP-6
- (5) 分光光度計: 島津製作所 UVmini-1240
- (6) 原子吸光分析装置: 日立ハイテクノロジーズ Z-2310

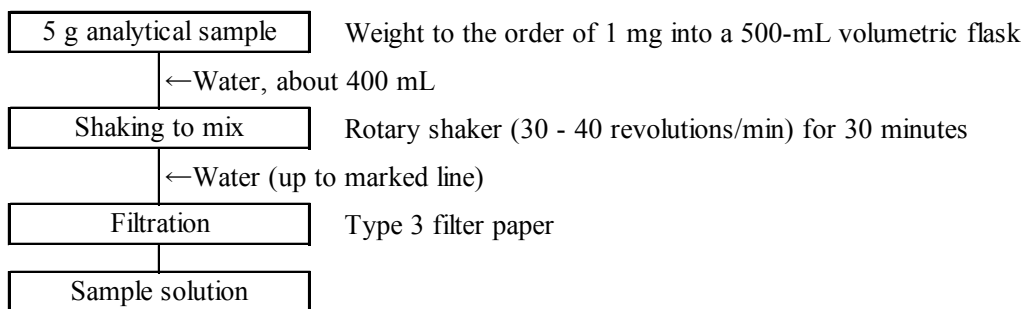
4) 分析方法

試料 2.5 gを 1 mgの桁まではかりとり, 全量フラスコ 250 mLに入れ, 水約 200 mLを加え, 垂直往復振とう機で約 30分間振り混ぜた後水で定容し, ろ紙 3種でろ過し試料溶液とした(Scheme 1). また, 方法間比較による真度の評価に使用した従来の上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出手順¹⁾を Scheme 2に示した.

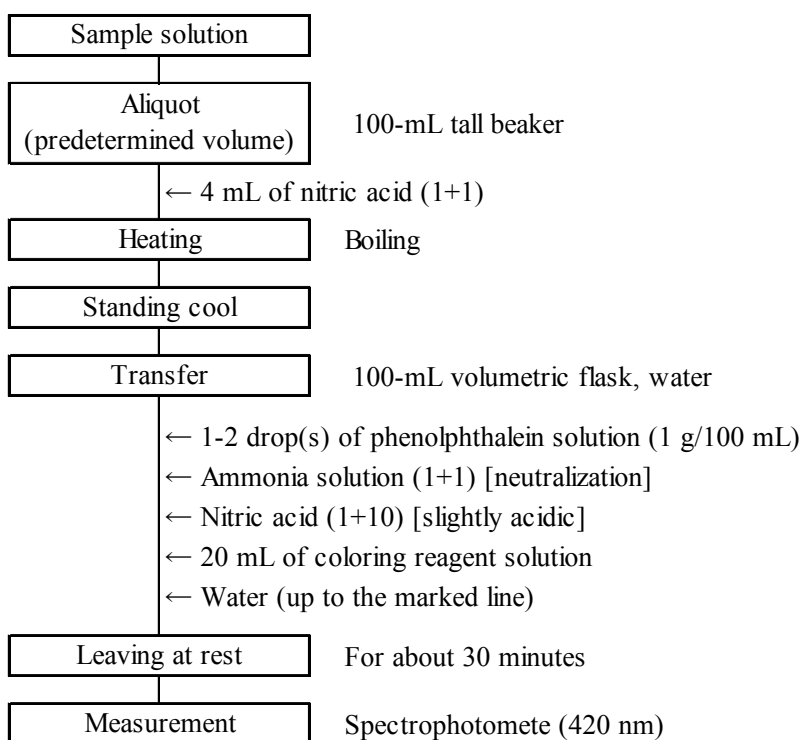
これらの試料溶液について, 水溶性りん酸(W-P₂O₅)はバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法(Scheme 3), 水溶性加里(W-K₂O)及び水溶性マンガン(W-MnO)はフレイム原子吸光法(Scheme 4及びScheme 5)の手順¹⁾でそれぞれ測定した.



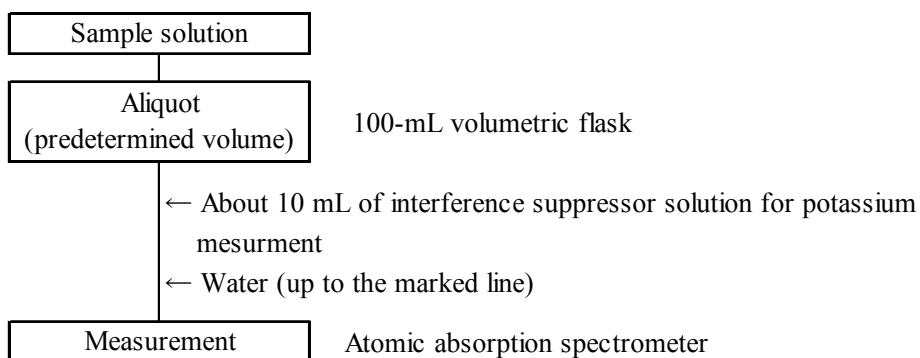
Scheme 1 The flow sheet of extraction procedure using vertical reciprocating shaker



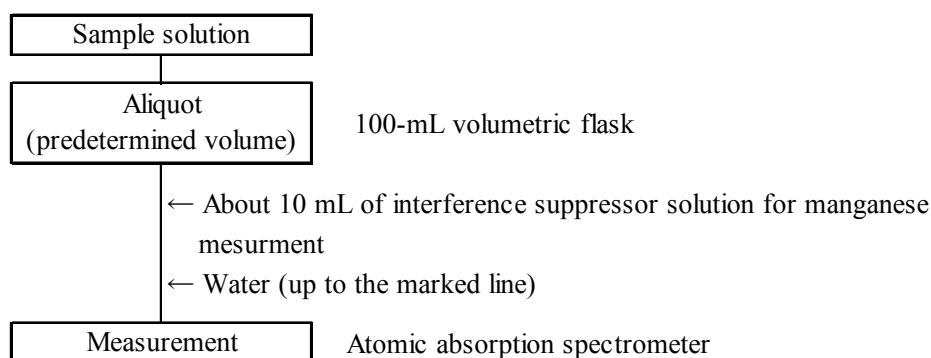
Scheme 2 The flow sheet of extraction procedure using rotary shaker that can a 500-mL volumetric flask upside down



Scheme 3 The flow sheet for water-soluble phosphoric acid (W-P₂O₅)



Scheme 4 The flow sheet for water-soluble potassium (W-K₂O)



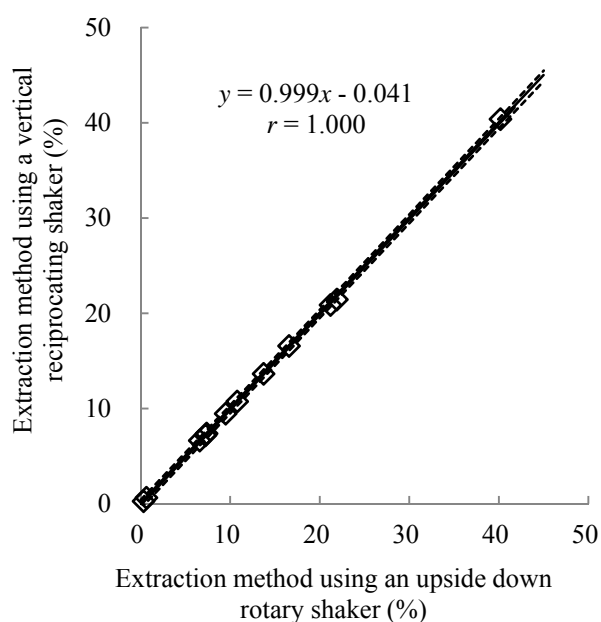
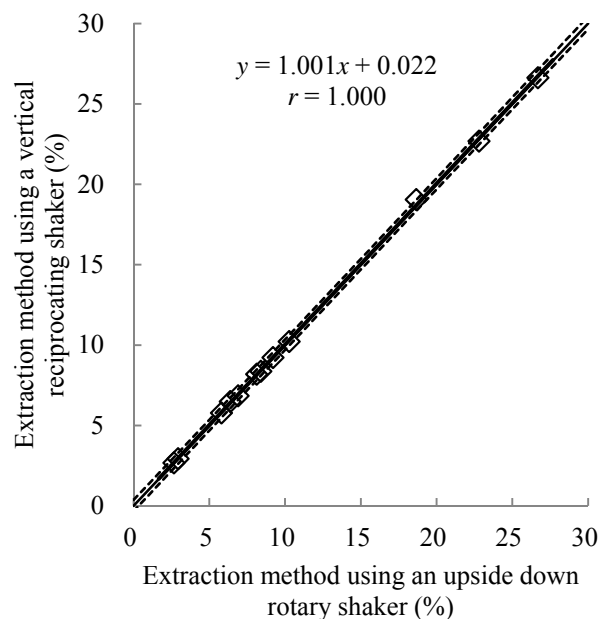
Scheme 5 The flow sheet for water-soluble manganese (W-MnO)

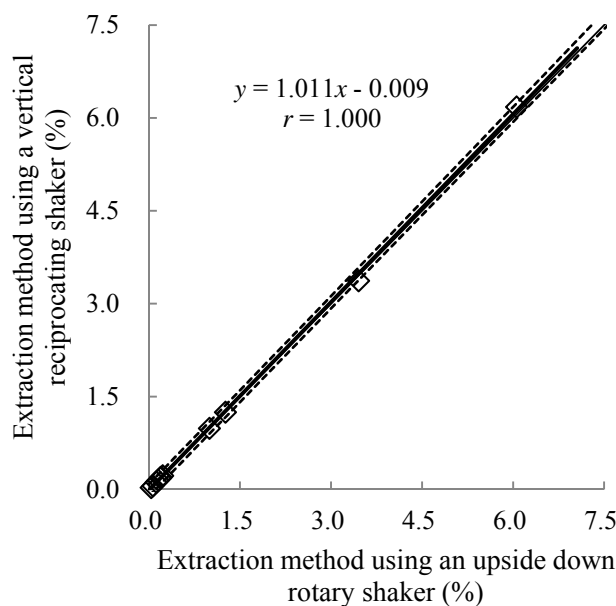
3. 結果

1) 方法間比較による真度の評価

水溶性りん酸 (W-P₂O₅), 水溶性加里 (W-K₂O) 及び水溶性マンガン (W-MnO) について, 試料 12 点を用いて, 上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出法と本法との測定値の相関並びに本法の 95 % 予測区間を回帰直線の周囲に描き Fig. 1 に示した.

水溶性りん酸 (W-P₂O₅) ($y = -0.041 + 0.999x$, $r = 1.000$) の傾きの 95 % 信頼区間は 0.988 ~ 1.010, 切片の 95 % 信頼区間は -0.227 ~ 0.144, 水溶性加里 (W-K₂O) ($y = 0.022 + 1.001x$, $r = 1.000$) の傾きの 95 % 信頼区間は 0.989 ~ 1.013, 切片の 95 % 信頼区間は -0.137 ~ 0.180, 水溶性マンガン (W-MnO) ($y = -0.009 + 1.011x$, $r = 1.000$) の傾きの 95 % 信頼区間は 0.996 ~ 1.026, 切片の 95 % 信頼区間は -0.040 ~ 0.022 であり, いずれも肥料等試験法¹⁾ に示されている真度評価の推奨範囲内であった.

1) W-P₂O₅2) W-K₂O



3) W-MnO

Fig. 1 Comparison of extraction method using an upside down rotary shaker and using a vertical reciprocating shaker

Heavy line: Regression line

Dotted lines: Upper and Lower limit of 95 % prediction interval

Thin line: $y=x$

2) 併行精度及び中間精度の評価

併行精度及び中間精度を確認するため、化成肥料、混合微量元素肥料及び指定配合肥料を用いて、2濃度の水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)及び水溶性マンガン(W-MnO)を2点併行で日を変えて7回試験を実施して得られた結果をTable 1に示した。また、この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度をTable 2に示した。化成肥料の水溶性りん酸(W-P₂O₅)の平均値は質量分率1.19%で、併行相対標準偏差は0.5%、中間相対標準偏差は0.5%であった。また、指定配合肥料の水溶性りん酸(W-P₂O₅)の平均値は質量分率13.77%で、併行相対標準偏差は0.2%、中間相対標準偏差は0.5%であった。化成肥料の水溶性加里(W-K₂O)の平均値は質量分率19.67%で、併行相対標準偏差は0.5%、中間相対標準偏差は0.7%であった。また、指定配合肥料の水溶性加里(W-K₂O)の平均値は質量分率6.50%で、併行相対標準偏差は1.1%、中間相対標準偏差は1.1%であった。化成肥料の水溶性マンガン(W-MnO)の平均値は質量分率0.226%で、併行相対標準偏差は1.0%、中間相対標準偏差は1.7%であった。また、混合微量元素肥料の水溶性マンガン(W-MnO)の平均値は質量分率3.57%で、併行相対標準偏差は0.7%、中間相対標準偏差は1.5%であった。

この濃度におけるいずれの相対標準偏差も肥料等試験法¹⁾に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安以内であった。このことから、水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)及び水溶性マンガン(W-MnO)の抽出については、上下転倒式回転振り混ぜ機を用いない垂直往復振とう機による抽出でも十分な精度を有していることが確認された。

Table 1 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation
(% (Mass fraction))

Test day	W-P ₂ O ₅				W-K ₂ O			
	Compound fertilizer		Specify mixed fertilizer		Compound fertilizer		Specify mixed fertilize	
1	1.18	1.19	13.73	13.64	19.52	19.62	6.49	6.56
2	1.19	1.19	13.74	13.76	19.42	19.49	6.48	6.60
3	1.19	1.20	13.73	13.75	19.88	19.61	6.63	6.42
4	1.19	1.21	13.73	13.75	19.72	19.83	6.48	6.54
5	1.20	1.18	13.78	13.83	19.67	19.75	6.46	6.46
6	1.20	1.19	13.77	13.81	19.83	19.80	6.53	6.51
7	1.20	1.20	13.89	13.84	19.65	19.53	6.43	6.44

Table 1 Continue

Test day	W-MnO			
	Compound fertilizer		Mixed trace element fertilizer	
1	0.220	0.228	3.53	3.50
2	0.224	0.223	3.58	3.51
3	0.222	0.223	3.50	3.50
4	0.225	0.225	3.60	3.59
5	0.232	0.232	3.65	3.61
6	0.228	0.227	3.58	3.61
7	0.231	0.227	3.59	3.61

Table 2 Statistical analysis of repetition test result for evaluating precision

Sample	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision			
		s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%) ^{b)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)	
W-P ₂ O ₅	Compound fertilizer	1.19	0.01	0.5	2.0	0.01	0.5	3.5
	Specified mixed fertilizer	13.77	0.03	0.2	1.5	0.06	0.5	2.5
W-K ₂ O	Compound fertilizer	19.67	0.09	0.5	1.5	0.15	0.7	2.5
	Specified mixed fertilizer	6.50	0.07	1.1	2.0	0.07	1.1	3.5
W-MnO	Compound fertilizer	0.226	0.002	1.0	3.0	0.004	1.7	4.5
	Mixed micronutrients fertilizer	3.57	0.03	0.7	2.0	0.05	1.5	3.5

a) Mean value ($n = \text{Sample number of parallel test (2)} \times \text{Number of Test days (7)}$)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability (repeatability relative standard deviation) shown in Testing Methods for Fertilizers

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate precision (intermediate relative standard deviation)

shown in Testing Methods for Fertilizers

4. まとめ

固形肥料中の水溶性りん酸、水溶性加里及び水溶性マンガンについて、垂直往復振とう機を用いた抽出方法について検討したところ、次のとおり単一試験室の妥当性確認のための満足する結果が得られた。

(1) 水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)及び水溶性マンガン(W-MnO)について分析用試料 12 点を用いて、上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出法と本法の測定値を比較したところ、水溶性りん酸(W-P₂O₅)の回帰式及び相関係数は $y=-0.041+0.999x$ 及び $r=1.000$ 、水溶性加里(W-K₂O)は $y=0.022+1.001x$ 及び $r=1.000$ 、水溶性マンガン(W-MnO)は $y=-0.009+1.011x$ 、 $r=1.000$ であり、いずれも肥料等試験法¹⁾に示されている真度評価の推奨範囲内であった。

(2) 化成肥料、混合微量要素肥料及び指定配合肥料について水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)及び水溶性マンガン(W-MnO)を 2 点併行で日を変えて 7 回試験を実施したところ、化成肥料の水溶性りん酸(W-P₂O₅)の平均値は質量分率 1.19 %で、併行相対標準偏差は 0.5 %、中間相対標準偏差は 0.5 %であった。また、指定配合肥料の水溶性りん酸(W-P₂O₅)の平均値は質量分率 13.77 %で、併行相対標準偏差は 0.2 %、中間相対標準偏差は 0.5 %であった。化成肥料の水溶性加里(W-K₂O)の平均値は質量分率 19.67 %で、併行相対標準偏差は 0.5 %、中間相対標準偏差は 0.7 %であった。また、指定配合肥料の水溶性加里(W-K₂O)の平均値は質量分率 6.50 %で、併行相対標準偏差は 1.1 %、中間相対標準偏差は 1.1 %であった。化成肥料の水溶性マンガン(W-MnO)の平均値は質量分率 0.226 %で、併行相対標準偏差は 1.0 %、中間相対標準偏差は 1.7 %であった。また、混合微量要素肥料の水溶性マンガン(W-MnO)の平均値は質量分率 3.57 %で、併行相対標準偏差は 0.7 %、中間相対標準偏差は 1.5 %であり、いずれも肥料等試験法¹⁾に示されている精度評価の推奨範囲内であった。

文 献

- 1) 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(2016)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2016.pdf>
- 2) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992 版), 肥糧検定協会, 東京(1992)

Extraction method for the water-soluble principal ingredients in the solid fertilizer using a general-purpose equipment

Shinji KAWAGUCHI¹

¹Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center
(Now) Kobe Regional Center

The Japanese Official Methods of Analysis of Fertilizer provides several extraction methods using the upside down rotary shaker for the determination of water-soluble and citrate soluble components in fertilizers. However, these extraction methods are only used in the analytical methods for fertilizer. In addition, the upside down rotary shaker is a custom order apparatus. Therefore it is needed not to use it in the extraction methods for those components in fertilizer. This study describes development and validation of extraction method for the water-soluble principal ingredients in the solid fertilizer using the vertical reciprocating shaker. The values of W-P₂O₅, W-K₂O and W-MnO measured in 12 analytical samples by extraction method using a vertical reciprocating shaker were compared with ones using an upside down rotary shaker. The former values were achieved and correlated highly with the latter values (Line of regression and correlation coefficient; W-P₂O₅ ($y=-0.041+0.999x$, $r=1.000$), W-K₂O ($y=0.022+1.001x$, $r=1.000$), W-MnO ($y=0.009+1.011x$, $r=1.000$)). W-P₂O₅, W-K₂O and W-MnO were conducted a duplicate test per 7 test days using two analytical samples of solid fertilizers respectively. As the result, total mean values (mass fraction) of W-P₂O₅ were 1.19 % and 13.77 %, the repeatability relative standard deviation (RSD_r) were 0.5 % and 0.2 %, and intermediate relative standard deviation (RSD_I) 0.5 % and 0.5 %, respectively. Total mean values (mass fraction) of W-K₂O were 19.67 % and 6.50 %, RSD_r were 0.5 % and 1.1 %, RSD_I were 0.7 % and 1.1 %, respectively. Total mean values (mass fraction) of W-MnO were 0.226 % and 3.57 %, RSD_r 1.0 % and 0.7 %, RSD_I 1.7 % and 1.5 %, respectively. These results were satisfied for the criteria shown in the Testing Methods for Fertilizers. This extraction method is valid for the determination of the water-soluble principal ingredients in the solid fertilizer.

Key words vertical reciprocating shaker, water-soluble principal ingredients, solid fertilizer, single-laboratory method validation

(Research Report of Fertilizer, **10**, 1~8, 2017)

2 有機物を含まない肥料中のクロムの測定

廣井利明¹, 高津文香²

キーワード クロム, 原子吸光法, 硝酸-硫酸-過塩素酸, 硫酸アンモニウム

1. はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)では肥料取締法¹⁾に基づき, 農林水産大臣の指示により肥料の生産事業場等への立入検査を行っている. 普通肥料は公定規格²⁾において含有を許される有害成分の最大量等が定められており, 重金属として知られるクロムも含有許容量が定められている.

現在 FAMIC では, 肥料分析法(1992年版)³⁾との整合性に配慮しながら新たに妥当性が確認された試験法等を検討し, 「肥料等試験法」⁴⁾を策定し, ホームページに掲載している. クロムについてはりん酸を用いて試料溶液を調製し, 原子吸光分析装置で測定する方法が肥料分析法に収載されているが, 2014年に肥料認証標準物質の値付けのための共同試験を実施したところ, 室間再現精度が肥料等試験法の目安を大幅に超え, 測定できない試験室もあった. その原因として, 測定溶液中のりん酸が測定溶液の粘性を高めたため, 導入速度が安定せず測定値が不安定となることが考えられた⁵⁾. また, りん酸による影響から, 原子吸光分析装置の試料溶液吸引部分が目詰まりしやすいという問題もあった. 肥料分析法にはクロム分析法として, アルカリ融解による方法も収載されているが, 白金るつぼを使用することや熟練を要する手法であるといった問題がある. そのため, りん酸やアルカリ融解を用いない試料溶液調製方法を検討することとした.

試料溶液調製方法として, 肥料等試験法のひ素及び焼成汚泥肥料中のクロム試験法として採用されている硝酸-硫酸-過塩素酸分解法⁶⁾を選定し, 突沸する肥料(熔融物, 鉍さい等を原料とする肥料において突沸する人が多い)に対応するための改良法を検討した. 改良法については有機物を含まない肥料全般を対象として, 改良前の硝酸-硫酸-過塩素酸分解法については有機物を含まない肥料のうち突沸しない肥料を対象として, 単一試験室における妥当性確認を行ったので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

肥料公定規格でクロムの含有許容量が定められている有機物を含まない市販の肥料, 計 58 点(熔成けい酸りん肥 4 点, 加工鉍さいりん酸肥料 1 点, 加工りん酸肥料 4 点, 混合りん酸肥料 6 点, 混合加里肥料 5 点, 熔成複合肥料 1 点, 化成肥料 12 点, 配合肥料 6 点, 液状複合肥料 3 点, 熔成汚泥灰複合肥料 1 点, 鉍さいけい酸質肥料 6 点, 副産苦土肥料 5 点, 混合苦土肥料 1 点, 及び鉍さいマンガン肥料 3 点)を試験品として収集し, けい酸質肥料, 苦土肥料, マンガン質肥料は 212 μm の網ふるいを, その他の固形肥料は目開き 500 μm の網ふるいを通過するまでそれぞれ粉砕機で粉砕して分析用試料とした. 分析用試料は使用時までポリ袋又はポリ容器に密封して常温保管した.

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター(現)神戸センター

2) 装置及び器具

- (1) 原子吸光分析装置: 日立ハイテクノロジーズ Z-2310 偏光ゼーマン原子吸光光度計
- (2) ホットプレート: アサヒ理化製作所 APS-500
- (3) 砂浴

3) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水
- (2) リン酸: 特級
- (3) 硝酸, 硫酸, 過塩素酸及び塩酸: 有害金属測定用
- (4) 硫酸水素アンモニウム: 純度 98 % の試薬
- (5) 硫酸アンモニウム: 原子吸光分析用
- (6) 干渉抑制剤溶液: 二硫酸カリウム(特級) 100 g を水に溶かして 1000 mL とした.
- (7) クロム標準液: クロム標準液 (Cr: 0.1 mg/mL, 和光純薬工業; JCSS) 又は クロム標準液 (Cr: 1 mg/mL, 和光純薬工業; JCSS)
- (8) 検量線用クロム標準液: クロム標準液 (Cr 0.1 mg/mL) を標準原液として一定量を全量フラスコにとり, 1/10 容量の干渉抑制剤溶液をそれぞれ加え, 塩酸 (1+23) で希釈し肥料等試験法のクロム試験法に従い調製した.
- (9) 酸化クロム(III): 純度 99 % の試薬

4) 試料溶液調製方法

- (1) リン酸-硝酸-硫酸分解法 (以下, 「リン酸法」という.)

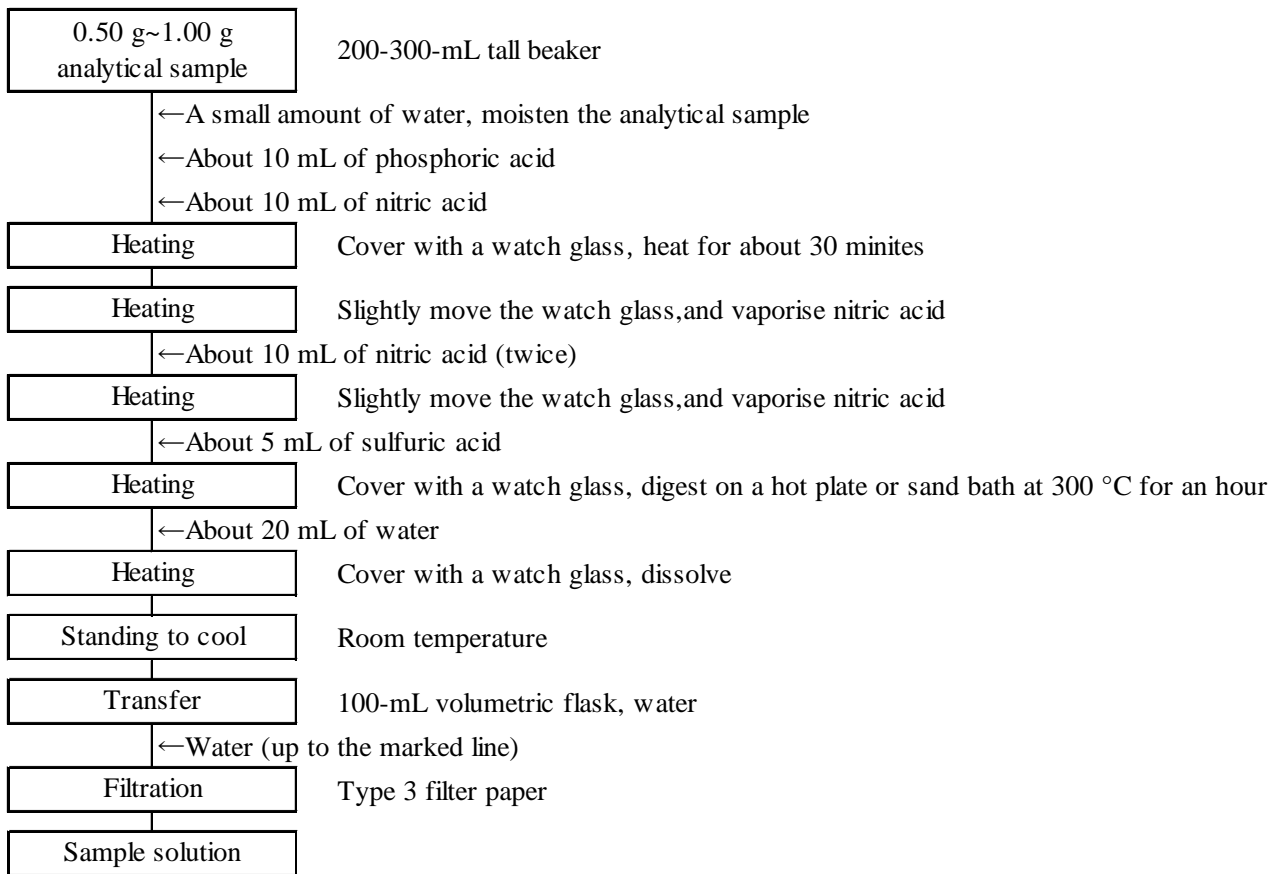
肥料分析法において, クロム試験法として記載されている既存の方法. 試験操作方法を以下に示す.

分析試料 0.50 g ~ 1.00 g をはかりとり, トールビーカー 200 mL ~ 300 mL に入れ, 少量の水で試料を潤した後, リン酸約 10 mL 及び硝酸約 10 mL を加え, 時計皿で覆いホットプレート又は砂浴上で約 30 分間加熱後, 時計皿をずらし, 硝酸が蒸発するまで加熱した. 放冷後, 硝酸約 10 mL を残留物に加え, 砂浴上で硝酸が蒸発するまで加熱する操作を 2 回繰り返した. 放冷後, 硫酸約 5 mL を残留物に加え, トールビーカーを時計皿で覆い 300 °C 以上で硫酸の白煙が発生した状態で約 1 時間加熱した. 放冷後, 水約 20 mL を加え, トールビーカーを時計皿で覆い静かに加熱して溶かした. 放冷後, 全量フラスコ 100 mL に移し, 標線まで水を加えた後, ろ紙 3 種でろ過し, クロム測定用の試料溶液とした (Scheme 1).

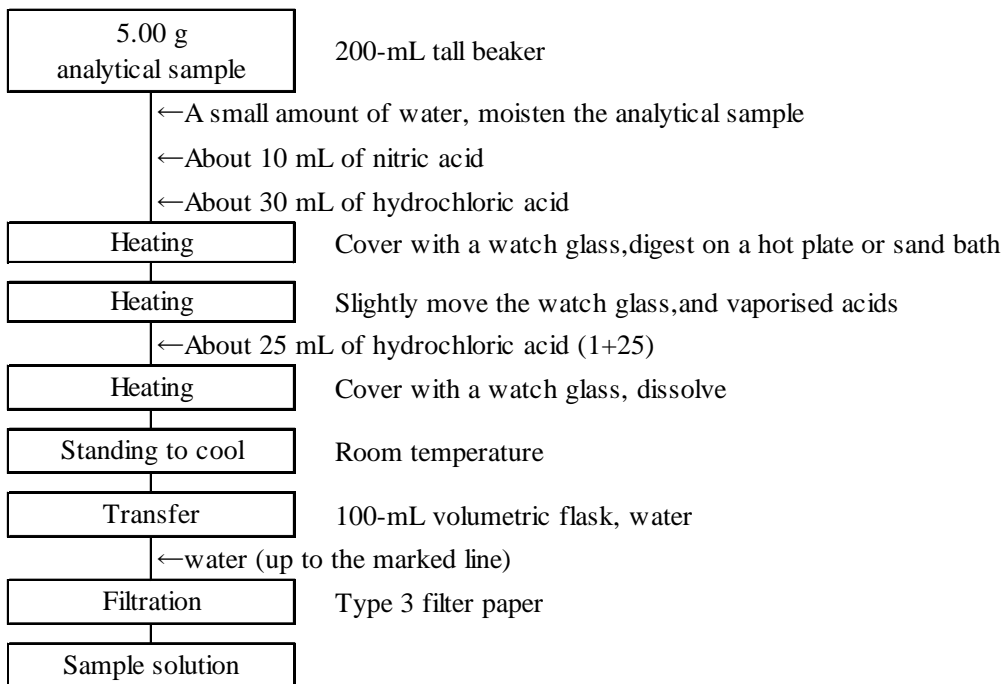
- (2) 王水分解法 (以下, 「王水法」という.)

肥料等試験法において, カドミウム及び有機物を含む肥料中のクロム等の試験法に採用されている方法 (灰化操作を除く). 試験操作方法を以下に示す.

分析試料 5.00 g をはかりとり, トールビーカー 200 mL に入れ, 少量の水で試料を潤した後, 硝酸約 10 mL 及び塩酸約 30 mL を加え, 時計皿で覆いホットプレート又は砂浴上で約 30 分加熱後時計皿をずらし, 酸をほとんど蒸発させた. 放冷後, 塩酸 (1+5) 約 25 mL を残留物に加え, トールビーカーを時計皿で覆い, 静かに加熱して溶かした. 放冷後, 全量フラスコ 100 mL に移し, 標線まで水を加えた後, ろ紙 3 種でろ過し, クロム測定用の試料溶液とした (Scheme 2).



Scheme 1 Method flow sheet of chromium in inorganic fertilizers
(Sample solution preparation by phosphoric acid method)

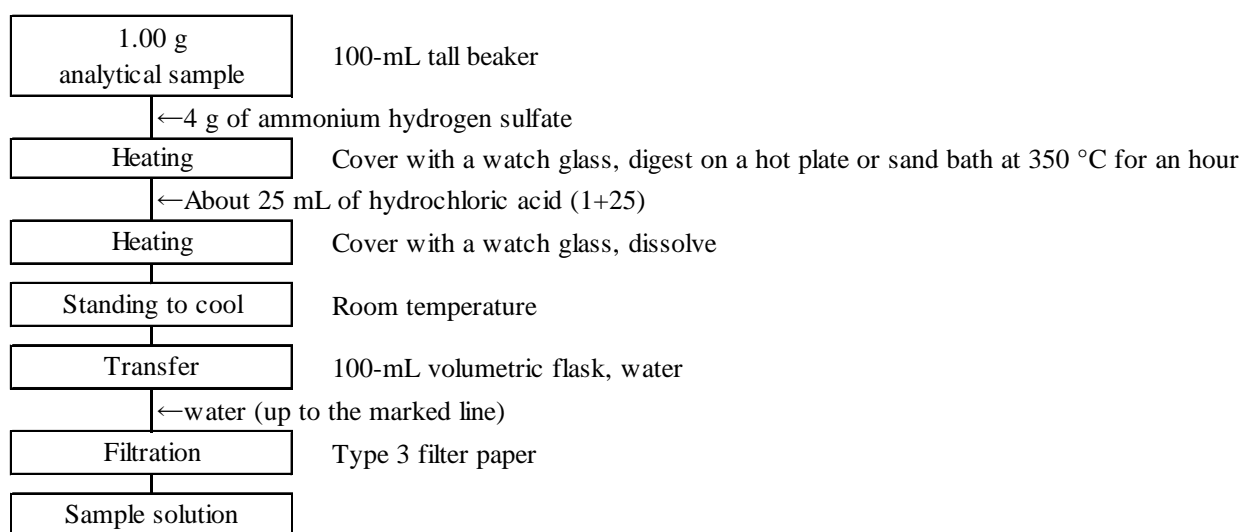


Scheme 2 Method flow sheet of chromium in inorganic fertilizers
(Sample solution preparation by aqua regia method)

(3) 硫酸水素アンモニウム融解法(以下、「硫水安融解法」という。)

難溶性金属酸化物の分解法として文献⁷⁾にある方法。文献の方法では、分析試料を試験管にとり、バーナーで直接加熱する方法であるが、「試験管」を「トールビーカー」に、「バーナー直接加熱」を「350 °C のホットプレート又は砂浴」で加熱する方法に変更した。試験操作方法を以下に示す。

分析試料 1.00 g をはかりとり、トールビーカー 100 mL に入れ、硫酸水素アンモニウム 10 g を加え、時計皿で覆い 350 °C のホットプレート又は砂浴上で 1 時間加熱した。放冷後、塩酸 (1+5) 約 25 mL を残留物に加え、トールビーカーを時計皿で覆い、静かに加熱して溶かした。放冷後、全量フラスコ 100 mL に移し、標線まで水を加えた後、ろ紙 3 種でろ過し、クロム測定用の試料溶液とした (Scheme 3)。



Scheme 3 Method flow sheet of chromium in inorganic fertilizers
(Sample solution preparation by ammonium hydrogen sulfate method)

(4) 硝酸-硫酸-過塩素酸分解法(以下、「三混酸法」という。)

肥料等試験法において、ひ素又は焼成汚泥肥料中のクロム試験法として採用されている方法。試験操作方法を以下に示す。

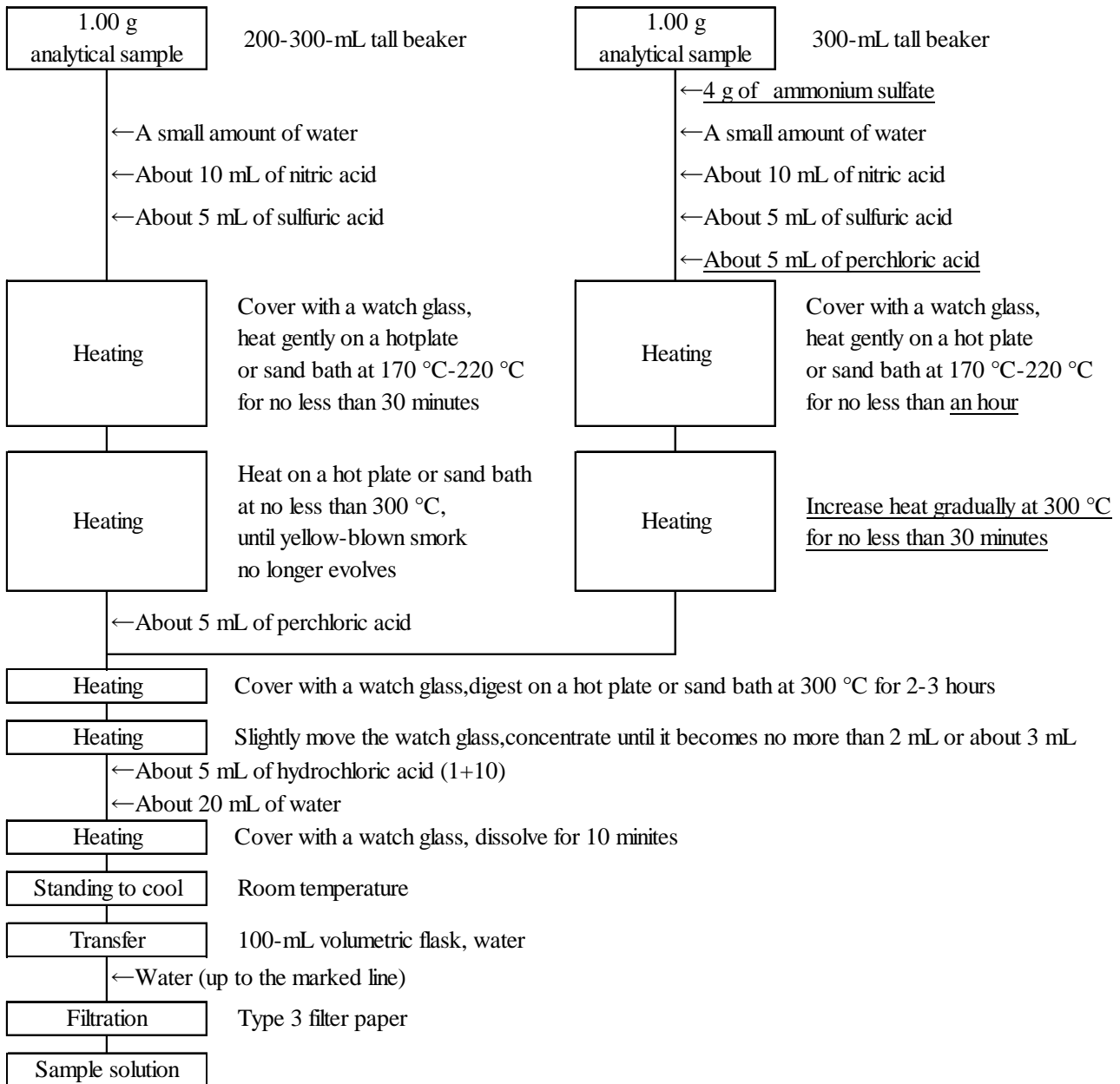
分析試料 1.00 g をはかりとり、トールビーカー 200 mL ~ 300 mL に入れ、少量の水で試料を潤した後、硝酸約 10 mL 及び硫酸約 5 mL を加え、時計皿で覆い、170 °C ~ 220 °C のホットプレート又は砂浴上で穏やかに 30 分間以上加熱後、300 °C 以上で強熱し、黄褐色煙が発生しなくなるまで加熱した。放冷後、過塩素酸約 5 mL を加え、時計皿で覆い、300 °C 以上で 2 ~ 3 時間加熱し、さらに時計皿をずらして液量が 2 mL 以下になるまで加熱した。放冷後、塩酸 (1+10) 約 5 mL 及び水約 20 mL を残留物に加え、トールビーカーを時計皿で覆い、穏やかに 10 分間程度加熱して溶かした。放冷後、水を用いて全量フラスコ 100 mL に移し、標線まで水を加えた後、ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とした (Scheme 4)。なお、有機物を含まない肥料を対象とすることから、酸添加後の一夜放置の操作は省略した。

(5) 改良法

本検討において三混酸法を改良した方法。三混酸法で突沸する肥料に対応するため、突沸防止試薬として硫酸アンモニウムの添加を追加した方法。試験操作方法を以下に示す。

分析試料 1.00 g をはかりとり、トールビーカー 300 mL に入れ、硫酸アンモニウム 4 g を加え、少量の水で試料

を潤した後、硝酸約 10 mL、硫酸約 5 mL 及び過塩素酸約 5 mL を加え、時計皿で覆い、170 °C~220 °C のホットプレート又は砂浴上で穏やかに 1 時間以上加熱した後、30 分間以上かけて加熱温度を徐々に 300 °C 以上まで上げ、300 °C 以上で 2~3 時間加熱し、さらに時計皿をずらして液量が約 3 mL になるまで加熱した。放冷後、水を用いて全量フラスコ 100 mL に移し、標線まで水を加えた後、ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とした (Scheme 5)。



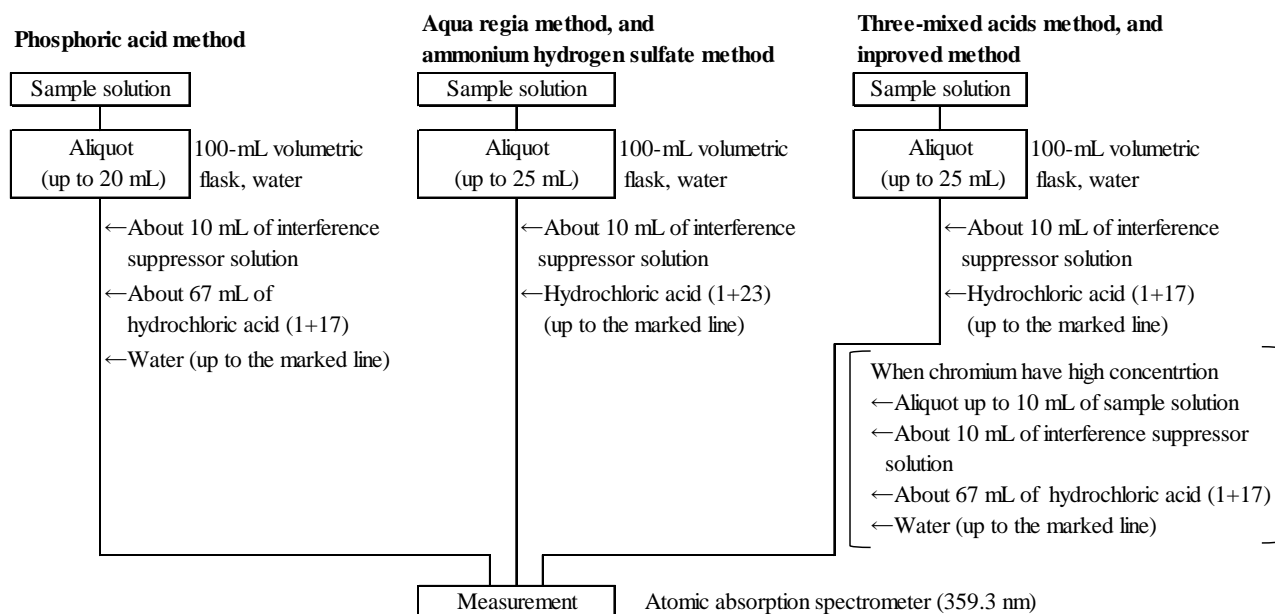
Scheme 4 Method flow sheet of chromium in inorganic fertilizers (Sample solution preparation by 3-mixed acid method)

Scheme 5 Method flow sheet of chromium in inorganic fertilizers (Sample solution preparation by improved method)

5) クロムの測定方法

試料溶液の一定量 (25 mL 以下) を全量フラスコ 100 mL にとり、干渉抑制剤溶液 10 mL を加え、更に検量線用クロム標準液と塩酸濃度が同程度の濃度となるように塩酸 (1+17)、塩酸 (1+23) 又は水を標線まで加え (検量

線用クロム標準液 100 mL 中に塩酸約 3.7 mL 含有しているため、試料溶液中の塩酸濃度及び分取量に応じて測定用溶液の塩酸濃度が同程度となるよう調整した)、原子吸光分析装置に導入し、クロムについて波長 359.3 nm の吸光度を測定した。同時に標準液を同様に測定して得られた検量線を用いて分析試料中のクロムの濃度を求めた。各試料溶液調製方法により調製した試料溶液の測定方法を Scheme 6 に示した。



Scheme 6 Method flow sheet of chromium in inorganic fertilizers
(Measurement procedure by 5 methods respectively)

3. 結果及び考察

3.1 試料溶液調製方法の選定

1) 各種試料溶液調製方法による測定値比較

試料溶液調製方法を選定するため、候補として 2.4).(1)りん酸法, (2)王水法, (3)硫水安融解法, (4)三混酸法を用いて試験し、各方法によるクロム測定値を既存法であるりん酸法による測定値と比較した結果を Table 1 に示した。使用した試料は、化成肥料, 配合肥料, 鉍さいけい酸質肥料, 混合りん酸肥料, 熔成けい酸りん肥, 鉍さいマンガン肥料 各 1 点 計 6 点。

その結果、王水法及び硫水安融解法は、混合りん酸肥料, 熔成けい酸りん肥, 鉍さいマンガン肥料において、りん酸法に対する測定値の割合が 21 %~82 %と低値を示した。一方、三混酸法は、りん酸法に対する測定値の割合が 94 %~103 %とほぼ同等の測定値を示した。この結果から、一部の無機質肥料には、りん酸法及び三混酸法では分解できるが、王水法及び硫水安融解法では分解できない難溶性のクロム化合物が含まれていることが考えられた。

Table 1 Result of quantitative value of chromium in inorganic fertilizers digested by 4 methods respectively

Method	Compound fertilizer		Mixed fertilizer		Silicate slag fertilizer		Phosphate fertilizer mixture		Fused silicate phosphate		Processed ferromanganese slag	
	Measured value ^{a)} (mg/kg)	Ratio ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (mg/kg)	Ratio ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (mg/kg)	Ratio ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (mg/kg)	Ratio ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (mg/kg)	Ratio ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (mg/kg)	Ratio ^{b)} (%)
Phosphoric acid method	502	100	1633	100	303	100	4014	100	3122	100	3214	100
Aqua regia method	561	112	1395	85	333	110	2453	61	2372	76	676	21
Ammonium hydrogen sulfate method	524	104	1457	89	314	104	2774	69	2570	82	2155	67
3-mixed acids method	517	103	1598	98	293	97	3998	100	3057	98	3017	94

a) $n = 1$

b) The ratio of values when the result of phosphoric acid method taken as 100

2) 酸化クロム(III)による添加回収試験結果

上記 1) の結果から、各試料溶液調製方法の難溶性クロム化合物の分解能力を確認することとした。りん酸法、王水法、硫水安融解法及び三混酸法により、難溶性クロム化合物の一種である酸化クロム(III) (Cr_2O_3)^{7, 8)} を化成肥料に 0.010 g (Crとして試料中濃度 6842 mg/kg 相当、上記 1) の検討で使用した各種肥料のクロム濃度よりも高濃度となるように設定) 添加し 3 点併行で回収試験を実施した結果を Table 2 に示した。

各方法の平均回収率は、りん酸法は 98 %、王水法及び硫水安融解法は 1 % 未満、三混酸法は 99 % であった。これは、王水法及び硫水安融解法では、酸化クロム(III) をほとんど分解できなかったが、りん酸法及び三混酸法ではほとんど分解できたためと考えられた。この硫水安融解法の結果については、硫酸水素アンモニウムによる融解では酸化クロム(III) はほとんど分解できないという報告⁸⁾ と一致する結果であった。

以上のことから、三混酸法は既存法であるりん酸法と同程度の分解能力を有している可能性があり、りん酸を使用しない方法として採用できる可能性があると考え、三混酸法により以下の検討を進めることとした。

なお、今回のりん酸法の添加回収試験成績は、回収率及び併行相対標準偏差ともに良好であった。前述の共同試験でりん酸法の室間再現精度が不良となった一因として、りん酸を含む測定用溶液の粘性が高かったこと⁵⁾ に加えて、肥料分析法のりん酸法の規定では添加する酸の量に幅 (5 mL ~ 10 mL) があり、加熱温度及び時間が明示されていないため、試験室によって試験条件が異なっていたことも一因と考えられた。このため、本検討では肥料分析法に規定の条件の範囲内で一定の条件により試験を実施した (Scheme 1)。また、前述の共同試験では測定用溶液中のりん酸の影響により測定装置への溶液導入速度の不安定化や、多点測定した場合に装置の目詰まりが起きたが、これは低濃度のクロム (約 50 mg/kg) を含む試料を用いたことにより、試料溶液の分取量を 25 mL と多くする必要があり、測定用溶液中のりん酸濃度が高い状態での試験であったため、より影響があったものと考えられた。一方、本検討では比較的高濃度のクロムを含む試料を使用したため、希釈倍率を高くしたことにより測定用溶液中のりん酸濃度を低くすることができ、かつ多点を連続して測定することはしなかったため、りん酸の粘性によるばらつき等の問題は認められなかった。しかし、激しく突沸する試料があり低温での加熱が必要なことから試験に長時間 (2 日間程度) を要したこと (本検討ではりん酸法により突沸する試料が認められた場合は、突沸防止のため分析試料量を減じることや、加熱温度を低下させ、長時間かけて加熱す

る等の対応を行った.),りん酸を使用することによりビーカーの底部が腐蝕等により白く汚染されビーカーの消耗が早いこと等,りん酸法の改良の必要性が認められた.

Table 2 Recovery rate of chromium by respective methods for chromium oxide(III)

Sample	Method	Concentration	Concentration of	Mean	RSD_r ^{b)}	Recovery
		of additional	chromium naturally			
		(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
Compound fertilizer	Phosphoric acid method	6842	54	6746	1.0	98
	Aqua regia method	6842	38	42	9.2	0.1
	Ammonium hydrogen sulfate method	6842	38	78	4.6	0.6
	3-mixed acids method	6842	60	6801	1.0	99

a) Mean value of parallel test ($n=3$)

b) Repeatability relative standard deviation

c) ((Mean value-concentration of chromium naturally in fertilizer)/concentration of additional chromium) $\times 100$

3.2 三混酸法改良法の検討

1) 三混酸法における突沸の状況確認

三混酸法により,各種の有機物を含まない肥料を試験したところ,規定加熱温度170℃~300℃で徐々に昇温して加熱した際に一部の熔成けい酸りん肥,化成肥料,鉍さいけい酸質肥料等で激しく突沸し,ビーカーから流出する場合があった.このため,三混酸法による突沸状況を確認することとし,58点の各種肥料を用いて突沸の状況を確認した結果をTable 3に示した.

58点中14点において激しい突沸が確認された.突沸が特に激しい肥料の使用原料を調査したところ,水砕処理により生産された鉍さいや熔融物(加圧水を噴射するなどして急冷・粒状化する処理.急冷水砕するため結晶化せずガラス状構造となる.)⁹⁾を原料とした肥料において特に突沸が起きやすかったが,それらの原料を使用していない肥料についても突沸が認められた.その対策として試料量を1.00gから0.50gに減じることや,加熱温度を低下させ長時間分解することで突沸を防止できる肥料もあったが,水砕処理物を原料としている肥料については,それらの操作変更では突沸を防止することができない場合もあった.

このため,三混酸法を改良し突沸を防止するための操作を追加する検討を行うこととした.

Table 3 Status of bumping used 3 mixed acids method

Sample	Number of analysis	Number of bumping ^{a)}	Sample	Number of analysis	Number of bumping ^{a)}
Fused silicate phosphate	4	2	Mixed fertilizer	6	1
Processed silicate slag phosphate fertilizer	1	0	Fluid mixed fertilizer	3	0
Processed phosphate fertilizer	4	1	Fused sluge mixed fertilizer	1	1
Phosphate fertilizer mixture	6	1	Silicate slag fertilizer	6	3
Pottasium fertilzer mixture	5	0	Byproduct magnesium fertilizer	5	3
Fused mixed fertilizer	1	1	Magnesium fertilizer mixture	1	0
Compound fertilizer	12	1	Processed ferromanganese slag	3	0
			Total	58	14

a) Fertilizer bumped vigorously and falled out of beaker

2) 突沸防止のための硝酸-硫酸分解の加熱時間の検討

三混酸法の加熱操作が突沸の有無に与える影響を検討した。三混酸法では、過塩素酸分解時の激しい反応を防止する目的で予め硝酸-硫酸分解により有機物を予備分解した後、過塩素酸を添加する操作とされている。この硝酸-硫酸分解の加熱時間を0~60分まで変えて分解液が突沸する際の加熱温度を確認した結果をTable 4に示した。使用した試料は、収集した全58点の肥料を試験した結果(Table 3)から最も突沸しやすかった水砕処理により生産された熔成けい酸りん肥及び鉍さいけい酸質肥料各1点とした。

その結果、突沸した加熱温度は、硝酸-硫酸分解の加熱時間の最も長い60分で最も低く(220℃)、硝酸-硫酸分解を行わなかった加熱時間0分で最も高温(230℃又は240℃)であった。

このことから、三混酸法の加熱操作をより高温で加熱しても突沸しにくい操作に改良するため、硝酸-硫酸による予備分解操作を省略し、硝酸、硫酸、過塩素酸を加熱開始前に同時添加する方法とすることとした(Scheme 5のとおり)。なお、本検討の対象は有機物を含まない肥料のため、予備分解操作を省略しても過塩素酸分解での激しい反応は生じないと考えられた。この操作変更に加えて、分解液が300℃以上まで突沸せずに加熱可能となるよう、引き続き突沸防止方法についての検討を行った。

Table 4 Effect of time length digested with nitric acid-sulfuric acid

Sample	Time length of nitric acid-sulfuric acid digestion	Temperature of bumping digested with nitric acid-sulfuric acid-perchloric acid
	(minutes)	(°C)
Fused silicate phosphate (quenching)	0	230
	15	220
	30	220
	60	220
Silicate slag fertilizer (quenching)	0	240
	15	230
	30	230
	60	220

3) 突沸防止のための硫酸追加量の検討

三混酸法における硫酸添加量は 5 mL とされているが、沸点が比較的高い硫酸の添加量を増加させることで突沸防止効果が高まることが考えられた。そのため、三混酸法の硫酸添加量を更に 2 mL~10 mL 追加した方法により突沸の有無を確認することとし、結果を Table 5 に示した。使用した試料は、上記 2) で使用したのと同じ熔成けい酸りん肥 1 点とした。

その結果、硫酸を 8 mL 以上追加(硫酸合計添加量 13 mL 以上)することで、300 °C 以上で加熱しても突沸を防ぐことができた。これは、硫酸を追加したことにより分解液の沸点が上昇したため、突沸が防止されたと考えられた。

しかし、硫酸添加量を増加させた場合、三混酸法の分解終了時に分解液を 2 mL 以下に加熱濃縮する操作に 1 時間程度を要する場合があった。このため、より迅速に試験が可能でかつ突沸防止効果のある他の添加試薬について検討を行うこととした。

Table 5 Influence of sulfuric acid amount for prevention of bumping

Sample	Amount of additional sulfuric acid	Presence or absence of bumping and temperature of bumping
	(mL)	
Fused silicate phosphate (quenching)	2	bumping at 230 °C
	4	bumping at 230 °C
	6	bumping at 270 °C
	8	no bumping(over 300 °C)
	10	no bumping(over 300 °C)

4) 突沸防止のための添加試薬の検討

突沸防止に効果があると考えられる添加試薬として、硫酸水素アンモニウム及び硫酸アンモニウムを選定した。これは、硫酸水素アンモニウムは、上記 3.1.1) の検討で用いた硫水安融解法において様々な試料を試験しても突沸が認められなかったこと、また、難溶性金属酸化物の原子吸光分析法の融解剤として用いられており¹⁰⁾、アルカリ金属等を含まないため原子吸光分析装置での測定において干渉等の影響は少ないものと考えられた。

ことから選定した。加えて、硫酸水素アンモニウムの類似試薬であり、より純度が高く安価で市販されている硫酸アンモニウムについても検討を行った。

三混酸法において、試料採取後に硫酸水素アンモニウム 5 g~8 g 又は硫酸アンモニウム 1 g~4 g を添加し、以下の操作を三混酸法と同様に行い、突沸の有無を確認した結果を Table 6 に示した。使用した試料は、上記 2) の検討で使用したのと同じ熔成けい酸りん肥及び鉍さいけい酸質肥料各 1 点とした。

その結果、添加試薬量が増加するに従い突沸が起こる際の加熱温度が上昇し、突沸防止効果が認められ、硫酸水素アンモニウムでは 7 g 以上、硫酸アンモニウムでは 3 g 以上添加することで、300 °C 以上で加熱しても突沸は認められなかった。これは、両試薬に由来する硫酸による沸点上昇の影響に加えて、上記 3) の検討での硫酸追加量 8 mL よりも少量の硫酸量でも突沸防止効果が認められていることから、付随するアンモニウムイオンが他のイオンと作用することによる複合的な要因により突沸防止効果が生じることが考えられた。また、上記 3) の検討で問題となった分解終了時の液量を 2 mL 以下に濃縮する操作に要する時間については、硫酸水素アンモニウム又は硫酸アンモニウムを添加しても、現行の三混酸法と比較して同程度であった。

この結果から、比較的少量で突沸防止効果が認められた硫酸アンモニウムを 4 g 添加する操作を三混酸法に追加することとした。また、硝酸-硫酸-過塩素酸添加後の加熱温度及び時間については、三混酸法では 170 °C~220 °C で 30 分間以上加熱した後、300 °C 以上までの昇温方法は「突沸の激しい場合、徐々に温度を上げる」と注記されていることから、突沸防止をより確実にするために「170 °C~220 °C で 1 時間以上加熱した後、30 分間以上かけて加熱温度を徐々に 300 °C 以上まで上げ、300 °C 以上で 2~3 時間加熱」とする方法とした(以下、「改良法」という。Scheme 5.)。

また、改良法により上記 1) の検討で突沸が認められた試料 14 点 (Table 3) 及び液状複合肥料 3 点を用いて試験したところ、突沸は起こらなかった。

Table 6 Influence of ammonium hydrogen sulfate or ammonium sulfate amount for prevention of bumping

Sample	Amount of ammonium hydrogen sulfate (g)	Amount of ammonium sulfate (g)	Presence or absence of bumping and temperature of bumping
Fused silicate phosphate (quenching)	5	—	bumping at 230 °C
	6	—	bumping at 250 °C
	7	—	no bumping(over 300 °C)
	8	—	no bumping(over 300 °C)
Silicate slag fertilizer (quenching)	5	—	bumping at 230 °C
	6	—	bumping at 270 °C
	7	—	no bumping(over 300 °C)
	8	—	no bumping(over 300 °C)
Fused silicate phosphate (quenching)	—	1	bumping at 260 °C
	—	2	bumping at 270 °C
	—	3	no bumping(over 300 °C)
	—	4	no bumping(over 300 °C)
Silicate slag fertilizer (quenching)	—	1	bumping at 240 °C
	—	2	bumping at 280 °C
	—	3	no bumping(over 300 °C)
	—	4	no bumping(over 300 °C)

5) 改良法における硫酸アンモニウム添加による測定干渉の確認

改良法において添加することとした硫酸アンモニウムが、クロム測定時に干渉等の影響を及ぼすかどうかを確認した。クロム標準液を用いて、改良法による添加回収試験を実施した結果を Table 7 に示した。添加濃度は、一般的な化成肥料(窒素, リン酸, 加里の成分量の合計が 30 %)のクロム含有許容量付近(Cr 15000 mg/kg 相当量)及びその 1/10 の濃度(Cr 1500 mg/kg 相当量)で実施した。

その結果、回収率は 99.6 %~99.9 %と良好な結果となり、硫酸アンモニウムを添加することによる測定干渉はほとんどないと考えられた。

Table 7 Recovery rate of chromium by Improved method for chromium standard solution

Sample	Concentration (mg/kg)	Aliquot amount of sample solution (mL)	Mean value ^{a)} (mg/kg)	Recovery rate (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Criteria of the trueness ^{b)} (%)
chromium standard	15000	2.5	14938	99.6	0.5	96~104
	1500	25	1499	99.9	0.3	94~106

a) Mean value of parallel test ($n=3$)

b) Criteria of trueness (recovery) shown in Testing Methods of Fertilizer

6) 方法間比較による真度の評価

改良法の真度確認のため、試料 29 点(化成肥料 4 点, 配合肥料 2 点, 熔成複合肥料 1 点, 鉍さいけい酸質肥料 3 点, 混合りん酸肥料 5 点, 鉍さいマンガン肥料 3 点, 加工りん酸肥料 3 点, 加工鉍さいりん酸肥料 1 点,

熔成けい酸りん肥 4 点, 熔成汚泥灰複合肥料 1 点, 混合加里肥料 2 点)を用いて, 既存法であるりん酸法と改良法によるクロム測定値を回帰分析により比較した.

りん酸法測定値に対する改良法測定値の回帰直線及び 95 % 予測区間を Fig. 1 に示した. また, 95 % 信頼区間の傾き (b), 切片 (a), 及び回帰直線の相関係数 (r) を Table 8 に示した.

肥料等試験法の妥当性確認方法の基準では, 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 0 が含まれ, 相関係数が 0.99 以上を推奨しており, この基準を満たしていた.

この結果から, 改良法は既存法であるりん酸法と同等の真度を有していると考えられた.

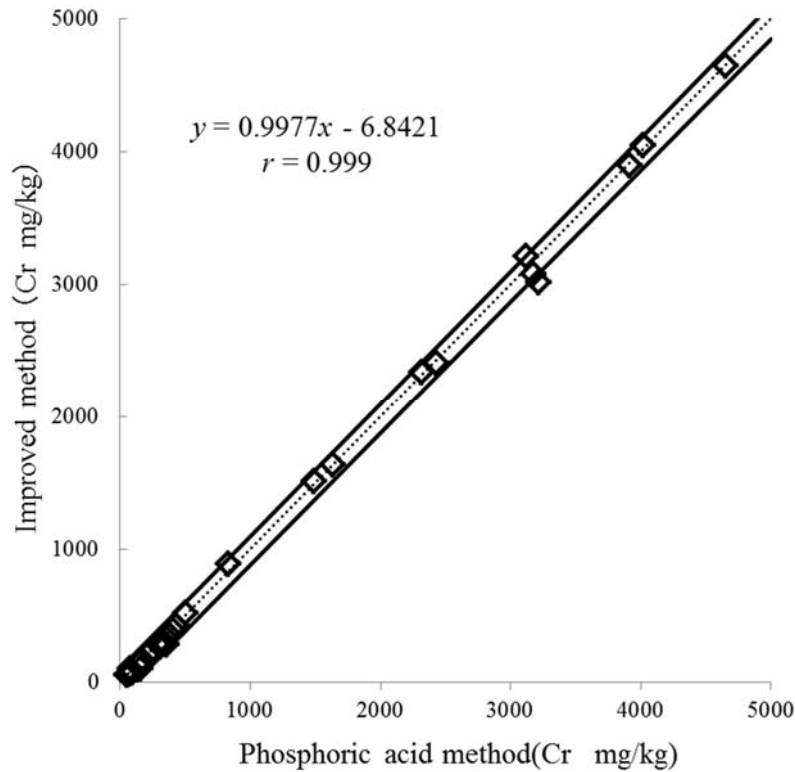


Fig. 1 Comparison between Phosphoric acid method and Improved method
Dotted line: $y=x$, Solid lines: Upper and Lower limit of 95 % prediction intervals

Table 8 The 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line

Method of Benchmark	Method of object	95% confidence interval		Correlation coefficient(r)
		Slope(b)	Intercept(a)	
Phosphoric acid method	Improved method	0.984 ~ 1.01	-32.4 ~ 18.7	0.999

7) 併行精度及び中間精度の評価

改良法の併行精度及び中間精度を確認するため, 熔成けい酸りん肥, 鉍さいけい酸質肥料及び化成肥料各 1 点を用いて, クロムの試験を 2 点併行で日を変えて 5 回実施して得られた結果を Table 9 に示した. また, この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 10 に示した.

熔成けい酸りん肥の平均値は質量分率で 4628 mg/kg で, 併行相対標準偏差は 0.8 %, 中間相対標準偏差は 3.8 %であった. 鉍さいけい酸質肥料の平均値は質量分率で 319 mg/kg で, 併行相対標準偏差は 1.2 %, 中間相対標準偏差は 1.8 %であった. また, 化成肥料の平均値は質量分率で 545 mg/kg で, 併行相対標準偏差は 1.1 %, 中間相対標準偏差は 1.3 %であった.

これらの濃度におけるいずれの相対標準偏差も肥料等試験法に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安内であったことから、改良法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 9 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation

Test days	(mg/kg)					
	Fused silicate phosphate		Silicate slag fertilizer		Compound fertilizer	
1	4628	4695	309	319	538	548
2	4311	4351	323	324	554	545
3	4781	4745	313	312	539	548
4	4754	4717	324	318	550	556
5	4615	4686	324	321	535	541

Table 10 Statistical analysis of repetition test result for evaluation precision

Sample	Mean value ^{a)} (mg/kg)	Repeatability precision			Intermediate precision		
		s_r ^{b)}	RSD_r ^{c)}	$CRSD_r$ ^{d)}	$s_{I(T)}$ ^{e)}	$RSD_{I(T)}$ ^{f)}	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)}
		(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%) ^{d)}	(%)
Fused silicate phosphate	4628	37	0.8	3	175	3.8	4.5
Silicate slag fertilizer	319	3.8	1.2	4	5.7	1.8	6.5
Compound fertilizer	545	5.9	1.1	4	7.3	1.3	6.5

a) Total mean (Number of test days (5) × Sample number of parallel test (2))

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of Repeatability precision (repeatability relative standard deviation)
shown in Testing Method for Fertilizer

e) Intermediate standard deviation

f) Intermediate relative standard deviation

g) Criteria of Intermediate precision (intermediate relative standard deviation)
shown in Testing Method for Fertilizer

8) 定量下限等の確認

改良法の定量下限を確認するため、化成肥料及び鉍さいけい酸質肥料を用いてクロムの試験を7点併行で実施した結果をTable 11に示した。化成肥料及び鉍さいけい酸質肥料の平均定量値はそれぞれ43.7 mg/kg及び31.5 mg/kgであり、その標準偏差はそれぞれ0.57 mg/kg及び0.31 mg/kgであった。なお、定量下限は標準偏差×10、検出下限は標準偏差×2× $t(n-1,0.05)$ を用いて算出¹¹⁾したところ、改良法の定量下限は6 mg/kg程度、検出下限は3 mg/kg程度と推定された。

肥料公定規格におけるクロムの最小含有許容量は家庭園芸用複合肥料の100 mg/kgであり、推定した定量下限値(6 mg/kg)はこの最小含有許容量の1/5以下であった。このことから、改良法は肥料等試験法が示している定量下限の推奨基準を満たしていることを確認した。

Table 11 Calculated *LOQ* and *LOD* values of chromium

Sample	Mean value ^{a)}	SD ^{b)}	(mg/kg)	
			<i>LOQ</i> ^{c)}	<i>LOD</i> ^{d)}
Compound fertilizer	43.7	0.57	5.7	2.2
Silicate slag fertilizer	31.5	0.31	3.1	1.2

a) $n=7$

b) Standard deviation

c) Standard deviation $\times 10$ d) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$

3.3 三混酸法によるクロム試験の単一試験室妥当性確認

有機物を含まない肥料のうち、三混酸法により突沸せずに試料溶液調製可能な肥料も数多く認められた (Table 3)。肥料公定規格でクロム含有許容量が設定されている有機物を含まない肥料の種類 22 種類のうち、ひ素の含有許容量も設定されている肥料の種類は 13 種類と多くある。三混酸法によりクロムの試験が可能であれば、ひ素とクロムを同一試料溶液で測定できるため試験の迅速化、効率化を図ることができる。このことから、突沸しない肥料を用いて、三混酸法の単一試験室での妥当性確認を実施した。

1) 方法間比較による真度の評価

試料 27 点 (化成肥料 4 点, 配合肥料 2 点, 鉍さいけい酸質肥料 3 点, 混合りん酸肥料 5 点, 鉍さいマンガン肥料 3 点, 加工りん酸肥料 3 点, 加工鉍さいりん酸肥料 1 点, 熔成けい酸りん肥 3 点, 熔成汚泥灰複合肥料 1 点, 混合加里肥料 2 点) を用いて, 既存法であるりん酸法と三混酸法によりクロム測定値を比較した。

りん酸法測定値に対する三混酸法測定値の回帰直線及び 95 % 予測区間を Fig. 2 に示した。また, 95 % 信頼区間の傾き (b), 切片 (a), 及び回帰直線の相関係数 (r) を Table 12 に示した。

肥料等試験法の妥当性確認方法の基準では, 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 0 が含まれ, 相関係数が 0.99 以上を推奨しており, この基準を満たしていた。

この結果から, 突沸しない肥料において三混酸法は公定法であるりん酸法と同等の真度を有していると考えられた。

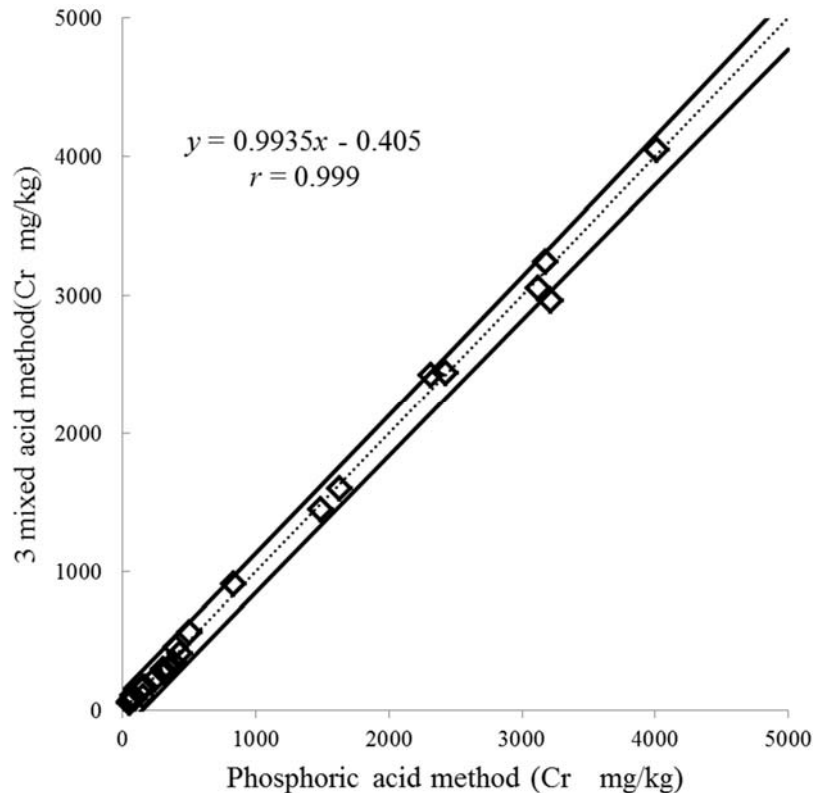


Fig. 2 Comparison between Phosphoric acid method and 3-mixed acid method
Dotted line: $y=x$, Solid lines: Upper and Lower limit of 95 % prediction intervals

Table 12 The 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line

Method of Benchmark	Method of object	95 % confidence interval		Correlation coefficient(r)
		Slope(b)	Intercept(a)	
Phosphoric acid method	3-mixed acids method	0.971 ~ 1.02	-34.6 ~ 33.8	0.999

2) 併行精度及び中間精度の評価

三混酸法の併行精度及び中間精度を確認するため、鉍さいけい酸質肥料、化成肥料及び混合りん酸肥料を用いて、クロムの試験を2点併行で日を変えて5回実施して得られた結果を Table 13 に示した。また、この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 14 に示した。

鉍さいけい酸質肥料の平均値は質量分率で 288 mg/kg で、併行相対標準偏差は 2.4 %、中間相対標準偏差は 4.4 % であった。化成肥料の平均値は質量分率で 542 mg/kg で、併行相対標準偏差は 1.1 %、中間相対標準偏差は 1.6 % であった。また、混合りん酸肥料の平均値は質量分率で 3966 mg/kg で、併行相対標準偏差は 2.4 %、中間相対標準偏差は 2.7 % であった。

これらの濃度におけるいずれの相対標準偏差も肥料等試験法に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安内であったことから、三混酸法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 13 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation

Test days	(mg/kg)					
	Silicate slag fertilizer		Compound fertilizer		Phosphate fertilizer mixture	
1	272	269	530	548	3911	3764
2	287	299	540	544	4052	3925
3	277	293	541	537	3991	3946
4	287	295	550	547	3856	4084
5	305	301	541	541	4084	4049

Table 14 Statistical analysis of repetition test result for evaluation precision

Sample	Mean value ^{a)} (mg/kg)	Repeatability			Intermediate precision		
		s_r ^{b)}	RSD_r ^{c)}	$CRSD_r$ ^{d)}	$s_{I(T)}$ ^{e)}	$RSD_{I(T)}$ ^{f)}	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)}
		(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%) ^{d)}	(%)
Silicate slag fertilizer	288	7.0	2.4	4	13	4.4	6.5
Compound fertilizer	542	6.1	1.1	4	8.6	1.6	6.5
Phosphate fertilizer mixture	3966	96	2.4	3	107	2.7	4.5

a) Total mean (Number of test days (5) × Sample number of parallel test (2))

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of Repeatability precision (repeatability relative standard deviation)

shown in Testing Method for Fertilizer

e) Intermediate standard deviation

f) Intermediate relative standard deviation

g) Criteria of Intermediate precision (intermediate relative standard deviation)

shown in Testing Method for Fertilizer

3) 定量下限等の確認

三混酸法の定量下限を確認するため、化成肥料及び副産苦土肥料を用いてクロムの試験を7点併行で実施した結果を Table 15 に示した。化成肥料及び副産苦土肥料の平均定量値はそれぞれ 40.7 mg/kg 及び 1.71 mg/kg であり、その標準偏差はそれぞれ 0.55 mg/kg 及び 0.21 mg/kg であった。なお、定量下限は標準偏差×10、検出下限は標準偏差×2× $t(n-1, 0.05)$ を用いて算出¹¹⁾したところ、三混酸法の定量下限は 6 mg/kg 程度、検出下限は 3 mg/kg 程度と推定された。

肥料公定規格におけるクロムの最小含有許容量は家庭園芸用複合肥料の 100 mg/kg であり、推定した定量下限値 (6 mg/kg) はこの最小含有許容量の 1/5 以下であった。このことから、三混酸法は、肥料等試験法が示している定量下限の推奨基準を満たしていることを確認した。

Table 15 Calculated *LOQ* and *LOD* values of chromium

Sample	Mean value ^{a)}	SD ^{b)}	(mg/kg)	
			<i>LOQ</i> ^{c)}	<i>LOD</i> ^{d)}
Compound fertilizer	40.7	0.55	5.5	2.1
Byproduct magnesium fertilizer	1.71	0.21	2.1	0.8

a) $n=7$

b) Standard deviation

c) Standard deviation $\times 10$ d) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$

4. まとめ

有機物を含まない肥料中のクロムの測定法について、りん酸を用いない試料溶液の調製方法を検討し、単一試験室における妥当性確認試験を実施したところ、次の結果を得た。

4.1 改良法の検討及び単一試験室妥当性確認

(1) 試料溶液調製方法の検討を行い、肥料等試験法のひ素又は焼成汚泥肥料中のクロム試験法として採用されている硝酸－硫酸－過塩素酸分解法(以下、「三混酸法」という。)を選定した。更に、三混酸法では突沸する肥料(熔融物、鉍さい等を原料とする肥料において突沸する場合が多い)が認められたため突沸防止方法を検討し、三混酸法の操作に突沸防止試薬として硫酸アンモニウムの添加を追加する方法を設定した(以下、「改良法」という。)

(2) 硫酸アンモニウム添加による測定干渉を確認するため、クロム標準液(一般的な化成肥料のクロム含有許容量付近とその1/10濃度相当)を用いて回収試験を3点併行で行った結果、回収率は99.6%～99.9%あり良好な値が得られた。

(3) 真度確認のため、りん酸法(既存法)と改良法により、流通肥料計29銘柄を分析し、回帰分析による方法間比較を実施した。回帰直線の傾きは95%信頼区間に1が含まれ、切片の95%信頼区間に0が含まれ、相関係数が0.99以上であり、肥料等試験法に示されている真度の推奨する規準を満たしていた。

(4) 併行精度及び中間精度を確認するため、3種類の試料を用い、2点併行で日を変えて5回試験を行った結果、併行相対標準偏差は0.8%～1.2%、中間相対標準偏差は1.3%～3.8%であった。この結果は肥料等試験法に示されている併行精度及び中間精度の目安を満たしていた。

(5) 改良法の定量下限は6 mg/kg程度、検出下限は3 mg/kg程度と推定され、肥料公定規格におけるクロムの最小含有許容量である100 mg/kgの1/5以下であり、定量下限の推奨基準を満たしていた。

(6) 以上の結果から、改良法によるクロム試験の適用範囲は有機物を含まない肥料全般とすることとした。

4.2 三混酸法の単一試験室妥当性確認

改良法の基とした三混酸法(ひ素試験に用いられている方法)により突沸しない肥料も多いことから、ひ素とクロムを同一試料溶液で測定可能であれば試験の迅速化、効率化を図ることができる。このため、突沸しない肥料を用いて、三混酸法の単一試験室での妥当性確認を実施した。

(1) 真度確認のため、りん酸法(既存法)と三混酸法により、流通肥料計27銘柄を分析し、回帰分析による方

法間比較を実施した。回帰直線の傾きは 95 %信頼区間に 1 が含まれ、切片の 95 %信頼区間に 0 が含まれ、相関係数が 0.99 以上であり、肥料等試験法に示されている真度の推奨する規準を満たしていた。

(2) 併行精度及び中間精度を確認するため、3 種類の試料を用い、2 点併行で日を変えて 5 回試験を行った結果、併行相対標準偏差は 1.1 %～2.4 %、中間相対標準偏差は 1.6 %～4.4 %であった。この結果は肥料等試験法に示されている併行精度及び中間精度の目安を満たしていた。

(3) 三混酸法の定量下限は 6 mg/kg 程度、検出下限は 3 mg/kg 程度と推定され、肥料公定規格におけるクロムの最小含有許容量である 100 mg/kg の 1/5 以下であり、定量下限の推奨基準を満たしていた。

(4) 以上の結果から、三混酸法によるクロム試験の適用範囲は有機物を含まない肥料のうち、突沸しない肥料とすることとした。

文 献

- 1) 肥料取締法:一部改正 平成 26 年 6 月 13 日, 法律第 69 号(2014)
- 2) 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件:改正平成 28 年 12 月 19 日, 農林水産省告示第 2535 号
- 3) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992 年版), p.88~93, 日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
- 4) 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 (2016)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikinho_2016.pdf >
- 5) 阿部進, 秋元里乃, 坂井田里子, 八木寿治, 伊藤浩平, 田中雄大, 加島信一, 廣井利明, 鈴木時也, 佐久間健太, 橋本良美, 白井祐治:2014 年度 肥料認証標準物質の開発ー普通化成肥料 FAMIC-B-14 の調製ー, 肥料研究報告, **8**, 140~152 (2015)
- 6) 顯谷久典, 竹葉佳己:焼成汚泥肥料中のカドミウム, 鉛, ニッケル及びクロム測定ー無機質肥料の分解法の適用ー, 肥料研究報告, **3**, 30~42(2010)
- 7) 化学大辞典編集委員会:化学大辞典, **3**, 907~908(1960)
- 8) 松本健:アンモニウム塩融解法による難溶性金属酸化物の迅速分解, ぶんせき, **8**, 83~87(1994)
- 9) 農山漁村文化協会:肥料・土づくり大事典, 229~248(2007)
- 10) 松本健, 小浦利弘:アンモニウム塩融解による難溶性硫酸バリウムの迅速分解・分析, 分析化学, **50**(12), 807~811(2001)
- 11) Codex:“Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009(2009)

Evaluation of Digest Method for Determination of Chromium in Inorganic Fertilizer by Atomic Absorption Spectrometry

Toshiaki HIROI¹, Fumika TAKATSU²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center
(Now) Kobe Regional Center

An atomic absorption spectrometry was developed and valid for the determination of chromium in inorganic fertilizer. The sample was digested with nitric acid, sulfuric acid and perchloric acid (3-mixed acids method). When the sample bumped vigorously, added ammonium sulfate too (Improving method). The results showed that samples were appropriately digested for the analysis of chromium by 3-mixed acids method or Improving method. Ammonium sulfate could prevent bumping samples and didn't interfere chromium determination. Twenty-nine samples were compared in measurement values with existing method (phosphoric acid method) and improving method. Chromium was within the recommended range of trueness evaluation criteria (95 % confidence interval of slope: 0.984 ~ 1.01, 95 % confidence interval of intercept: -32.4 ~ 18.7) defined in The Testing Methods for Fertilizers provided by the Food and Agricultural Materials Inspection Center. In addition, 27 samples were compared in measurement values with existing method (Phosphoric acid method) and 3-mixed acids method. Chromium was within the recommended range of trueness evaluation criteria (95 % confidence interval of slope: 0.971 ~ 1.02, 95 % confidence interval of intercept: -34.6 ~ 33.8) defined in The Testing Methods for Fertilizers. In the train of duplicate test per 5 tests on different days using three analytical samples and digested by the improved method, repeatability relative standard deviation (RSD_r) were ranged from 0.8 % to 1.2 %, and intermediate relative standard deviation ($RSD_{I(T)}$) were ranged from 1.3 % to 3.8 %, respectively. In the train of same test using three analytical samples and digested by 3-mixed acids method, RSD_r were ranged from 1.1 % to 2.4%, and $RSD_{I(T)}$ were ranged from 1.6 % to 4.4 %, respectively. On the basis of 7 replicate analysis of chromium using Improved method, the limit of quantitative value (LOQ) was estimated at 6 mg/kg. The result of same analysis using 3-mixed acids method, LOQ was estimated at 6 mg/kg. These results were satisfied for the criteria shown in the Testing Methods for Fertilizers. These results indicated that Improved method was valid for the determination of chromium in inorganic fertilizer when there were vigorous bumping, and 3-mixed acids method valid for the determination of chromium in inorganic fertilizer when there were not bumping.

Key words chromium, inorganic fertilizer, atomic absorption spectrometry, perchloric acid

(Research Report of Fertilizer, **10**, 9~28, 2017)

3 ICP 発光分光分析法によるチタンの測定

青山恵介¹

キーワード チタン, 湿式分解法, 融解法, 硫酸水素アンモニウム, ICP 発光分光分析法

1. はじめに

肥料の公定規格では化成肥料, 混合りん酸肥料, 鉍さいけい酸質肥料及び液状複合肥料等について, 有害成分としてチタン(Ti)の含有許容量が規定されている. 肥料中の Ti の分析は, 肥料分析法(1992 年版)¹⁾に吸光光度法及びフレーム原子吸光法が掲載されているが, 吸光光度法では融解操作に熟練を要することから精確さを担保することが難しい. また, フレーム原子吸光法においては, 一酸化二窒素-アセチレンフレーム(高温フレーム)を必要とするが, 多くの分析機関では汎用的でそれ以上の性能を有する ICP 発光分光分析装置(ICP-OES)に置き換わっている. また, いずれの分析法においても試料の分解操作で毒物であるフッ化水素酸を使用するが, 分析者や環境への影響から, 使用しない事が望ましい.

本検討では ICP-OES を用いたより簡便な分解法を検討することとし, カドミウム及び鉛等の分析²⁾で用いられる乾式灰化法(Dry ashing method)及びひ素の分析²⁾で用いられる湿式分解法(Wet digestion method)について比較した. その結果, 湿式分解法の方が良好であった. しかし, 鉍さいけい酸質肥料を酸分解する際に激しい突沸が起り, 分解液が容器の外に飛散することがあるため, 分析値及び精度の低下の要因となる. そこで, 鉍さいけい酸質肥料については, 湿式分解法以外の分解法についても検討した.

酸化チタン等の難溶性金属酸化物の分析は, 硫酸水素アンモニウム融解法(NH₄HSO₄ fusion method)が簡便かつ有効な方法であると報告^{3)~7)}されている. 肥料分析法(1992 年版)では二硫酸カリウムを融解材と使用しているが, 白金るつぼを用いて直火による強熱処理を行うこととされている. 一方, 硫酸水素アンモニウムを用いた融解法は, ガラスビーカーを破損することはなく, また, 融解材としては比較的融点が高いためホットプレートによる加熱処理が可能のため, より簡便な手法である. さらに, 鉍さいけい酸質肥料を分解する際の突沸も認められないため, 鉍さいけい酸質肥料については, 硫酸水素アンモニウム融解法の適用を検討した.

2. 材料及び方法

1) 分析試料

流通している鉍さいけい酸質肥料, 混合りん酸肥料, 化成肥料, 配合肥料, 鉍さいマンガン肥料, 形成複合肥料, 軽量気泡コンクリート粉末肥料, 混合堆肥複合肥料, 液状複合肥料及び家庭園芸用複合肥料を用いた. 液状複合肥料を除く固形肥料については, 目開き 500 μm のスクリーンを通過するまで粉碎したものを分析した.

2) 試薬等の調製

- (1) Ti 標準液(Ti 1 mg/mL): チタン標準液(Ti: 1000 $\mu\text{g/mL}$) (和光純薬工業; JCSS)
- (2) 検量線用標準液: チタン標準液(Ti 1 mg/mL)を塩酸(1+23)で希釈し, 検量線用混合標準液を調製した.

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

- (3) 水: JIS K 0211 に規定する超純水(比抵抗値 18 M Ω cm 以上)
- (4) 塩酸: 精密分析用
- (5) 硝酸: 精密分析用
- (6) 硫酸: 精密分析用
- (7) 過塩素酸: 精密分析用
- (8) 硫酸水素アンモニウム: 特級 (純度 98%以上)

3) 装置及び器具

- (1) ICP 発光分光分析装置(ICP-OES): 島津製作所 ICPS-8100(横方向観測方式, シーケンシャル形分光器)
- (2) 超純水製造装置: Millipore Elix UV5
- (3) ホットプレート: SIBATA NP-6 及びアサヒ理化製作所 AHS-500
- (4) 電気炉: Yamato FO 610
- (5) マイクロピペット: Eppendorf
- (6) 全量フラスコ
- (7) 全量ピペット
- (8) ろ紙 3 種

4) 分析方法

乾式灰化法, 湿式分解法, 硫酸水素アンモニウム融解法について検討した. なお, 肥料試験法に掲載されている原子吸光測光法ではフッ化水素酸を用いて酸分解を行うこととされていることから, 酸分解法の違いにおける Ti の分析値の同等性を確認するため, フッ化水素酸分解法による分析も実施した.

(1) 乾式灰化法

分析試料 5.00 g をトールビーカー 200 mL に入れ, 電気炉に入れて穏やかに加熱して炭化させた後, 450 °C で灰化させた. 放冷後, 少量の水で残留物を潤し, 硝酸 10 mL 及び塩酸 30 mL を加えた. トールビーカーを時計皿で覆い, 砂浴上で加熱分解した. 時計皿をずらし, 加熱を続けて乾固近くまで濃縮した. 放冷後, 塩酸 (1+5) 25 mL を加えてトールビーカーを時計皿で覆い, 加熱溶解した. 放冷後, 水で全量フラスコ 100 mL に移し, 標線まで水を加え, ろ紙 3 種でろ過し, 試料溶液とした. 試料溶液の濃度が検量線の範囲を超える場合は, 塩酸(1+23)で希釈した.

(2) 湿式分解法

分析試料 1.00 g をトールビーカー 300 mL に入れ, 硝酸 10 mL 及び硫酸 5 mL を加えて時計皿で覆い, 一昼夜放置した. 砂浴上で窒素酸化物(黄褐色煙)の発生が収まるまで加熱し, 放冷後, 過塩素酸 5 mL を加えてさらに 2 時間加熱分解した. 時計皿をずらし, 加熱を続けて液量が 2 mL 以下になるまで濃縮した. 放冷後, 塩酸(1+10) 約 5 mL 及び水約 20 mL を加えて時計皿で覆い, 加熱溶解した. 放冷後, 水で全量フラスコ 100 mL に移し, 標線まで水を加え, ろ紙 3 種でろ過し, 一定量を塩酸(1+23)で希釈した.

(3) 硫酸水素アンモニウム融解法

分析試料 1.00 g を 200 mL トールビーカーに入れ, 硫酸水素アンモニウム 10 g を加えた後, ホットプレートで

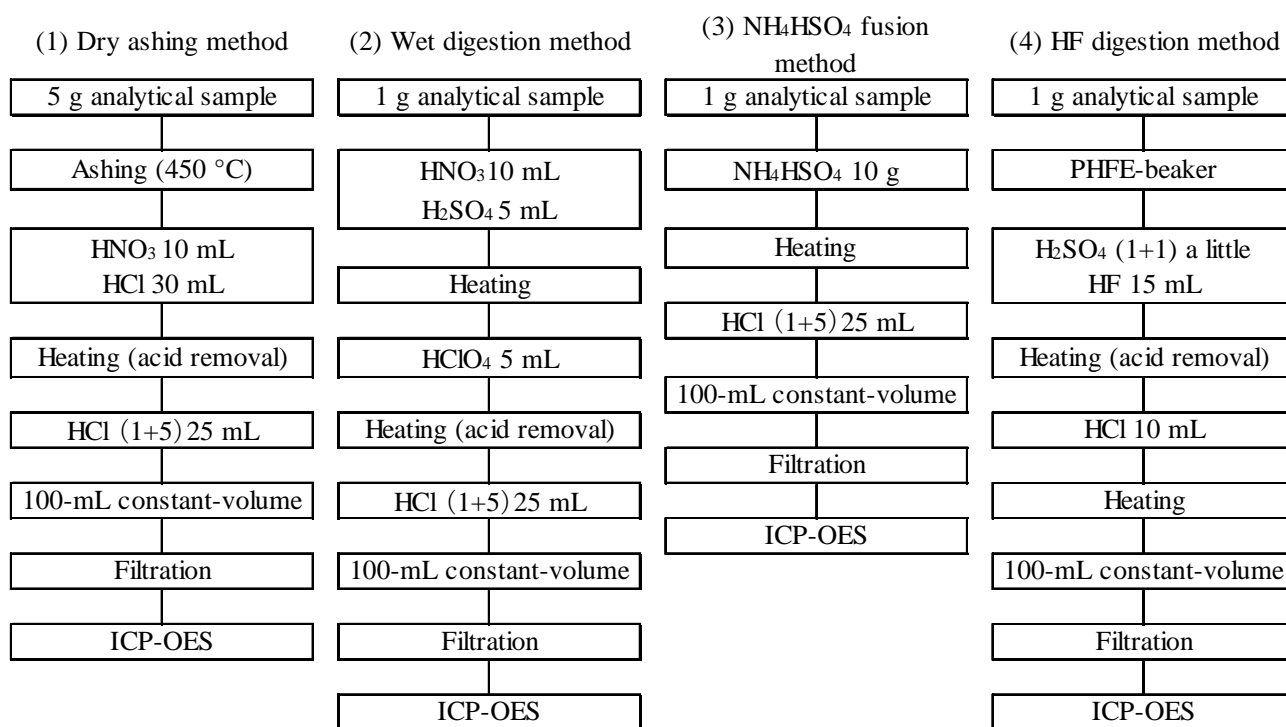
350 °C 以上で加熱して硫酸水素アンモニウムを融解させ試料とよく混合した後、60 分間加熱した。放冷後、塩酸(1+5) 25 mL を加えて数分間加熱し溶解した。100 mL 全量フラスコに移し、水で 100 mL に定容した後、ろ過した。ろ液の 10 mL を別の 100 mL 全量フラスコに入れ、塩酸(1+23) で定容し試料溶液とした。

(4) フッ化水素酸分解法

分析試料 1.00 g を 100 mL テフロンビーカーに入れ硫酸(1+1)を少量加え、さらにフッ化水素酸 15 mL を加え砂浴場で加熱し、乾固近くまで濃縮した。塩酸 10 mL を加えて加熱溶解し、放冷後、水で全量フラスコ 100 mL に移し、標線まで水を加え、ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とした。ろ液の 10 mL を別の 100 mL 全量フラスコに入れ、塩酸(1+23) で定容し試料溶液とした。

(1)～(4)で調製した試料溶液を ICP-OES で分析し、Ti 濃度を定量した。

各分析方法のフローシートは Scheme 1 のとおり。



Scheme 1 Flow of the Ti analysis method examined in this examination

3. 結果及び考察

1) 検量線の直線性

Ti 濃度が 0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L 及び 20 mg/L の標準液を ICP-OES で測定し、絶対検量線法により検量線を作成したところ、Fig. 1 のとおり直線性 ($r^2=0.999$ 以上)を示した。

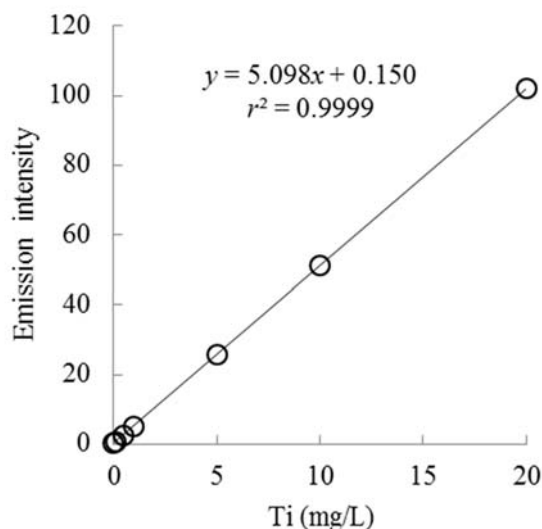


Fig. 1 Calibration curves of Ti

2) 硫酸水素アンモニウムの添加量

硫酸水素アンモニウム融解法における硫酸水素アンモニウムの添加量について検討した。鉍さいけい酸質肥料 1 g に対して、硫酸水素アンモニウムを 1 g, 2 g, 5 g 及び 10 g 添加し、350 °C で 10 分間加熱分解した後、Ti を定量した。結果は Table 1 のとおり。硫酸水素アンモニウムの添加量を 1 g 及び 2 g とした場合は 20 分程度の加熱で乾固してしまい、それ以上分解は進まなかった。5 g 及び 10 g とした場合の分析値は同等であったが、分解中の乾固防止を目的として添加量を 10 g とした。

Table 1 Additive amount of NH_4HSO_4

Sample	NH_4HSO_4 (g)	Measured value (%) ^{a) b)}	RSD (%) ^{c)}
Slag silicate fertilizer	1	0.264	1.7
	2	0.277	2.6
	5	0.285	1.3
	10	0.290	1.4

a) Mass fraction

b) $n=3$

c) Relative standard deviation

3) 硫酸水素アンモニウムによる分解時間

硫酸水素アンモニウムによる分解時間を検討した。試料 1 g に硫酸水素アンモニウム 10 g を添加した後、350 °C で 10 分, 30 分, 60 分及び 120 分間分解した。結果は Fig 2 のとおり。試料 1 は 10 分以上の分解で分析値が安定するが、試料 2 は 60 分以上の分解が必要であった。試料はいずれも鉍さいけい酸質肥料であるが、試料 1 の原料は製鉄鉍さいの水砕スラグを用いているのに対し、試料 2 は水砕スラグと徐冷スラグの混合品であった。

鉍さいけい酸質肥料においては、原料の種類を表示する必要がなく、分析をする際に原料の種類を把握することが困難なことから分解時間は 60 分とした。

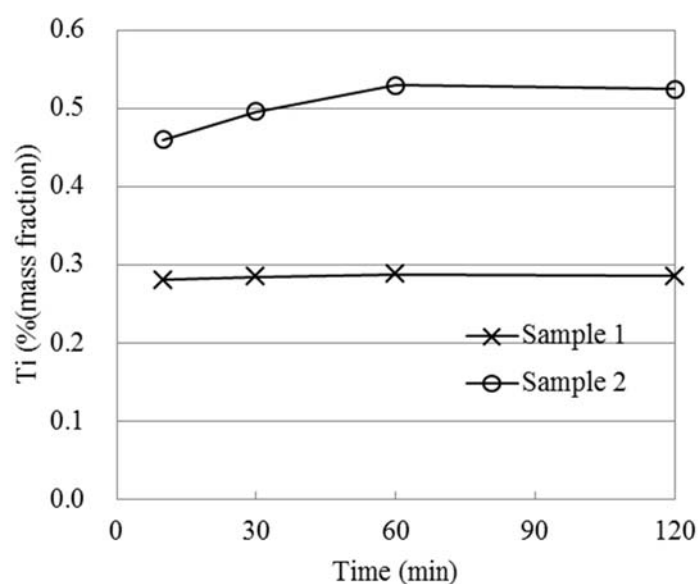


Fig. 2 Determination of the melting time with NH_4HSO_4 in 350°C

4) 硫酸水素アンモニウムの純度

使用する硫酸水素アンモニウムの純度について検討した. 市販されている硫酸水素アンモニウムのうち, 純度が98.0%以上及び99.9%以上のものを用いて鉍さいけい酸質肥料を7点分析した. 結果はFig. 3のとおり. 得られた結果に対して対応のある t 検定を行ったところ, これら純度が異なる硫酸水素アンモニウムを使用しても, Tiの分析値において有意水準5%で有意な差は認められなかった. したがって, 本法で使用する硫酸水素アンモニウムの純度は98.0%以上とした.

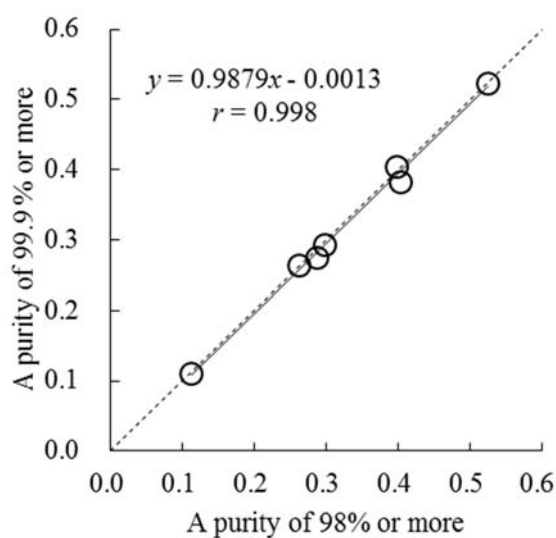


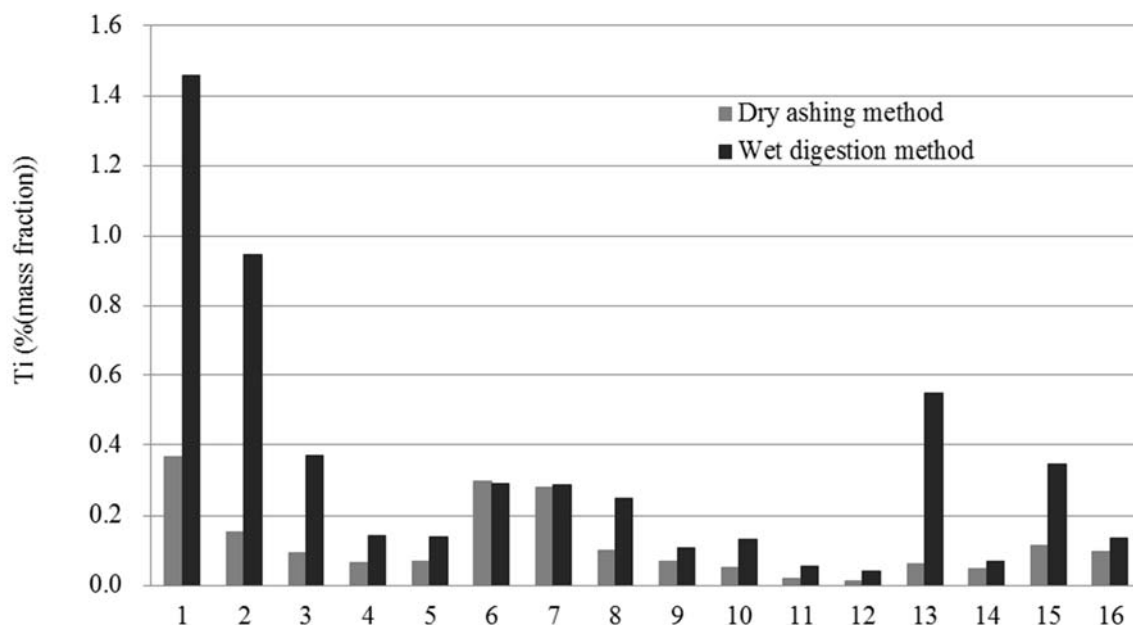
Fig. 3 The comparison of Ti values by the difference of the NH_4HSO_4 purity (%:Mass fraction)

5) 分析法の検討

混合りん酸肥料(5点), 鉍さいけい酸質肥料(4点), 化成肥料(3点), 軽量気泡コンクリート粉末肥料(2点)及び鉍さいマンガン肥料(2点)を用いて, 分析法の検討を行った.

まず, 乾式灰化法と湿式分解法による分析値(3点併行分析の平均値)をFig.4に示す. 一部の鉍さいけい酸質肥料を除いて湿式分解法の方が1.4倍~8.9倍高い分析値が得られ, 湿式分解法の方が良好であった. しかし, 鉍さいけい酸質肥料においては, 湿式分解法の酸分解中に激しい突沸が認められたが, 突沸による分解液の飛散は分析値の低下の要因となる. そこで, 鉍さいけい酸質肥料については硫酸水素アンモニウム融解法の適用を検討した. 鉍さいけい酸質肥料(7点)を用いて, それぞれ湿式分解法及び硫酸水素アンモニウム融解法により分析した. 結果はFig.5のとおり, 2方法間において同等の分析値が得られた.

よって, 鉍さいけい酸質肥料を除く肥料については湿式分解法, 鉍さいけい酸質肥料については硫酸水素アンモニウム融解法を適用することとした.



1~5: Mixed phosphate fertilizer, 6~9: Slag silicate fertilizer, 10~12: Chemical fertilizer, 13~14: Lightweight aerated concrete fertilizer, 15~16: Slag manganese fertilizer

Fig. 4 Ti analysis values of the Dry ashing method and Wet digestion method ($n=3$)

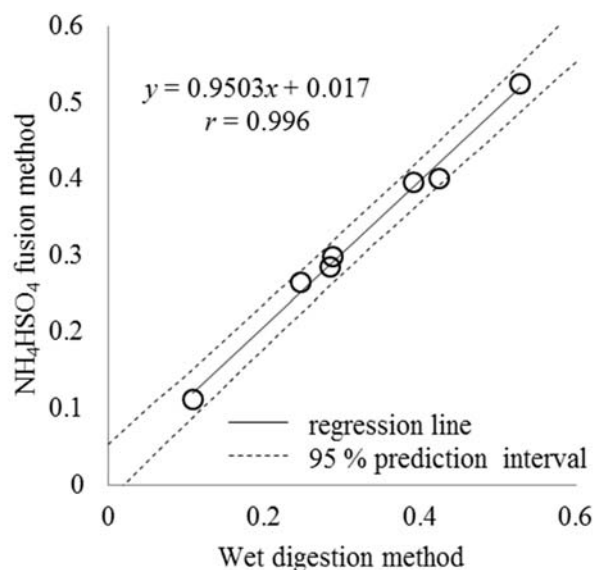


Fig. 5 The comparison of Ti values by NH_4HSO_4 fusion method and Wet digestion method

6) 肥料分析法との同等性の確認

湿式分解法については、鉍さいけい酸質肥料(7点)、混合りん酸肥料(5点)、化成肥料(3点)、軽量気泡コンクリート粉末肥料(2点)及び鉍さいマンガン肥料(2点)、硫酸水素アンモニウム融解法については鉍さいけい酸質肥料(7点)を用いて本法と肥料分析法で定められているフッ化水素酸分解法との同等性の確認を行った。

結果、湿式分解法については Fig. 6、硫酸水素アンモニウム融解法については Fig. 7 のとおりであり、いずれの分析法においてもフッ化水素酸分解法と同等であることが確認できた。

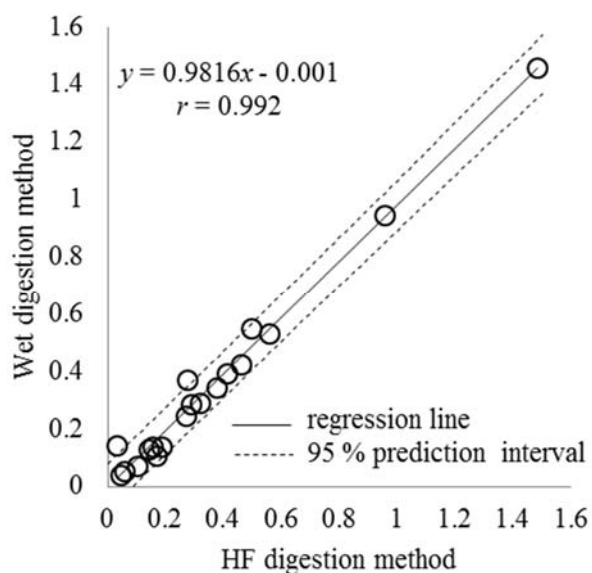


Fig. 6 The comparison of Ti values by Wet digestion method and HF digestion method

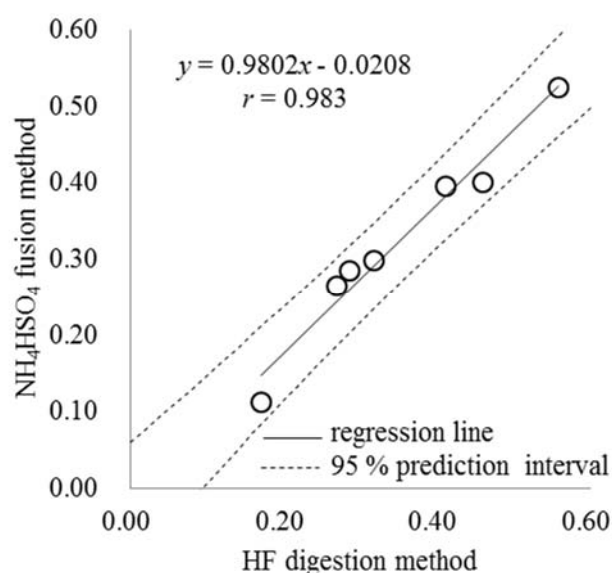


Fig. 7 The comparison of Ti values by NH_4HSO_4 fusion method and HF digestion method

7) 添加回収試験による真度の評価

鉍さいけい酸質肥料、軽量気泡コンクリート粉末肥料、混合りん酸肥料、化成肥料、鉍さいマンガン肥料、成

形複合肥料, 液状複合肥料, 混合堆肥複合肥料及び配合肥料に質量分率 0.01 %～質量分率 0.5 %相当量の Ti 標準液を添加した試料を用いて, 鉍さいけい酸質肥料を除く肥料は湿式分解法, 鉍さいけい酸質肥料は硫酸水素アンモニウム融解法で分析した.

結果は Table 2 のとおり, 湿式分解法による回収率は, 92.9 %～99.5 %であり, 硫酸水素アンモニウム融解法による回収率は 95.1 %～98.2 %であった. いずれの結果も, 肥料等試験法²⁾で定めた真度(回収率)の目標の範囲内であった.

Table 2 Addition recovery tests

Sample	Method	Spike level (%) ^{a)}	Recovery ^{b)} (%)	RSD ^{c)} (%)	Criteria of the trueness ^{d)} (%)
Lightweight aerated concrete fertilizer		0.5	98.4	3.1	94～106
Mixed phosphate fertilizer		0.1	98.1	0.6	94～106
Chemical fertilizer		0.1	95.9	0.8	94～106
Slag manganese fertilizer	Wet digestion	0.2	99.5	1.0	94～106
Formed fertilizer	method	0.02	96.2	0.8	92～108
Liquid fertilizer		0.01	92.9	1.8	92～108
Mixed compost fertilizer		0.01	97.3	2.1	92～108
Mixed fertilizer		0.01	93.2	4.3	92～108
Slag silicate fertilizer	NH ₄ HSO ₄	0.1	95.1	0.2	94～106
Slag silicate fertilizer	fusion method	0.2	98.2	0.8	94～106

a) Mass fraction

b) Mean value ($n=3$)

c) Relative standard deviation

d) Criteria of trueness (recovery) show in Testing Methods for Fertilizers

8) 併行精度及び中間精度の評価

併行精度及び中間精度を確認するため, 湿式分解法は混合りん酸肥料及び化成肥料, 硫酸水素アンモニウム融解法は鉍さいけい酸質肥料 2 点を用いて, Ti 濃度を 2 点併行で日を変えて 7 回試験を実施した. 得られた結果を Table 3 に示した. また, この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 4 に示した.

湿式分解法については, 混合りん酸肥料及び化成肥料の Ti 濃度の平均値は質量分率 0.950 %及び 0.130 %, 併行相対標準偏差は 1.7 %及び 1.4 %, 中間相対標準偏差は 4.3 %及び 3.2 %であった.

硫酸水素アンモニウム融解法については, 鉍さいけい酸質肥料 1 及び 2 の Ti 濃度の平均値は質量分率 0.525 %及び 0.112 %, 併行相対標準偏差は 1.0 %及び 1.6 %, 中間相対標準偏差は 1.0 %及び 2.4 %であった.

この濃度におけるいずれの相対標準偏差も肥料等試験法²⁾に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安以内であった.

Table 3 Repeatability test results on different days (% (Mass fraction))

Sample	Method	Test day (factor)						
		1	2	3	4	5	6	7
Mixed phosphate fertilizer	Wet digestion	0.933	0.936	0.912	0.931	1.01	0.945	0.941
	method	0.944	0.939	0.958	0.943	1.02	0.940	0.942
Chemical fertilizer	Wet digestion	0.124	0.135	0.131	0.138	0.134	0.125	0.124
	method	0.122	0.133	0.134	0.134	0.131	0.121	0.129
Slag silicate fertilizer	NH ₄ HSO ₄	0.530	0.535	0.526	0.521	0.524	0.522	0.530
	fusion method	0.520	0.523	0.520	0.531	0.519	0.524	0.528
Slag silicate fertilizer	NH ₄ HSO ₄	0.112	0.107	0.113	0.110	0.110	0.112	0.112
	fusion method	0.111	0.109	0.118	0.113	0.112	0.116	0.112

Table 4 Repeatability and intermediate precision

Sample	Method	Total mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
			s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%) ^{b)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)
Mixed phosphate fertilizer	Wet digestion	0.950	0.013	1.7	3	0.031	4.3	4.5
Chemical fertilizer	method	0.130	0.002	1.4	3	0.006	3.2	4.5
Slag silicate fertilizer	NH ₄ HSO ₄	0.525	0.005	1.0	3	0.005	1.0	4.5
Slag silicate fertilizer	fusion method	0.112	0.002	1.6	3	0.003	2.4	4.5

a) $n=14$ (duplication $\times 7$ days)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability relative standard deviation

f) Intermediate standard

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate relative standard deviation

9) 定量下限等の確認

湿式分解法及び硫酸水素アンモニウム融解法の定量下限等を確認するため、家庭園芸用複合肥及び鉍さいけい酸質肥料を7点併行で試験を実施した結果を Table 5 に示した。平均値は質量分率 0.00416 % 及び質量分率 0.111 % であり、その標準偏差は質量分率 0.00033 % 及び質量分率 0.002 % であった。定量下限は標準偏差 $\times 10$ 、また、検出下限は標準偏差 $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$ として示される^{2), 8)}ので、湿式分解法及び硫酸水素アンモニウム融解法による定量下限は質量分率 0.001 % 及び質量分率 0.02 %、検出下限は質量分率 0.0005 % 及び質量分率 0.008 % 程度と推定された。

肥料中において最も低い Ti の含有許容量は質量分率 0.004 % であり、いずれの分析法においても含有許容量に対して十分な定量下限を有していた。

Table 5 Estimation of the lower limit of quantitation and lower limit of detection of Ti

(%(Mass fraction))					
Sample	Method	Mean	s_r ^{a)}	LOQ ^{b)}	LOD ^{c)}
Home garden-use mixed fertilizer	Wet digestion method	0.00399	0.00014	0.001	0.0005
Slag silicate fertilizer	NH ₄ HSO ₄ fusion method	0.111	0.002	0.020	0.008

a) Repeatability standard deviation

b) Lower limit of quantitation ($LOQ = s_r \times 10$)

c) Lower limit of detection ($LOD = s_r \times 2 \times t(n-1, 0.05)$)

4. まとめ

ICP-OES を用いた肥料中の Ti の分析法の単一試験室における妥当性確認を実施したところ、次の結果を得た。

- (1) 検量線は 0.1 mg/L ~ 20 mg/L の濃度範囲で原点付近をとる直線性を示した。
- (2) 湿式分解法の方が乾式灰化法よりも高い分析値が得られたが、鉍さいけい酸質肥料を過塩素酸で加熱分解する際、激しい突沸が認められた。
- (3) 鉍さいけい酸質肥料の分析については、硫酸水素アンモニウム融解法の適用を検討した。試料採取量 1 g に硫酸水素アンモニウム 10 g を添加し、350 °C 以上の温度で 60 分間処理することにより十分に分解できた。
- (4) 硫酸水素アンモニウムの純度は 98.0 % 以上であれば、同等の結果が得られた。
- (5) 乾式灰化法と湿式分解法を検討したところ、湿式分解法の方が高い分析値が得られた。しかし、鉍さいけい酸質肥料においては、酸分解中に激しい突沸が認められたため、硫酸水素アンモニウム融解法を適用した。
- (6) 湿式分解法及び硫酸水素アンモニウム融解法は肥料分析法の分解方法と同等の分析値が得られた。
- (7) 真度を確認するため添加回収試験を実施した。湿式分解法は濃度 0.01 % (質量分率) ~ 0.5 % (質量分率) 相当量の Ti を添加した試料 8 点に対して分析した結果、平均回収率は 92.9 % ~ 99.5 % であった。硫酸水素アンモニウム融解法は濃度 0.1 % (質量分率) ~ 0.2 % (質量分率) 相当量の Ti を添加した試料 2 点に対して分析した結果、平均回収率は 95.1 % ~ 98.2 % であった。いずれの結果においても肥料等試験法に示されている目標以内であった。
- (8) 中間精度及び併行精度を確認した。湿式分解法は混合りん酸肥料及び化成肥料を用いて 2 点併行で日を変えて 7 回試験を実施した。Ti の平均値は 0.950 % (質量分率) 及び 0.130 % (質量分率)、併行相対標準偏差は 1.7 % 及び 1.4 %、中間相対標準偏差は 4.3 % 及び 3.2 % であった。硫酸水素アンモニウム融解法は鉍さいけい酸質肥料 2 点を用いて 2 点併行で日を変えて 7 回試験を実施した。硫酸水素アンモニウムの Ti の平均値は、0.525 % (質量分率) 及び 0.112 % (質量分率)、併行相対標準偏差は 1.0 % 及び 1.6 %、中間相対標準偏差は 1.0 % 及び 2.4 % であった。この濃度におけるいずれの相対標準偏差も肥料等試験法に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安内であった。
- (9) 湿式分解法及び硫酸水素アンモニウム融解法の定量下限は質量分率 0.001 % 及び質量分率 0.02 %、検出下限は質量分率 0.0005 % 及び質量分率 0.008 % と推定された。いずれの方法も含有許容量に対して十分な定量下限を有していた。

文 献

- 1) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992)
- 2) 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(2016)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2016.pdf>
- 3) 松本健:難溶解性物質の分解法, *ぶんせき*, **2**, 60~66(2002)
- 4) 松本健, 北川真由美:硫酸水素アンモニウム融解による難溶性酸化セリウム(IV)の迅速分解と分析への応用, *分析化学*, **47**, 491~495(1998)
- 5) 松本健, 小浦利弘:アンモニウム塩融解による難溶性硫酸バリウムの迅速分解・分析, *分析化学*, **50**, 807~811(2001)
- 6) 松本健, 油野まゆみ:硫酸水素アンモニウム融解による難溶性タングステン化合物の迅速分解と分析への応用, *分析化学*, **46**, 101~105(1997)
- 7) 松本健:アンモニウム塩融解法による難溶性金属酸化物の迅速分解, *ぶんせき*, **8**, 653~657(1994)
- 8) Codex:“Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009(2009)

Determination of Titanium in Fertilizer using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)

Keisuke AOYAMA¹

¹Food and Agricultural Materials Inspection Center, Department

A single-laboratory validation study was conducted for the determination of titanium (Ti) in fertilizer products by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). The fertilizer without the slag silicate fertilizer was heating and digested by HNO₃ and H₂SO₄, then was heating and digested by HClO₄. As a result of 3 replicate analysis of 8 fertilizer samples spiked with Ti at 0.01 % ~ 0.5 % (mass fraction), the mean recoveries were 92.9 % ~ 99.5 %. Repeatability of Ti were 1.4 % ~ 1.7 %, intermediate precision of there were 3.2 % ~ 4.3 %. Minimum limit of quantification of there were estimated 0.001 % (mass fraction). The slag silicate fertilizer was heated with melted NH₄HSO₄ over 350 °C. The slag silicate fertilizer was easy to bump when it was heating and digested by HClO₄. But heating and digested by NH₄HSO₄ prevented sample bumping. As a result of 3 replicate analysis of 2 fertilizer samples spiked with Ti at 0.1 % ~ 0.2 % (mass fraction), the mean recoveries were 95.1 % ~ 98.2 %. Repeatability of Ti was 1.0 % ~ 1.6 %, intermediate precision of there were 1.0 % ~ 2.4 %. Minimum limit of quantification of there were estimated 0.02 % (mass fraction). Those results indicated that the developed method was valid for the determination of Ti.

Key words titanium, wet digestion method, fusion method, ammonium hydrogen sulfate, ICP-OES

(Research Report of Fertilizer, **10**, 29-40, 2017)

4 ガスクロマトグラフ(質量分析計)(GC(-MS))法による堆肥等中の 塩素系農薬の測定

野崎友春¹

キーワード 有機塩素系農薬, ガスクロマトグラフ分析法

1. はじめに

住宅解体時に廃棄される建築廃材や畳わらを肥料として利用する際に、有機塩素系農薬の残留が判明したことから、平成14年に農林水産省生産局長通知で堆肥に使用できる古畳を原料とするわらは塩素系農薬が検出されないことが確認されたものと規定されている(平成14年4月10日付け14生畜第185号農林水産省生産局長通知)。また、平成21年に実施した建築廃材の堆肥化における有害成分の推移の調査では8ヶ月後においても残留していたことを確認している。有機塩素系農薬は過去に殺虫剤、殺鼠剤、殺菌剤又はシロアリ駆除剤等として使用されていた化学物質である。難分解性であり、発がん性があるものがあるため現在は製造、使用禁止のものも多く、また、有機塩素系農薬の一種であるドリソ系農薬がウリ科の植物に吸収され濃縮されることが確認されている。

有機塩素系農薬の分析法としては、飼料分析法¹⁾では「有機塩素系及び酸アミド系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法」、「農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法」、「有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法」がある。また、愛玩動物用飼料等の検査法²⁾として「有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法」が、食品の検査法³⁾として「GC/MSによる農薬等の一斉分析法」、「BHC等試験法」が、その他 QuEChERS 法⁴⁾や STQ 法があるが、肥料中の有機塩素系農薬の分析法が確立されていない。

今回、愛玩動物用飼料等の検査法を参考に、通知で示されている7種類の農薬(BHC, DDT, アルドリン, デルドリン, エンドリン, クロルデン及びヘプタクロル)及び関連物質について肥料中の有機塩素系農薬の測定法を検討したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 供試試料

豚糞堆肥及び松の木くずを粉碎したものをそれぞれ目開き1.0 mmのふるいに通し、通過したものをを用いた。

2) 試薬等の調整

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 水
- (2) アセトニトリル: 残留農薬分析用
- (3) 塩化ナトリウム: 残留農薬分析用

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

- (4) ヘキサン:残留農薬分析用
- (5) シクロヘキサン:高速液体クロマトグラフ用
- (6) アセトン:残留農薬分析用
- (7) ジエチルエーテル:残留農薬分析用
- (8) 2,2,4-トリメチルペンタン:高速液体クロマトグラフ用
- (9) 有機塩素系農薬混合標準液(10 µg/mL):アーレンストファー製混合標準液
- (10) 検量線用混合標準液(5 ng/mL~200 ng/mL):有機塩素系農薬混合標準液(10 µg/mL)を2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1)で順次希釈して、5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mLの濃度の検量線用混合標準液を調製した。

3) 装置及び器具

- (1) ガスクロマトグラフ(GC):島津製作所 GC-2010Plus
- (2) ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS):島津製作所 GCMS-QP2010Plus
- (3) 分析カラム:アジレントテクノロジー DB-1701
- (4) 縦型振とう機:タイテック SR-2DW
- (5) ロータリーエバポレーター:ビュッヒ R-200
- (6) ろ過器:桐山製作所 桐山ロート

4) 試験操作

(1) 抽出

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、アセトニトリル-水(3+1)20 mLを加え、10分間静置した。その後アセトニトリル 100 mLを加え、縦型振とう機で30分280往復/分で振とうし、農薬を抽出した。

なす形フラスコ 300 mLを吸引ろう斗の下に置き、抽出液全量をろ紙(No.5B)でろ過した後、残さをアセトニトリル 50 mLで洗浄し、ろ液とあわせた。

抽出液を40℃以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、塩化ナトリウム飽和水溶液 20 mLを加えてカラム処理 I に供する試料溶液とした。

(2) カラム処理 I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム(Agilent製 Chem elut, 20 mL容)に入れ、5分間静置した。300 mLのなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 20 mLずつで3回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、定量する各農薬を溶出させた。更に、ヘキサン 60 mLをカラムに加えて同様に流出させ、溶出液を40℃以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮したあと、窒素ガスを送って乾固した。シクロヘキサン-アセトン(4+1)10 mLを正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター(孔径 0.5 mm以下)でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

(3) ゲル浸透クロマトグラフィー

試料溶液 5.0 mLをゲル浸透クロマトグラフに注入し、Table 1の条件で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し、40℃以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮したあと、窒素ガスを送って乾固した。

ヘキサン 2 mLを加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

Table 1 Analytical conditions for GPC

Column	Showadenko Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm×300 mm, 15 μm)
Guard column	Showadenko Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm×100 mm, 15 μm)
Mobile phase	Cyclohexane - Acetone (4+1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction	70 mL~120 mL

(4) カラム処理 II

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (Waters Sep-pak Florisil Plus Long) をヘキサン 5 mL で洗浄した。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充填剤の上端に達するまで流下させた。ヘキサソージエチルエーテル (9+1) 15 mL をミニカラムに加えて各農薬を溶出させた。

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た。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とした (Scheme 1)。

(5) 測定

各検量線用混合標準液 1 μL を GC に注入し、Table 2 の GC 条件で測定し、得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した。試料溶液 1 μL を GC に注入し、ピーク面積又は高さから検量線により試料溶液中の各農薬の量を求め、分析試料中の濃度を算出した。

また、同様に各検量線用混合標準液 1 μL を GC-MS に注入し、Table 3 の GC-MS 条件で測定し、得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した。試料溶液 1 μL を GC-MS に注入し、ピーク面積又は高さから検量線により試料溶液中の各農薬の量を求め、分析試料中の濃度を算出した。

Table 2 Analytical conditions for GC

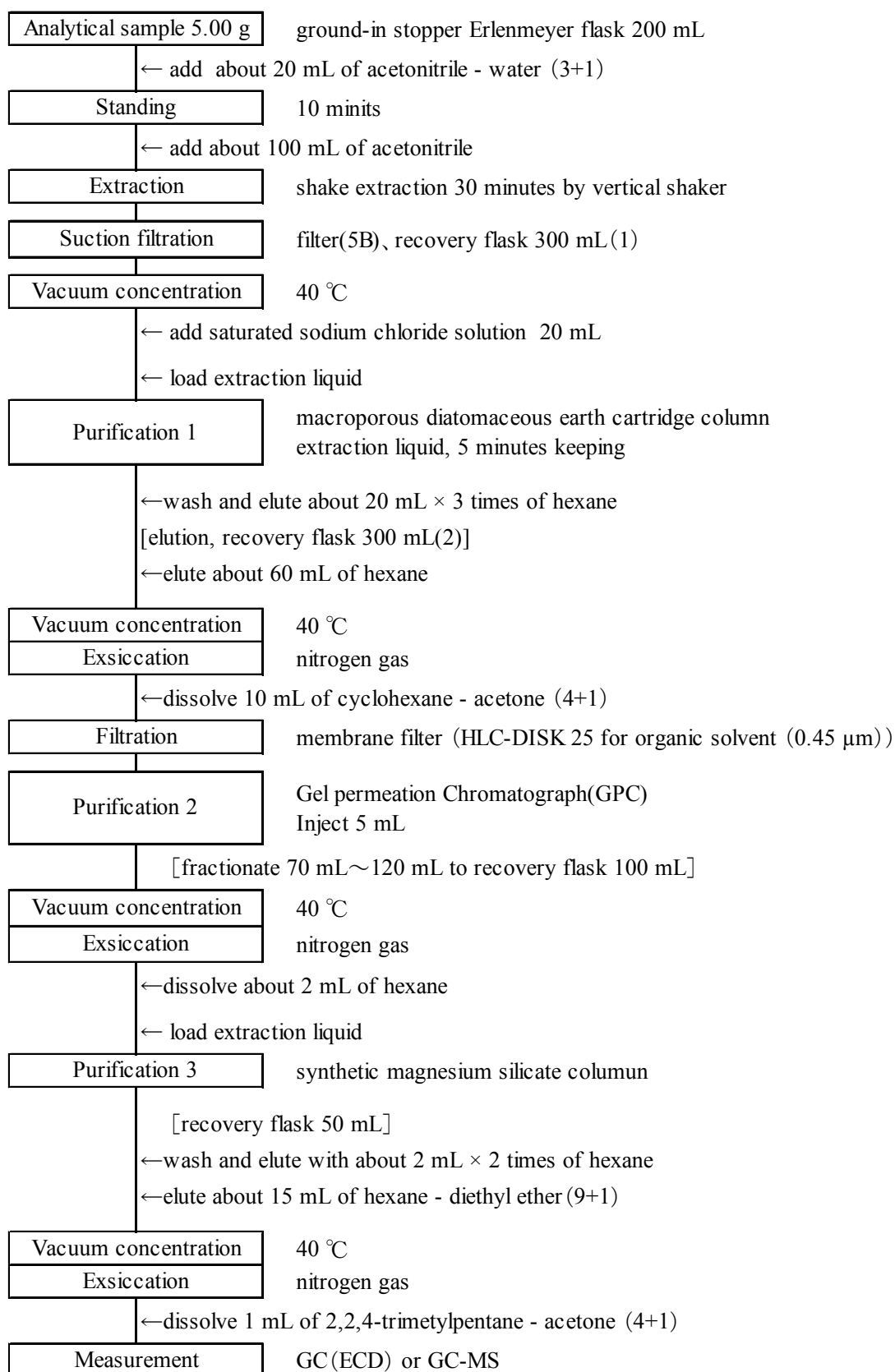
Detector	Electron Capture Detector (ECD)
Column	Agilent DB-1701 (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
Carrier gas	He (1.5 mL/min)
Makeup gas	N ₂ (60 mL/min)
Injector	Splitless (1 min)
Injector temp.	250 °C
Column Oven temp.	Initial 60 °C (1 min) → 20 °C/min → 180 °C → 2 °C/min → 260 °C → 5 °C/min → 275 °C (1 min)
Detector temp.	280 °C

Table 3 Analytical conditions for GC/MS

Ionization mode	EI
Electron energy	70 eV
Monitor ion	Show table 4
Column	Restek Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
Carrier gas	He (1.0 mL/min)
Injector	Splitless (1 min)
Injector temp.	250 °C
Column Oven temp.	Initial 70 °C (1 min) →25 °C /min→150 °C→3 °C /min →200 °C→8 °C/min→280 °C (10 min)
Interface temp.	230 °C
Detector temp.	250 °C

Table 4 Monitoring ion

Compound name	Quantitation Confirmation		Compound name	Quantitation Confirmation	
	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)		(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)
α -BHC	181	219	<i>trans</i> -Chlordane	373	375
β -BHC	219	217	<i>cis</i> -Chlordane	373	375
γ -BHC	219	217	<i>trans</i> -Nonachlor	406	408
δ -BHC	217	219	<i>cis</i> -Nonachlor	406	408
HCB	284	286	Dieldrin	263	277
Heptachlor	272	237	Endrin	263	265
Ardrin	263	293	<i>o,p'</i> -DDE	246	318
Oxychlordane	387	389	<i>p,p'</i> -DDE	246	318
Heptachlor epoxide (1)	353	355	<i>o,p'</i> -DDD	235	237
Heptachlor epoxide (2)	353	355	<i>p,p'</i> -DDD	235	237
			<i>o,p'</i> -DDT	235	165
			<i>p,p'</i> -DDT	235	237



Scheme 1 Flow sheet for organochlorine pesticide

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

分析用試料として豚糞堆肥及び松の木くずを本法に従って分析をおこなったところ、一部の農薬について夾雑ピークが認められたが、他の農薬には夾雑ピークがなかったことから、検討を進めることとした。

有機塩素系農薬混合標準液(100 ng/mL 相当量)のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

5 ng/mL~200 ng/mL の検量線用混合標準液を作成し、本法に従って検量線を作成した。その結果、5 ng/mL~200 ng/mL の範囲で直線性のある検量線が得られた(Fig. 2)。

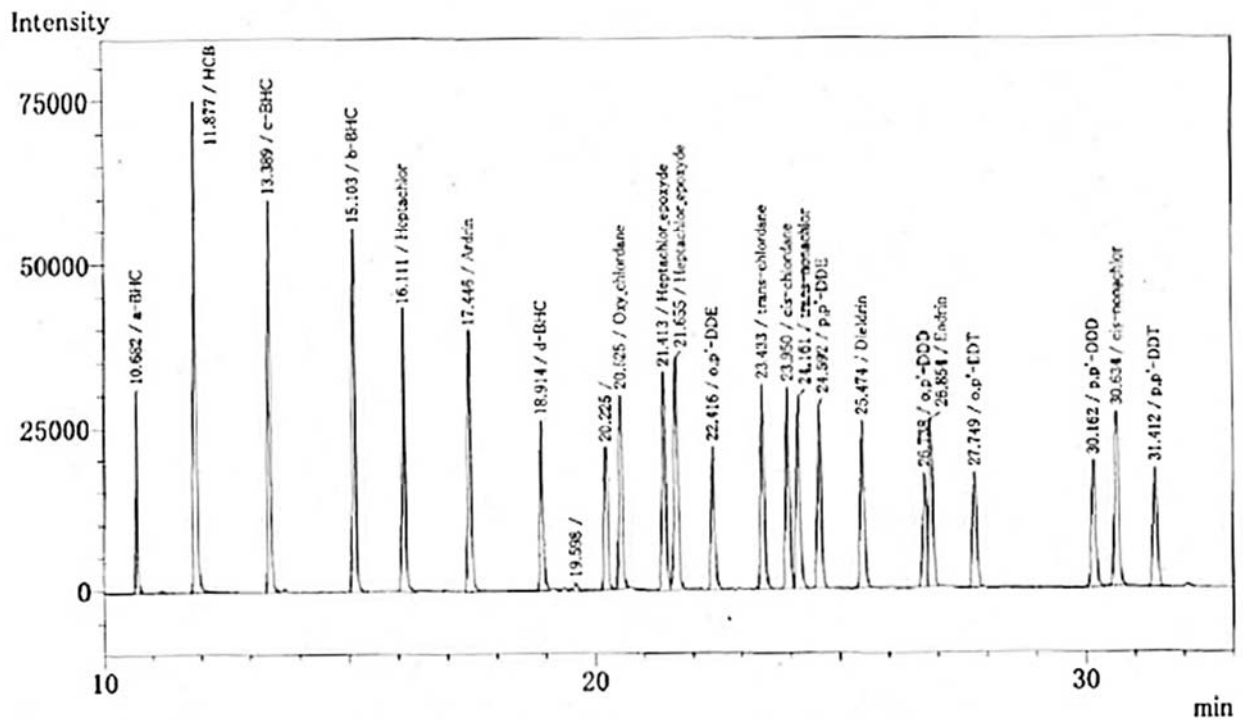


Fig. 1 GC chromatogram of organic chloride pesticide standards

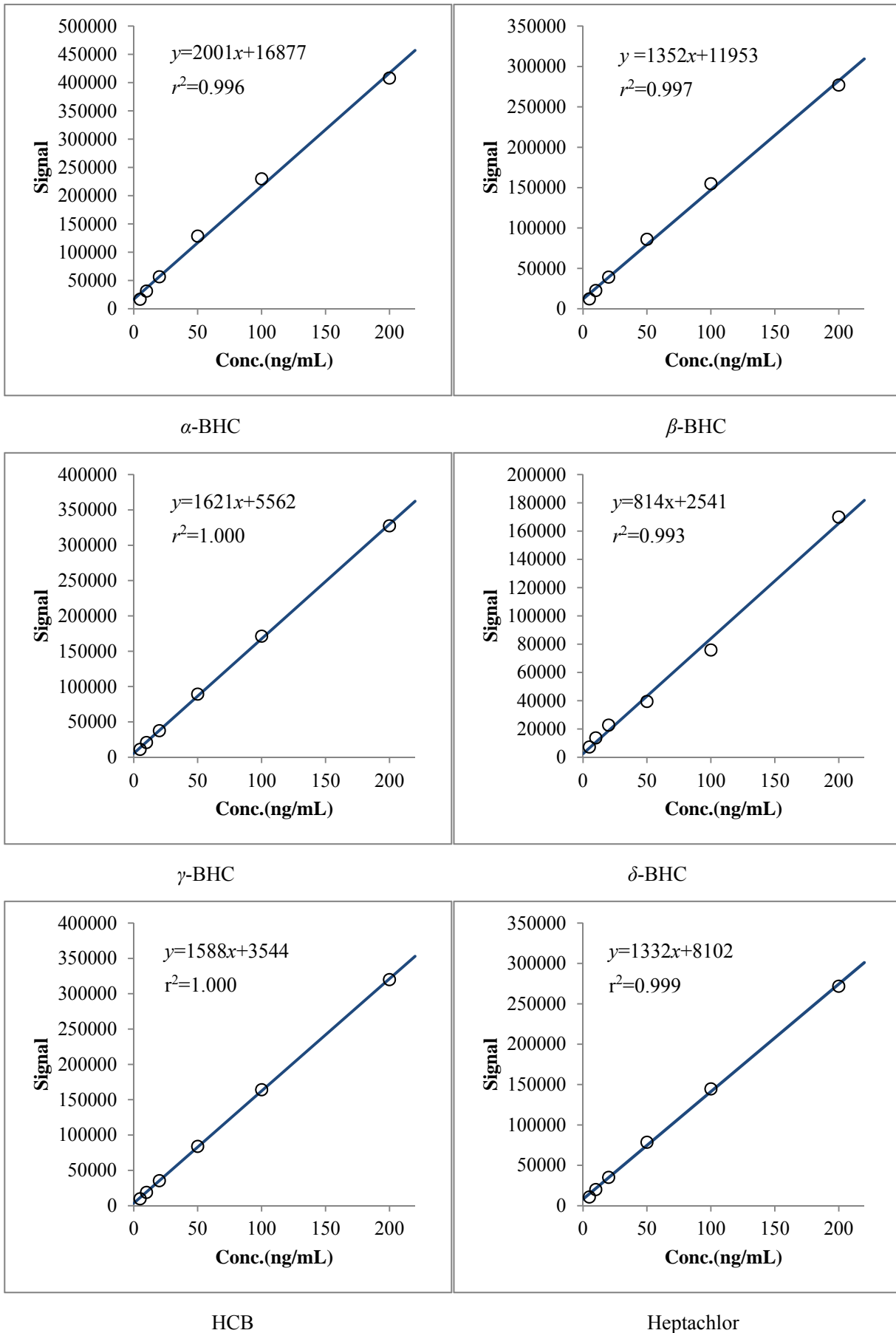
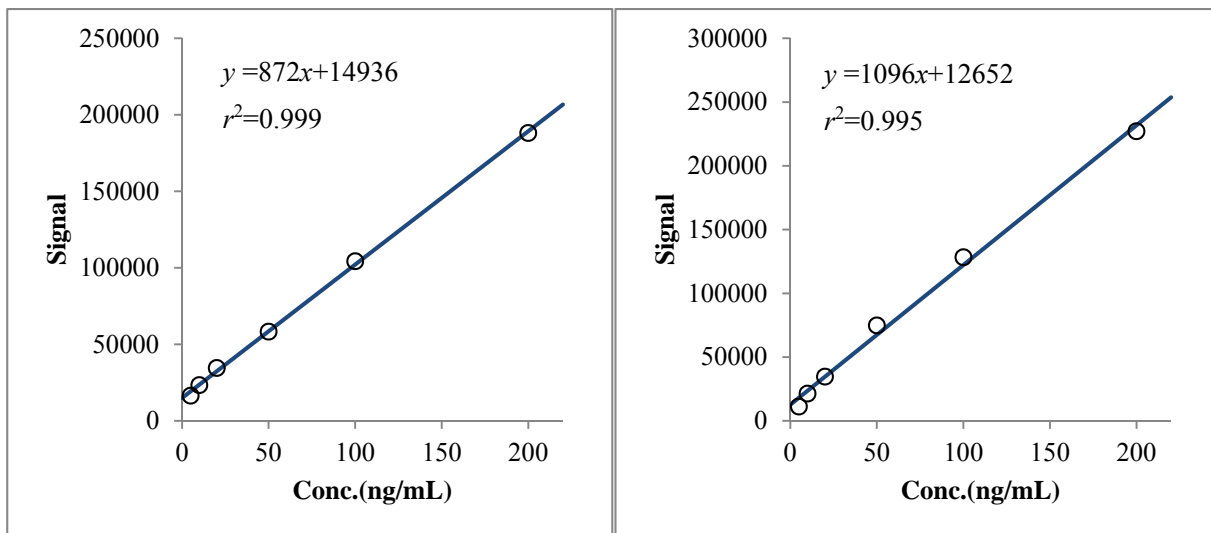
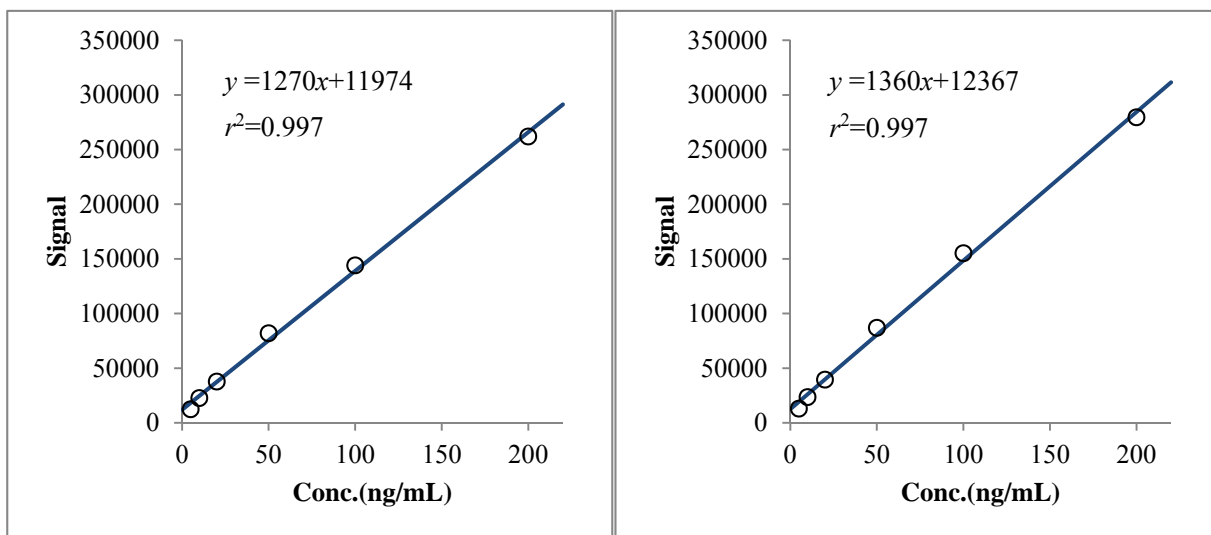


Fig. 2 Calibration curves of organic chloride pesticides (1)



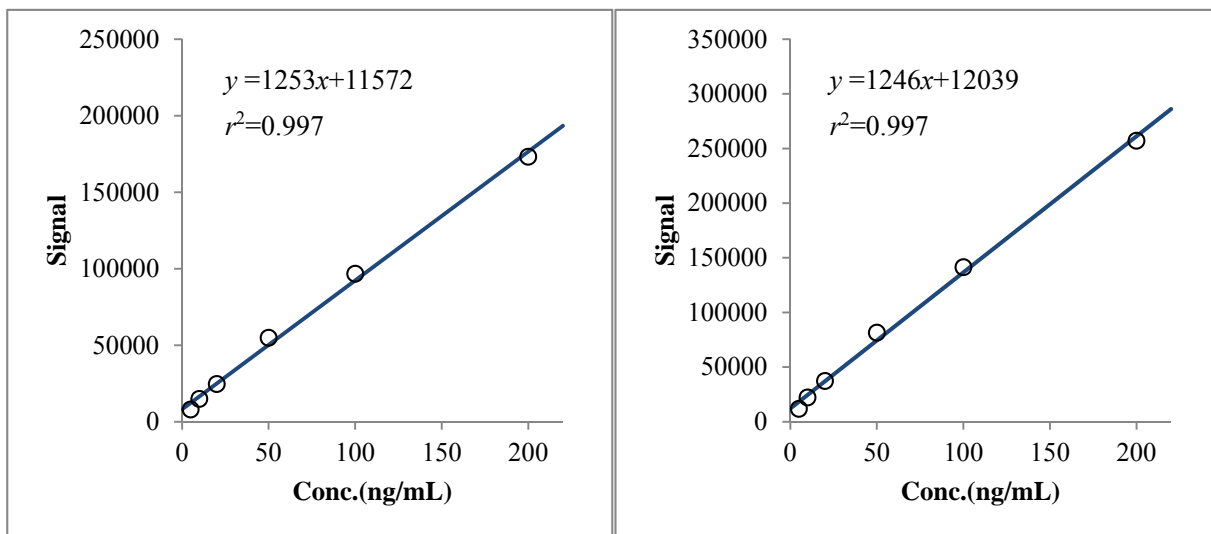
Ardrin

Oxychlorthane



Heptachlor epoxide (1)

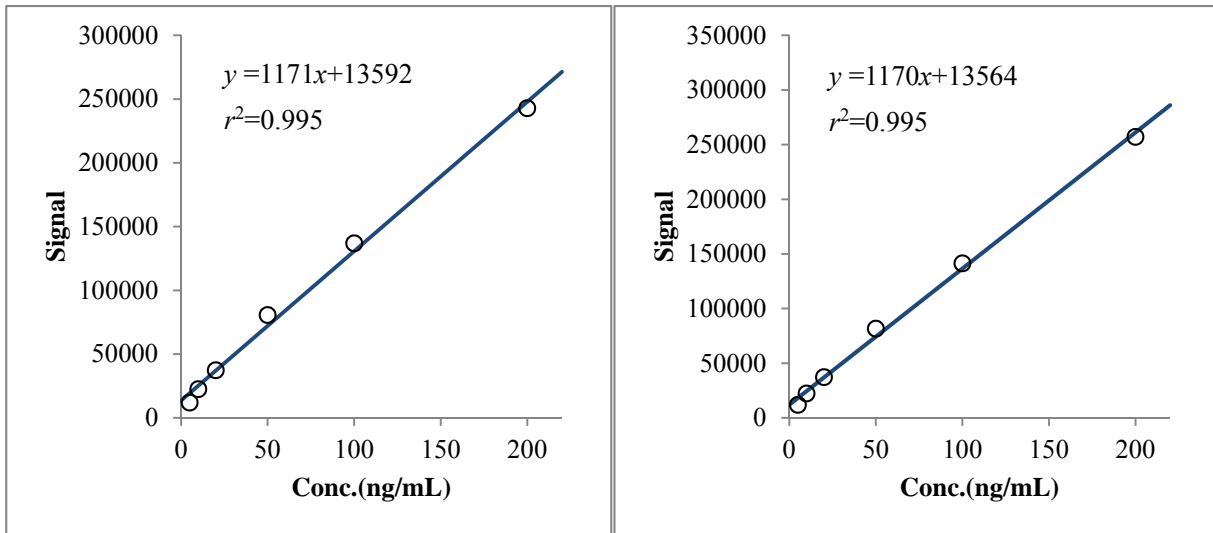
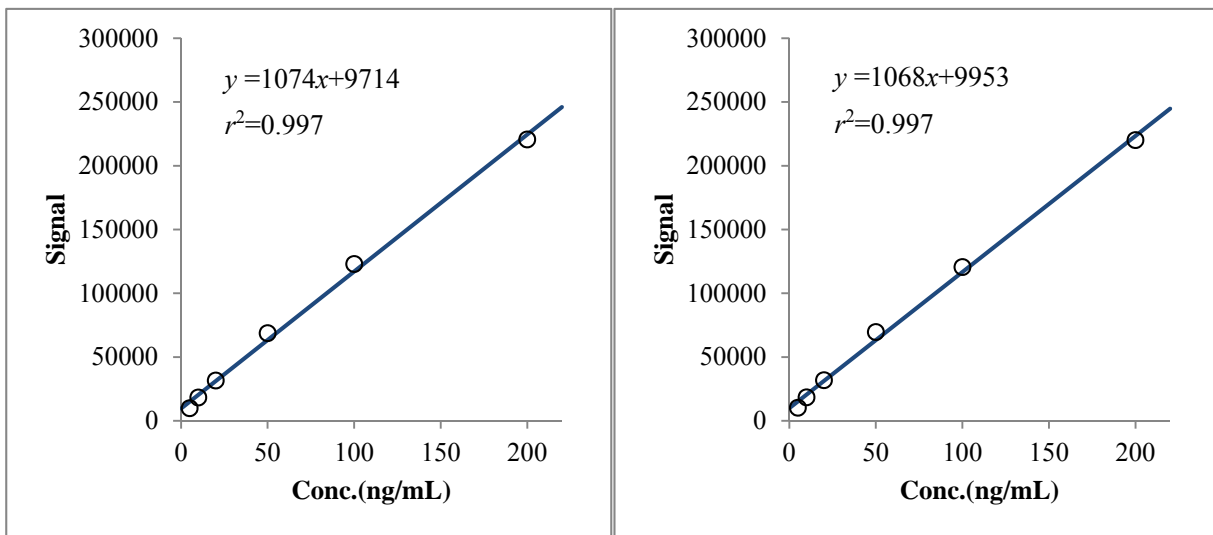
Heptachlor epoxide (2)



trans-Chlordane

cis-Chlordane

Fig. 2 Calibration curves of organic chloride pesticides (2)

*trans*-Nonachlor*cis*-Nonachlor

Dieldrin

Endrin

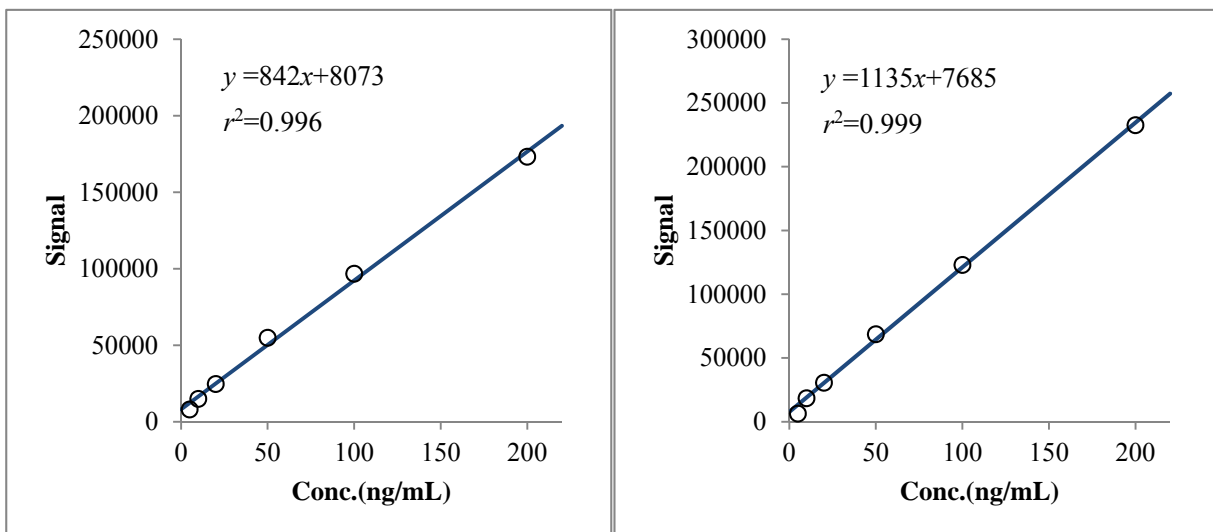
*o,p'*-DDE*p,p'*-DDE

Fig. 2 Calibration curves of organic chloride pesticides (3)

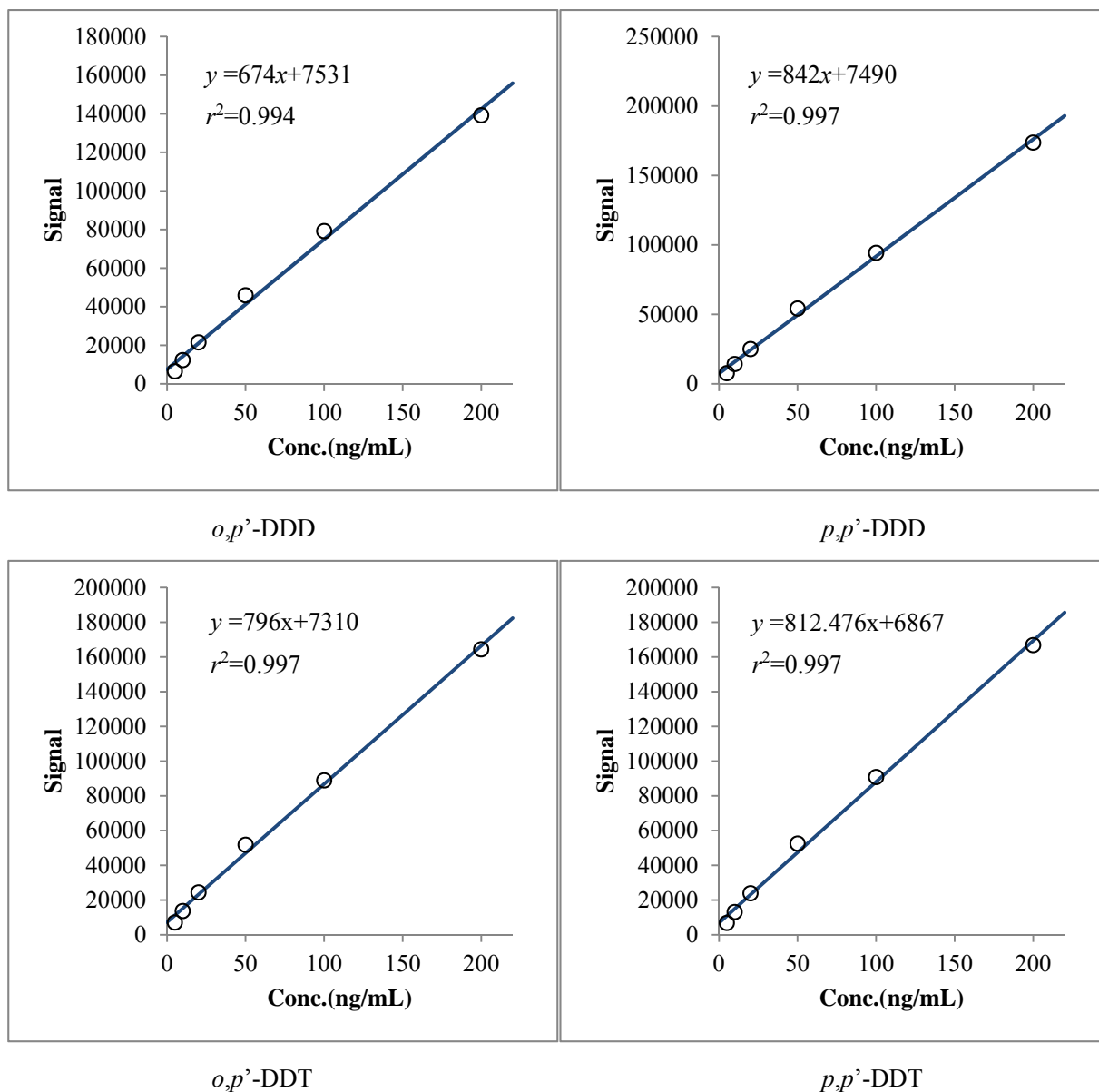


Fig. 2 Calibration curves of organic chloride pesticides (4)

2) 添加回収試験

豚糞堆肥及び松の木にそれぞれ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量, また別堆肥に 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量, 松の木に 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加し, 3 点併行で添加回収試験を実施した. 結果を Table 5 に示した. 回収率は 0%~1660.4%であった. GC-ECD で, 妨害ピークのため測定値が不良となったのは, 堆肥中の 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量 δ -BHC 及びオキシンク ロルデン並びに松の木中のアルドリン及び *o,p'*-DDE であった. また, 松の木中の 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加は全体的に低回収率であった. それらを除いた堆肥中の有機塩素系農薬の回収率は 62.5%~118%, *RSD* は 7.7% 以下, 松の木の 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量の有機塩素系農薬の回収率は 35.6%~109%, *RSD* は 16.1% 以下であった. なお, GC-MS で測定した結果は, 全体的に回収率にばらつきがあった.

このことから, 以下の検討は GC-ECD を用いることとした. GC-MS は, 有機塩素系農薬の定量性に劣る結果であったが, 選択性が優れているので有機塩素系農薬の存在の確認に用いることとした.

Table 5 Recovery and precision data (1)

Pesticide	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	GC-ECD		GC-MS		Target range of recovery ^{d)} (%)	
		Mean ^{a(b)}	RSD ^{c)}	Mean ^{a(b)}	RSD ^{c)}		
		(%)	(%)	(%)	(%)		
α -BHC	Compost	20	63.4	6.6	225.7	47.9	70~120
		50	67.2	2.2	18.0	2.4	70~120
	Pine chips	20	88.3	12.3	125.5	24.9	70~120
		80	40.8	8.7	8.9	1.9	70~120
β -BHC	Compost	20	83.8	1.1	98.9	8.0	70~120
		50	79.3	5.0	93.5	4.0	70~120
	Pine chips	20	99.7	10.9	26.5	7.6	70~120
		80	41.9	9.0	38.6	11.9	70~120
γ -BHC	Compost	20	82.1	4.1	138.3	13.6	70~120
		50	74.3	4.2	110.3	6.0	70~120
	Pine chips	20	67.8	4.8	72.1	3.3	70~120
		80	28.2	6.2	25.4	6.6	70~120
δ -BHC	Compost	20	244.4	1.7	133.1	34.5	70~120
		50	115.9	5.4	101.9	3.3	70~120
	Pine chips	20	35.6	4.1	38.4	12.5	70~120
		80	29.8	10.3	40.7	12.1	70~120
HCB	Compost	20	83.9	2.3	75.4	10.3	70~120
		50	66.9	3.6	67.1	7.7	70~120
	Pine chips	20	60.7	8.7	28.6	4.4	70~120
		80	28.1	6.2	25.8	6.7	70~120
Heptachlor	Compost	20	110.8	2.2	134.0	17.2	70~120
		50	62.5	1.0	116.1	6.0	70~120
	Pine chips	20	96.7	11.7	64.4	11.8	70~120
		80	39.4	8.7	40.8	10.9	70~120
Ardrin	Compost	20	86.2	2.4	98.4	5.0	70~120
		50	120.2	8.9	76.5	5.4	70~120
	Pine chips	20	0.0	0.0	50.6	2.8	70~120
		80	56.5	6.3	52.3	16.3	70~120
Oxychlorane	Compost	20	185.6	9.0	155.0	12.1	70~120
		50	115.4	6.8	114.3	9.3	70~120
	Pine chips	20	96.6	11.8	37.4	20.1	70~120
		80	41.3	9.0	31.5	10.1	70~120
Heptachlor epoxide (1)	Compost	20	117.3	3.2	156.9	13.7	70~120
		50	83.5	4.7	126.0	9.7	70~120
	Pine chips	20	97.2	12.0	63.2	0.5	70~120
		80	39.7	8.0	48.3	17.8	70~120

a) $n=3$

b) Results which were out of recovery target range were written cell of half-tone dot meshing.

c) Relative standard deviation

d) Criteria of the trueness (recovery) required by Testing Methods for Fertilizer (2016)

Table 5 Continue

Pesticide	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	GC-ECD		GC-MS		Target range of recovery ^{d)} (%)	
		Mean ^{a)b)}	RSD ^{c)}	Mean ^{a)b)}	RSD ^{c)}		
		(%)	(%)	(%)	(%)		
Heptachlor epoxide (2)	Compost	20	118.3	1.8	119.6	13.2	70~120
		50	84.5	5.0	122.1	13.5	70~120
	Pine chips	20	97.9	11.6	33.1	29.3	70~120
		80	38.0	7.8	37.2	11.9	70~120
<i>trans</i> -Chlordane	Compost	20	113.1	0.9	149.1	10.3	70~120
		50	81.5	4.4	134.5	11.5	70~120
	Pine chips	20	95.9	11.1	69.2	3.4	70~120
		80	38.5	8.4	47.6	15.7	70~120
<i>cis</i> -Chlordane	Compost	20	113.6	1.4	142.7	11.8	70~120
		50	82.6	5.1	132.0	12.7	70~120
	Pine chips	20	90.7	8.6	67.0	3.7	70~120
		80	34.7	6.1	50.4	16.8	70~120
<i>trans</i> -Nonachlor	Compost	20	108.6	1.1	198.8	20.4	70~120
		50	74.3	5.4	76.7	10.3	70~120
	Pine chips	20	76.6	7.3	89.2	19.8	70~120
		80	37.0	7.2	71.4	18.2	70~120
<i>cis</i> -Nonachlor	Compost	20	116.5	4.4	178.6	12.0	70~120
		50	78.2	4.7	80.4	7.7	70~120
	Pine chips	20	88.9	7.8	105.4	10.1	70~120
		80	37.8	7.8	86.3	27.3	70~120
Dieldrin	Compost	20	110.4	1.3	148.9	6.5	70~120
		50	80.4	4.4	133.6	12.0	70~120
	Pine chips	20	99.9	10.1	55.9	3.6	70~120
		80	38.0	8.5	46.7	14.6	70~120
Endrin	Compost	20	118.1	1.4	154.7	14.1	70~120
		50	86.2	5.2	136.0	14.7	70~120
	Pine chips	20	84.8	4.5	50.2	7.8	70~120
		80	36.4	6.7	50.0	8.8	70~120
<i>o,p'</i> -DDE	Compost	20	113.2	2.3	182.4	6.2	70~120
		50	89.4	6.8	135.8	12.5	70~120
	Pine chips	20	1660.4	85.3	90.0	5.0	70~120
		80	-	-	69.2	18.2	70~120
<i>p,p'</i> -DDE	Compost	20	110.4	4.0	153.7	3.9	70~120
		50	78.9	5.4	130.8	10.2	70~120
	Pine chips	20	109.1	16.1	78.8	2.3	70~120
		80	41.7	8.2	63.4	17.3	70~120
<i>o,p'</i> -DDD	Compost	20	118.1	1.2	174.0	11.2	70~120
		50	87.4	3.8	144.1	13.8	70~120
	Pine chips	20	90.9	5.9	94.0	4.4	70~120
		80	42.3	7.3	72.6	20.3	70~120

Table 5 Continue

Pesticide	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	GC-ECD		GC-MS		Target range of recovery ^{d)} (%)	
		Mean ^{a)b)} (%)	RSD ^{c)} (%)	Mean ^{a)b)} (%)	RSD ^{c)} (%)		
<i>p,p'</i> -DDD	Compost	20	106.1	3.4	183.4	11.3	70~120
		50	75.3	4.5	141.9	11.8	70~120
	Pine chips	20	94.6	12.3	88.6	0.5	70~120
		80	38.8	7.5	62.5	17.5	70~120
<i>o,p'</i> -DDT	Compost	20	115.8	2.0	248.4	18.9	70~120
		50	81.6	5.4	173.8	16.6	70~120
	Pine chips	20	64.1	4.3	129.9	10.9	70~120
		80	35.3	7.9	100.3	29.9	70~120
<i>p,p'</i> -DDT	Compost	20	104.1	2.1	176.2	8.5	70~120
		50	77.3	5.9	135.6	12.5	70~120
	Pine chips	20	93.3	7.1	106.5	3.3	70~120
		80	43.8	10.3	73.5	26.7	70~120

3) 併行精度及び中間精度の評価

併行精度及び中間精度を確認するため、豚糞堆肥と松の木くずに有機塩素系農薬がそれぞれ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量となるよう標準液を添加した試料を用い、それぞれ 2 点併行で日を変えて GC-ECD を用いて 5 回試験を実施して得られた結果を Table 6-1 及び Table 6-2 に示した。また、これらの結果から一元配置の分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 7-1 及び Table 7-2 に示した。

豚糞堆肥の各農薬の平均値は 4.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であったが、そのうち、 α -BHC、 δ -BHC 及びオキソクロルデン以外の平均値は、12.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~18.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。また、それらの農薬の併行相対標準偏差は 14.4 % 以下、中間相対標準偏差は 26.4 % 以下であった。また、松の木くずはアルドリン以外の有機塩素系農薬の回収率が 12 %~42 % であり、また、アルドリンの回収率が 157 % であった。また、併行相対標準偏差は 30 % 以下、中間相対標準偏差は 26.4 % 以下であった。

Table 6-1 Repeatability test results on different days (swine manure) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Pesticide	Test day (factor)				
	1	2	3	4	5
α -BHC	3.3	4.4	4.5	5.8	4.3
	3.6	3.2	3.6	4.7	3.9
β -BHC	13.3	17.8	16.2	16.8	16.7
	14.2	15.5	13.5	17.7	14.9
γ -BHC	12.7	17.1	15.2	15.8	15.8
	13.5	14.3	13.1	15.7	14.1
δ -BHC	34.9	75.3	46.6	57.4	39.6
	33.8	42.4	59.4	59.4	51.6
HCB	13.0	17.7	16.0	17.4	15.5
	13.7	15.0	13.3	18.2	13.5
Heptachlor	13.9	18.2	17.6	18.9	17.8
	15.1	16.6	15.0	19.4	16.4
Ardrin	10.7	15.6	14.2	15.0	10.0
	11.7	13.0	13.4	15.7	9.0
Oxychlordane	29.8	31.4	36.3	34.3	33.3
	32.6	30.0	28.9	37.1	30.3
Heptachlor epoxide (1)	15.3	18.7	20.2	18.8	19.1
	17.0	16.4	15.3	19.9	16.9
Heptachlor epoxide (2)	15.5	18.8	19.9	19.7	19.1
	17.1	16.8	15.3	20.0	17.1
<i>trans</i> -Chlordane	14.7	18.8	19.8	18.9	18.1
	16.5	16.7	15.3	19.9	17.3
<i>cis</i> -Chlordane	14.8	19.3	19.0	18.7	18.9
	16.3	17.7	15.9	19.9	17.8
<i>trans</i> -Nonachlor	13.1	17.7	16.4	16.7	16.2
	15.9	16.2	13.7	17.0	15.8
<i>cis</i> -Nonachlor	14.1	17.5	17.7	18.4	16.8
	16.3	16.0	14.3	19.8	15.9
Dieldrin	13.8	17.8	17.9	18.0	17.5
	15.5	15.6	14.7	19.1	16.5
Endrin	16.4	18.3	19.1	19.2	18.2
	17.2	16.2	15.7	20.5	17.1
<i>o,p'</i> -DDE	16.0	19.5	25.0	20.3	17.9
	17.9	16.3	17.5	19.9	16.3
<i>p,p'</i> -DDE	13.6	17.9	18.5	17.4	18.3
	15.8	16.0	14.6	18.7	16.8
<i>o,p'</i> -DDD	15.6	17.5	18.0	17.9	16.9
	17.2	15.5	15.6	19.3	15.9
<i>p,p'</i> -DDD	13.4	16.8	18.2	17.8	17.1
	16.2	15.3	14.1	18.7	15.4
<i>o,p'</i> -DDT	15.3	19.2	18.4	19.6	18.8
	17.0	16.9	15.6	20.7	17.4
<i>p,p'</i> -DDT	13.8	17.0	18.2	18.0	17.6
	15.4	15.3	15.2	19.6	16.3

Table 6-2 Repeatability test results on different days (pine chips) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Pesticide	Test day (factor)				
	1	2	3	4	5
α -BHC	6.3	8.8	7.0	9.5	8.1
	6.8	11.2	4.2	8.0	5.3
β -BHC	5.6	10.9	7.6	10.3	7.5
	7.3	13.3	5.8	8.7	5.5
γ -BHC	4.1	8.1	5.8	7.7	5.8
	5.1	10.2	3.5	6.1	4.1
δ -BHC	2.7	13.4	7.4	10.8	8.9
	8.8	13.8	6.0	8.0	4.6
HCB	4.8	8.2	6.0	8.4	6.3
	5.7	10.5	3.7	6.5	4.4
Heptachlor	4.7	10.0	7.3	10.1	7.4
	7.3	12.0	5.0	8.1	5.0
Ardrin	21.1	40.2	38.0	35.8	29.8
	29.9	51.6	18.3	34.1	15.6
Oxychlordane	4.1	8.7	7.0	8.7	7.2
	4.0	9.9	7.1	7.1	4.9
Heptachlor epoxide (1)	5.0	7.9	6.4	9.2	6.6
	5.9	10.8	6.2	6.6	4.1
Heptachlor epoxide (2)	4.4	7.8	6.1	8.8	6.8
	5.6	10.5	6.1	6.8	4.2
<i>trans</i> -Chlordane	3.9	8.2	6.5	8.4	5.4
	5.4	10.3	6.9	6.8	4.5
<i>cis</i> -Chlordane	3.4	8.0	5.5	7.4	4.8
	4.2	9.2	6.0	6.0	3.4
<i>trans</i> -Nonachlor	3.0	7.8	4.7	7.0	4.1
	3.9	9.0	6.4	5.6	3.7
<i>cis</i> -Nonachlor	3.4	7.7	6.2	7.4	4.5
	5.8	9.7	7.5	5.4	2.8
Dieldrin	4.9	9.5	7.1	9.8	6.1
	7.5	12.0	6.2	7.5	4.8
Endrin	3.3	7.8	5.2	7.0	5.7
	5.8	8.9	5.3	5.5	3.4
<i>o p'</i> -DDE	Not quantitative for obstruction peak				
<i>p p'</i> -DDE	5.0	8.8	7.2	9.1	6.9
	6.4	9.8	7.8	7.5	6.1
<i>o p'</i> -DDD	5.0	8.3	6.9	9.3	6.7
	8.1	10.6	8.1	7.1	4.8
<i>p p'</i> -DDD	5.2	8.0	7.5	9.0	7.2
	7.9	11.1	8.1	7.1	5.3
<i>o p'</i> -DDT	3.4	6.8	6.4	8.3	5.7
	4.8	9.0	6.1	6.0	2.9
<i>p p'</i> -DDT	5.3	5.1	8.7	9.4	6.6
	8.3	11.8	9.3	7.6	6.4

Table 7-1 Repeatability and intermediate precision (swine manure) (μg/kg)

Pesticide	mean ^{a)} (μg/kg)	Repeatability			Intermediate precision		
		s_r ^{b)} (μg/kg)	RSD_r ^{c)} (%)	$CRSD_r$ ^{d)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)} (μg/kg)	$RSD_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)
α -BHC	4.1	0.6	14.9	11	1.0	23.9	18
β -BHC	15.7	1.3	8.3	11	2.0	12.8	18
γ -BHC	14.7	1.3	8.6	11	1.6	10.9	18
δ -BHC	50	11.8	23.6	11	14.5	29.1	18
HCB	15.3	1.4	9.3	11	2.5	16	18
Heptachlor	16.9	1.1	6.7	11	2.4	14.3	18
Ardrin	12.8	1.0	7.8	11	3.4	26.4	18
Oxychlorthane	32.4	2.8	8.7	11	2.8	8.6	18
Heptachlor epoxide (1)	17.8	2.0	11.1	11	1.6	9	18
Heptachlor epoxide (2)	17.9	1.8	10.1	11	1.8	10	18
<i>trans</i> -Chlordane	17.6	1.7	9.9	11	1.9	10.8	18
<i>cis</i> -Chlordane	17.8	1.3	7.2	11	2.0	11.3	18
<i>trans</i> -Nonachlor	15.9	1.3	8.3	11	1.5	9.6	18
<i>cis</i> -Nonachlor	16.7	1.5	8.8	11	2.1	12.4	18
Dieldrin	16.6	1.4	8.5	11	2.0	11.9	18
Endrin	17.8	1.4	7.9	11	1.7	9.5	18
<i>o,p'</i> -DDE	18.7	2.7	14.4	11	2.7	14.6	18
<i>p,p'</i> -DDE	16.8	1.6	9.8	11	1.8	10.9	18
<i>o,p'</i> -DDD	16.9	1.2	7.3	11	1.3	7.8	18
<i>p,p'</i> -DDD	16.3	1.7	10.7	11	1.8	10.9	18
<i>o,p'</i> -DDT	17.9	1.4	7.8	11	2.2	12	18
<i>p,p'</i> -DDT	16.6	1.4	8.1	11	2.2	13	18

a) $n=14$ (duplication $\times 7$ days)

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of repeatability relative standard deviation required by Testing Methods for Fertilizer (2016)

e) Intermediate standard deviation

f) Intermediate relative standard deviation

g) Criteria of intermediate relative standard deviation required by Testing Methods for Fertilizer (2016)

Table 7-2 Repeatability and intermediate precision (pine chips)

(μg/kg)

Pesticide	mean ^{a)} (μg/kg)	Repeatability			Intermediate precision			
		s_r ^{b)} (μg/kg)	RSD_r ^{c)} (%)	$CRSD_r$ ^{d)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)} (μg/kg)	$RSD_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	
α -BHC	7.5	1.5	20.5	11	2.6	34	18	
β -BHC	8.2	1.4	16.5	11	3.5	42.8	18	
γ -BHC	6.1	1.3	20.7	11	2.8	46	18	
δ -BHC	8.4	2.6	30.2	11	4.5	53.3	18	
HCB	6.4	1.4	21.4	11	2.7	42.1	18	
Heptachlor	7.7	1.6	20.7	11	3.2	41.6	18	
Ardrin	31.4	9.0	28.5	11	13.1	41.7	18	
Oxychlorane	6.9	1.0	14.2	11	2.8	40.6	18	
Heptachlor epoxide (1)	6.9	1.5	21.4	11	2.5	35.7	18	
Heptachlor epoxide (2)	6.7	1.4	21	11	2.5	36.6	18	
<i>trans</i> -Chlordane	6.6	1.0	15.3	11	2.7	40.8	18	
<i>cis</i> -Chlordane	5.8	0.8	13.8	11	2.8	48.4	18	
<i>trans</i> -Nonachlor	5.5	0.8	15.1	11	2.8	51.3	18	
<i>cis</i> -Nonachlor	6	1.4	22.4	11	2.8	46.6	18	
Dieldrin	7.5	1.4	19	11	3.1	40.5	18	
Endrin	5.8	1.2	21	11	2.3	38.8	18	
<i>o,p'</i> -DDE			Not quantitative for obstruction peak					
<i>p,p'</i> -DDE	7.5	0.8	10.9	11	2.8	51.3	18	
<i>o,p'</i> -DDD	7.5	1.6	21	11	2.0	27.1	18	
<i>p,p'</i> -DDD	7.6	1.6	20.4	11	1.9	24.4	18	
<i>o,p'</i> -DDT	6	1.4	23.6	11	2.4	40.1	18	
<i>p,p'</i> -DDT	7.9	2.4	30.4	11	1.6	20	18	

a) ~ g) Refer of the footnote of Table 7-1

4) 定量下限の確認

豚糞堆肥 1 種類を用いた有機塩素系農薬の GC-ECD による定量下限確認結果を Table 8 に示した。豚糞堆肥に有機塩素系農薬としてそれぞれ 20 μg/kg 相当量を添加して GC-ECD を用いて 7 点併行試験を実施したところ、本法の定量下限は 10 μg/kg ~ 20 μg/kg 程度と推定された。また、本法の検出下限は 3 μg/kg ~ 7 μg/kg と推定された。

Table 8 Calculated *LOQ* and *LOD* values

Pesticide	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	mean ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>Sr</i> ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>LOQ</i> ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>LOD</i> ^{d)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
α -BHC	20	11.7	1.0	10	4
β -BHC	20	13.7	0.8	8	3
γ -BHC	20	11.9	0.8	8	3
δ -BHC	20	38.0	1.4	14	6
HCB	20	15.2	0.9	9	3
Heptachlor	20	18.7	0.9	10	4
Ardrin	20	12.3	1.4	14	5
Oxychlordane	20	31.5	1.7	17	7
Heptachlor epoxide (1)	20	19.9	1.2	12	5
Heptachlor epoxide (2)	20	19.8	1.1	11	4
<i>trans</i> -Chlordane	20	19.0	0.8	8	3
<i>cis</i> -Chlordane	20	18.7	1.0	10	4
<i>trans</i> -Nonachlor	20	19.3	0.9	9	3
<i>cis</i> -Nonachlor	20	20.1	1.1	11	4
Dieldrin	20	19.8	1.1	11	4
Endrin	20	20.5	0.8	8	3
<i>o,p'</i> -DDE	20	20.2	1.1	11	4
<i>p,p'</i> -DDE	20	18.9	1.0	10	4
<i>o,p'</i> -DDD	20	20.2	0.8	8	3
<i>p,p'</i> -DDD	20	18.4	1.5	15	6
<i>o,p'</i> -DDT	20	20.5	0.8	8	3
<i>p,p'</i> -DDT	20	18.2	0.9	10	4

a) $n=7$

b) Standard deviation

c) Standard deviation $\times 10$ d) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$

5) 流通肥料の分析

堆肥 2 種類, 建築廃材 1 種類及び松の木くず 1 種類を GC-ECD を用いて測定し, GC-MS を用いて確認した. GC-ECD で夾雑ピークにより定量に影響を受けた成分を表 9 に示した. GC-MS で検出されなかった成分のうち, GC-ECD では δ -BHC, オキシクロルデン, アルドリン及び *o,p'*-DDE の保持時間付近にピークが検出された.

δ -BHC 及びオキシクロルデンは堆肥の測定成分対象からは外れているが, その他の農薬も GC-ECD で検出された場合は GC-MS で確認するべきと考える.

Table 9 Pesticide affected by quantification due to contaminating peak

Sample	Pesticide ^{a)}
Compost 1	δ -BHC, Oxychlorane
Compost 2	δ -BHC
Construction waste	Ardrin, δ -BHC
Pine chips	Ardrin, o,p'-DDE

a) Peak was detected near by standard retention time by GC-ECD, but no detected by GC-MS.

4. まとめ

GC-ECD を用いて堆肥及び松の木くず中の有機塩素系農薬の試験法の検討をおこなったところ、次のとおりの成績を得た。

(1) 検量線は 10 ng/mL～200 ng/mL の範囲で直線性を示し、決定係数は $r^2=0.99$ 以上であった。

(2) 堆肥及び木くずに有機塩素系農薬として 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、堆肥に 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量並びに木くずに 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加し 3 点併行分析を実施した。平均回収率は一部の農薬を除き、豚糞堆肥中で 62.5 %～118 %, *RSD* は 7.7 %以下、松の木の 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量では率は 35.6 %～109 %, *RSD* は 16.1 %以下であった。豚糞堆肥では、今回検討を行った有機塩素系農薬 22 種類のうち、 α -BHC、 δ -BHC 及びオキシクロルデンを除き、肥料等試験法に示されている真度(回収率)の目標をおおむね満たしていた。なお、満たしていなかった成分は、ヘプタクロル(62.5 %)及び HCB(66.9 %)であった。松の木くずでは、肥料等試験法に示されている真度(回収率)の目標を満たすことができなかった。

(3) 豚糞堆肥及び木くずに有機塩素系農薬として 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量となるようにそれぞれ添加し 2 点併行で日を変えて 5 日間試験を実施し、中間精度及び併行精度の確認を行った。豚糞堆肥では、 α -BHC、 δ -BHC 及びオキシクロルデン以外の併行相対標準偏差は 14.4 %以下、中間相対標準偏差は 26.4 %以下であり、肥料等試験法に示されている精度の目安を満たしていた。松の木くずでは、回収率が低く、また、併行相対標準偏差、中間相対標準偏差が肥料等試験法に示されている精度の目安を満たしていなかった。

(4) 本法の定量下限は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された。また、本法の検出下限は 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と推定された。

以上の結果より、GC-ECD を用いた試験法は、今回検討を行った有機塩素系農薬 22 種類のうち、 α -BHC、 δ -BHC 及びオキシクロルデン以外の成分の堆肥中の含有量を測定するために十分な性能を有していることを確認した。また、松の木くずについては、この試験法が適用できないことを確認した。

文 献

- 1) 飼料分析基準(平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号 農林水産省消費・安全局長通知)
- 2) 愛玩動物用飼料等の検査法 (平成 21 年 9 月 1 日付け 21 消技第 1764 号 (独)農林水産消費安全技術センター)
- 3) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 (平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 4) Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate, AOAC Official Method 2007.01

Determination of Organic Chloride Pesticides in Composts using Gas Chromatography-Electron Capture Detector (GC-ECD)

Tomoharu NOZAKI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

A GC-ECD method for determination of organic chloride pesticides in compost was developed and validated as a single-laboratory validation. The pesticides were extracted from analytical sample with acetonitrile. The extract was purified by Gel Permeation Chromatography and solid phase extraction, and diluted with acetone. The organic chloride pesticides was analysis by GC-ECD on (14%-Cyanopropylphenyl)-Methylpolysiloxane column. As a result of 3 replicate analysis of 2 samples spiked with organic chloride pesticides at 20 µg/kg, 50 µg/kg and 80 µg/kg, the mean recovery of pesticides were 62.5 % ~ 118 % (compost) and 35.6 % ~ 109 % (pine chips, spiked level 20 µg/kg). In the train of duplicate analysis per 5 days, the repeatability and intermediate precision of organic chloride pesticides were under 14.4 % and under 26.4 % without α -BHC, δ -BHC and oxy-Chlordane case compost. Case pine chips, low recovery. On the basis of 7 replicate measurements of organic chloride pesticide added to samples, the *LOQ* value were 10 µg/kg ~ 20 µg/kg. These results demonstrated that this method was validated for the determination of organic chloride pesticides without α -BHC, δ -BHC and oxy-Chlordane in compost.

Key words Organic chloride pesticides, GC-ECD

(Research Report of Fertilizer, **10**, 41-60, 2017)

5 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

汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の測定

－共同試験成績－

小塚健志¹, 大島舞弓¹, 橋本良美¹, 田丸直子¹, 白井裕治¹

キーワード クロピラリド, アミノピラリド, ピクロラム, 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, 共同試験

1. はじめに

クロピラリド, アミノピラリド及びピクロラムはカルボキシル基を有するピリジン系の農薬である. このうちクロピラリドは, これ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⁾. 一方, 諸外国において堆肥中からアミノピラリドが検出され, これによるものと疑われる生育障害報告例²⁾があるなど, クロピラリドと類似の構造を持った植物ホルモン系除草剤であるアミノピラリド及びピクロラムはクロピラリドと同様の障害を発生させる可能性がある. このことから, 堆肥及び汚泥発酵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分析法として, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析(LC-MS/MS)法が検討され, 単一試験室における真度, 併行精度, 定量下限等を平成 25 年度に顯谷らが検討したところ, 単一試験室内における試験方法の妥当性が確認された³⁾.

今回, この 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, アミノピラリド及びピクロラムの測定の性能評価のため, 共通試料を用いて試験室間の再現精度を調査したので, その概要を報告する.

なお, クロピラリド, アミノピラリド及びピクロラムの構造式を Fig.1 に示した.

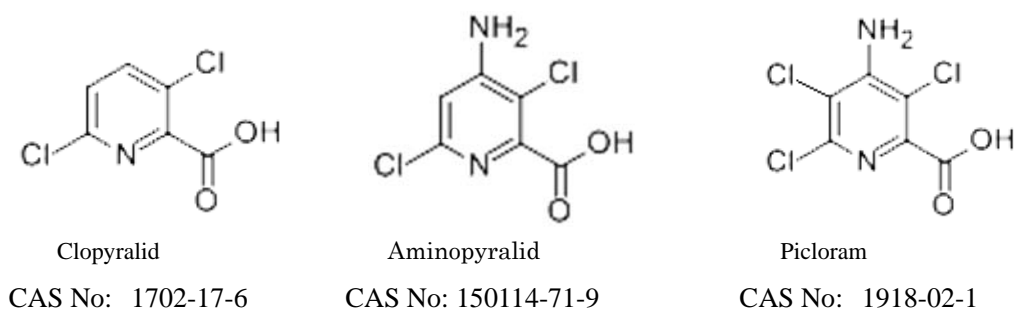


Fig.1 Chemical structural formulas of clopyralid, aminopyralid and picloram

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

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料

市販されている2種類の堆肥及び3種類の汚泥発酵肥料(畜糞含有)を40℃で一昼夜乾燥した後、目開き500 µmのスクリーンを通過するまで粉砕し、よく混合して共同試験用試料とした。この内の1種類の堆肥はクロピラリドの含有が認められ、アミノピラリド及びピクロラムの含有が認められない試料であり、その他4種類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9gをポリエチレン袋に入れ密封してそれぞれ35袋を調製した。一対のブラインド試料を提供するため、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。

2) 添加用標準液

市販されているクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラム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5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5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及びマニホールドを使用した。

4) クロピラリド等の測定

(1) 抽出

分析試料5.00gをはかって共栓三角フラスコ200 mLに入れ、水酸化ナトリウム溶液(40 g/L) 1 mL及びメタノール99 mLを加え、30分間振り混ぜた。その後、共栓遠心沈殿管50 mLに内容量を移し、1700×g(3000 rpm)で5分間遠心分離して上澄み液を抽出液とした。

(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。なすフラスコ50 mLをカートリッジカラムの下に置き、抽出液5 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。

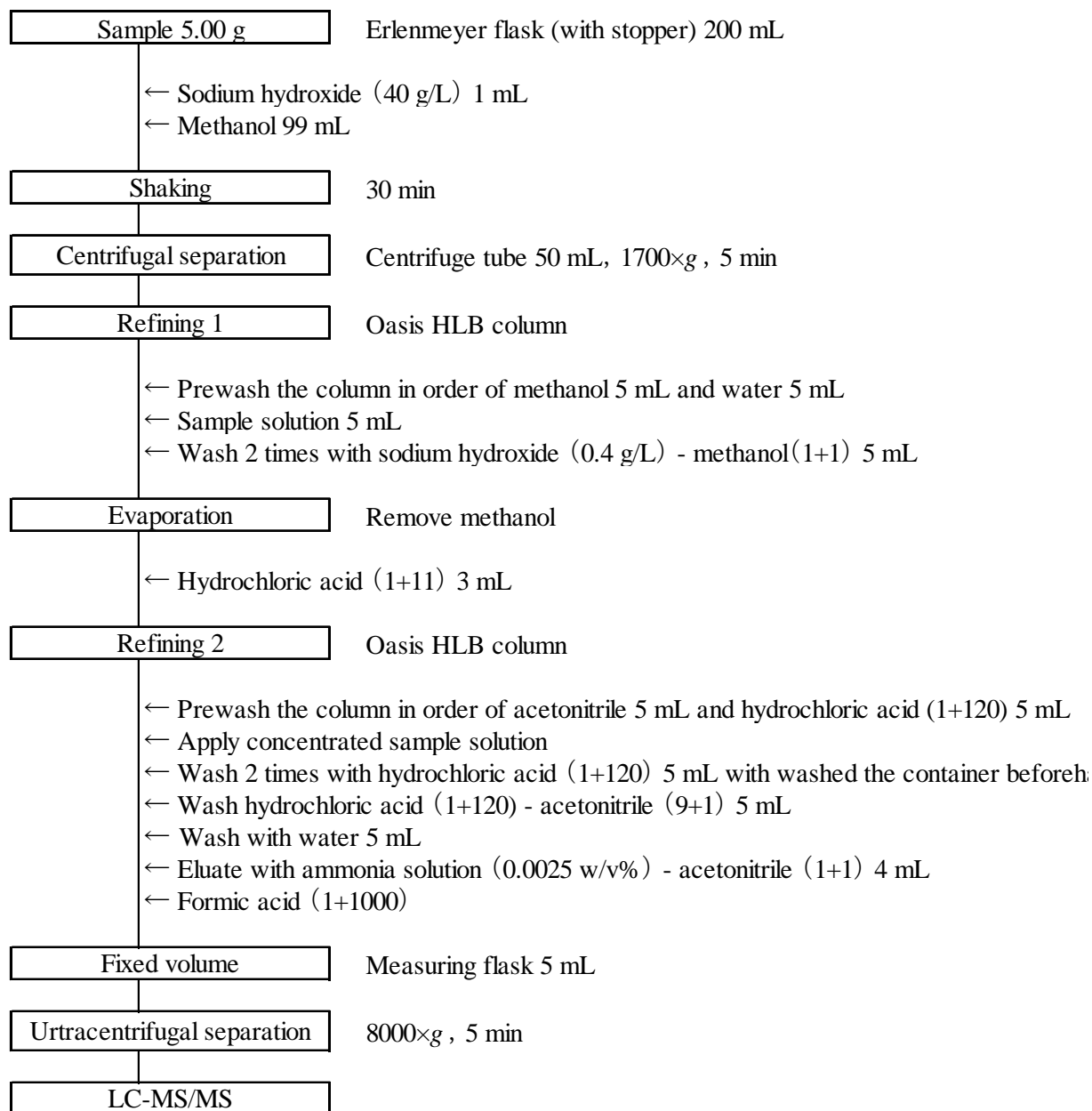
(3) 精製2

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℃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。容器を塩酸(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。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(0.0025 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、アミノピラリド及びピクロラムを速やかに溶出させた。ギ酸(1+1000)で定容した後、プラスチック製遠心沈殿管1.5 mLに入れ、8000×g(10000 rpm)で5分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とした。

(4) 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、アミノピラリド及びピクロラムの各量を算出した。なお、測定にあたっては、肥料等試験法 (2016) 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 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for clopyralid, aminopyralid and picloram in compost and composted sludge 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⁴⁾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、三角フラスコにはかり入れる分析試料は 4.00 g とした。

6) 共同試験

試験に参加した 9 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。

- ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所微量試験部農薬試験課
 - ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所微量試験部微量試験課
 - ・ 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前処理課
 - ・ 日本ウォーターズ株式会社テクノロジーセンター
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター
 - ・ 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
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター
 - ・ 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飼料鑑定第一課
 - ・ 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
- (50 音順)

Table 1 Instruments used in the collaborative study

LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
LC: Nexera X2, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies
MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: Nexera X2, Shimadzu	InertSustain C18, GL Sciences
MS/MS: Triple Quad API 6500, AB SCIEX	(2.1 mm×100 mm, 2.0 μm)
LC: LC800 System, GL Sciences	InertSustain AQ-C18, GL Sciences
MS/MS: API 4000 Q TRAP, AB SCIEX	(2.1 mm×50 mm, 1.9 μm)
LC: ACQUITY UPLC H-Class, Waters	ACQUITY UPLC HSS T3, Waters
MS/MS: Xevo TQ-S micro, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: TQD, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: TQD, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: TQD, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)

Table 1 Continue

LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: TQD, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 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 の外れ値検定による操作した後、一元配置分散分析から得られた統計量を Table 2 に示した。この結果、 F 値が $F(9, 10; 0.05)$ 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ず、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)} (µg/kg)	s_r ^{c)} (µg/kg)	RSD_r ^{d)} (%)	s_{bb} ^{e)} (µg/kg)	s_{b+r} ^{f)} (µg/kg)	RSD_{b+r} ^{g)} (%)	F value ^{h,i)}
Compost 1	10 (0)	114	8	7.4	0	8	7.4	0.68

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

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

c) Standard deviation of repeatability

d) Relative standard deviation of repeatability

e) Standard deviation of sample-to-sample

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

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

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

i) 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 3-1～Table 3-3 に示した。各系列の試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル⁵⁾に従って統計処理した。なお、検量線の範囲を下回って算出された値もあるが、これらの値は除かず不検出と報告された結果のみを除いて統計処理をした。試験成績の外れ値を検定するために Cochran 検定及び Grubbs 検定を実施した。その結果、10 試験室の試験成績のうちクロピラリドについては 1 種類の試料で 1 試験室が、アミノピラリドについては 1 種類の試料で 1 試験室及び 3 種類の試料で各 2 試験室が、ピクロラムについては 2 種類の試料で各 1 試験室及び 2 種類の試料で各 2 試験室が外れ値として判定された。

Table 3-1 Individual result of clopyralid

(μg/kg)

Lab ID ^{a)}	Compost 1		Compost 2			
	A	140	153	883	890	
B	131	128	805	812		
C	94.8	113	676	692		
D	91.2	93.3	1070	977		
E	151	155	846	906		
F	125	126	797	855		
G	149	142	759	845		
H	120	121	789	722		
I	112	114	740	804		
J	148	149	895	941		

Lab ID ^{a)}	Composted sludge fertilizer 1		Composted sludge fertilizer 2		Composted sludge fertilizer 3	
	A	21.0	17.2	95.9	77.9	357
B	21.3	17.4	105	97.2	321	318
C	4.18 ^{c)}	6.83 ^{c)}	99.9	75.3	361	275
D	31.2 ^{d)}	4.67 ^{c)d)}	88.6	74.3	343	365
E	13.4	15.8	102	103	377	360
F	16.0	16.0	84.3	80.1	329	375
G	24.4	22.0	71.5	96.8	312	343
H	13.8	11.6	86.2	87.1	325	316
I	17.7	17.4	81.9	82.9	302	355
J	17.7	18.0	101	102	337	348

a) Laboratory identification

b) No detect

c) The value which was lower than the range of calibration curve

d) Outlier of Cochran test

e) Outlier of Grubbs

Table 3-2 Individual result of aminopyralid

(μg/kg)

Lab ID ^{a)}	Compost 1		Compost 2			
	A	76.4 ^{e)}	80.9 ^{e)}	9.78 ^{c)}	26.7	
B	278	274	18.5	21.8		
C	81.0 ^{d)}	229 ^{d)}	15.1	7.30 ^{c)}		
D	390	365	31.9 ^{d)}	69.3 ^{d)}		
E	337	353	24.5	27.2		
F	355	339	26.9	27.4		
G	355	344	163 ^{d)}	49.7 ^{d)}		
H	259	302	23.0	20.1		
I	314	329	15.7	23.3		
J	296	286	24.6	27.4		

a)~e) Refer to the footnote of Table 3-1

Table 3-2 Continue

Lab ID ^{a)}	Composted sludge		Composted sludge		Composted sludge	
	fertilizer 1		fertilizer 2		fertilizer 3	
A	3.52 ^{c)}	1.66 ^{c)}	200	133	22.4	42.7
B	14.5 ^{d)}	4.51 ^{c),d)}	682	546	66.8	44.2
C	N.D. ^{b)}	N.D. ^{b)}	630	595	52.5	36.2
D	6.34 ^{c)}	9.74 ^{c)}	1300	809	86.0	76.3
E	3.32 ^{c)}	4.51 ^{c)}	845	812	83.2	76.0
F	5.81 ^{c)}	8.68 ^{c)}	824	783	63.7	63.7
G	24.4 ^{e)}	23.3 ^{e)}	745	419	219 ^{d)}	139 ^{d)}
H	4.83 ^{c)}	3.12 ^{c)}	707	770	65.9	61.7
I	6.39 ^{c)}	6.49 ^{c)}	733	799	57.0	54.9
J	5.78 ^{c)}	5.26 ^{c)}	880	805	54.4	62.5

Table 3-3 Individual result of picloram

Lab ID ^{a)}	Compost 1		Compost 2	
	A	876	930	31.4
B	737	685	34.4	34.0
C	1310	1150	90.2 ^{e)}	107 ^{e)}
D	667	655	52.8	51.5
E	819	811	21.0	17.8
F	836	735	43.8	37.1
G	850	781	43.1	40.5
H	652	694	31.6	27.2
I	791	821	34.6	35.7
J	1010	990	47.8	51.2

Lab ID ^{a)}	Composted sludge		Composted sludge		Composted sludge	
	fertilizer 1		fertilizer 2		fertilizer 3	
A	71.8	68.9	330	328	161	167
B	102	67.7	325	307	152	150
C	412 ^{d)}	284 ^{d)}	724 ^{e)}	752 ^{e)}	761 ^{d)}	467 ^{d)}
D	73.0	88.3	319	267	143	133
E	105	95.8	288	291	162	159
F	80.7	95.3	355	329	165	193
G	143	158	785 ^{d)}	467 ^{d)}	432 ^{d)}	308 ^{d)}
H	50.9	37.9	287	310	157	155
I	81.7	83.4	395	354	188	204
J	105	116	490	488	286	338

a)～e) Refer to the footnote of Table 3-1

3) 併行精度及び室間再現精度

試験成績より算出した平均値、併行標準偏差(s_r)及び併行相対標準偏差(RSD_r)値並びに室間再現標準偏差(s_R)及び室間再現相対標準偏差(RSD_R)を Table 4-1～4-3 に示した。

クロピラリドの平均値は 16.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～835 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、その併行標準偏差は1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、併行相

対標準偏差は 4.5 %～12.6 %，室間再現標準偏差は 5.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び室間再現相対標準偏差は 8.3 %～31.8 %であった。

アミノピラリドの平均値は 5.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～701 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり，その併行標準偏差は 1.41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～146 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，併行相対標準偏差は 4.5 %～26.2 %，室間再現標準偏差は 2.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～263 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び室間再現相対標準偏差は 12.0 %～41.2 %であった。

ピクロラムの平均値は 37.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～840 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり，その併行標準偏差は 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，併行相対標準偏差は 5.6 %～12.3 %，室間再現標準偏差は 10.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (及び室間再現相対標準偏差は 19.8 %～33.5 %であった。

クロピラリド及びピクロラムについては，今回配付した共同試験用試料(濃度範囲)で，併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が，肥料等試験法⁶⁾における試験法の妥当性確認の手順に示している各濃度レベルにおける精度の目安の 1.5 倍に概ね収まっていた。但し，1 種類の汚泥発酵肥料中のピクロラムで室間再現相対標準偏差が 33.5 %で，この精度の目安の 1.5 倍 33 %を僅かに上回っていた。

アミノピラリドについては，1 種類の堆肥及び 1 種類の汚泥発酵肥料で，併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が，肥料等試験法における試験法の妥当性確認の手順に示している各濃度レベルにおける精度の目安の 1.5 倍以内であった。しかし，1 種類の堆肥で併行相対標準偏差がこの精度の目安の 1.5 倍を超え，2 種類の汚泥発酵肥料で併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差がこの精度の目安の 1.5 倍を超えていた。

Table 4-1 Statistical analysis of collaborative study results for clopyralid

Sample	Labs ^{a)} $p(q)$ ^{a)}	Mean ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_r ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	s_R ^{f)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_R ^{g)} (%)	$CRSD_R$ ^{h)} (%)
Compost 1	10(0)	128	6	4.5	11	21	16.4	22
Compost 2	10(0)	835	41	4.9	11	100	11.9	22
Composted sludge fertilizer 1	9(1)	16.2	1.7	10.6	11	5.2	31.8	22
Composted sludge fertilizer 2	10(0)	89.6	11.3	12.6	11	11.3	12.6	22
Composted sludge fertilizer 3	10(0)	339	28	8.3	11	28	8.3	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 2016

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 2016

Table 4-2 Statistical analysis of collaborative study results for aminopyralid

Sample	Labs ^{a)} <i>p</i> (<i>q</i>) ^{a)}	Mean ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>s_r</i> ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>RSD_r</i> ^{d)} (%)	<i>CRSD_r</i> ^{e)} (%)	<i>s_R</i> ^{f)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>RSD_R</i> ^{g)} (%)	<i>CRSD_R</i> ^{h)} (%)
Compost 1	8(2)	324	15	4.5	11	39	12.0	22
Compost 2	8(2)	21.2	5.2	24.7	11	6.4	30.3	22
Composted sludge fertilizer 1	7(2)	5.39	1.41	26.2	11	2.22	41.2	22
Composted sludge fertilizer 2	10(0)	701	146	20.8	11	263	37.6	22
Composted sludge fertilizer 3	9(1)	59.5	8.9	15.0	11	16.6	28.0	22

a)~h) refer to the footnotes of Table 4-1

Table 4-3 Statistical analysis of collaborative study results for picloram

Sample	Labs ^{a)} <i>p</i> (<i>q</i>) ^{a)}	Mean ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>s_r</i> ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>RSD_r</i> ^{d)} (%)	<i>CRSD_r</i> ^{e)} (%)	<i>s_R</i> ^{f)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>RSD_R</i> ^{g)} (%)	<i>CRSD_R</i> ^{h)} (%)
Compost 1	10(0)	840	50	5.9	11	175	20.8	22
Compost 2	9(1)	37.7	3.5	9.4	11	10.3	27.3	22
Composted sludge fertilizer 1	9(1)	90.2	11.1	12.3	11	30.3	33.5	22
Composted sludge fertilizer 2	8(2)	341	19	5.6	11	67	19.8	22
Composted sludge fertilizer 3	8(2)	182	16	8.6	11	56	31.0	22

a)~h) refer to the footnotes of Table 4-1

4) 低濃度標準液の変化

今回の共同試験は、共同試験用試料に添加用標準液を加えて実施した。添加用標準液はアセトニトリルを溶媒としてガラスバイアルに入れて参加試験室に配付した。配付した5種類の添加用標準液において各成分で最も低い濃度は、クロピラリド及びアミノピラリドが0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ピクロラムが0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。そこで、アセトニトリルを溶媒として各成分 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した混合溶液をガラスバイアルに入れ一時間程度置いた後、ぎ酸(1+1000)で各 2 ng/mL に希釈して LC-MS/MS に注入し各成分量を求めた。このときの各成分の測定値を 2 ng/mL に対する百分率にして Table 5 に示した。この結果、特にアミノピラリドの量に大きな減少が認められた。

こうしたことから、配付した添加用標準液では低濃度のアミノピラリド濃度に変化があったため、最も低いアミノピラリド量の試料では併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が肥料等試験法に示している精度の目安を大きく超えたことが考えられた。

Table 5 Recoveries of standard solution in glass vial

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)
Clopyralid	90
Aminopyralid	62
Picloram	74

a) Recovery for the concentration of preparation solution ($n=3$)

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及びその関連物質の測定の評価を行った。その結果、クロピラリドの平均値 17.5 µg/kg～826 µg/kg において室間再現精度(相対標準偏差)は 8.3 %～21.1 %, アミノピラリドの平均値 5.37 µg/kg～685 µg/kg において室間再現精度(相対標準偏差)は 12.0 %～45.1 %, ピクロラムの平均値 36.2 µg/kg～771 µg/kg において室間再現精度(相対標準偏差)は 10.6 %～35.6 %であった。試験室間の比較による本試験法の室間再現精度は、クロピラリドでは、全ての共通試験用試料の濃度範囲で肥料等試験法に示している精度の目安の 1.5 倍以内にあり、同試験法の性能基準に適合していることが確認された。また、ピクロラムでも、全ての共通試験用試料の濃度範囲で肥料等試験法に示している精度の目安の 1.5 倍に概ね収まっていた。一方、アミノピラリドでは、1 種類の堆肥及び 1 種類の汚泥発酵肥料で肥料等試験法に示している精度の目安の 1.5 倍以内であったが、1 種類の堆肥及び 2 種類の汚泥発酵肥料で肥料等試験法に示している精度の目安の 1.5 倍を上回っており目標とする精度を確認できなかった。

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) Health and Safety Executive: Aminopyralid - Results of Analysis of Contaminated Manure, Soil, and Damaged Crops
<<http://www.pesticides.gov.uk/guidance/industries/pesticides/topics/using-pesticides/General/aminopyralid-results-of-analysis-of-contaminated-manure-soil-and-damaged-crops>>
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) Horwitz W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)
- 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/obj/shikhenho_2016.pdf>

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

Kenji KOZUKA¹, Mayu OSHIMA¹, Yoshimi HASHIMOTO¹, Naoko TAMARU¹, and Yuji SHIRAI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

A collaborative study was conducted to evaluate liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for determination of clopyralid, aminopyralid and picloram in compost and composted sludge fertilizer. Clopyralid, aminopyralid and picloram was extracted and with methanol under alkaline condition. The extract was refined with a cleanup cartridge by taking advantage of characteristics that the behavior of elution varies between acidity and alkaline. The clopyralid, aminopyralid and picloram were 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 17.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 826 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 8.3 % ~ 21.1 %, respectively. Those for aminopyralid were 5.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 685 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 12.0 % ~ 45.1 %, respectively. Those of picloram were 36.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 771 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 10.6 % ~ 35.6 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of clopyralid, but an unacceptable precision for determination of aminopyralid in these concentration ranges.

Key words clopyralid, aminopyralid, picloram, compost, composted, sludge fertilizer, LC-MS/MS, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **10**, 61-71, 2017)

6-1 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素,

ビウレット性窒素等の測定

— 単一試験室の妥当性確認 —

惠智正宏¹, 木村康晴², 白井裕治³

キーワード 尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素,
グアニル尿素性窒素

1. はじめに

近年, 施肥作業省力化や環境保全等の観点から肥効調節型肥料が注目されており¹⁾, 多くの緩効性窒素肥料が使用されている. 緩効性窒素肥料の主原料の一つである尿素は, 製造時に高温下での粒状化工程等でビウレットを生成し, 葉面散布時に植害が生じる恐れがあることから^{2), 3)}, 公定規格において, 含有を許される有害成分の最大量が設定されている. また, 尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素及びグアニジン性窒素は, 緩効性能に影響を及ぼすことから, 同じく公定規格⁴⁾において, 含有量が制限項目として設定されている.

検査機関, 肥料メーカー品質管理部門等では, 迅速な分析が求められる一方, 詳解肥料分析法等^{5), 6)}に記載されている従来法は, 分析操作に習熟を要し, その簡便性, 迅速性等が課題になると考えられる. 近年, 肥料分析において, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法の導入が進んでおり⁷⁾, 弱酸性陽イオン交換カラムを用いることで, 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), さらにグアニル尿素性窒素(GU-N)の一斉分析が可能と推測された. そこで, HPLC法による5成分一斉分析法として, 対象成分の選択性, 検量線の直線性, 測定の真度, 定量下限及び夾雑物の影響排除等の検討を行ったので概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 供試試料

ホルムアルデヒド加工尿素肥料4点, 尿素3点, メチロール尿素重合肥料2点, 硫酸グアニル尿素2点, イソブチルアルデヒド縮合尿素2点, アセトアルデヒド縮合尿素1点及び原料に尿素又はホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む肥料(化成肥料11点, 液状窒素肥料8点, 家庭園芸用複合肥料7点, 被覆窒素肥料3点及び配合肥料1点)の合計44点を供試肥料とした. 供試試料のうち固形のものには, 500 µmのスクリーンを装着した遠心粉碎機を用いて粉碎した.

2) 試薬等の調製

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

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

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

(1) 精製水: HPLCの移動相及び標準液の調製にはDirectQ 3UV (MILLIPORE)で製造した超純水, 試料の抽出等の前処理操作にはRFD240NA (ADVANTEC)で製造した蒸留水を用いた.

(2) りん酸塩緩衝液(移動相): 特級りん酸二水素カリウム(KH_2PO_4 , Wako) 19.60 g 及び特級りん酸(H_3PO_4 , Wako) 0.584 g を超純水に溶かして 500 mL とし, 使用時に超純水で 10 倍に希釈して使用した.

(3) 尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素標準液: 尿素($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, Wako) 0.2145 g, ビウレット($(\text{CO}\cdot\text{NH}_2)_2\text{NH}$, 東京化成) 0.2454 g, 特級ジシアンジアミド($(\text{CN}\cdot\text{NH}_2)_2$) 0.1502 g, グアニジン硫酸塩($\text{C}_2\text{H}_{10}\text{N}_6\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$) 0.2574 g 及びグアニル尿素硫酸塩($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_8\text{O}_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$) 0.2699 g をそれぞれ超純水に溶かし 100 mL とした(各成分の窒素(N)として, いずれも 1.0 g/L に相当).

(4) 検量線用混合標準液(各成分のNとして 1 mg/L~200 mg/L): 尿素性窒素標準液, ビウレット性窒素標準液, ジシアンジアミド性窒素標準液, グアニジン性窒素標準液及びグアニル尿素性窒素標準液の一定量を混合し, 水で順次希釈し, 各成分のNとして 1 mg/L~200 mg/L の濃度の検量線用混合標準液を調製した.

3) 器具及び装置

Table 1 に示した装置及び測定条件により HPLC 測定を行った. なお, ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む肥料については, その成分由来のピークを分離するため HAMILTON PRP-X200 弱酸性陽イオン交換カラム (HAMILTON PRP-X200) を用い, それ以外は Asahipak ES-502C 7C 弱酸性陽イオン交換カラム (Asahipak ES-502C 7C) を用いた. 前処理に親水性 PTFE (Polytetrafluoroethylene) メンブレンフィルター (孔径 0.45 μm , ADVANTEC), マグネチックスターラー (OCUTOPUS CS-1), 高速遠心分離機 6800 (KUBOTA) 及び遠心粉碎器 ZM-200 (Retsch) を用いた.

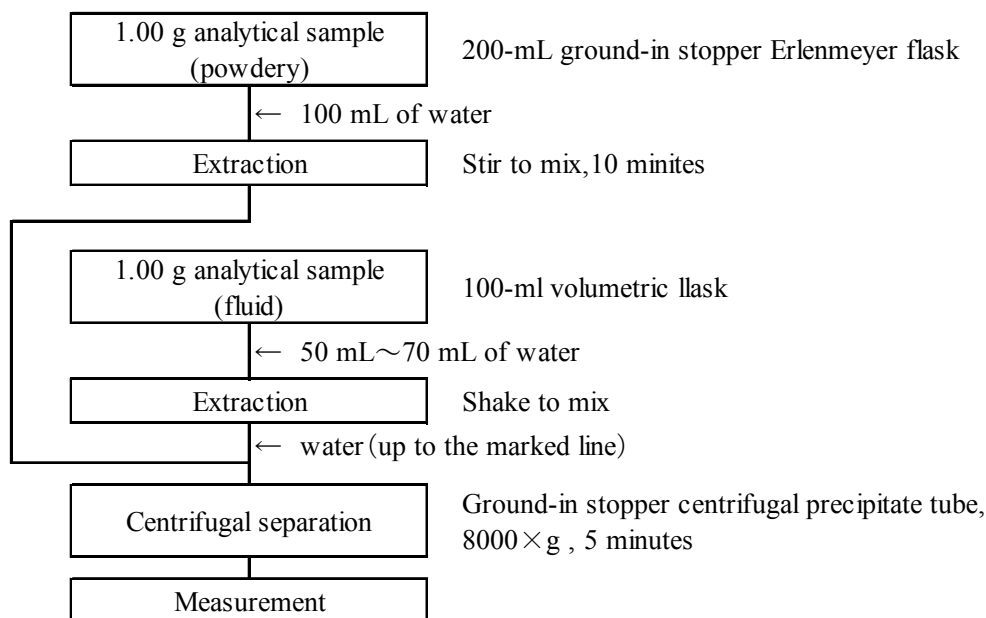
Table 1 HPLC Conditions

HPLC	Waters 2695 Separation module
Detector system	2996 photo diode array detector
Wavelength	190 nm
Column	(1) Asahipak ES-502C 7C (100 mm L×7.5 mm I.D. 9 μm particle size) (2) HAMILTON PRP-X200 (150 mm L×4.1 mm I.D. 10 μm particle size)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	Phosphate buffer (KH_2PO_4 28.81 mmol/L, H_3PO_4 1.19 mmol/L)
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	10 μL
Measurement time	20 min

4) 試験操作

試料の調製について Scheme 1 に示した. 固形試料は, 1.00 g を 200 mL の共栓付き三角フラスコにはかりとり, 100 mL の蒸留水を加え, マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜた. これを遠沈管に移して 8000 $\times g$ で約 5 分間遠心分離した上澄み液を測定液とした. その試料溶液を Table 1 の測定条件で測定し, 得られたピーク面積から検量線法により試料液中の尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の質量を求め, 分析試料中の濃度を算出した.

液状の分析試料は、分析試料 1.00 g を 100 mL の全量フラスコにはかり取り、約 50 mL の蒸留水を加えて蓋をして振り混ぜた後、100 mL とした。これを遠沈管に移して $8000 \times g$ で約 5 分間遠心分離した上澄み液を測定液とした。以降は固形肥料と同じ操作を行った。



Scheme 1 Method flow sheet for Urea nitrogen (U-N), Biuret nitrogen (B-N), Dicyandiamide nitrogen (Dd-N), Guanidine nitrogen (Gd-N) and Guanylurea nitrate (GU-N) in fertilizers

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

移動相は、りん酸二水素カリウム(KH_2PO_4)及びりん酸(KH_2PO_4)の緩衝液とし、20通りの濃度比率で移動相を作成して最適な移動相組成を検討した。Asahipak ES-502C 7Cを用いて混合標準液(10 mg/L)を測定したところ、りん酸緩衝液の濃度変化に対してグアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の保持時間が、大きく変動する傾向が認められた(Fig. 1)。尿素性窒素、ビウレット性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素、グアニル尿素性窒素の順に5成分が分離され(Fig. 2-1)、移動相濃度は KH_2PO_4 28.81 mmol/L, H_3PO_4 1.19 mmol/L が最適と判断した。

なお、ホルムアルデヒド加工尿素肥料について、本法により調製した試料溶液をAsahipak ES-502-C 7を用いてクロマトグラムを作成したところ、尿素性窒素と夾雑成分のピークが重なった(Fig. 2-2)。そのため、HAMILTON PRP-X200 カラムを用いて、同様に調製した試料溶液について同じ測定条件でクロマトグラムを作成したところ、夾雑成分と分離した尿素性窒素のピークが得られた(Fig. 2-3)。このことから、ホルムアルデヒド加工尿素肥料及びそれを含む肥料中の尿素性窒素の測定には HAMILTON PRP-X200 カラムを用いることとした。

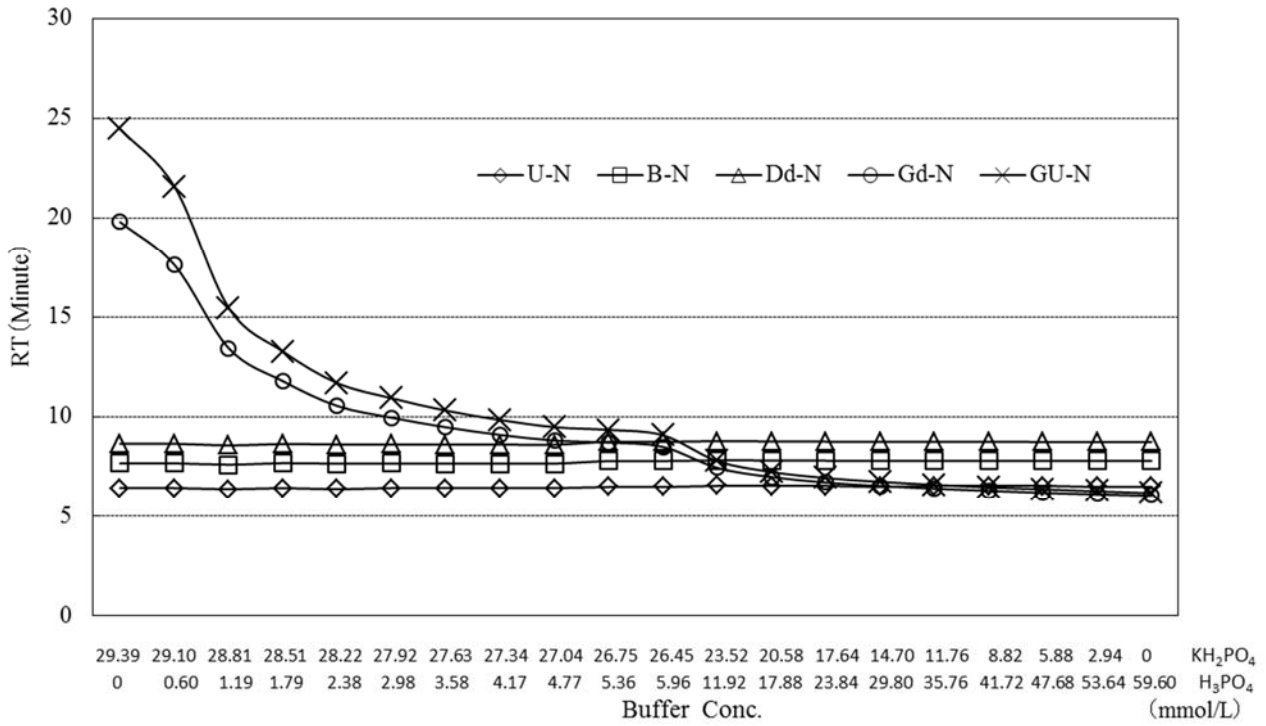


Fig. 1 Retention time of any peak at different concentration of the buffer

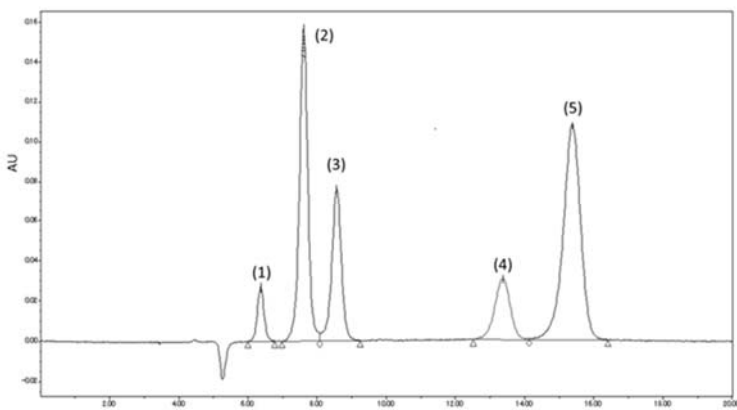


Fig. 2-1 HPLC chromatogram of mixed standard solution using Asahipak ES-502-C 7
(Peak 1:U-N, Peak 2:B-N, Peak 3:Dd-N, Peak 4:Gd-N, Peak 5:GU-N)

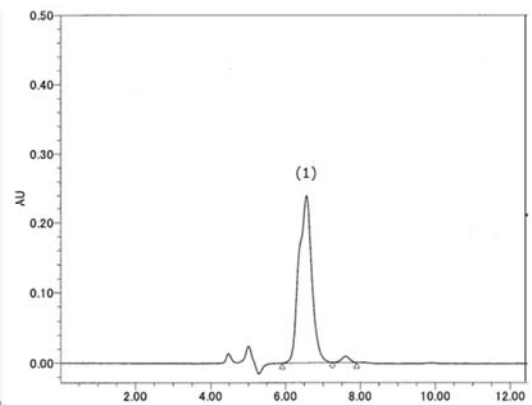


Fig. 2-2 HPLC chromatogram sample solution of urea form using Asahipak ES-502-C 7
(Peak 1:U-N)

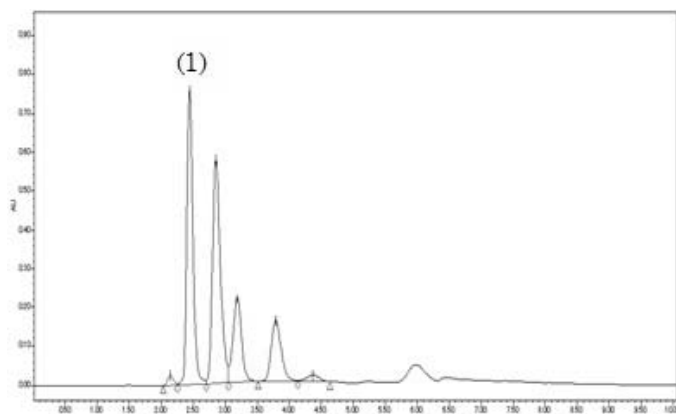
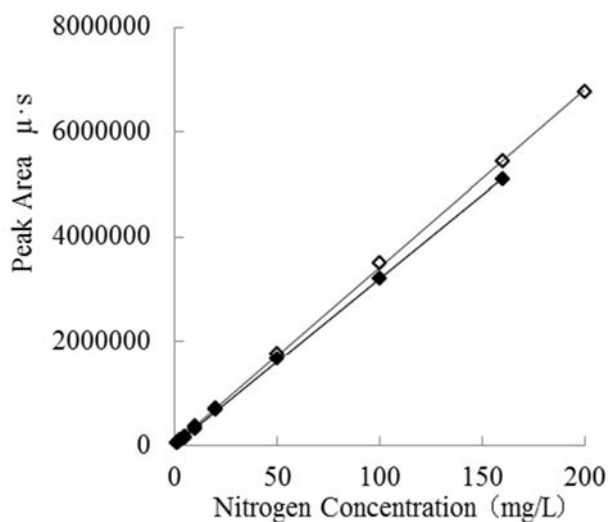


Fig. 2-3 HPLC chromatogram of HAMILTON PRP-X200
(Peak 1: U-N)

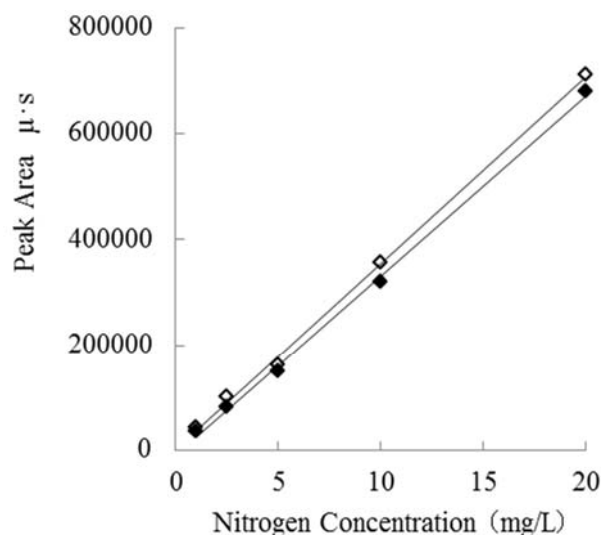
2) 検量線の検討

検量線用混合標準液 9 点 (各成分の N として 1.0 mg/L, 2.5 mg/L, 5.0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 160 mg/L 及び 200 mg/L) 及び超純水 1 点を 2 点併行で測定し、ピーク面積から検量線を作成した。

Asahipak ES-502C 7C を用いた場合、ビウレット性窒素が 1 mg/L～50 mg/L の範囲で直線性を示し、尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素が 1 mg/L～200 mg/L の範囲で、グアニル尿素性窒素が 1 mg/L～100 mg/L の範囲で直線性を示し、決定係数 (r^2) はいずれも 0.9997 以上であった。また、HAMILTON PRP-X200 を用いた場合、尿素性窒素が 1 mg/L～160 mg/L の範囲で直線性を示し、決定係数 (r^2) は 0.9998 であった (Fig. 3-1, Fig. 3-2)。



◇ : Asahipak ES-502C 7C $y = 33879x + 26304$
 $r^2 = 0.9997$
◆ : HAMILTON PRP-X200 $y = 31872x + 14297$
 $r^2 = 0.9998$



◇ : Asahipak ES-502C 7C $y = 35207x + 1620.8$
 $r^2 = 0.9985$
◆ : HAMILTON PRP-X200 $y = 34025x - 10711$
 $r^2 = 0.9984$

Fig. 3-1 Calibration curves of U-N using Asahipak ES-502C 7C and HAMILTON PRP-X200

The figure on the right: All concentration range (1 ~ 200 mg/L)

The figure on the left: Low concentration range (1 ~ 20 mg/L)

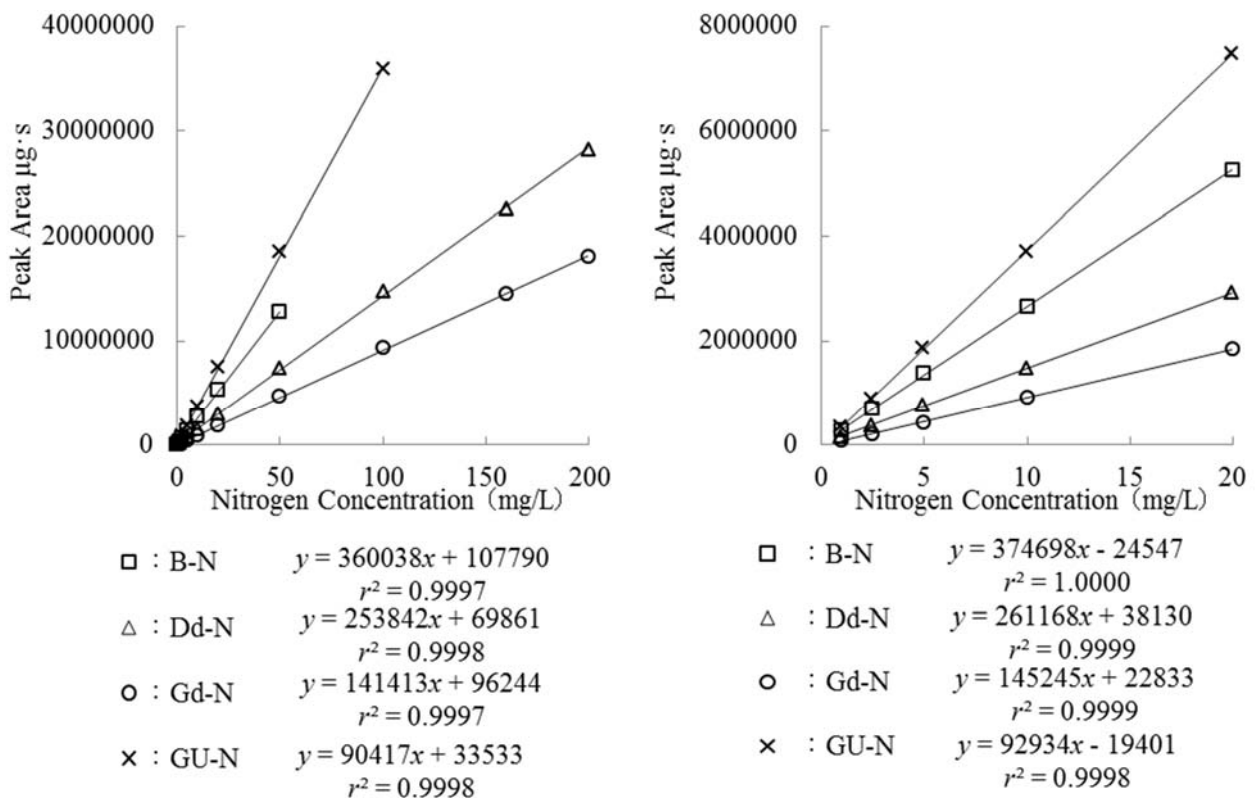


Fig. 3-2 Calibration curves of B-N, Dd-N, Gd-N and GU-N using Asahipak ES-502C 7C

The figure on the right: All concentration range (1 ~ 200 mg/L)

The figure on the left: Low concentration range (1 ~ 20 mg/L)

3) 抽出条件の検討

化成肥料及びグアニル尿素肥料を試料として用いて、抽出条件(時間)を検討した。試料に蒸留水を加えてかき混ぜずに直ちに遠心分離した抽出液、マグネチックスターラーで5分間~30分間それぞれかき混ぜた抽出液について5成分を測定した(Fig. 4-1, Fig. 4-2)。尿素性窒素は17.6 mg/L~18.1 mg/L, ビウレット性窒素は7.21 mg/L~7.53 mg/L, ジシアンジアミド性窒素は128 mg/L~132 mg/L, グアニジン性窒素は1.40 mg/L~1.51 mg/L, グアニル尿素性窒素は17.3 mg/L~18.5 mg/Lと一定範囲内で推移した。亜硝酸及び硫酸化物の測定法⁷⁾における抽出時間と同一の10分間が最適と判断した。

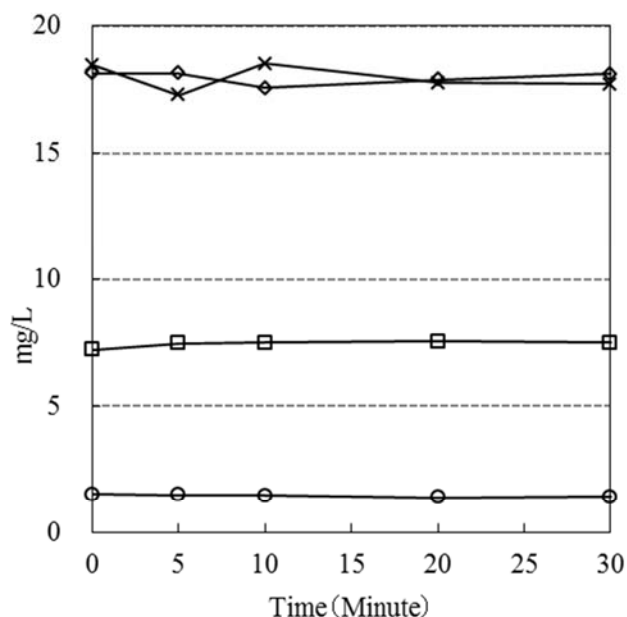


Fig.4-1 Effect of extraction time on extraction efficiency of each component

—◇— U-N —□— B-N —○— Gd-N —×— GU-N

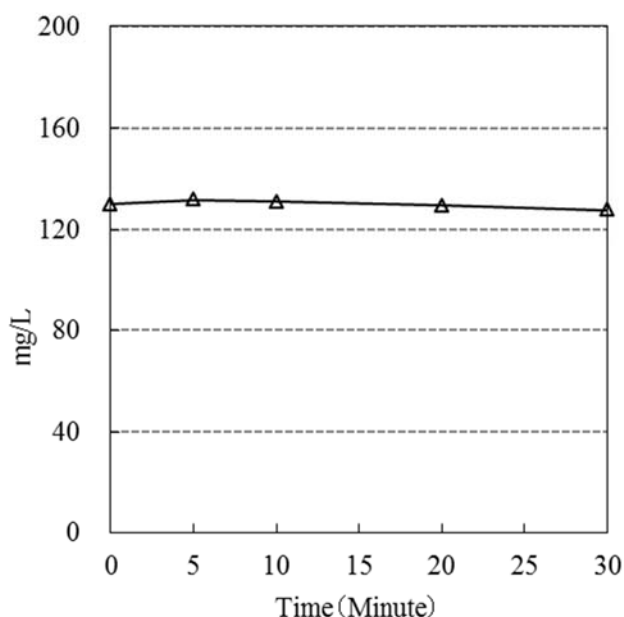


Fig.4-2 Effect of extraction time on extraction efficiency of Dd-N

—△— Dd-N

4) 添加回収試験による真度の評価

アセトアルデヒド縮合尿素, 化成肥料, 配合肥料, 液状複合肥料及び家庭園芸用複合肥料の 5 種類の市販肥料と, 硫酸グアニル尿素試薬にグアニジン硫酸塩試薬を添加した模擬肥料(硫酸グアニル尿素模擬肥料)の計 6 試料を用いて真度の確認を実施した。

5 種類の市販肥料に, 尿素性窒素, ビウレット性窒素及びジシアンジアミド性窒素を, 含有許容量, 含有許容量の 0.2 倍及び含有許容量の 2 倍の 3 段階で添加し, 本法にしたがって Asahipak ES-502C 7C を用いて 3 点併行で分析した (Table 2-1). なお, ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む化成肥料については, 尿素性窒素を含有許容量, 含有許容量の 0.2 倍及び含有許容量の 2 倍の 3 段階で添加し, 本法にしたがって HAMILTON PRP-X200 を用いて 3 点併行で分析した (Table 2-2). 平均回収率は 87.0 %~105.6 %, 併行相対標準偏差 (RSD) は 0.1 %~3.7 %であり, いずれも肥料等試験法⁸⁾に示されている添加濃度における真度(回収率)の目標以内であり, 満足な結果が得られた。

Table 2-1 Results of recovery test (Asahipak ES-502C 7C)

Sample Content	Acetaldehyde condensation Urea		Compound fertilizer		Mixed fertilizer		Fluid mixed fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer		Criteria of the trueness ^{d)} (%)	
	Rec ^{b)}	RSD ^{c)}	Rec ^{b)}	RSD ^{c)}	Rec ^{b)}	RSD ^{c)}	Rec ^{b)}	RSD ^{c)}	Rec ^{b)}	RSD ^{c)}		
	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}		
U-N	6.0	98.5	0.8	98.3	1.9	100.4	2.0	102.0	0.5	102.9	0.7	85 ~ 110
	3.0	98.9	0.5	99.6	1.9	105.2	1.1	103.6	0.6	102.6	0.6	85 ~ 110
	0.6	92.3	1.9	99.1	0.7	98.8	0.1	99.9	1.0	96.9	2.0	85 ~ 110
B-N	0.2	87.0	0.9	94.0	0.9	91.5	0.7	95.1	0.8	91.7	1.3	85 ~ 110
	0.1	91.4	0.7	94.9	0.8	101.1	0.2	97.9	0.4	90.6	0.6	85 ~ 110
	0.02	105.5	1.6	105.0	1.4	91.2	0.3	105.3	1.3	91.5	3.7	85 ~ 110
Dd-N	3.0	97.2	0.5	96.3	1.8	97.4	1.0	96.4	0.8	96.8	0.5	85 ~ 110
	1.5	96.2	0.2	96.4	0.5	99.7	0.5	94.5	0.2	95.0	1.2	85 ~ 110
	0.3	99.2	1.3	96.1	0.9	100.6	0.3	90.2	0.5	88.9	0.6	85 ~ 110

a) Mass fraction

b) Mean recovery ($n=3$)

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of trueness (recovery) show in Testing Methods for Fertilizers (2016)

Table 2-1 Continue

Sample Content	Mock fertilizer of guanlyurea			Criteria of the trueness ^{d)} (%)
	Rec ^{b)}	RSD ^{c)}		
	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}	
G-N	3.7	91.2	1.3	85 ~ 110
	1.9	94.0	0.8	85 ~ 110
	0.4	100.0	0.8	85 ~ 110
GU-N	36.7	103.8	0.5	90 ~ 108
	35.2	104.6	0.8	90 ~ 108
	33.4	105.6	1.0	90 ~ 108

Table 2-2 Result of recovery test
(HAMILTON PRP-X200)

Sample Content	Acetaldehyde condensation Urea		Criteria of the trueness ^{d)} (%)	
	Rec ^{b)}	RSD ^{c)}		
	(%) ^{a)}	(%) ^{a)}		
U-N	6.0	101.0	1.9	85 ~ 110
	3.0	103.1	0.6	85 ~ 110
	0.6	86.8	0.5	85 ~ 110

a)~d) refer to the footnotes of Table 2-1

5) 併行精度及び中間精度

併行精度及び中間精度を確認するため、尿素性窒素、ビウレット性窒素及びジシアンジアミド性窒素を含有許容量前後となるよう添加した化成肥料、配合肥料及び家庭園芸用複合肥料と、硫酸グアニル尿素試薬にグアニジン硫酸塩試薬を添加した硫酸グアニル尿素模擬肥料の計 4 試料を調製した。更に、ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含有する化成肥料に尿素性窒素を含有許容量前後となるよう添加した試料を調製した。これらの試料を用いて 2 点併行で日を変えて 5 回試験した結果を Table 3-1 に示した。また、この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 3-2 に示した。なお、前者の試料の測定には Asahipak ES-502C 7C を、また、後者の試料の測定には HAMILTON PRP-X200 を用いて測定した。

その結果、各成分における窒素の平均値に対して、併行相対標準偏差は 0.5 %～1.1 %であり、中間相対標準偏差は 0.8 %～2.3 %であった。いずれの相対標準偏差も肥料等試験法⁸⁾に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安以内であったことから、十分な精度を有していることが確認された。

Table 3-1 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation

(% (Mass fraction))

Test day	U-N								Gd-N		GU-N	
	Mixed fertilizer		Compound fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer		Compound fertilizer ^{a)}		Compound fertilizer		Specify mixed fertilize	
1	6.27	6.30	3.07	3.03	0.31	0.31	3.07	3.06	1.84	1.85	37.31	36.88
2	6.21	6.16	2.95	2.97	0.30	0.31	3.02	3.03	1.83	1.85	37.34	37.32
3	6.27	6.21	2.99	3.04	0.32	0.32	3.14	3.14	1.77	1.80	37.09	36.90
4	6.27	6.28	2.99	3.06	0.32	0.32	3.10	3.12	1.82	1.81	37.18	36.74
5	6.20	6.26	2.98	3.03	0.32	0.32	3.13	3.18	1.77	1.76	36.46	37.03

a) Measurement using HAMILTON PRP-X200 as HPLC column

Table 3-1 Continue

Test day	B-N						Dd-N					
	Mixed fertilizer		Compound fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer		Mixed fertilizer		Compound fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer	
1	0.20	0.20	0.098	0.098	0.010	0.010	3.03	3.04	1.47	1.46	0.144	0.143
2	0.21	0.21	0.095	0.095	0.010	0.010	3.04	3.01	1.41	1.41	0.139	0.143
3	0.20	0.20	0.098	0.099	0.010	0.010	3.03	3.00	1.45	1.47	0.143	0.143
4	0.20	0.20	0.096	0.097	0.010	0.010	3.04	3.03	1.44	1.47	0.149	0.149
5	0.20	0.20	0.096	0.097	0.010	0.011	3.02	3.04	1.44	1.46	0.146	0.147

Table 3 Statistical analysis of repetition test result for evaluating precision

Ingredient	Sample	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
			s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%) ^{b)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)
U-N	Mixed fertilizer	6.24	0.03	0.5	4	0.05	0.8	6.5
	Compound fertilizer	3.01	0.0345	1.1	4	0.0407	1.4	6.5
	Home garden-use mixed fertilizer	0.315	0.003	1.0	4	0.005	1.7	6.5
	Compound fertilizer ⁱ⁾	3.10	0.0168	0.5	4	0.0558	1.8	6.5
B-N	Mixed fertilizer	0.204	0.001	0.3	4	0.002	0.9	6.5
	Compound fertilizer	0.097	0.001	0.7	4	0.002	1.6	6.5
	Home garden-use mixed fertilizer	0.0103	0.0001	0.9	4	0.0001	0.9	6.5
Dd-N	Mixed fertilizer	3.03	0.02	0.5	4	0.02	0.5	6.5
	Compound fertilizer	1.45	0.01	0.9	4	0.02	1.6	6.5
	Home garden-use mixed fertilizer	0.145	0.001	0.9	4	0.003	2.3	6.5
Gd-N	Mock fertilizer of guanlylurea	1.81	0.01	0.8	4	0.04	2.0	6.5
GU-N	Mock fertilizer of guanlylurea	37.0	0.3	0.7	4	0.3	0.8	6.5

a) $n=10$ (5 test days \times duplicate measurement)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability (repeatability relative standard deviation) shown in Testing Methods for Fertilizers

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate precision (Intermediate relative standard deviation) shown in Testing Methods for Fertilizers

i) Measurement using HAMILTON PRP-X200 as HPLC column

6) 検出下限及び定量下限の確認

混合標準溶液(各成分のNとして各1 mg/L)を測定して得られたクロマトグラム上のSN比より, 対象5成分の定量下限及び検出下限を推定した. 対象5成分を含有しない液状の家庭園芸用複合肥料に, 推定定量下限濃度相当を添加した試料を調製し, 3回分析して得られた分析値の平均値より回収率を求めた. 本法の定量下限はビウレット性窒素0.005%(質量分率), 尿素性窒素0.03%(質量分率), ジシアンジアミド性窒素0.01%(質量分率), グアニジン性窒素0.02%(質量分率), 及びグアニル尿素性窒素0.006%(質量分率)程度と推測された. なお, これらの定量下限は含有許容量の確認に十分な定量範囲を有した.

Table 4 Quantification lower limit and detection lower limit of each target component

Sample	Estimated value from chromatogram		Confirmation by recovery test			Criteria of the trueness ^{e)}
	<i>LOQ</i> ^{a)}	<i>LOD</i> ^{c)}	Content of material	Mean value ^{d)}	Mean recovery	
	(%) ^{b)}	(%) ^{b)}	(%) ^{b)}	(%) ^{b)}	(%) ^{b)}	(%) ^{b)}
(Asahipak ES-502C 7C)						
Urea nitrogen	0.026	0.0078	0.026	0.0266	102	80 ~ 115
Biuret nitrogen	0.005	0.0014	0.005	0.0046	98	70 ~ 120
Dicyandiamide nitrogen	0.009	0.0028	0.009	0.0087	94	70 ~ 120
Guanidine nitrogen	0.023	0.0069	0.023	0.0257	112	80 ~ 115
Guanylurea nitrate	0.006	0.0017	0.006	0.0061	107	70 ~ 120
(HAMILTON PRP-X200)						
Urea nitrogen	0.019	0.0057	0.019	0.0188	99	80 ~ 115

a) Lower limited of quantitation

b) Mass fraction

c) Lower limited of detection

d) $n=3$

e) Criteria of trueness (recovery) show in Testing Methods for Fertilizers

7) 流通肥料の測定

本法に従って前述の流通肥料 44 点(原材料として 94 種類を使用)を測定し、夾雑物による妨害、ベースラインの変動による影響等を調査した。Asahipak ES-502C 7C を使用した場合、ビウレット性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素については、定量を妨害する夾雑ピーク等の影響は確認されなかった(Fig. 5-1)。尿素性窒素は、ホルムアルデヒド加工尿素肥料及びそれを原料とする化成肥料等について、夾雑ピークにより測定できなかったが、HAMILTON PRP-X200 を用いることで測定できることを確認した(Fig. 5-2)。

このことから、複合肥料等中の使用した尿素又は硫酸グアニル尿素的含有量の確認並びに公定規格に定める有害成分及び制限事項の確認など、実際の肥料製品に対する品質管理並びに規格適合性の評価に十分使用できる分析法であると考えられた。

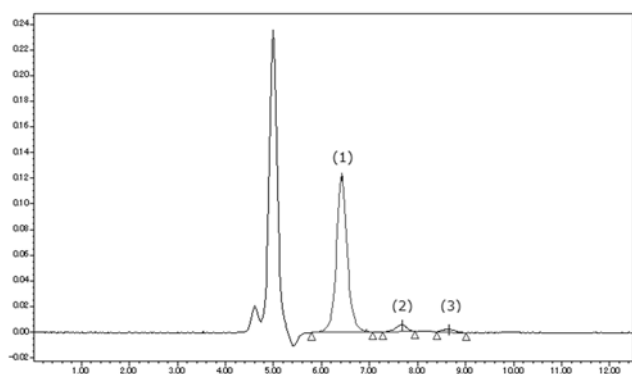


Fig.5-1 HPLC chromatogram of Compound fertilizer using Asahipak ES-502C 7C
(Peak1:U-N, Peak2:B-N, Peak3:Dd-N)

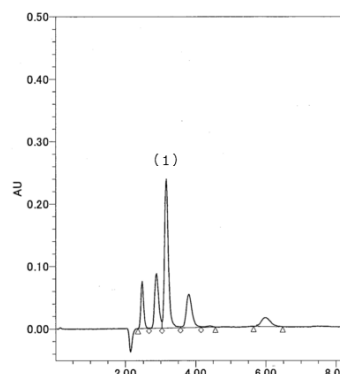


Fig.5-2 HPLC chromatogram of chemical fertilizer containing urea formaldehyde using HAMILTON PRP-X200
(Peak1:U-N)

4. まとめ

HPLC法による肥料中のビウレット性窒素、尿素性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の同時分析法について検討したところ、次のとおりの結果が得られた。

(1) HPLCカラムとして Asahipak ES-502C 7C を用い、移動相はりん酸緩衝液(KH_2PO_4 28.81 mol/L, H_3PO_4 1.19 mol/L) でクロマトグラムを作成したところ、尿素性窒素(U-N)、ビウレット性窒素(B-N)、ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、グアニジン性窒素(Gd-N)、グアニル尿素性窒素(GU-N)の順で十分に分離されたピークを得た。なお、ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む肥料の尿素性窒素は、先のカラムでは夾雑ピークと分離できなかったため、HPLCカラムとして HAMILTON PRP-X200 を用いて同移動相でクロマトグラムを作成したところ、十分に分離されたピークを得た。

(2) Asahipak ES-502C 7C を用いた場合の検量線は、ビウレット性窒素が 1 mg/L～50 mg/L までの濃度範囲、尿素性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素が 1 mg/L～200 mg/L の濃度範囲、グアニル尿素性窒素が 1 mg/L～100 mg/L までの範囲で直線性を示した。また、HAMILTON PRP-X200 を用いた場合の検量線は、尿素性窒素が 1 mg/L～160 mg/L までの濃度範囲で直線性を示した。

(3) 添加回収試験を行ったところ、尿素性窒素、ビウレット性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素、グアニル尿素性窒素の回収率は、86 %～105 %、87 %～105 %、88 %～100 %、91 %～100 %及び 103 %～105 %であり、いずれも肥料等試験法に示されている添加濃度における真度(回収率)の目標以内であった。

(4) 本法の併行精度及び中間精度を確認したところ、肥料等試験法に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安内であった。

(5) 定量下限等の確認を行った結果、本法における尿素性窒素、ビウレット性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素、グアニル尿素性窒素の定量下限は、0.03 %、0.005 %、0.009 %、0.02 %及び 0.006 %程度と推測された。また、各測定項目の定量下限相当を添加した試料により添加回収試験を行ったところ、尿素性窒素、ビウレット性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の回収率は、それぞれ 102 %、98 %、94 %、112 %及び 107 %であり、いずれも肥料等試験法に示される添加濃度における真度(回収率)の目標範囲であった。

(6) 本法に従って流通肥料 44 点を測定したところ、夾雑成分由来の妨害ピーク及びベースラインの変動は認められなかった。

以上のことから、本法はビウレット性窒素、尿素性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の一斉分析法として、十分な性能を有していることが確認された。

参考文献

- 1) 安田環, 越野正義: 環境保全と新しい施肥技術, 養賢堂, 東京 (2001)
- 2) 植物栄養・肥料の辞典編集委員会: 植物栄養・肥料の辞典, 朝倉書店, 東京 (2002)
- 3) ポケット肥料要覧 2015/2016 年, 農林統計協会, p.137, 東京 (2017)
- 4) 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 27 年 1 月 9 日, 農林水産省告示第 52 号 (2015)
- 5) 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)
- 6) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.87~93, 養賢堂, 東京 (1988)

- 7) 伊藤浩平, 木村康晴, 長谷川正憲, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ法を用いた肥料中の亜硝酸およびチオシアン酸塩の同時定量
- 8) 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 (2015)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2015.pdf>

Determination of Urea Nitrogen, Biuret Nitrogen, Dicyandiamide Nitrogen, Guanidine Nitrogen and Guanyl urea Nitrogen in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography: A Single-Laboratory Validation

Masahiro ECHI¹, Yasuharu KIMURA² and Yuji SHIRAI³

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now) Fertilizer and Feed Inspection Department

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

A HPLC method for simultaneous determination of urea nitrogen (U-N), biuret nitrogen (B-N), dicyandiamide nitrogen (Dd-N), guanidine nitrogen (G-N) and guanyl urea nitrogen (GU-N) in fertilizer was developed and validated as a single-laboratory validation. Samples were extracted by shaking and diluted with water. After centrifugation, sample solution was analyzed by HPLC, on cation exchanged column with UV detection at 190 nm. As a result of 3 replicate analysis of 6 fertilizer samples spiked with U-N, B-N, Dd-N, Gd-N and GU-N each, the mean recoveries were 86 % ~ 105 %, 87 % ~ 105 %, 88 % ~ 100 %, 91 % ~ 100 % and 103 % ~ 105 %, respectively. Repeatability standard deviation of U-N, B-N, Dd-N, Gd-N and GU-N were 0.5 % ~ 1.1 %, 0.3 % ~ 0.9 %, 0.5 % ~ 0.9 %, 0.8 % and 0.7 % respectively. Intermediate relative standard deviations of there were 0.8 % ~ 1.8 %, 0.9 % ~ 1.6 %, 0.5 % ~ 2.3 %, 2.0 % and 0.8 %, respectively. The limits of quantification of there were 0.026 %, 0.005 %, 0.009 %, 0.023 %, 0.006 %, respectively. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of U-N, Bd-N, Dd-N, G-N and GU-N in a fertilizer.

Key words urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen, guanyl urea nitrogen

(Research Report of Fertilizer, **10**, 72~85, 2017)

6-2 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定

—共同試験成績—

船木紀夫¹, 木村康晴¹

キーワード 高速液体クロマトグラフィー, 尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素, グアニル尿素性窒素

1. はじめに

ビウレットは尿素肥料を高温下における粒状化工程等で生成されるが¹⁾, 葉面散布時に植害が生じる恐れがあるため²⁾, 肥料取締法の公定規格³⁾において, ビウレット性窒素として含有を許される最大量が規定されている。また, 尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素, 及びグアニジン性窒素についても, 肥料取締法の公定規格³⁾において, 含有量を許される最大量が規定されている。

肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素(以下「ビウレット性窒素等」という。)の分析法として, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法が恵智らによって検討され, 真度, 併行精度, 定量下限等の検討を行った結果, 単一試験室内における試験方法の妥当性が確認された⁴⁾。

今回, HPLC 法による肥料中のビウレット性窒素等の測定の性能評価のため, 共通試料を用いて, 試験室間の再現精度を調査したので, その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料

ビウレット性窒素等を含まないことを確認した化成肥料を目開き 500 μm のふるいを通すまで粉砕したものに, 尿素、ビウレット、ジシアンジアミド、グアニジン及びグアニル尿素有の各試薬を 4 通りの比率で混合, 55 $^{\circ}\text{C}$ 通風乾燥及び粉砕することで, ビウレット性窒素等を含む 4 種類の化成肥料試料を調製した。別途, 尿素及びビウレット, グアニジン及びグアニル尿素有をそれぞれ乳鉢で混合することで, 尿素肥料試料及びグアニル尿素肥料試料を調製した。これらの共同試験用試料を約 1.3 g ずつアルミラミネート袋に密封して, それぞれ 75 個を調製した。ブラインド試料を提供するため, 共同試験用試料に乱数を付し, 参加試験室に配付した。

2) 装置及び器具

各試験室に設置している高速液体クロマトグラフ, 遠心分離機及び高速遠心分離機を使用した。

3) ビウレット性窒素等の測定

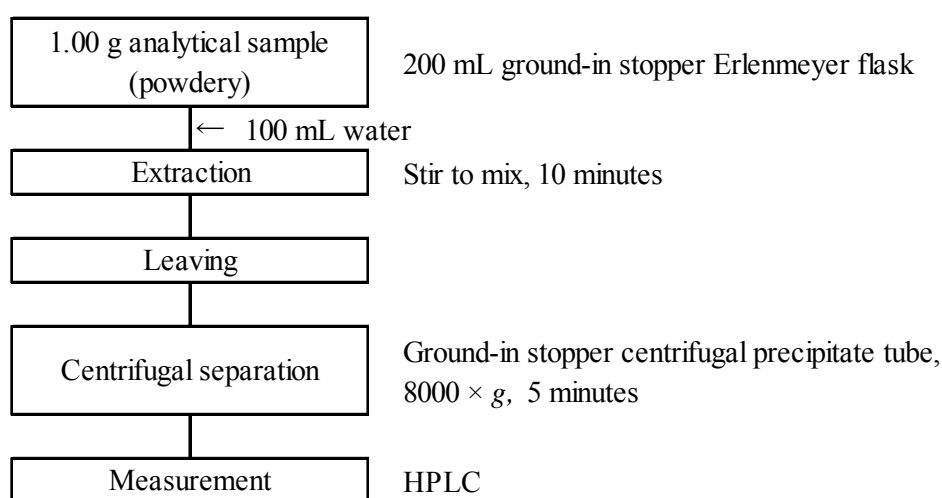
¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

(1) 抽出

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, 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, 抽出液とした。

(2) 測定

各抽出液を 1.5 mL の共栓遠心沈殿管にとり, 8000×g で約 5 分間遠心分離した上澄み液または, 親水性 PTFE メンブランフィルターを用いてろ過した溶液を HPLC 測定用試料溶液とした (Scheme 1)。その試料溶液を高速液体クロマトグラフに供し, Table 1 の測定条件で測定し, ピーク高さから試料溶液中のビウレット性窒素等の量を求め, 分析試料中の濃度を算出した。測定に当たっては, 各試験室の高速液体クロマトグラフの操作方法に従った。



Scheme 1 Flow sheet for urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen in fertilizers

Table 1 HPLC Conditions

HPLC	Waters 2695 Separation module
Detector system	2996 photo diode array detector
Wavelength	190 nm
Column	(1) Asahipak ES-502C 7C (100 mm L×7.5 mm I.D. 9 μm particle size) (2) HAMILTON PRP-X200 (150 mm L×4.1 mm I.D. 10 μm particle size)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	Phosphate buffer (KH ₂ PO ₄ 28.81 mmol/L, H ₃ PO ₄ 1.19 mmol/L)
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	10 μL
Measurement time	20 min

4) 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⁵⁾の均質性試験に従い, 各系列の共同試験用試料からそれぞれ 20 試料を抜き取り, 2 試料ずつを混合したもの (10 試料) を, それぞれ 2 点併行で 3) に従って分析した。

5) 共同試験

試験に参加した 12 試験室と使用した高速液体クロマトグラフは以下のとおりであり、それぞれの試験室において送付した 12 試料について、3)に従って分析した。

- ・ エムシー・ファーティコム株式会社いわき工場(日本分光 UV-2075, PU-2080, CO-2060)
 - ・ エムシー・ファーティコム株式会社つくば開発センター(島津製作所 LC-10AD VP, SPD-10A, CTO-10A VP)
 - ・ 株式会社島津製作所(島津製作所 Prominence)
 - ・ 昭和電工株式会社(島津製作所 Prominence-i)
 - ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所(島津製作所 LD-20AD, SPD-20AD)
 - ・ 公益財団法人日本肥糧検定協会(島津製作所 LC-20AD, SPD-20A, CTO-20A)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター(Waters 2695 Series)
 - ・ 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(島津製作所 LC-10AD VP, SPD-10AV VP, CTO-10A VP)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター(日本分光 ChromNAV Series)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター(Waters 1515 Isocratic HPLC Pump, 2487 Duel λ)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター(Agilent technologies 1100 Series)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部(Waters e2695 Series)
- (50 音順)

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)及び併行精度を含む試料間相対標準偏差(RSD_{b+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精度(併行相対標準偏差及び中間相対標準偏差)の目安の 1.5 倍以内であり、 F 値が F 限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⁵⁾。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 2-1 Homogeneity test results of urea nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j,k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	0.320	0.003	0.9	0	0.003	0.9	4	0.89
Compound fertilizer 2	9(1)	0.614	0.017	2.8	0.010	0.020	3.2	4	1.63
Compound fertilizer 3	10(0)	3.37	0.02	0.7	0	0.02	0.7	4	0.62
Compound fertilizer 4	10(0)	6.48	0.06	1.0	0.06	0.09	1.4	4	2.65
Urea fertilizer	10(0)	48.6	0.8	1.7	0	0.8	1.7	4	0.50

a) The Number of samples used for analysis; (): The number of outliers

b) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retained after outlier removed ($n =$ The number of laboratories (p) \times The number of repetition (2))

e) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Relative standard deviation of repeatability

f) Standard deviation of sample-to-sample

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

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

i) The aim of Relative standard deviation of repeatability for Testing Methods For Fertilizers F value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

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

k) F critical value: F (9,10:0.05)=3.02

F critical value: F (8,9:0.05)=3.23

Table 2-2 Homogeneity test results of biuret nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j,k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	0.00959	0.00023	2.4	0	0.00023	2.4	6	0.52
Compound fertilizer 2	9(1)	0.0198	0.0006	2.9	0.0003	0.0007	3.4	4	1.73
Compound fertilizer 3	9(1)	0.102	0.005	4.9	0.003	0.006	6.0	4	1.95
Compound fertilizer 4	10(0)	0.207	0.010	5.1	0	0.010	5.1	4	0.80
Urea fertilizer	9(1)	0.853	0.028	3.3	0.023	0.036	4.2	4	2.33

a) ~ k) Refer to the footnote of Table 2-1

Table 2-3 Homogeneity test results of dicyandiamide nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j,k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	0.00959	0.00023	2.4	0	0.00023	2.4	6	0.52
Compound fertilizer 2	9(1)	0.0198	0.0006	2.9	0.0003	0.0007	3.4	4	1.73
Compound fertilizer 3	9(1)	0.102	0.005	4.9	0.003	0.006	6.0	4	1.95
Compound fertilizer 4	10(0)	0.207	0.010	5.1	0	0.010	5.1	4	0.80
Urea fertilizer	9(1)	0.853	0.028	3.3	0.023	0.036	4.2	4	2.33

a) ~ k) Refer to the footnote of Table 2-1

Table 2-4 Homogeneity test results of guanidine nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j)k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	4.98	0.04	0.9	0.02	0.05	1.0	4	1.61
Compound fertilizer 2	10(0)	3.76	0.22	5.8	0.06	0.23	6.0	4	1.13
Compound fertilizer 3	10(0)	3.08	0.06	2.0	0.02	0.06	2.1	4	1.20
Compound fertilizer 4	10(0)	2.06	0.01	0.7	0	0.01	0.7	4	2.03
Guanyl urea fertilizer	10(0)	5.12	0.13	2.6	0.13	0.19	3.7	4	2.90

a) ~ k) Refer to the footnote of Table 2-1

Table 2-5 Homogeneity test results of guanyl urea nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j)k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	2.13	0.02	0.9	0.01	0.02	1.0	4	1.59
Compound fertilizer 2	9(1)	3.97	0.16	4.0	0.09	0.18	4.6	4	1.65
Compound fertilizer 3	10(0)	5.82	0.06	1.1	0.04	0.07	1.2	4	1.66
Compound fertilizer 4	10(0)	7.56	0.06	0.8	0	0.06	0.8	4	0.83
Guanyl urea fertilizer	10(0)	32.0	0.7	2.2	0.2	0.7	2.3	4	1.15

a) ~ k) Refer to the footnote of Table 2-1

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^{7, 8)}に従って統計処理した。最初に、不検出と報告された試験成績を除外してから、残りの試験成績の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、12 試験室の試験成績のうち、尿素性窒素については 5 種類の試料のうち、1 種類の試料で 4 試験室及び 4 種類の試料で各 2 試験室の報告値が、ビウレット性窒素については 5 種類の試料のうち、1 種類の試料で 3 試験室、1 種類の試料で 2 試験室及び 1 種類の試料で 1 試験室の報告値が、ジシアンジアミド性窒素については 4 種類の試料のうち、2 種類の試料で 2 試験室の報告値が、グアニジン性窒素については 5 種類の試料のうち、3 種類の試料で 1 試験室の報告値が、グアニル尿素性窒素については 5 種類の試料のうち、2 種類の試料で 2 試験室の報告値が、それぞれ不検出による除外値または外れ値となった。

Table 3-1 Individual result of urea nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	N.D. ^{d)}	0.251 ^{d)}	0.606	0.583	3.18	3.22
B	0.290	0.299	0.591	0.589	3.05	3.07
C	0.296	0.295	0.589	0.592	2.99	3.00
D	0.303	0.301	0.557	0.620	3.10	3.06
E	0.129 ^{b)}	0.0369 ^{b)}	0.251 ^{c)}	0.353 ^{c)}	3.11	3.09
F	0.308	0.311	0.610	0.611	3.05	3.09
G	0.295	0.296	0.590	0.588	3.03	3.00
H	0.315 ^{b)}	0.0683 ^{b)}	0.611	0.619	3.11	3.07
I	0.307	0.276	0.541	0.534	2.81 ^{c)}	2.80 ^{c)}
J	0.291	0.263	0.638 ^{b)}	0.495 ^{b)}	2.51 ^{c)}	2.57 ^{c)}
K	N.D. ^{d)}	0.298 ^{d)}	0.575	0.575	3.08	2.98
L	0.298	0.300	0.596	0.598	3.07	3.15
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4		Urea fertilizer			
A	6.43	6.37	47.5	46.0		
B	5.61	5.90	46.0	46.1		
C	6.07	6.00	45.0	45.0		
D	5.84	6.12	46.7	45.5		
E	5.52 ^{b)}	4.68 ^{b)}	46.8	46.8		
F	6.02	6.21	44.2	46.1		
G	6.03	6.02	45.4	45.6		
H	6.21	6.29	48.5	48.5		
I	5.83	5.83	48.1	49.0		
J	4.84 ^{c)}	4.37 ^{c)}	47.5 ^{b)}	34.1 ^{b)}		
K	5.93	6.02	40.7 ^{b)}	49.6 ^{b)}		
L	5.91	5.91	46.2	46.4		

a) Laboratory identification

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Grubbs test

d) Outlier of No detection

Table 3-2 Individual result of biuret nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	0.217 ^{b)}	0.00689 ^{b)}	0.0189	0.0190	0.115	0.0944
B	0.00931	0.00979	0.0202	0.0201	0.104	0.109
C	0.00961	0.00973	0.0201	0.0205	0.0916	0.0979
D	0.00915	0.00952	0.0202	0.0203	0.114	0.125
E	0.00976	0.00980	0.0200	0.0203	0.109	0.108
F	0.00923	0.00933	0.0190	0.0190	0.118	0.157
G	0.00960	0.0100	0.0202	0.0202	0.120	0.122
H	0.00978	0.00991	0.0203	0.0216	0.107	0.109
I	0.0178 ^{b)}	0.0187 ^{b)}	0.0592 ^{b)}	0.0336 ^{b)}	0.137	0.144
J	0.0102	0.00918	0.0192 ^{b)}	0.0163 ^{b)}	0.0767	0.110
K	0.0216 ^{d)}	N.D. ^{d)}	0.0206	0.0206	0.117	0.114
L	0.00981	0.00970	0.0204	0.0204	0.101	0.132
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4		Urea fertilizer			
A	0.233	0.192	0.765	0.802		
B	0.167	0.201	0.832	0.846		
C	0.180	0.192	0.879	0.896		
D	0.347 ^{b)}	0.215 ^{b)}	0.910	0.949		
E	0.219	0.218	0.805	0.794		
F	0.245	0.199	0.863	0.918		
G	0.216	0.222	0.897	0.962		
H	0.208	0.204	0.899	0.842		
I	0.143	0.222	0.392	0.402		
J	0.146	0.170	0.748	0.536		
K	0.208	0.199	0.956	0.841		
L	0.222	0.223	0.516	0.614		

a)~d) Refer to the footnote of Table 3-1

Table 3-3 Individual result of dicyandiamide nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	0.0315	0.0296	0.224	0.217	1.83	1.82
B	0.0342	0.0386	0.177	0.184	1.56	1.59
C	0.0379	0.0393	0.186	0.180	1.63	1.61
D	0.0489	0.0498	0.221	0.220	1.72	1.74
E	0.0266	0.0262	0.142	0.165	1.53	1.50
F	0.0580	0.0560	0.227	0.231	1.77	1.77
G	0.0332	0.0372	0.182	0.180	1.69	1.63
H	0.0641	0.0649	0.241	0.255	1.80	1.79
I	0.0302 ^{b)}	0.0148 ^{b)}	0.190	0.167	1.57	1.71
J	0.0662	0.0587	0.221	0.186	1.55	1.55
K	0.0203 ^{b)}	0.0590 ^{b)}	0.227	0.232	1.75	1.72
L	0.0650	0.0629	0.246	0.246	1.94	1.78
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4					
A	2.93	2.99				
B	2.25 ^{b)}	2.76 ^{b)}				
C	2.68	2.72				
D	2.68	2.77				
E	2.59	2.64				
F	2.73	2.72				
G	2.56	2.68				
H	2.81	2.76				
I	2.68	2.84				
J	2.32 ^{c)}	2.07 ^{c)}				
K	2.93	2.77				
L	2.95	2.82				

a)~d) Refer to the footnote of Table 3-1

Table 3-4 Individual result of guanidine nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	5.24	5.25	4.09	4.00	3.31	3.29
B	4.72	4.86	3.96	3.94	3.05	2.99
C	4.87	4.86	3.90	3.95	2.95	2.97
D	5.65	5.16	4.17	4.35	3.14	3.27
E	4.91	4.76	3.88	3.82	2.94	2.97
F	4.98	5.02	4.01	3.99	2.97	3.05
G	4.84	4.85	3.90	3.92	3.04	3.03
H	4.95	4.99	3.94	3.94	3.04	2.96
I	5.28	4.83	3.92	3.92	3.11	3.07
J	4.15	4.68	3.63	3.14	2.45 ^{c)}	2.47 ^{c)}
K	4.67	4.66	3.66	3.76	3.12	2.95
L	4.85	4.92	4.05	4.64	3.09	2.95
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4		Guanyl urea fertilizer			
A	2.18	2.16	5.45	5.03		
B	1.81	2.00	5.16	4.86		
C	2.02	2.02	5.11	5.21		
D	2.20	2.15	5.22	5.15		
E	1.99	1.98	4.83	5.05		
F	2.06	2.08	5.47	5.11		
G	2.01	2.02	5.40	4.82		
H	2.02	2.04	5.05	4.96		
I	2.05	1.98	5.27	5.21		
J	1.62 ^{c)}	1.41 ^{c)}	4.32 ^{c)}	4.52 ^{c)}		
K	2.08	1.99	5.19	4.89		
L	2.03	2.12	5.06	5.28		

a)~d) Refer to the footnote of Table 3-1

Table 3-5 Individual result of guanyl urea nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	2.56	2.35	4.46	4.39	6.36	6.19
B	1.97	2.21	4.37	4.21	5.96	5.92
C	2.17	2.18	4.30	4.34	5.68	5.77
D	2.48	2.45	4.68	4.88	6.75	6.59
E	2.23	2.20	4.41	4.45	6.14	6.02
F	2.20	2.26	4.53	4.48	5.13 ^{b)}	5.93 ^{b)}
G	2.19	2.20	4.31	4.32	5.94	5.90
H	2.14	2.15	4.30	4.26	5.71	5.78
I	2.41	2.21	4.42	4.41	6.14	6.08
J	1.82	2.06	3.95 ^{b)}	3.43 ^{b)}	4.64	4.74
K	2.01	2.02	3.97	4.08	5.73	5.55
L	2.17	2.20	4.34	4.41	5.28	5.44
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4		Guanyl urea fertilizer			
A	8.13	8.15	32.4	32.3		
B	6.11	7.61	30.8	31.3		
C	7.57	7.43	30.0	29.8		
D	8.61	8.49	29.3	28.7		
E	7.75	7.75	30.3	30.1		
F	6.37	7.59	29.8	29.4		
G	7.67	7.61	30.3	30.6		
H	7.64	7.61	30.2	29.4		
I	7.84	7.77	31.3	30.1		
J	6.04	5.29	29.4	28.4		
K	7.45	7.37	30.4	29.6		
L	7.24	7.31	31.8	31.7		

a)~d) Refer to the footnote of Table 3-1

3) 併行精度及び室間再現精度

不検出のデータ, 並びに Cochran の検定及び Grubbs の検定による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_f) 及び併行相対標準偏差 (RSD_f), 並びに室間再現標準偏差 (s_R) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を Table 4 に示した.

4 種類の化成肥料試料における尿素性窒素の平均値は 0.296 % (質量分率) ~ 6.03 % (質量分率) であり, その s_f は 0.011 % (質量分率) ~ 0.11 % (質量分率), RSD_f は 1.1 % ~ 3.6 %, s_R は 0.012 % (質量分率) ~ 0.20 % (質量分率), RSD_R は 2.0 % ~ 4.1 % であった. 尿素肥料試料における尿素性窒素の平均値は 46.5 % (質量分率) であり, その s_f は 0.6 % (質量分率), RSD_f は 1.4 %, s_R は 1.3 % (質量分率), RSD_R は 2.8 % であった.

4 種類の化成肥料試料におけるビウレット性窒素の平均値は 0.00963 % (質量分率) ~ 0.212 % (質量分率) であり, その s_f は 0.00030 % (質量分率) ~ 0.017 % (質量分率), RSD_f は 1.6 % ~ 11.7 %, s_R は 0.00029 % (質量分率) ~ 0.026 % (質量分率), RSD_R は 3.1 % ~ 15.3 % であった. 尿素肥料試料におけるビウレット性窒素の平均値

は 0.832 % (質量分率) であり, その s_r は 0.050% (質量分率), RSD_r は 6.0 %, s_R は 0.086 % (質量分率), RSD_R は 10.3 % であった.

4 種類の化成肥料試料におけるジシアンジアミド性窒素の平均値は 0.0464 % (質量分率) ~ 2.76 % (質量分率) であり, その s_r は 0.0023 % (質量分率) ~ 0.07 % (質量分率), RSD_r は 2.6 % ~ 5.1 %, s_R は 0.0148 % (質量分率) ~ 0.12 % (質量分率), RSD_R は 4.4 % ~ 31.9 % であった.

4 種類の化成肥料試料におけるグアニジン性窒素の平均値は 2.05 % (質量分率) ~ 4.91 % (質量分率) であり, その s_r は 0.05 % (質量分率) ~ 0.18 % (質量分率), RSD_r は 2.0 % ~ 4.2 %, s_R は 0.09 % ~ 0.29 % (質量分率), RSD_R は 4.0 % ~ 6.8 % であった. グアニル尿素肥料試料における平均値は 5.13 % (質量分率) であり, その s_r は 0.21 % (質量分率), RSD_r は 4.0 %, s_R は 0.19 % (質量分率), RSD_R は 3.6 % であった.

4 種類の化成肥料試料におけるグアニル尿素性窒素の平均値は 2.20 % (質量分率) ~ 7.43 % (質量分率) であり, その s_r は 0.07 % (質量分率) ~ 0.43 % (質量分率), RSD_r は 1.4 % ~ 5.7 %, s_R は 0.17 % (質量分率) ~ 0.78 % (質量分率), RSD_R は 4.3 % ~ 10.5 % であった. グアニル尿素肥料試料における平均値は 30.3 % (質量分率) であり, その s_r は 0.4 % (質量分率), RSD_r は 1.5 %, s_R は 1.1 % (質量分率), RSD_R は 3.6 % であった.

尿素性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素については, 今回配布した全ての試料において, 併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が肥料等試験法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 1.5 倍を下回った.

ビウレット性窒素については, 2 種類の化成肥料試料 (平均値 0.114 % (質量分率) ~ 0.212 % (質量分率)) において, 併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が, 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 1.5 倍を上回った. なお, 他の 2 種類の化成肥料試料 (平均値 0.00963 % (質量分率) ~ 0.0201 % (質量分率)) 及び尿素肥料 (平均値 0.832 % (質量分率)) においては, 目安の 1.5 倍を下回った.

ジシアンジアミド性窒素については, 2 種類の化成肥料試料 (平均値 0.0464 % (質量分率) ~ 0.206 % (質量分率)) において, 併行相対標準偏差が, 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 1.5 倍を下回ったが, 室間再現相対標準偏差については, 目安の 1.5 倍を上回った. なお, 他の 2 種類の化成肥料試料 (平均値 1.69 % (質量分率) ~ 2.76 % (質量分率)) については, 併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差ともに, 目安の 1.5 倍を下回った.

以上のことから, 本法の精度は尿素性窒素及びグアニジン性窒素について, 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. また, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素及びグアニル尿素性窒素については, 一部の濃度範囲で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 4-1 Statistical analysis of Collaborative study results for urea nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	8(2)	0.296	0.011	3.6	4	0.012	4.1	8
Compound fertilizer 2	10(2)	0.589	0.015	2.6	4	0.024	4.1	8
Compound fertilizer 3	10(2)	3.08	0.04	1.1	4	0.06	2.0	8
Compound fertilizer 4	10(2)	6.03	0.11	1.7	4	0.20	3.4	8
Urea fertilizer	10(2)	46.5	0.6	1.4	4	1.3	2.8	8

a) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier removed and (q) =number of outliers

b) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retained after outlier removed (n = The number of laboratories (p) × The number of repetition (2))

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Relative standard deviation of repeatability

f) Rough standard of relative standard deviation of repeatability in Testing Methods for Fertilizers 2016

g) Standard deviation of reproducibility

h) Relative standard deviation of reproducibility

i) Rough standard of relative deviation of reproducibility in Testing Methods for Fertilizers 2016

Table 4-2 Statistical analysis of Collaborative study results for biuret nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	9(2)	0.00963	0.00030	3.1	6	0.00029	3.1	11
Compound fertilizer 2	10(2)	0.0201	0.0003	1.6	4	0.0007	3.4	8
Compound fertilizer 3	12(0)	0.114	0.013	11.7	4	0.017	15.3	8
Compound fertilizer 4	11(1)	0.212	0.017	7.8	4	0.026	12.4	8
Urea fertilizer	12(0)	0.832	0.050	6.0	4	0.086	10.3	8

a) ~ i) Refer to the footnote of Table 4-1

Table 4-3 Statistical analysis of Collaborative study results for dicyandiamido nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	10(2)	0.0464	0.0023	5.0	4	0.0148	31.9	8
Compound fertilizer 2	12(0)	0.206	0.011	5.1	4	0.031	15.2	8
Compound fertilizer 3	12(0)	1.69	0.05	2.8	4	0.12	7.0	8
Compound fertilizer 4	10(2)	2.76	0.07	2.6	4	0.12	4.4	8

a) ~ i) Refer to the footnote of Table 4-1

Table 4-4 Statistical analysis of Collaborative study results for guanidine nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	12(0)	4.91	0.18	3.7	4	0.29	5.8	8
Compound fertilizer 2	12(0)	3.94	0.16	4.2	4	0.27	6.8	8
Compound fertilizer 3	11(1)	3.03	0.06	2.0	4	0.12	4.0	8
Compound fertilizer 4	11(1)	2.05	0.05	2.6	4	0.09	4.2	8
Guanyl urea fertilizer	11(1)	5.13	0.21	4.0	4	0.19	3.6	8

a) ~ i) Refer to the footnote of Table 4-1

Table 4-5 Statistical analysis of Collaborative study results for guanyl urea nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	12(0)	2.20	0.09	4.2	4	0.17	7.7	8
Compound fertilizer 2	11(1)	4.38	0.07	1.5	4	0.19	4.3	8
Compound fertilizer 3	11(1)	5.83	0.08	1.4	4	0.52	8.9	8
Compound fertilizer 4	12(0)	7.43	0.43	5.7	4	0.78	10.5	8
Guanyl urea fertilizer	12(0)	30.3	0.4	1.5	4	1.1	3.6	8

a) ~ i) Refer to the footnote of Table 4-1

4. まとめ

12試験室において6種類(12点)の化成肥料試料, 尿素肥料試料及びグアニル尿素肥料を用いて共同試験を実施し, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中のビウレット性窒素等測定の評価を行ったところ, 次の結果を得た.

(1) 尿素性窒素は平均値 0.296 % (質量分率) ~ 46.5 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 2.0 % ~ 4.1 % であった.

(2) ビウレット性窒素は平均値 0.00963 % (質量分率) ~ 0.0201 % (質量分率) の範囲及び 0.832 % (質量分率) において, その室間再現精度 (RSD_R) は 3.1 % ~ 10.3 % であった.

(3) ジシアンジアミド性窒素は平均値 1.69 % (質量分率) ~ 2.76 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 4.4 % ~ 7.0 % であった.

(4) グアニジン性窒素は平均値 2.05 % (質量分率) ~ 5.13 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 3.6 % ~ 6.8 % であった.

(5) グアニル尿素性窒素は平均値 2.20 % (質量分率) ~ 30.3 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 3.6 % ~ 10.5 % であった.

(6) ビウレット性窒素等5成分は, それぞれ(1) ~ (5)に示した濃度範囲において, いずれの室間再現精度も肥料等試験法に示されている併行精度及び室間再現精度の目安の1.5倍以内であり, 本法が肥料等試験法の要求する精度に適合していることを確認した.

(7) ビウレット性窒素は平均値 0.114 % (質量分率) ~ 0.212 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 12.4 % ~ 15.8 % であった.

- (8). ジシアンジアミド性窒素は平均値 0.0464 % (質量分率) ~ 0.206 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 15.2 ~ 31.9 % であった
- (9) ビウレット性窒素及びジシアンジアミド性窒素は, それぞれ (7) ~ (8) に示した濃度範囲において, いずれの室間再現精度も肥料等試験法に示されている併行精度及び室間再現精度の目安の 1.5 倍を上回り, 肥料等試験法の要求する精度に適合しなかった.

謝 辞

共同試験にご協力頂きました, エムシー・ファーティコム株式会社いわき工場, 同社つくば開発センター, 株式会社島津製作所, 昭和電工株式会社, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 公益財団法人日本肥糧検定協会の各位に謝意を示します.

文 献

- 1) 植物栄養・肥料の辞典編集委員会: 植物栄養・肥料の辞典, 朝倉書店, 東京 (2002)
- 2) ポケット肥料要覧: 農林統計協会, 東京 (2015)
- 3) 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 28 年 1 月 8 日, 農林水産省告示第 413 号 (2016)
- 4) 恵智正宏, 木村康晴, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 ー単一試験室の妥当性確認ー, 肥料研究報告, **10**, 72~85 (2017)
- 5) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78** (1), 145~196 (2006)
- 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 (2016)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2016.pdf >
- 7) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 8) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

Determination of Urea Nitrogen, Biuret Nitrogen, Dicyandiamide Nitrogen, Guanidine Nitrogen and Guanyl urea Nitrogen in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Collaborative Study

Norio FUNAKI¹ and Yasuharu KIMURA¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

A collaborative study was conducted to evaluate high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen in fertilizers. The urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen were extracted with water. The extract was centrifuged. The urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen were analyzed by HPLC on cation exchanged column with UV detection at 190 nm. We sent twelve collaborators 6 materials in a blind duplicate design. After identification of outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of urea nitrogen were reported 0.296 % ~ 46.5 % as a mass fraction and 2.0 % ~ 4.1 %, respectively. Those of determination of biuret nitrogen were reported 0.00963 % ~ 0.201 % and 0.832 % as a mass fraction and 3.1 % ~ 10.3 %, respectively. Those of determination of dicyandiamide nitrogen were reported 1.69 % ~ 2.76 % as a mass fraction and 4.4 % ~ 7.0 %, respectively. Those of determination of guanidine nitrogen were reported 2.05 % ~ 5.13 % as a mass fraction and 3.6 % ~ 6.8 %, respectively. Those of determination of guanyl urea nitrogen were reported 2.20 % ~ 30.3 % as a mass fraction and 3.6 % ~ 10.5 %, respectively. These results indicated that this method has acceptable precision for determination of urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen in these concentration ranges. The mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of biuret nitrogen were reported 0.114 % ~ 0.212 % as a mass fraction and 12.4 % ~ 15.3 %, respectively. Those of determination of dicyandiamide nitrogen were reported 0.00464 % ~ 0.206 % as a mass fraction and 15.2 % ~ 31.9 %, respectively. These results indicated that this method has unacceptable precision for determination of biuret nitrogen and dicyandiamide nitrogen in these concentration ranges.

Key words urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen, guanyl urea nitrogen

(Research Report of Fertilizer, **10**, 86~100, 2017)

7 カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における汚泥肥料連用の影響(続報)

— 2015年冬作・2016年夏作 —

八木寿治¹, 鈴木時也², 田中雄大¹, 阿部文浩¹, 橋本良美¹, 田丸直子¹, 阿部進³

キーワード 汚泥肥料, 連用試験, カドミウム

1. はじめに

肥料の公定規格¹⁾では汚泥肥料中の含有を許されるカドミウムの最大量(以下, 「含有許容値」という.) は 0.0005 %と定められており, 汚泥肥料はこの範囲内において流通, 施用されている. 一方, 汚泥肥料の施用により土壌に負荷された重金属が蓄積し, 更に長期に施用すると土壌の保持力を超えて農作物へ移行し, 人畜に有害な農作物が生産されることが懸念されている. 2009年3月に農林水産省から発表された「汚泥肥料の規制のあり方に関する懇談会報告書」²⁾において, 「3 将来実施することが必要な調査研究課題」として, カドミウム含有許容値の科学的知見を集積するため, 「汚泥肥料の連用により通常に比べカドミウムの蓄積が進んでいる土壌を活用し, カドミウムを吸収しやすい農作物を栽培し, 植物への吸収の有無, 程度を調べる必要がある」と記載された. このことから, 肥料の有効性及び安全の確保に必要な課題に関する調査研究として, 汚泥肥料の連用施用試験を実施し, カドミウムの土壌への蓄積及び作物体の吸収量を確認する.

2009年夏作から2015年夏作にかけては, 汚泥肥料を施用した区及び施用していない区の2試験区を設け, ニンジン, ホウレンソウ, ホウレンソウ, チンゲンサイ, カブ, ホウレンソウ, 以後ニンジン, ホウレンソウの繰返しの順で栽培し, 土壌中のカドミウム濃度の変化及び作物体のカドミウム吸収量を確認した. その結果は既に肥料研究報告第8号³⁾及び9号⁴⁾で報告した. 2015年冬作及び2016年夏作においても栽培試験を実施したのでその結果を報告する.

2. 材料及び方法

1) 2015年冬作の連用試験(2015年11月9日~2016年3月15日)

(1) 試験圃場及び供試土壌

本試験は当センター岩槻圃場(埼玉県さいたま市)で実施した. 試験は, 汚泥肥料の施用履歴がある土壌(汚泥肥料施用区)と施用履歴がない土壌(標準区)を供試土壌とし, 2試験区2反復とした. 土壌の種類, 土性, 前作跡地のpH, EC(電気伝導率), 有効態リン酸, 全窒素, 全炭素及び0.1 mol/L 塩酸可溶カドミウム(以下, 0.1 mol/L HCl-Cd)をTable 1に示した.

(2) 供試肥料等

施用する汚泥肥料はし尿汚泥肥料を使用した. し尿汚泥肥料は, し尿及び生活雑排水を沈殿分離及び接触ばっ気を組合せた方式により排水処理して発生した汚泥に高分子凝集剤を添加し, 脱水, 加熱乾燥した黒色,

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

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 (現)農林水産省消費・安全局

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)仙台センター

粒径約3 mmの市販肥料である。し尿汚泥肥料の成分分析結果をTable 2に示した。カドミウム濃度は3.6 mg/kg (現物)であり、その乾物濃度は肥料公定規格の含有許容値付近(約5 mg/kg)である。窒素全量(現物値)質量分率3.3%及び窒素無機化率約30%(30℃, 28日間培養)であり、窒素全量及び無機化率は一般的な、し尿汚泥肥料の中では低めであるため、長期連用や大量施用した場合も作物への生理障害等は発現しにくく、カドミウム負荷量を高く保ちつつ長期連用試験が可能な肥料と考えられる。

補正肥料として特級試薬の尿素、リン酸一アンモニウム及び塩化カリウムを使用した。汚泥肥料及び補正肥料の各成分の分析は肥料等試験法⁵⁾によった(補正肥料の成分量はTable 3に示した)。

なお、汚泥肥料中の0.1 mol/L HCl-Cd濃度は、汚泥肥料1 gを0.1 mol/L塩酸50 mLで1時間振とうして抽出したカドミウムをフレイム原子吸光分析装置(Z-2310:日立ハイテクノロジーズ)で測定した。汚泥肥料中の1 mol/L酢酸アンモニウム溶液(pH7.0)可溶カドミウム(以下、1 mol/L酢安(pH7.0)-Cd)濃度は、汚泥肥料1 gを1 mol/L酢酸アンモニウム溶液(pH7.0)50 mLで1時間振とうして抽出したカドミウムをICP質量分析装置(ICPM-8500:島津製作所)で測定した。

Table 1 Characteristics of soil for using in winter 2015 crop

	Unit	Year	AP ^{a)} -1	AP ^{a)} -2	SP ^{b)} -1	SP ^{b)} -2
pH (H ₂ O) ^{c)}		2009 ^{g)}	6.1	6.1	6.2	6.2
		2015 ^{h)}	6.8	6.9	6.9	6.8
EC ^{d)}	mS/m	2009	10.0	10.3	14.0	11.6
		2015	12.0	10.8	9.6	10.4
Phosphate absorption coefficient ^{e)}	mg/100 g	2009	5.8	6.1	7.7	6.9
		2015	6.5	6.4	7.2	6.2
Total nitrogen ^{e)}	% ^{f)}	2015	0.37	0.37	0.34	0.33
Total carbon ^{e)}	% ^{f)}	2015	5.1	5.1	4.8	4.9
0.1 mol/L HCl-Cd ^{e)}	mg/kg	2009	0.18	0.19	0.18	0.21
		2015	0.14	0.15	0.11	0.11
Kind of soil	Andosol					
Soil texture	Light clay					

a) Sludge-fertilizer-application plot

b) Standard plot

c) Soil pH determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with a glass electrode, $n=2$

d) Soil electrical conductivity determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with an electrical conductivity meter, $n=2$

e) Content in the dry matter, average ($n=2$)

f) Mass fraction

g) The year when the study was designed to evaluate the effects of sludge fertilizer applications on soil intended for long-term use

h) The year when the study was conducted

Table 2 Properties of sludge fertilizer

Item	Unit	Content	Item	Unit	Content
Total nitrogen	% ^{a)}	3.3	Total copper	mg /kg	546
Total phosphorus ^{b)}	% ^{a)}	5.2	Total Zinc	mg /kg	1760
Total potassium ^{c)}	% ^{a)}	0.4	Carbon to nitrogen ratio	-	7.1
Total calcium ^{d)}	% ^{a)}	2.1	Total cadmium ^{e)}	mg /kg	3.6 ^{f)}
Organic carbon	% ^{a)}	23.6	Acid-solubility-cadmium ^{g)}	mg /kg	3.2
Moisture	% ^{a)}	26.1	Exchangeable-cadmium ^{h)}	mg /kg	0.32

a) Mass fraction

b) Content as P₂O₅

c) Content as K₂O

d) Content as CaO

e) Content of cadmium dissolved with aqua regia

f) 4.9 mg /kg in the dry matter

g) Content of cadmium dissolved with 0.1 mol/L hydrochloric acid

h) Content of cadmium dissolved with pH 7.0, 1 mol/L ammonium acetate solution

Table 3 Properties of reagent

Item	Unit	Urea	Ammonium dihydrogen phosphate	Potassium chloride
Total nitrogen	% ^{a)}	46.2	12.0	—
Total phosphorus ^{b)}	% ^{a)}	—	61.5	—
Total potassium ^{c)}	% ^{a)}	—	—	63.1

a) Mass fraction

b) Content as P₂O₅

c) Content as K₂O

(3) 試験区の構成

汚泥肥料施用区及び標準区は、1 試験区の面積を 4 m²(縦 2 m×横 2 m)とし、各試験区 2 反復の計 4 試験区を Fig.1 のとおり配置した。施肥量は埼玉県の高レンソウ施肥基準⁶⁾を基に施肥設計した。

汚泥肥料の施肥量は、農林水産省のアンケート調査結果では 1 作当たり 2 t/10a 程度施用している農家も存在するが、施肥量は、500 kg/10a 程度が最も一般的であった⁷⁾。自治体によっては、汚泥肥料中の重金属の農地への蓄積を抑制するために施用上限量の目安を示しており、年間 500～1000 kg/10a としている事例がある^{8～10)}。また、高分子凝集剤を使用した汚泥肥料を連用した場合、土壌 pH が低下する¹¹⁾ことが知られている。連用施用による土壌理化学性への影響等を考慮し、ここでは、1 作当たりの施肥量は 500 kg/10a(現物)とした。

汚泥肥料の窒素肥効率は前作までの標準区との生育量の差から 10 %として計算し、不足分を補正肥料で施用した。りん酸及び加里についても不足分は補正肥料を用いて補った。標準区については、補正肥料を用いて汚泥肥料施用区と同様の成分量になるよう施用した(Table 4)。りん酸施用については 2012 年夏作以降成りん酸を使用していたが、交換性苦土が大幅に上昇したため、施用を中止し、2014 年冬作から施用されているりん酸一アンモニウムを施用した。なお、前作の跡地土壌を分析したところ、汚泥肥料施用区の有効態りん酸は、6.4 mg/100 g 乾土、標準区の有効態りん酸は、6.7 mg/100 g 乾土となり地力増進基本指針¹²⁾における有効態り

ン酸の改善目標下限値(10 mg/100g 乾土)に満たないため、有効態リン酸の改善目標下限値に到達するよう施肥基準を上回る量のりん酸施用を行った(Table 4)。

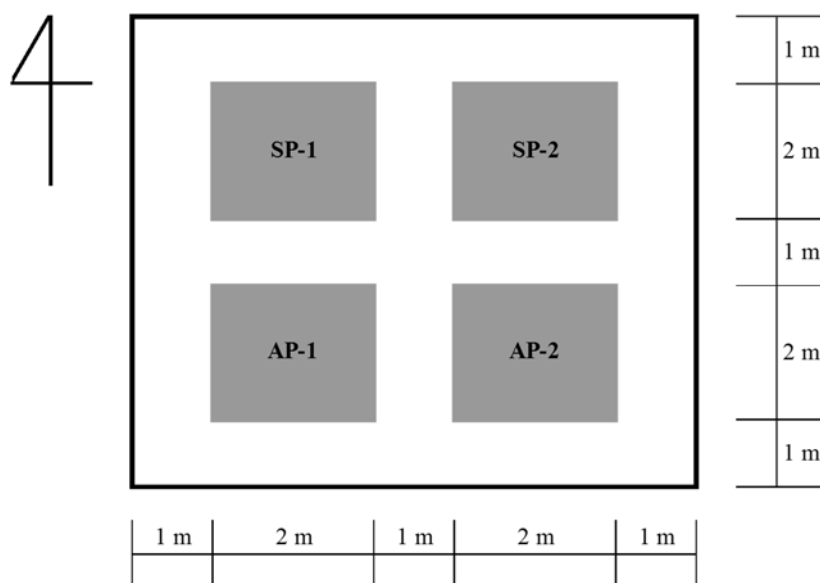


Fig.1 Plot plan of the test field

(AP:Sludge-fertilizer application plot SP:Standard plot)

Table 4 The fertilization design of the test plots where spinach was cultivated in winter 2015

	Amount of application per 4 m ² (g)	The applied components per 4 m ²				Amount of application per 10 a (kg)	The applied components per 10 a			
		N (g)	P ^{a)} (g)	K ^{b)} (g)	Cd (mg)		N (kg)	P ^{a)} (kg)	K ^{b)} (kg)	Cd (g)
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>										
Sludge fertilizer	2000	66	104	7	7.3	500	16.6	26.1	1.8	1.8
Urea	84	39	—	—	—	21	9.7	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	288	35	176	—	—	72	8.7	44.0	—	—
Potassium chloride	103	—	—	65	—	26	—	—	16.2	—
Total		140	280	72	7.3		34.9	70.1	18.0	1.8
<Standard plot (SP)>										
Urea	59	27	—	—	—	15	6.8	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	437	53	267	—	—	109	13.2	66.8	—	—
Potassium chloride	114	—	—	72	—	29	—	—	18.0	—
Total		80	267	72	—		20.0	66.8	18.0	—

a) Content as P₂O₅

b) Content as K₂O

(4) 栽培方法

供試作物はホウレンソウ(品種名:ニューアンナ R4)とし、埼玉県の施肥基準を基に栽培した。各試験区の周辺部にはガードプランツとして供試作物を栽培した。

施肥は2015年11月6日に、各試験区の表層土約12 kgを袋に取り、肥料を入れ混合し、各試験区表層に均等に散布し、耕耘機で深さ約15 cmまで耕耘した。

試験区内は9条(条間約20 cm)とし、播種は11月9日にシーダーテープ種子により行った。

間引きは11月27日から12月10日に行い、農薬散布はヨトウムシ等の害虫防除のため播種時にダイアジノン粒剤を散布した。雑草防除は手除草により適宜実施した。

収穫は2016年3月15日に行い、地際をハサミで切断して地上部を収穫した。

(5) 作物体のカドミウム分析

収穫したホウレンソウは直ちに試験区毎に全株重量を測定した。分析用試料として試験区中央の1 m²分全てを、水道水、イオン交換水の順に洗浄し、ガラス室で自然乾燥した後に通風乾燥器にて65℃で一昼夜乾燥した。重量を測定した後、目開き500 µmのふるいを通過するまで粉砕機(ZM200:Retsch ローター回転数6000 rpm)で粉砕し分析用試料とした。

カドミウム含有量は、分析試料0.5 gに硝酸5 mL及び過酸化水素水2 mLを加えマイクロ波分解装置(Multiwave 3000:Perkin Elmar)¹³⁾で分解したものを50 mLに定容し試料溶液とした。測定はICP質量分析装置(ICPM-8500:島津製作所)により行った。

(6) 跡地土壌の分析

収穫後の跡地土壌は、対角線採土法¹⁴⁾により採取した。各試験区の作物体の分析用試料を収穫した場所と同じ試験区中央1 m²の四隅及び中央の計5か所より、採土器(内径50 mm×長さ250 mm)を用いて表層から約15 cmまで採取、混合した。通風乾燥器により35℃で一晩乾燥後、目開き2 mmのふるいを通過したものを分析用試料とした。

風乾した土壌の水分は、ハロゲン水分計(HG53:メラー・トレド)により測定した。

土壌pH及びECは風乾土壌1に対して水5を加え1時間振とう後、pHはガラス電極法(F-23:HORIBA)により、ECは電気伝導率計(F-54:HORIBA)により測定した。

土壌中のカドミウム分析については、形態別カドミウムを分析した。土壌中カドミウムの形態(可溶性)別評価法については、土壌の種類による溶出傾向や作物体の吸収との相関などに対応するための様々な方法が検討されているものの、万能と呼べる方法がない状況にある。そこで統一的な尺度として、省令¹⁵⁾で定められた0.1 mol/L HCl-Cd、及び交換性陽イオンの測定に用いられており¹⁶⁾、0.1 mol/L HCl-Cdと比較してより多くの各種作物体のカドミウム濃度と相関があると報告されている^{17~18)}交換態カドミウム(1 mol/L 酢安(pH 7.0)-Cd)を選択した。

土壌中の0.1 mol/L HCl-Cdは、土壌10 gに対し0.1 mol/L 塩酸50 mLを加え約30℃に保ち1時間振とうして抽出したカドミウムをICP質量分析装置(ICPM-8500:島津製作所)により測定した。

土壌中の1 mol/L 酢安(pH 7.0)-Cd、Cu及びZnは、土壌2.5 gに対し1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 7.0)50 mLを加え約30℃に保ち1時間振とうして抽出したカドミウムをICP質量分析装置(ICPM-8500:島津製作所)により測定した。

2) 2016年夏作の連用試験(2016年6月22日～2016年10月7日)

(1) 試験圃場及び供試土壌

試験圃場及び供試土壌として2.1)の試験の汚泥肥料施用区及び標準区の跡地を引き続き使用した。

土壌の種類、土性、前作跡地のpH、EC、有効態リン酸(トルオーグ法)¹⁴⁾、全窒素、全炭素及び0.1 mol/L

HCl-Cd 濃度を Table 5 に示す.

Table 5 Characteristics of soil for using in summer 2016 crop

	Unit	Year	AP ^{a)} -1	AP ^{a)} -2	SP ^{b)} -1	SP ^{b)} -2
pH (H ₂ O) ^{c)}		2009 ^{g)}	6.1	6.1	6.2	6.2
		2016 ^{h)}	6.3	6.4	6.4	6.3
EC ^{d)}	mS/m	2009	10.0	10.3	14.0	11.6
		2016	10.1	9.0	7.0	7.2
Available phosphate ^{e)}	mg/100 g	2009	5.8	6.1	7.7	6.9
		2016	12.5	9.1	16.6	12.5
Total nitrogen ^{e)}	% ^{f)}	2016	0.37	0.37	0.33	0.33
Total carbon ^{e)}	% ^{f)}	2016	5.4	5.3	5.0	5.0
0.1 mol/L HCl-Cd ^{e)}	mg/kg	2009	0.18	0.19	0.18	0.21
		2016	0.16	0.15	0.11	0.11
Kind of soil	Andosol					
Soil texture	Light clay					

a) Sludge-fertilizer-application plot

b) Standard plot

c) Soil pH determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with a glass electrode, $n=2$

d) Soil electrical conductivity determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with an electrical conductivity meter, $n=2$

e) Content in the dry matter, average ($n=2$)

f) Mass fraction

g) The year when the study was designed to evaluate the effects of sludge fertilizer applications on soil intended for long-term use

h) The year when the study was conducted

(2) 供試肥料等

供試肥料及び補正肥料は 2.1) (2) と同様のものを用いた.

(3) 試験区の構成

試験区の構成は 2.1) (3) と同様に配置した. 施肥量は埼玉県のニンジン施肥基準⁶⁾を基に設計した. 汚泥肥料の施用量は, 500 kg/10 a (現物), 窒素肥効率を 50 % として計算し, 不足分を補正肥料で施用した. りん酸及び加里についても不足分は補正肥料を用いて補った. 標準区については, 補正肥料を用いて汚泥肥料施用区と同様の成分量になるよう施用した (Table 6). 前作までの跡地土壌を分析したところ, 各試験区の有効態リン酸は汚泥肥料施用区 10.8 mg/100 g 乾土, 標準区 14.5 mg/100 g 乾土であり, 地力増進基本指針¹²⁾における有効態リン酸の改善目標下限値 (10 mg/100g 乾土) に比べて同等な値又は高い値であった. しかしながら, 2015 年夏作ニンジンの収量が参考にした自治体施肥基準に記載されている目標収量に満たなかったことから, 地力を上げるため, さらに有効態リン酸を増やす方針とし, 汚泥肥料施用区の有効態リン酸が標準区と同等の 14 mg/100g 乾土に到達するよう施肥基準を上回る量のりん酸施用を行った (Table 6).

Table 6 The fertilization design of the test plots where carrot was cultivated in summer 2016

	Amount of application per 4 m ² (g)	The applied components per 4 m ²				Amount of application per 10 a (kg)	The applied components per 10 a			
		N (g)	P ^{a)} (g)	K ^{b)} (g)	Cd (mg)		N (kg)	P ^{a)} (kg)	K ^{b)} (kg)	Cd (g)
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>										
Sludge fertilizer	2000	66	104	7	7.3	500	16.6	26.1	1.8	1.8
Urea	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	356	43	217	—	—	89	11	54	—	—
Potassium chloride	90	—	—	57	—	23	—	—	14.2	—
Total		109	322	64	7.3		27.3	80.4	16.0	1.8
<Standard plot (SP)>										
Urea	120	55	—	—	—	30	13.9	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	170	20	104	—	—	42	5.1	26.1	—	—
Potassium chloride	101	—	—	64	—	25	—	—	16.0	—
Total		76	104	64	—		19.0	26.1	16.0	—

a) Content as P₂O₅

b) Content as K₂O

(4) 栽培方法

供試作物はニンジン(品種名:恋ごころ)とした。各試験区の周辺部にはガードプランツとして供試作物を栽培した。

施肥は2016年6月2日に行った。各試験区の表層土約12kgを袋に取り、肥料を入れ混合し、各試験区表層に均等に散布し、耕耘機で深さ約15cmまで耕耘した。

試験区内は9条(条間約20cm)とし、播種は6月22日にシーダーテープ種子を用いて行った。

間引きは7月20日から8月5日に行い、収穫時の株間が約8cmとなるようにした。

農薬散布はヨトウムシ等の害虫防除のため、施肥時にダイアジノン粒剤を散布した。雑草防除は手除草により適宜実施した。適宜水道水によるかん水を行った。

収穫は2016年10月7日に行い、葉部と根部を収穫した。

(5) 作物体のカドミウム分析

収穫したニンジンは水道水洗浄後、試験区毎に全株重量を測定した。分析用試料として試験区中央の1m²分全てを根部と葉部に切り分け、部位別に重量を測定した。根部はイオン交換水ですすぎ、自然乾燥して薄く切り分けた後、通風乾燥器により65℃で24時間乾燥を行い重量を測定した。葉部は葉が重ならないように広げ、自然乾燥し、その後、通風乾燥器により65℃で24時間乾燥を行い、重量を測定した。乾燥した根部及び葉部は、それぞれ目開き1mm及び500µmのふるいを通すまで粉砕機(ZM200:Retsch ローター回転数6000rpm)で粉砕した。

カドミウム含有量の分析は、2.1)(5)と同様に行った。

(6) 跡地土壌の分析

収穫後の土壌は、2.1)(6)と同様に採取及び調製し、全カドミウム分析用試料は、目開き500µmのふるいを

通過するまで粉砕機(ZM200:Retsch ローター回転数 6000 rpm)で粉砕し調製をした。

また、カドミウムの水平分布を調査するため、Fig.1 試験圃場配置図で示された汚泥肥料施用区(AP-2)と標準区(SP-2)の東方向に面した境界を境に、それぞれの境界中心から試験区中心方向へ0.3 mに位置した箇所(試験区境界-0.3 m)と0.9 mに位置した箇所(試験区境界-0.9 m)、試験区外側へ0.3 mに位置した箇所(試験区境界+0.3 m)と0.9 mに位置した箇所(試験区境界+0.9m)を調査点として作土層(表層から0-15 cm)の土壌を各1点採取し全カドミウム分析用試料と同様に調製した。

土壌の分析は、2.1) (6) の項目に加えて全カドミウムを分析した。

土壌中の全カドミウムは、分析試料0.5 gに、硝酸約10 mL、過酸化水素水約3 mL、及びフッ化水素酸約5 mLを加え、マイクロ波分解装置(Multiwave 3000:Perkin Elmar)により分解し試料溶液とした。測定はICP質量分析装置(ICPM-8500:島津製作所)により行った。

3. 結果

1) 2015年冬作連用試験(冬作ホウレンソウ:2015年11月9日~2016年3月15日)

(1) 作物体の収量及びカドミウム吸収量

播種から収穫までの栽培期間は約4ヶ月であり、その間に異常な症状は観察されなかった。

ホウレンソウの収量、カドミウム濃度及び吸収量をTable 7に示した。汚泥肥料施用区及び標準区の収量は、生体重平均値でそれぞれ21.13 kgと19.40 kgであり、標準区の収量を100とした汚泥肥料施用区の収量指数は109であった。カドミウム濃度(乾物)については、汚泥肥料施用区は平均値で0.35 mg/kg、標準区は0.30 mg/kgであり、汚泥肥料施用区が有意に高かった($p < 0.05$)が、その現物濃度はCodex基準値²³⁾(0.2 mg/kg)未満であった。カドミウム吸収量については、汚泥肥料施用区は平均値で0.71 mg/試験区、標準区は0.59 mg/試験区であり、汚泥肥料施用区が有意に高かった($p < 0.05$)。

Table 7 Cadmium uptake and yield of spinach (edible portion) in the test

	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Average	Yield index ^{d)}	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>								
Fresh weight	kg	22.40		19.85		21.13	109	-
Dry weight	kg	2.09		1.95		2.02	103	-
Cadmium concentration ^{a)}	mg/kg	0.36	0.35	0.35	0.34	0.35	-	Significance ^{e)}
Cadmium concentration ^{b)}	mg/kg	0.034	0.032	0.034	0.034	0.034	-	-
Quantity of cadmium uptake ^{c)}	mg/plot	0.75	0.73	0.68	0.67	0.71	-	Significance ^{e)}
<Standard plot(SP)>								
Fresh weight	kg	19.30		19.50		19.40	100	-
Dry weight	kg	1.96		1.95		1.95	100	-
Cadmium concentration ^{a)}	mg/kg	0.34	0.31	0.28	0.28	0.30	-	-
Cadmium concentration ^{b)}	mg/kg	0.034	0.031	0.028	0.028	0.030	-	-
Quantity of cadmium uptake ^{c)}	mg/plot	0.67	0.60	0.54	0.56	0.59	-	-

a) Content in the dry matter

b) Content in the fresh matter

c) Quantity of cadmium uptake = Yield (dry weight) × Cadmium concentration (dry matter)

d) Yield of Standard plot was indexed as 100

e) It was significantly different for Standard plot

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition × number of samples))

(2) 跡地土壌のカドミウム濃度

跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度, 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度, pH 及び EC を Table 8 に示した. 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度は, 平均値で汚泥肥料施用区は 0.16 mg/kg, 標準区は 0.11mg/kg であり, 汚泥肥料施用区が高い傾向にあった. 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度は, 平均値で汚泥肥料施用区は 0.034 mg/kg, 標準区は 0.021 mg/kg であり, 汚泥肥料施用区が高い傾向にあった.

Table 8 Characteristics of cultivated soil in winter 2015

	Unit	Test prot-1		Test prot-2		Average	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
0.1 mol /L HCl-Cd ^{a)}	mg/kg	0.16	0.16	0.15	0.15	0.16	Pending ^{e)}
Exchangeable-Cd ^{b)}	mg/kg	0.034	0.034	0.033	0.033	0.034	Pending ^{e)}
pH (H ₂ O) ^{c)}		6.3		6.4			
EC ^{d)}	mS/m	10.1		9.0			
<Standard plot(SP)>							
0.1 mol /L HCl-Cd ^{a)}	mg/kg	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	
Exchangeable-Cd ^{b)}	mg/kg	0.020	0.020	0.021	0.021	0.021	
pH (H ₂ O) ^{c)}		6.4		6.3			
EC ^{d)}	mS/m	7.0		7.2			

a) Content of cadmium dissolved with 0.1 mol/L hydrochloric acid in the drying soil

b) Content of cadmium dissolved with pH 7.0, 1 mol/L ammonium acetate solution in the drying soil

c) Soil pH determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with a glass electrode, $n=2$

d) Soil electrical conductivity determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with an electrical conductivity meter, $n=2$

e) It was pending decision to be significantly different for Standard plot and for interaction

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition \times number of samples))

2) 2016年夏作連用試験(夏作ニンジン:2016年6月22日~2016年10月7日)

(1) 作物体の収量及びカドミウム吸収量

播種から収穫までの栽培期間は約3ヶ月半であり、栽培期間の大半は、異常な症状は確認されなかったが、収穫数日前に葉部が害虫に食された形跡があった。

ニンジンの収量、カドミウム濃度及び吸収量を Table 9 に示した。汚泥肥料施用区及び標準区の収量は、生体重平均値で根がそれぞれ 8.63 kg と 8.05 kg、葉部がそれぞれ 4.98 kg と 3.83 kg であり、標準区の収量を 100 とした汚泥肥料施用区の収量指数は根が 107、葉部が 130 であった。

汚泥肥料施用区及び標準区のカドミウム濃度(乾物)については、平均値で根がそれぞれ 0.16 mg/kg と 0.16 mg/kg、葉部がそれぞれ 0.28 mg/kg と 0.21 mg/kg であり、葉部については汚泥肥料施用区が高い傾向にあったが、その現物濃度は Codex 基準値²³⁾ (0.2 mg/kg) 未満であった。汚泥肥料施用区及び標準区の試験区当たりのカドミウム吸収量については、平均値で根がそれぞれ 0.14 mg/試験区と 0.14 mg/試験区、葉部がそれぞれ 0.09 mg/試験区と 0.06 mg/試験区であり、葉部については汚泥肥料施用区が有意に高かった ($p < 0.05$)。作物体全体の試験区当たりのカドミウム吸収量の平均値は汚泥肥料施用区で 0.23 mg/試験区、標準区で 0.19 mg/試験区であり、汚泥肥料施用区が有意に高かった ($p < 0.05$)。

Table 9 Cadmium uptake and yield of carrot in the test

	Part	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Average	Yield index ^{d)}	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>									
Fresh weight	Root	kg	8.20		9.05		8.63	107	–
	Leaf	kg	4.80		5.2		4.98	130	–
	Total	kg	13.00		14.20		13.60	115	–
Dry weight	Root	kg	0.76		0.99		0.87	104	–
	Leaf	kg	0.40		0.29		0.34	130	–
	Total	kg	1.15		1.28		1.21	110	–
Cadmium concentration ^{a)}	Root	mg/kg	0.21	0.19	0.14	0.12	0.16		N.S. ^{e)}
	Leaf	mg/kg	0.27	0.28	0.27	0.28	0.28		Pending ^{f)}
Cadmium concentration ^{b)}	Root	mg/kg	0.020	0.017	0.015	0.013	0.016		–
	Leaf	mg/kg	0.019	0.019	0.011	0.011	0.015		–
Quantity of cadmium uptake ^{c)}	Root	mg/plot	0.16	0.14	0.14	0.11	0.14		N.S.
	Leaf	mg/plot	0.11	0.11	0.08	0.08	0.09		Significance ^{g)}
	Total	mg/plot	0.27	0.25	0.21	0.19	0.23		Significance
<Standard plot(SP)>									
Fresh weight	Root	kg	7.40		8.70		8.05		
	Leaf	kg	3.75		3.90		3.83		
	Total	kg	11.15		12.60		11.88		
Dry weight	Root	kg	0.77		0.92		0.84		
	Leaf	kg	0.29		0.23		0.26		
	Total	kg	1.06		1.15		1.11		
Cadmium concentration ^{a)}	Root	mg/kg	0.21	0.19	0.13	0.12	0.16		
	Leaf	mg/kg	0.23	0.22	0.20	0.19	0.21		
Cadmium concentration ^{b)}	Root	mg/kg	0.022	0.020	0.014	0.013	0.017		
	Leaf	mg/kg	0.014	0.013	0.008	0.008	0.011		
Quantity of cadmium uptake ^{c)}	Root	mg/plot	0.16	0.14	0.12	0.11	0.14		
	Leaf	mg/plot	0.07	0.06	0.05	0.04	0.06		
	Total	mg/plot	0.23	0.21	0.17	0.16	0.19		

a) Content in the dry matter

b) Content in the fresh matter

c) Quantity of cadmium uptake = Yield (dry weight) × Cadmium concentration (dry matter)

d) Yield of Standard plot was indexed as 100

e) It was not significantly different for processing examination section

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition × number of samples))

f) It was pending decision to be significantly different for Standard plot and for interaction

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition × number of samples))

g) It was significantly different for Standard plot

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition × number of samples))

(2) 跡地土壌のカドミウム濃度

跡地土壌の全 Cd 濃度, 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度, 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度, pH 及び EC を Table 10 に示した. 全 Cd 濃度は, 汚泥肥料施用区は 0.54 mg/kg, 標準区は 0.45 mg/kg で, 汚泥肥料施用区が有意に高かった ($p < 0.05$). 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度は, 平均値で汚泥肥料施用区は 0.19 mg/kg, 標準区は 0.12 mg/kg であり, 汚泥肥料施用区が高い傾向にあった. 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度は, 汚泥肥料施用区は 0.040 mg/kg, 標準区は 0.024 mg/kg で, 汚泥肥料施用区が高い傾向にあった.

Table 10-1 Characteristics of cultivated soil in summer 2016

	Unit	Test prot-1		Test prot-2		Average	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.55	0.54	0.54	0.54	0.54	Significance ^{f)}
0.1 mol/L HCl-Cd ^{b)}	mg/kg	0.20	0.21	0.18	0.17	0.19	Pending ^{g)}
Exchangeable-Cd ^{c)}	mg/kg	0.042	0.042	0.037	0.037	0.040	Pending
pH (H ₂ O) ^{d)}		6.3		6.5			
EC ^{e)}	mS/m	10.2		10.7			
<Standard plot(SP)>							
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.42	0.45	0.44	0.48	0.45	
0.1 mol/L HCl-Cd ^{b)}	mg/kg	0.12	0.11	0.13	0.12	0.12	
Exchangeable-Cd ^{c)}	mg/kg	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	
pH (H ₂ O) ^{d)}		6.4		6.5			
EC ^{e)}	mS/m	8.2		9.1			

a) Content in the dry matter

b) Content of cadmium dissolved with 0.1 mol/L hydrochloric acid in the drying soil

c) Content of cadmium dissolved with pH 7.0, 1 mol/L ammonium acetate solution in the drying soil

d) Soil pH determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with a glass electrode, $n=2$ e) Soil electrical conductivity determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with an electrical conductivity meter, $n=2$

f) It was significantly different for Standard plot

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition × number of samples))

g) It was pending decision to be significantly different for Standard plot and for interaction

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition × number of samples))

Table 10-2 Characteristics of cultivated soil in summer 2016 (horizontal distribution of total-Cd cocentration)

	Unit	Test area boundary -0.9 m		Test area boundary -0.3 m		Test area boundary +0.3 m		Test area boundary +0.9 m	
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>									
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.53	0.56	0.49	0.54	0.46	0.48	0.41	0.42
<Standard plot(SP)>									
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.44	0.48	0.42	0.44	0.40	0.43	0.39	0.45

a) Content in the dry matter

4. 考 察

1) 2009年連用試験開始時からの推移からみる2015年冬作及び2016年夏作の成績について

2009年の試験開始時から、これまで7年半、年2作、計15作の試験を行った。各試験結果等の推移から考えられる2015年冬作及び2016年夏作の傾向については下記のとおりであった。

(1) 施肥履歴

これまでの試験における施肥履歴を Table 11 に示した。試験開始当初、汚泥肥料施用区の施肥設計においては、汚泥肥料の連用による残効¹⁹⁾を考慮して、窒素肥効率を100%として計算していたが、汚泥肥料施用区の収量が標準区に比べて低い傾向にあることから、供試肥料であるし尿汚泥肥料の窒素無機化率について2012年に改めて無機化試験(恒温槽30℃で240日間培養)を実施したところ、培養期間90日までに無機化率30%となり、その後ほぼ一定で推移したことから、2012年冬作以降、汚泥肥料の窒素肥効率を30%として施肥した。その後、試験区間での収量差及び気温による無機化率の違いを考慮し汚泥肥料の窒素肥効率を調整して施肥を行ってきた。2015年冬作ハウレンソウ試験においては、汚泥肥料の窒素肥効率を10%、2016年夏作ニンジンにおいては、汚泥肥料の窒素肥効率を50%として施肥を行った。

Table 11 The fertilizer application log of the test plots

Year		<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>					<Standard plot(SP)>				
Season	Fertilizer	Amount of application per 10 a	The applied components per 10 a				Amount of application per 10 a	The applied components per 10 a			
Test crops		(kg)	N (kg)	P ^{a)} (kg)	K ^{b)} (kg)	Cd (g)	(kg)	N (kg)	P ^{a)} (kg)	K ^{b)} (kg)	Cd (g)
2009	Sludge fertilizer	332	11	17	1	1.2	—	—	—	—	—
Summer	Ammonium sulfate	52	11	—	—	—	104	22	—	—	—
	Potassium dihydrogen phosphate	3	—	2	1	—	36	—	19	12	—
Carrot	Potassium chloride	28	—	—	18	—	12	—	—	8	—
	Total		22	19	20	1.2		22	19	20	0
2009	Sludge fertilizer	302	10	16	1	1.1	—	—	—	—	—
Winter	Ammonium sulfate	47	10	—	—	—	95	20	—	—	—
	Potassium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	30	—	16	10	—
Spinach	Potassium chloride	27	—	—	17	—	12	—	—	8	—
	Total		20	16	18	1.1		20	16	18	0
2010	Sludge fertilizer	227	8	12	1	0.8	—	—	—	—	—
Summer	Ammonium sulfate	36	8	—	—	—	71	15	—	—	—
	Potassium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	23	—	12	8	—
Spinach	Potassium chloride	15	—	—	9	—	3	—	—	2	—
	Total		15	12	10	0.8		15	12	10	0
2010	Sludge fertilizer	181	6	9	1	0.7	—	—	—	—	—
Winter	Ammonium sulfate	28	6	—	—	—	57	12	—	—	—
	Potassium dihydrogen phosphate	5	—	3	2	—	23	—	12	8	—
Qing geng cai	Potassium chloride	15	—	—	10	—	6	—	—	4	—
	Total		12	12	12	0.7		12	12	12	0
2011	Sludge fertilizer	227	8	12	1	0.8	—	—	—	—	—
Summer	Ammonium sulfate	33	7	—	—	—	57	12	—	—	—
	Potassium dihydrogen phosphate	6	1	3	—	—	24	3	15	—	—
Turnip	Potassium chloride	22	—	—	14	—	24	—	—	15	—
	Magnesia lime ^{c)}	—	—	—	—	—	35	—	—	—	—
Total			15	15	15	0.8		15	15	15	0
2011	Sludge fertilizer	483	16	25	2	1.8	—	—	—	—	—
Winter	Urea	22	10	—	—	—	43	20	—	—	—
	Potassium dihydrogen phosphate	1	—	1	1	—	50	—	26	17	—
Spinach	Potassium chloride	25	—	—	16	—	1	—	—	1	—
	Slaked lime ^{c)}	176	—	—	—	—	216	—	—	—	—
Total			26	26	18	1.8		20	26	18	0
2012	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
Summer	Ammonium sulfate	65	14	—	—	—	80	17	—	—	—
	Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
Carrot	Potassium chloride	29	—	—	18	—	32	—	—	20	—
	Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—	—
Total			30	36	20	1.8		22	36	20	0
2012	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
Winter	Ammonium sulfate	71	15	—	—	—	71	15	—	—	—
	Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
Spinach	Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18	—
	Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—	—
Total			32	36	18	1.8		20	36	18	0

a) Content as P₂O₅b) Content as K₂O

c) It was used for pH adjustment

d) The average value of the two district for changing the amount used by each of the experimental plot (SP-1:240 kg, SP-2:196 kg)

Table 11 Continue

Year	Season	Fertilizer	<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>					<Standard plot(SP)>				
			Amount of application per 10 a (kg)	The applied components per 10 a				Amount of application per 10 a (kg)	The applied components per 10 a			
				N (kg)	P ^{a)} (kg)	K ^{b)} (kg)	Cd (g)		N (kg)	P ^{a)} (kg)	K ^{b)} (kg)	Cd (g)
2013	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	81	17	—	—	—	80	17	—	—	—
		Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
	Carrot	Potassium chloride	29	—	—	18	—	32	—	—	20	—
		Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—	—
		Total		34	36	20	1.8		22	36	20	0
2013	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	87	18	—	—	—	71	15	—	—	—
		Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
	Spinach	Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18	—
		Fused magnesium phosphate	250	—	25	—	—	250	—	25	—	—
		Slaked lime ^{c)}	196	—	—	—	—	218 ^{d)}	—	—	—	—
		Total		35	51	18	1.8		20	51	18	0
2014	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—	—
		Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
	Carrot	Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16	—
		Fused magnesium phosphate	291	—	58	—	—	33	—	7	—	—
		Slaked lime ^{c)}	—	—	—	—	—	196	—	—	—	—
		Total		27	84	16	1.8		19	33	16	0
2014	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	25	11	—	—	—	34	16	—	—	—
		Ammonium dihydrogen phosphate	71	9	43	—	—	36	4	22	—	—
	Spinach	Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18	—
		Total		37	70	18	1.8		20	22	18	0
2015	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—	—
		Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
	Carrot	Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16	—
		Slaked lime ^{c)}	196	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Total		27	26	16	1.8		19	26	16	0
2015	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	21	10	—	—	—	15	7	—	—	—
		Ammonium dihydrogen phosphate	72	9	44	—	—	109	13	67	—	—
	Spinach	Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18	—
		Total		35	70	18	1.8		20	67	18	0
2016	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	—	—	—	—	—	30	14	—	—	—
		Ammonium dihydrogen phosphate	89	11	54	—	—	42	5	26	—	—
	Carrot	Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16	—
		Total		27	80	16	1.8		19	26	16	0

(2) 作物体の収量

作物体の収量(生体重)の推移は Table 12 のとおりである。

これまでの収量は、ハウレンソウに関しては参考にした自治体施肥基準に記載されている目標収量と同等以上であり、一定の収量を確保できていると考えられる。

ニンジンに関しては 2012 年夏作より自治体施肥基準に記載されている目標収量を下回っている。これは、通常、ニンジンは根の肥大を促進するため基肥は緩効性肥料を使用し、加えて追肥を行うこととされている⁶⁾が、本試験では試験設計上、緩効性肥料の使用及び追肥が行えないことが一因と考えられる。また、標準区に比べて汚泥肥料施用区の収量が多かったのは、2015 年冬作ホウレンソウで汚泥肥料の窒素肥効率を 10 %としており、前作の残効により差が生じた可能性が考えられる。

Table 12 The yield of each crop body of 2009 to 2016 (fresh weight)

Year	Season	Test Crops	Part	AP ^{a)}	SP ^{b)}	Aim yield ^{c)} (kg/plot)	Fresh weight index of AP ^{d)}
				Fresh weight (kg/plot)	Fresh weight (kg/plot)		
2009	Summer	Carrot	Root	18.0 (0.1) ^{e)}	17.9 (1.0)	14	101
			Leaf	10.5 (0.4)	9.6 (0.9)	–	109
			Total	28.5 (0.4)	27.6 (1.8)	–	104
2009	Winter	Spinach	Edible portion	13.7 (0.8)	18.6 (1.0)	8	74
2010	Summer	Spinach	Edible portion	4.5 (0.1)	5.8 (0.6)	4	77
2010	Winter	Qing geng cai	Edible portion	22.4 (0.7)	26.9 (0.8)	12	83
2011	Summer	Turnip	Root	8.9 (0.6)	9.4 (0.9)	16	95
			Leaf	8.7 (1.0)	10.0 (1.3)	–	88
			Total	17.6 (1.5)	19.3 (2.2)	–	91
2011	Winter	Spinach	Edible portion	8.1 (0.0)	10.3 (0.5)	8	79
2012	Summer	Carrot	Root	12.3 (0.5)	12.1 (0.2)	14	101
			Leaf	10.0 (0.6)	9.7 (0.8)	–	103
			Total	22.3 (0.1)	21.8 (0.5)	–	102
2012	Winter	Spinach	Edible portion	11.3 (0.5)	13.3 (0.6)	8	85
2013	Summer	Carrot	Root	12.2 (0.9)	10.3 (1.4)	14	118
			Leaf	5.4 (0.3)	4.6 (0.6)	–	119
			Total	17.6 (1.2)	14.9 (2.0)	–	118
2013	Winter	Spinach	Edible portion	16.7 (1.2)	17.9 (0.8)	8	93
2014	Summer	Carrot	Root	8.9 (0.4)	8.9 (0.1)	14	100
			Leaf	6.1 (0.6)	6.2 (0.8)	–	98
			Total	15.0 (0.9)	15.1 (1.0)	–	99
2014	Winter	Spinach	Edible portion	14.8 (0.0)	13.6 (0.6)	8	109
2015	Summer	Carrot	Root	7.3 (0.0)	6.4 (0.7)	14	114
			Leaf	8.8 (1.8)	7.3 (0.9)	–	121
			Total	16.1 (1.9)	13.6 (1.6)	–	118
2015	Winter	Spinach	Edible portion	21.1 (1.8)	19.4 (0.1)	8	109
2016	Summer	Carrot	Root	8.6 (0.6)	8.1 (0.9)	14	107
			Leaf	5.0 (0.2)	3.8 (0.1)	–	130
			Total	13.6 (0.8)	11.9 (1.0)	–	115

a) Sludge-fertilizer-application plot

b) Standard plot

c) This value is shown in the recommending rate of fertilizer application (local government) exchanging aim yield (kg/10 a) to 4 m²

d) Fresh weight index of sludge-fertilizer-application plot when standard plot assume 100

e) Standard deviation ($n = 2$ (2 repetition))

(3) 跡地土壌の理化学性の推移

(3.1) 跡地土壌の pH

跡地土壌 pH の推移は Fig.2 のとおりである. pH 6.0～6.9 の範囲内で試験区間差も小さく推移している. 本試験では pH 6.0 を下回らず, 且つ試験区間で差が出ないよう, 適宜, 石灰資材による pH の補正を行っている. 本試験では, 汚泥肥料施用区と標準区の跡地土壌 pH はほぼ同程度で推移していることから, 各試験でのカドミウム動態の処理間差に土壌 pH はほとんど影響していないものと考えられる.

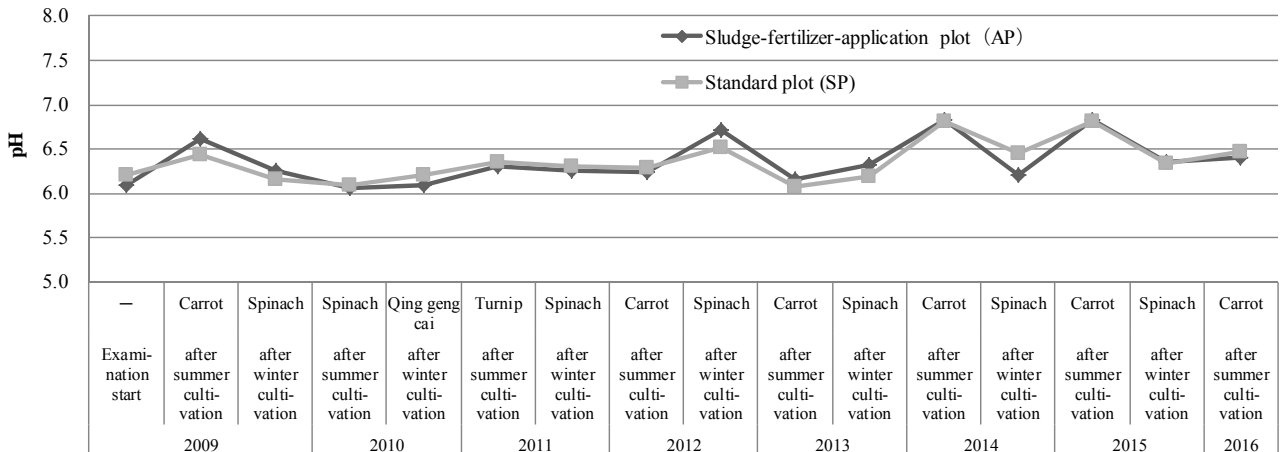


Fig.2 Changes in the pH of soil after harvest

(3.2) 跡地土壌の EC(電気伝導率)

跡地土壌 EC の推移は Fig.3 のとおりである. 試験開始以降, 2013 年冬作跡地までは年々上昇傾向となっていたが, 2014 年夏作跡地以降は下降傾向が見られた. これは, EC 上昇防止及び肥効の緩効化をはかるため, 2014 年夏作から窒素肥料をそれまで使用していた硫酸アンモニウムから尿素に変更したためと考えられる. 2014 年冬作跡地以降は一定傾向であった.

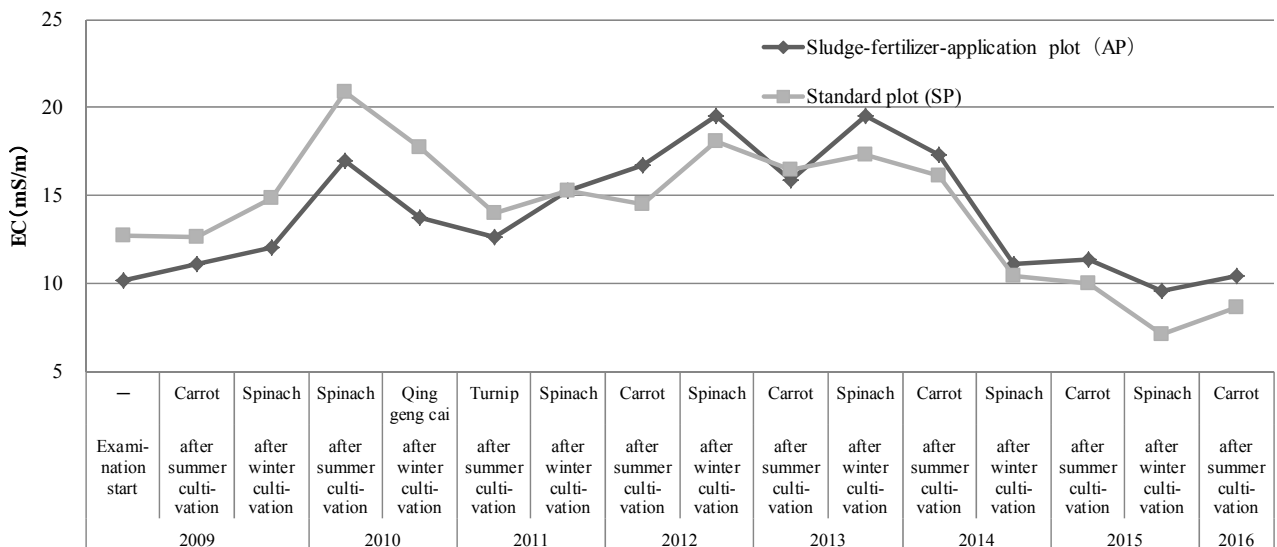


Fig.3 Changes in the EC of soil after harvest

(3.3) 跡地土壌の全窒素(TN)及び全炭素(TC)

跡地土壌の全窒素(TN)及び全炭素(TC)の推移は Fig.4 のとおりである。試験開始当初は TN 及び TC に試験区間でほとんど差が見られなかったが、2011 年冬作跡地以降、TN 及び TC 共に汚泥肥料施用区の方が標準区に比べて高い傾向にあった。これは、汚泥肥料施用区には汚泥肥料由来の有機物が施用されているが、標準区においては有機物の施用がない状態で連作が行われているため、標準区の有機物濃度が減少したことによると考えられる。

2015 年冬作及び 2016 年夏作の跡地土壌についても同様の傾向が見られた。

肥料由来のカドミウムは土壌中の有機物と結合し不可給態化することが知られており²⁰⁾、有機物濃度の差が土壌中のカドミウムの動態や作物への可給性に影響する可能性があるため、推移を確認する必要がある。

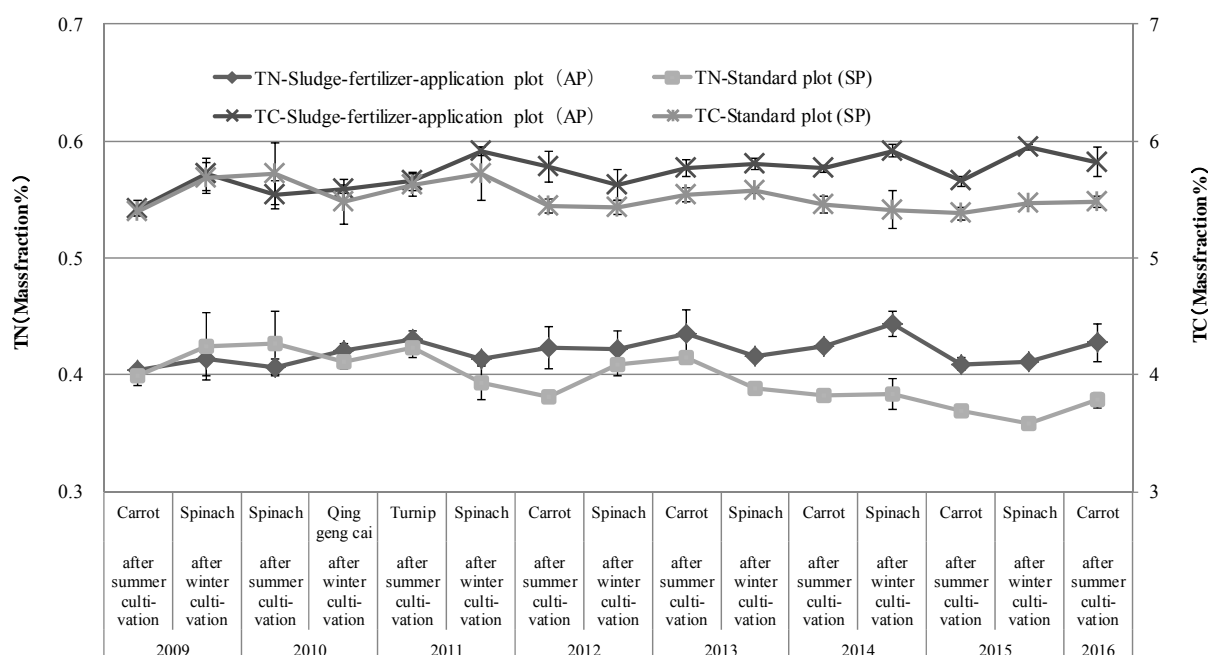


Fig.4 Changes in the total nitrogen (TN) and total carbon (TC) of soil after harvest
(The error bar indicating the standard deviation)

(3.4) 跡地土壌の有効態リン酸

跡地土壌の有効態リン酸の推移は Fig.5 のとおりである。試験開始当初から汚泥肥料施用区と比較して標準区が高く推移していたが、2014 年冬作跡地では汚泥肥料区の有効態リン酸が急激に増加した。これは、2014 年夏作時に汚泥肥料施用区に大量に施肥した溶成りん肥の影響によるものと推察された。前作に施肥した溶成りん肥により有効態リン酸が上昇する傾向は、標準区においても 2014 年夏作跡地で確認されている。

また、2016 年夏作は両試験区とも有効態リン酸を地力増進基本指針¹²⁾の改善目標内の 14 mg/100g 乾土になるよう施肥を行ったが、夏作跡地を確認すると汚泥肥料施用区は 15 mg/100g 乾土、標準区は 12 mg/100g 乾土であった。汚泥肥料施用区の収量は標準区に比べて多いため有効態リン酸は多く消費されたものと考えられたが、汚泥肥料施用区の有効態リン酸が標準区に比べて高いことは、前作に施用した汚泥肥料中のリンが夏に有効態化したこと、及び土壌改良効果を見込んで施肥したりん酸一アンモニウムの施肥量の影響が考えられた。

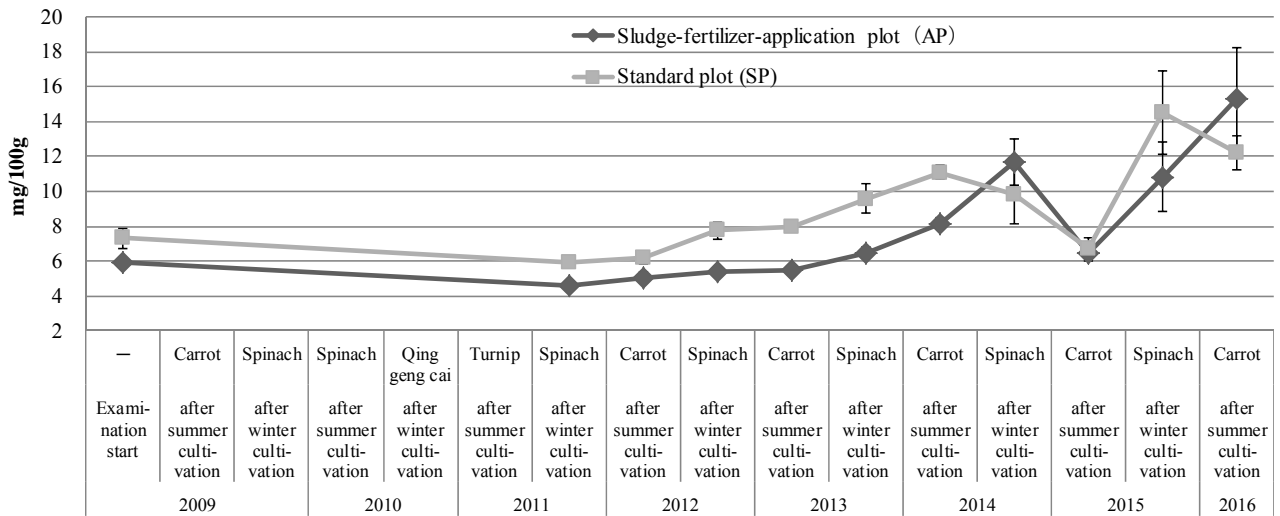


Fig.5 Changes in the available phosphate of soil after harvest
(The error bar indicating the standard deviation)

(3.5) 跡地土壌の交換性塩基(加里, 苦土, 石灰)

跡地土壌の交換性塩基(加里, 苦土, 石灰)の推移は Fig.6 のとおりである。

交換性加里は、ほぼ一定で推移していた。

交換性苦土は、試験開始時と 2011 年冬作跡地を比較するとやや減少していた。その後、2012 年夏作から、各試験区の有効態リン酸を増加させることを目的として熔成りん肥の施用を開始し、2013 年冬作までは全ての試験区に同量の熔成りん肥を施用していたが、汚泥肥料施用区は標準区と比較して熔成りん肥施用量に対する有効態リン酸の増加率が低かったため、2014 年夏作では標準区よりも熔成りん肥施用量を多く施用した。このため、標準区と比較して汚泥肥料施用区の跡地土壌中の交換性苦土が高い状態となっていると考えられる。

交換性石灰は、大きな変動はなく、また、試験区間で大きな差がなかったものの 2014 年夏作跡地では標準区において増加傾向が見られた。これは 2014 年夏作時に標準区にのみ消石灰を施用したことによるものと考えられる。また、2014 年冬作跡地では試験区間の差を維持したまま、汚泥肥料施用区及び標準区で減少傾向が確認された。これは 2014 年冬作時に消石灰の施用を行わなかったことによるものと考えられる。2015 年夏作においては汚泥肥料施用区にのみ消石灰を施用したため試験区間での差は解消され 2015 年冬作及び 2016 年夏作は消石灰を施用していなかったため減少傾向であった。

交換性塩基の違いが、作物生育及びカドミウムの動態に影響があるか今後の推移を確認する必要があると考えられる。

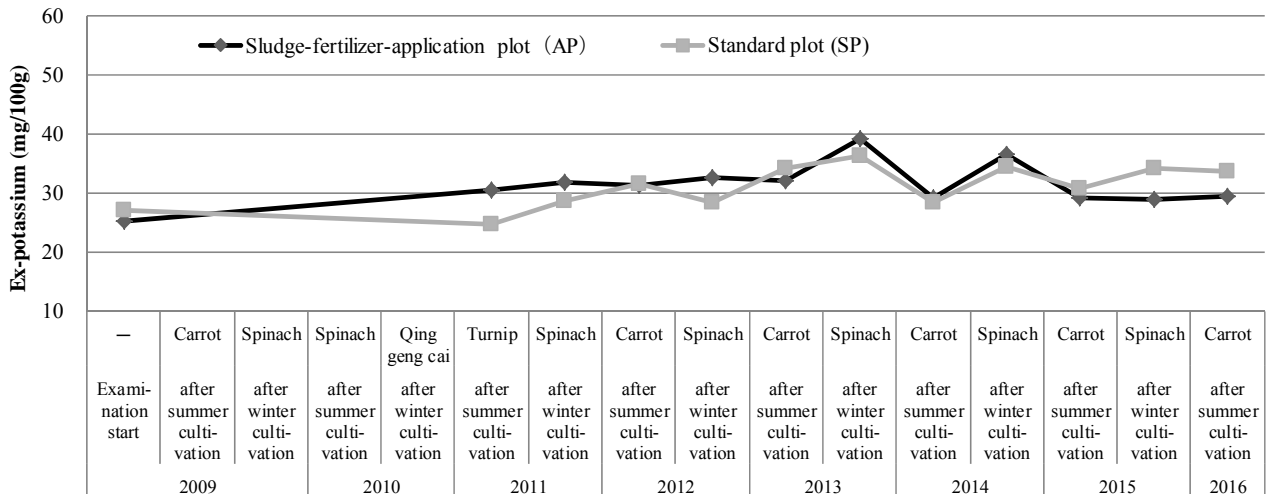


Fig.6-1 Changes in the exchangeable-potassium of soil after harvest

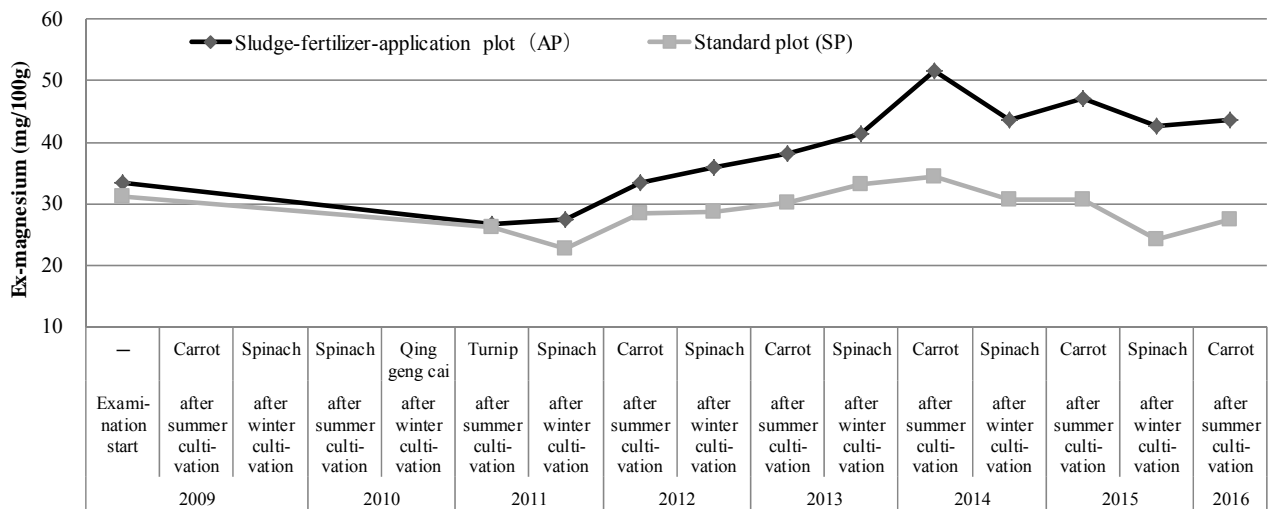


Fig.6-2 Changes in the exchangeable-magnesium of soil after harvest

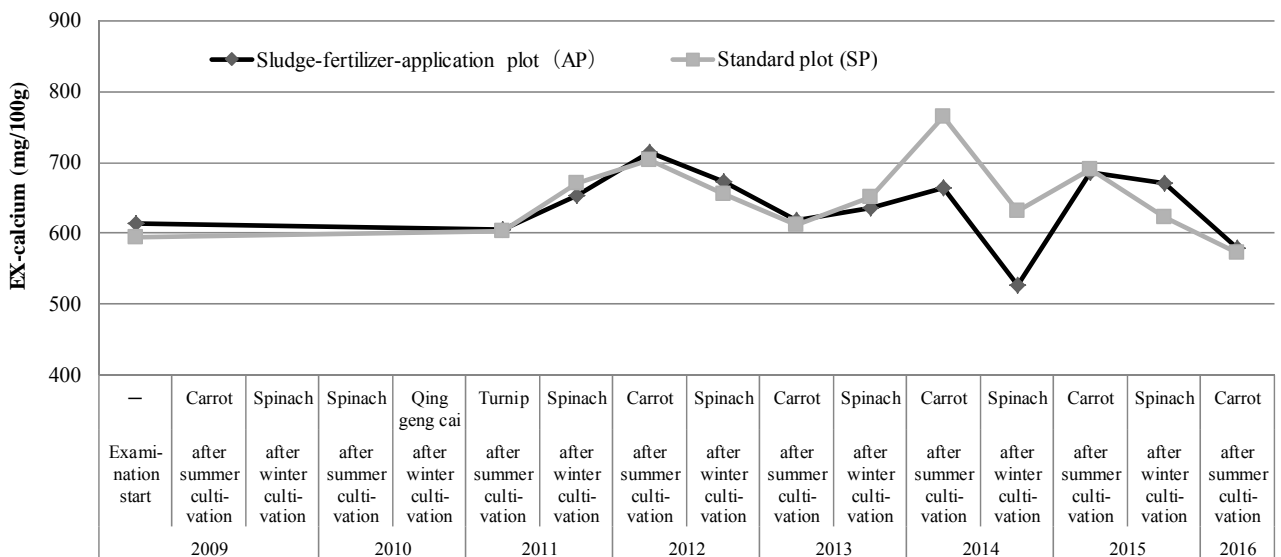


Fig.6-3 Changes in the exchangeable-calcium of soil after harvest

(4) 跡地土壌のカドミウム等濃度の推移

(4.1) 跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度

跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度の推移は Table 13 及び Fig.7 のとおりである。

汚泥肥料施用区及び標準区の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度の推移について傾向を把握するため、それぞれの処理区における、試験開始時からの経過月(各試験の間隔は 6 ヶ月とした)に対する 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度の線形単回帰分析を行った(単回帰式の分散分析表の p 値により評価, 両側有意水準 5%) (Table 13). 2016 年夏作跡地までの汚泥肥料施用区の回帰は有意でなく($p=0.30$)一定で推移している傾向であった。一方, 標準区では, 2011 年冬作跡地以降, 回帰が有意となり下降傾向が認められ($p<0.05$), 両試験区間の差は大きくなる傾向であった。また, 2011 年冬作以降, 汚泥肥料施用区の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度が標準区に比べて有意に高くなり, 以後同様の結果が続いていた。2016 年夏作跡地では交互作用が確認されたが, 引き続き汚泥肥料施用区が高い傾向にあった。これは, 標準区は肥料由来のカドミウム負荷がないため, 各試験において作物体の収穫により土壌中カドミウムの圃場外への持ち出しが継続されること等により, 跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度についても減少する傾向となっていると考えられる。

Table 13 Changes in the 0.1 mol/L HCl-Cd concentration^{a)} of soil after harvest

Year	Season	Test Crops	AP ^{b)}	SP ^{c)}	Significance test (difference between the processing)	<i>p</i> -value of single regression analysis ^{d)}	
			(mg/kg)	(mg/kg)		AP ^{b)}	SP ^{c)}
2009	Start	—	0.19 (0.01) ^{e)}	0.20 (0.02)	N.S. ^{f)}	—	—
2009	Summer	Carrot	0.21 (0.01)	0.21 (0.02)	N.S.	—	—
2009	Winter	Spinach	0.20 (0.003)	0.18 (0.01)	Pending ^{g)}	—	—
2010	Summer	Spinach	0.19 (0.01)	0.17 (0.02)	Pending	—	—
2010	Winter	Qing geng cai	0.18 (0.02)	0.18 (0.01)	N.S.	0.55	0.20
2011	Summer	Turnip	0.19 (0.004)	0.18 (0.01)	Pending	0.41	0.11
2011	Winter	Spinach	0.20 (0.01)	0.17 (0.01)	Significance ^{h)}	0.63	< 0.05
2012	Summer	Carrot	0.19 (0.005)	0.15 (0.01)	Significance	0.41	< 0.01
2012	Winter	Spinach	0.21 (0.01)	0.17 (0.01)	Significance	0.98	< 0.01
2013	Summer	Carrot	0.20 (0.004)	0.16 (0.01)	Significance	0.89	< 0.01
2013	Winter	Spinach	0.22 (0.01)	0.16 (0.004)	Significance	0.34	< 0.01
2014	Summer	Carrot	0.20 (0.01)	0.15 (0.005)	Significance	0.30	< 0.01
2014	Winter	Spinach	0.21 (0.01)	0.15 (0.003)	Pending	0.17	< 0.01
2015	Summer	Carrot	0.15 (0.01)	0.11 (0.005)	Significance	0.80	< 0.01
2015	Winter	Spinach	0.16 (0.01)	0.11 (0.001)	Pending	0.29	< 0.01
2016	Summer	Carrot	0.19 (0.02)	0.12 (0.005)	Pending	0.30	< 0.01

a) Content in drying soil

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

d) The *p*-value which calculated from dispersion analysis for linear regression by examination start of each experimental plot

e) Standard deviation ($n=4 (2 \times 2)$ (repetition \times number of samples))

f) It was not significantly different for processing examination section

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4 (2 \times 2)$ (repetition \times number of samples))

g) It was pending decision to be significantly different for Standard plot and for interaction

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4 (2 \times 2)$ (repetition \times number of samples))

h) It was significantly different for processing examination section

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4 (2 \times 2)$ (repetition \times number of samples))

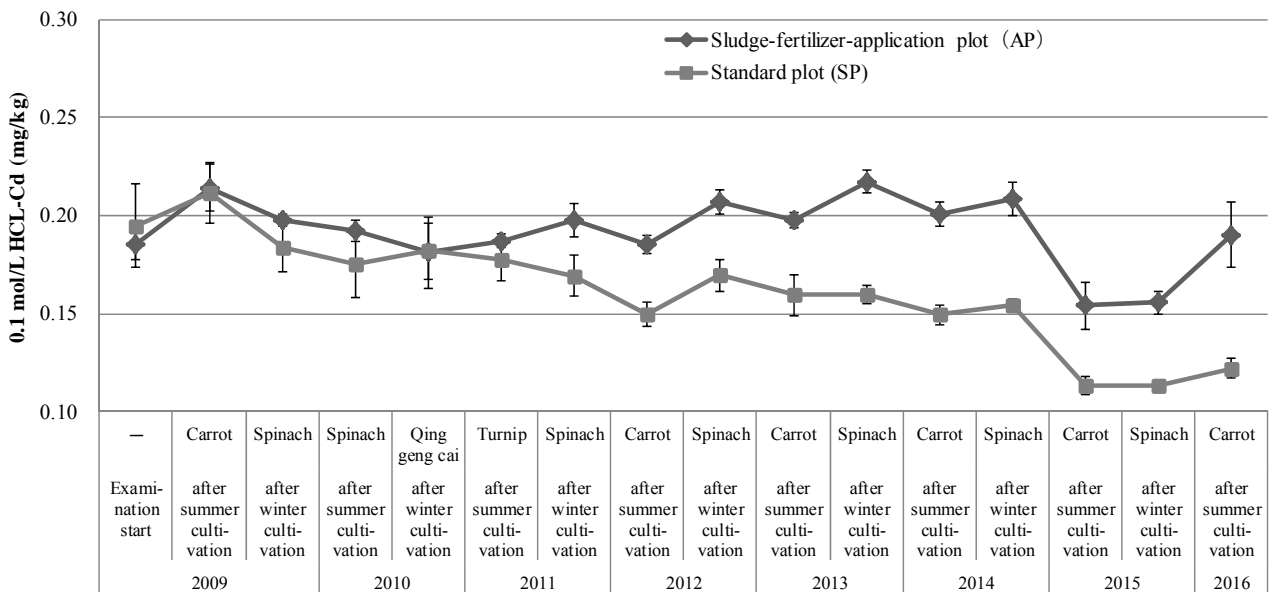


Fig.7 Changes in the 0.1 mol/L HCl-Cd concentration of soil after harvest
(The error bar indicating the standard deviation)

(4.2) 跡地土壌の 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度

跡地土壌の 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度の推移は Table 14 及び Fig.8 のとおりである。

汚泥肥料施用区及び標準区の 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度の推移について傾向を把握するため、それぞれの処理区における、2009 年冬作からの経過月 (各試験の間隔は 6 ヶ月とした) に対する 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度の線形単回帰分析を行った (単回帰式の分散分析表の p 値により評価, 両側有意水準 5 %) (Table 14). 2016 年夏作跡地までの汚泥肥料施用区の回帰は有意でなく ($p=0.42$), 一定で推移している傾向であった. 一方, 標準区では, 2012 年夏作跡地以降, 回帰が有意となり下降傾向が認められ ($p<0.05$), 両試験区間の差は大きくなる傾向であった. この傾向は 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度と同様であった (Table 13 及び Fig.7).

また, 汚泥肥料施用区及び標準区の跡地土壌の 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cd 濃度と, 作物中の Cd 濃度もしくは Cd 吸収量との関係性を評価した (Fig.9 及び Fig.10). 汚泥肥料施用区は両関係に相関は認められず, 標準区はある程度の相関が認められた. これは, 汚泥肥料施用区は汚泥中に有機物を含むため, 不溶態化の影響を受け土壌中の 1 mol/L 酢安 (pH 7.0) 抽出 Cd が適切に評価できていないことが考えられた. 一方, 標準区は有機物を土壌に投入していないことから, 不溶態化の影響を汚泥肥料施用区ほど受けず 1 mol/L 酢安 (pH 7.0) による抽出が概ね適切に行われていると考えられ, この結果, 相関性が認められると考えられた.

Table 14 Changes in the exchangeable-Cd concentration^{a)} of soil after harvest

Year	Season	Test Crops	AP ^{b)}	SP ^{c)}	Significance test (difference between the processing)	<i>p</i> -value of single regression analysis ^{d)}	
			(mg/kg)	(mg/kg)		AP ^{b)}	SP ^{c)}
2009	Winter	Spinach	0.036 (0.002) ^{e)}	0.037 (0.002)	N.S. ^{f)}	—	—
2010	Summer	Spinach	0.038 (0.002)	0.036 (0.003)	N.S.	—	—
2010	Winter	Qing geng cai	0.041 (0.001)	0.037 (0.001)	Significance ^{g)}	—	—
2011	Summer	Turnip	0.036 (0.0004)	0.035 (0.003)	Pending ^{h)}	—	—
2011	Winter	Spinach	0.039 (0.001)	0.035 (0.002)	Significance	0.58	0.13
2012	Summer	Carrot	0.037 (0.001)	0.032 (0.001)	Significance	0.93	< 0.05
2012	Winter	Spinach	0.038 (0.001)	0.032 (0.003)	Significance	0.93	< 0.01
2013	Summer	Carrot	0.038 (0.001)	0.031 (0.001)	Significance	0.91	< 0.01
2013	Winter	Spinach	0.041 (0.003)	0.029 (0.002)	Significance	0.34	< 0.01
2014	Summer	Carrot	0.038 (0.0005)	0.026 (0.001)	Significance	0.38	< 0.01
2014	Winter	Spinach	0.039 (0.001)	0.026 (0.001)	Significance	0.31	< 0.01
2015	Summer	Carrot	0.034 (0.002)	0.024 (0.001)	Significance	0.80	< 0.01
2015	Winter	Spinach	0.034 (0.001)	0.021 (0.000)	Pending	0.18	< 0.01
2016	Summer	Carrot	0.040 (0.003)	0.024 (0.000)	Pending	0.42	< 0.01

a) Content of cadmium dissolved with pH 7.0, 1 mol/L ammonium acetate solution in the drying soil

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

d) The *p*-value which calculated from dispersion analysis for linear regression by examination start of each experimental plot

e) Standard deviation ($n=4 (2 \times 2)$ (repetition \times number of samples))

f) It was not significantly different for processing examination section (two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4 (2 \times 2)$ (repetition \times number of samples))

g) It was significantly different for processing examination section (two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4 (2 \times 2)$ (repetition \times number of samples))

h) It was pending decision to be significantly different for Standard plot and for interaction (two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4 (2 \times 2)$ (repetition \times number of samples))

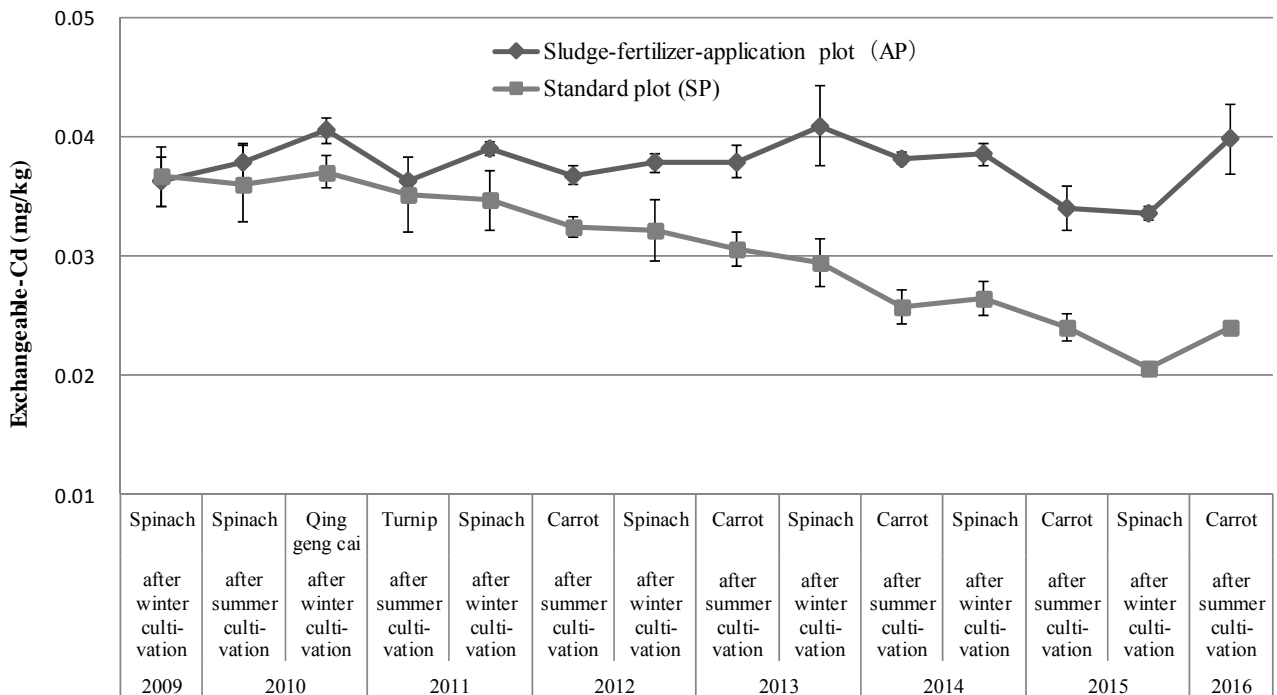


Fig.8 Changes in the exchangeable-Cd concentration of soil after harvest
(The error bar indicating the standard deviation)

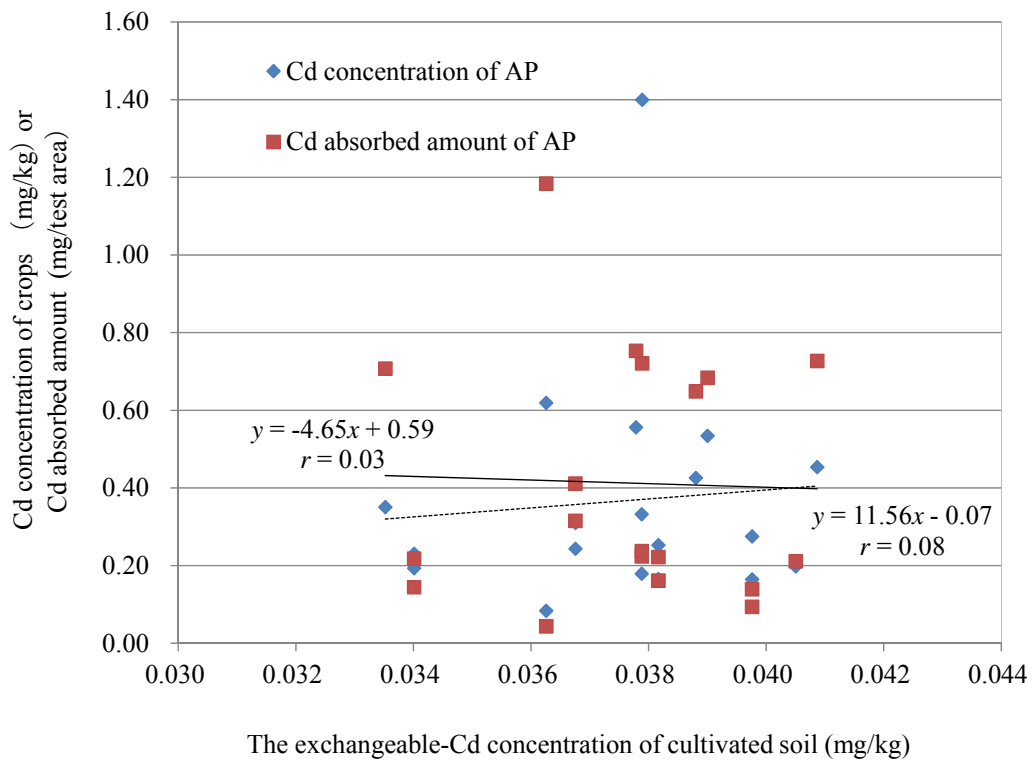


Fig.9 Correlation between Cd concentration or absorption amount in crops and the exchangeable Cd in cultivated soil (Sludge-fertilizer-application plot(AP))

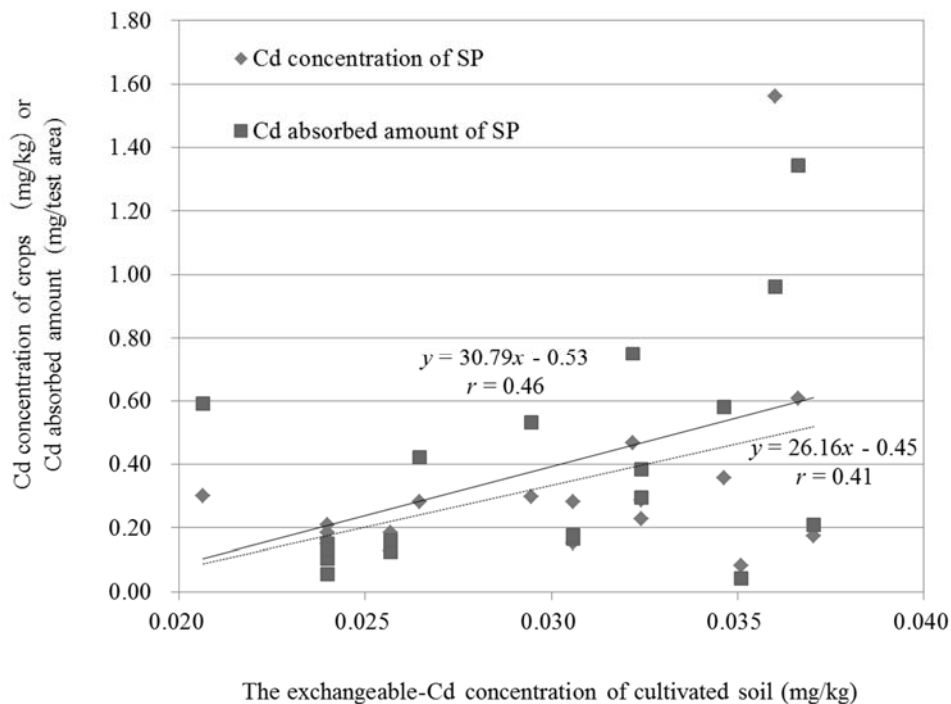


Fig.10 Correlation between Cd concentration or absorption amount in crops and the exchangeable Cd in cultivated soil (Standard plot (SP))

(4.3) 跡地土壌の 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cu 及び Zn 濃度

跡地土壌の 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cu 及び Zn 濃度の推移 (2009 年冬作～2016 年夏作まで) は Table 15 及び Fig.11 のとおりである。汚泥肥料中にカドミウムと比較して多量に含まれる銅及び亜鉛について、カドミウムの土壌蓄積の参考とするため推移を確認した。

汚泥肥料施用区及び標準区の 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cu 及び Zn 濃度の推移について傾向を把握するため、それぞれの処理区における、2009 年冬作からの経過月 (各試験の間隔は 6 ヶ月とした) に対する 1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cu 及び Zn 濃度の線形単回帰分析を行った (単回帰式の分散分析表の p 値により評価, 両側有意水準 5%)。1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Cu については、汚泥肥料施用区は 2015 年冬作跡地以降、回帰が有意となり ($p < 0.05$) 上昇傾向が認められた。標準区の回帰は有意でなく ($p > 0.05$)、一定で推移している傾向であった。

1 mol/L 酢安 (pH 7.0)-Zn については、汚泥肥料施用区では、2011 年冬作跡地以降、回帰が有意となり ($p < 0.05$) 上昇傾向が認められた (ただし、2015 年冬作跡地を除く)。一方、標準区は 2015 年夏作跡地以降、回帰が有意となり ($p < 0.05$) 下降傾向が認められた。

黒ボク土を用い、高分子凝集剤を使用した汚泥の連用ポット試験において、汚泥の連用によって土壌中の可溶性のカドミウム、銅及び亜鉛の増加が認められ、施肥量が多いほど蓄積量は多く、銅及びカドミウム濃度の増加傾向は亜鉛ほど顕著ではなかったことが報告されており²¹⁾、この報告と結果は矛盾しないものであった。

また、亜鉛濃度の高い汚泥肥料を連用した試験において、負荷量が多い試験区 (1 作当たり 2 t/10a 及び 6 t/10a) の 7 作目 (コマツナ) 及び 9 作目 (コカブ) において土壌の pH 6.0 未満という条件で亜鉛の過剰症状 (クロロシス及び生育抑制) が認められたという報告がある²²⁾。本試験では土壌 pH を 6.0 以上に保っているため影響は少ないと考えられるが、亜鉛を多く含む汚泥肥料を多量に長期連用する場合には、土壌 pH の変動とともに亜鉛の過剰症状についても注意する必要があると考えられた。

Table 15 Changes in the exchangeable-Cu and Zn concentration^{a)} of soil after harvest

Year	Season	Test Crops	Cu				Zn			
			AP	SP	<i>p</i> -value of single regression analysis ^{b)}		AP	SP	<i>p</i> -value of single regression analysis ^{b)}	
					(mg/kg)	(mg/kg)			AP	SP
2009	Winter	Spinach	0.40 (0.07) ^{c)}	0.40 (0.03)	—	—	1.3 (0.1)	1.2 (0.2)	—	—
2010	Summer	Spinach	0.37 (0.02)	0.36 (0.04)	—	—	1.3 (0.04)	1.2 (0.2)	—	—
2010	Winter	Qing geng cai	0.35 (0.004)	0.33 (0.004)	—	—	1.3 (0.1)	1.1 (0.1)	—	—
2011	Summer	Turnip	0.29 (0.002)	0.28 (0.01)	—	—	1.5 (0.1)	1.3 (0.3)	—	—
2011	Winter	Spinach	0.46 (0.01)	0.39 (0.02)	0.93	0.66	1.6 (0.2)	1.3 (0.3)	< 0.05	0.33
2012	Summer	Carrot	0.40 (0.04)	0.37 (0.02)	0.75	0.83	1.6 (0.1)	1.1 (0.1)	< 0.01	0.99
2012	Winter	Spinach	0.35 (0.02)	0.33 (0.03)	0.99	0.64	1.7 (0.1)	1.3 (0.1)	< 0.01	0.63
2013	Summer	Carrot	0.33 (0.02)	0.31 (0.01)	0.70	0.35	1.9 (0.2)	1.2 (0.1)	< 0.01	0.75
2013	Winter	Spinach	0.36 (0.13)	0.25 (0.05)	0.63	0.10	1.9 (0.1)	1.1 (0.1)	< 0.01	0.67
2014	Summer	Carrot	0.41 (0.04)	0.34 (0.06)	0.99	0.16	2.2 (0.1)	1.0 (0.1)	< 0.01	0.26
2014	Winter	Spinach	0.54 (0.04)	0.42 (0.10)	0.25	0.76	1.8 (0.1)	0.8 (0.1)	< 0.01	0.05
2015	Summer	Carrot	0.50 (0.02)	0.37 (0.02)	0.09	0.98	1.4 (0.0)	0.7 (0.2)	< 0.05	< 0.01
2015	Winter	Spinach	0.58 (0.02)	0.40 (0.02)	< 0.05	0.64	1.6 (0.0)	0.6 (0.0)	0.05	< 0.01
2016	Summer	Carrot	0.54 (0.03)	0.39 (0.03)	< 0.01	0.44	2.0 (0.1)	0.3 (0.1)	< 0.05	< 0.01

a) Content of copper and zinc dissolved with pH 7.0, 1 mol/L ammonium acetate solution in the drying soil

b) The *p*-value which calculated from dispersion analysis for linear regression by examination start of each experimental plot

c) Standard deviation (n = 4 (2×2) (repetition × number of samples))

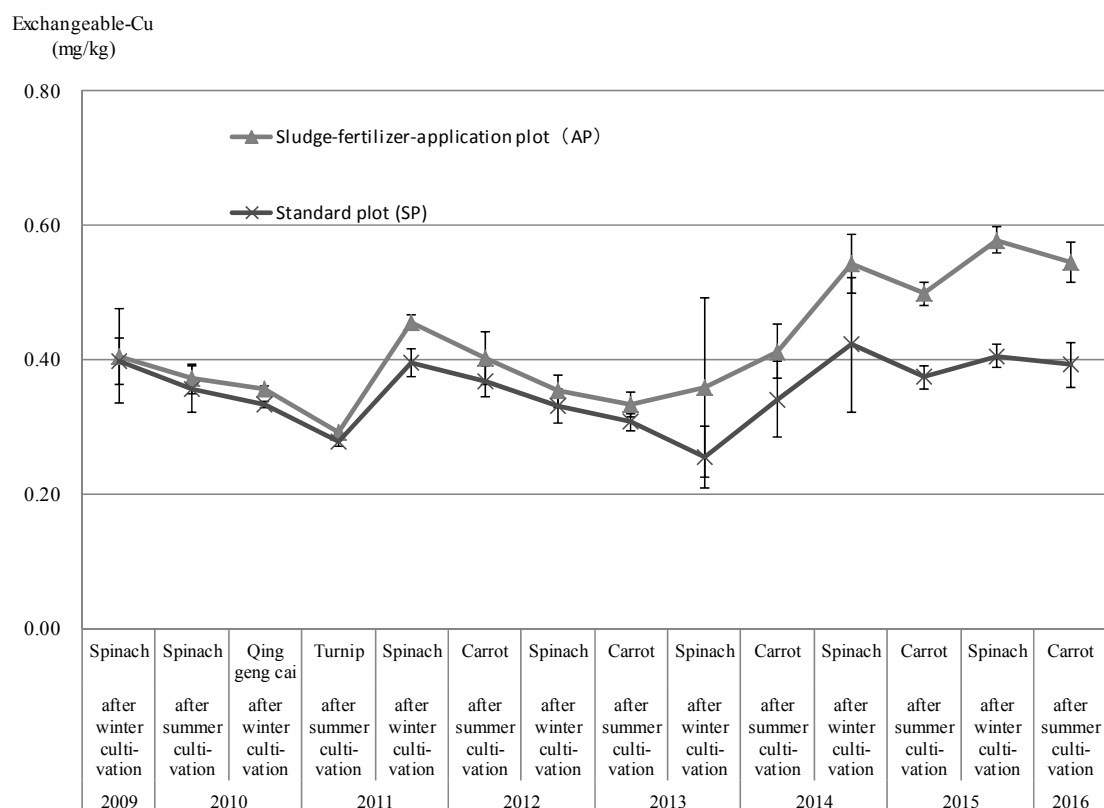


Fig. 11-1 Changes in the exchangeable-Cu concentration of soil after harvest (The error bar indicating the standard deviation)

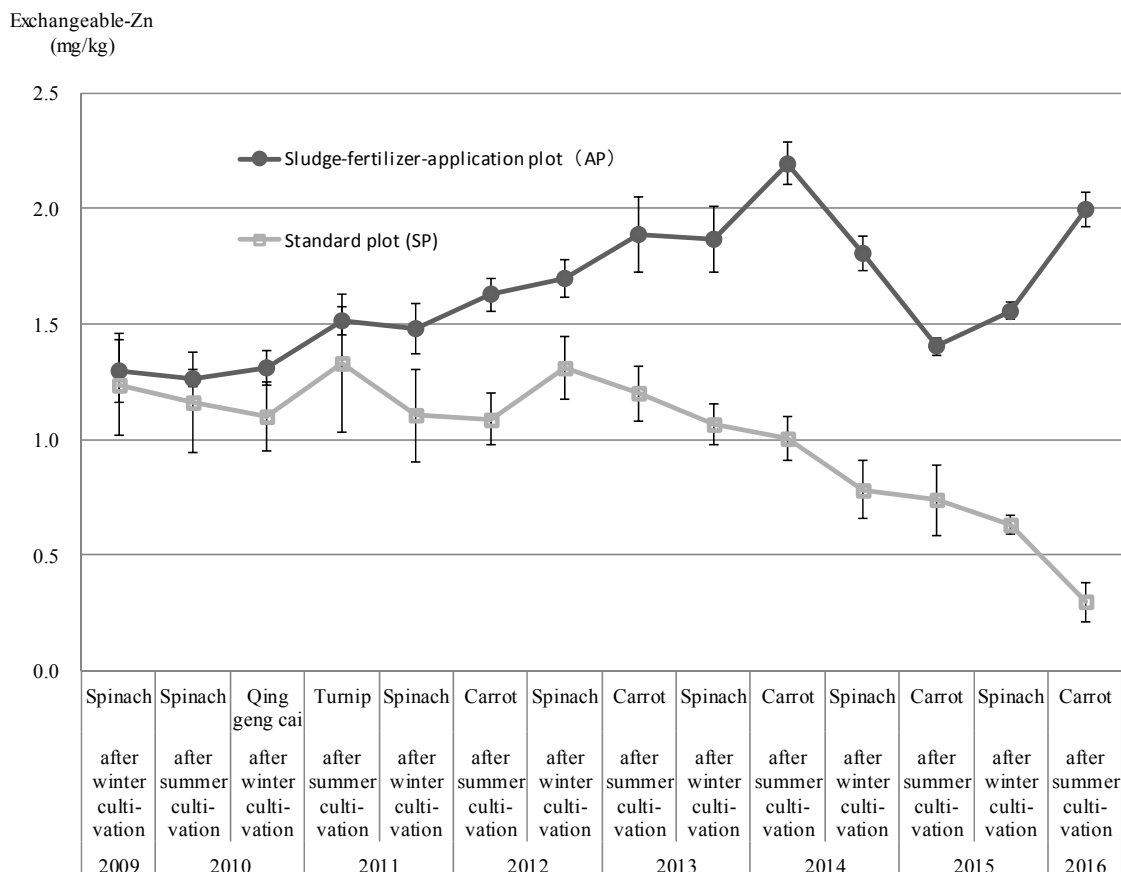


Fig.11-2 Changes in the exchangeable-Zn concentration of soil after harvest
(The error bar indicating the standard deviation)

(4.4) 跡地土壌の全カドミウム濃度

跡地土壌の全カドミウム濃度の推移は Table 16 及び Fig.14 のとおりである。

汚泥肥料施用区及び標準区の全カドミウム濃度の推移について傾向を把握するため、それぞれの処理区における、2009年夏作からの経過月(夏作から冬作までの間隔は6ヶ月とした)に対する全カドミウム濃度の線形単回帰分析を行った(単回帰式の分散分析表の p 値により評価, 両側有意水準5%) (Table 16). 2016年夏作跡地までの汚泥肥料施用区は上昇傾向($p < 0.05$)が認められ, 標準区は初めて下降傾向($p < 0.05$)が認められた。

汚泥肥料施用区及び標準区の全カドミウム濃度を比較したところ, 調査した2009年夏作から汚泥肥料施用区が標準区より有意に高くなっており, その差は2012年夏作以降, 顕著なものとなり以後同様の結果が続いている。これは, 汚泥肥料施用区は汚泥肥料由来のカドミウム負荷量が, 作物体の収穫による土壌中カドミウムの圃場外への持ち出し量よりも多いため, カドミウムが蓄積する傾向にあるが, 標準区は肥料由来のカドミウム負荷がないためと考えられる。

Table 16 Changes in the total-Cd concentration^{a)} of soil after harvest

Year	Season	Test Crops	AP ^{b)}		SP ^{c)}		Significance test (difference between the processing)	<i>p</i> -value of single regression analysis ^{d)}	
			(mg/kg)	(0.02) ^{e)}	(mg/kg)	(0.03)		AP ^{b)}	SP ^{c)}
2009	Summer	Carrot	0.51	(0.02) ^{e)}	0.48	(0.03)	Significance ^{f)}	—	—
2010	Summer	Spinach	0.52	(0.01)	0.49	(0.03)	Significance	—	—
2011	Summer	Turnip	0.51	(0.02)	0.48	(0.02)	Significance	—	—
2012	Summer	Carrot	0.52	(0.02)	0.46	(0.03)	Significance	—	—
2013	Summer	Carrot	0.53	(0.01)	0.46	(0.03)	Significance	—	—
2014	Summer	Carrot	0.57	(0.03)	0.47	(0.03)	Significance	<i>p</i> < 0.05 ^{g)}	0.16
2015	Summer	Carrot	0.57	(0.01)	0.46	(0.01)	Significance	<i>p</i> < 0.01	0.06
2016	Summer	Carrot	0.54	(0.00)	0.45	(0.02)	Significance	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05

a) Content in the drying soil

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

d) The *p*-value which calculated from dispersion analysis for linear regression by examination start of each experimental plot

e) Standard deviation (*n*=4 (2×2) (repetition × number of samples))

f) It was significantly different for processing examination section

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, *n*=4 (2×2) (repetition × number of samples))

g) It show that regression is significant in *p* < 0.05 (5 % of both sides levels of significance)

(4.5) 跡地土壌の全カドミウム濃度の水平分布

2016年夏作ニンジンの跡地土壌について、全カドミウム濃度の水平分布を調査した。その結果、汚泥肥料施用区の試験区境界-0.9 mと試験区境界+0.9 mの全カドミウム濃度は有意差が認められた(*p* < 0.05)が、それ以外は有意差は認められなかった(*p* > 0.05)。また、標準区はすべての箇所間で有意差は認められなかった(*p* > 0.05) (Table 17)。

既報³⁾ではカドミウムの垂直移動は認められていない。また、試験区以外はすべて標準区と同じ施肥設計で施用されており、カドミウムの移動がないとすれば汚泥肥料施用区は試験区内と試験区外で全カドミウム濃度はそれぞれ同濃度であると考えられるが、試験区境界-0.9 mから試験区境界+0.3 mまでの全カドミウム濃度は有意差が認められなかった(*p* > 0.05)。このことから、試験区外0.3 mまでカドミウムの移動があったが試験区外0.9 mまでは移動していないことが示唆された。

Table 17 Horizontal distribution of total-Cd cocentration^{a)} in soil after harvest

Year	Season	Test Crop	Test area	Test area boundary		Test area boundary		Test area boundary		Test area boundary	
				-0.9 m (mg/kg)	(0.02) ^{c)}	-0.3 m (mg/kg)	(0.04)	+0.3 m (mg/kg)	(0.01)	+0.9 m (mg/kg)	(0.004)
2016	Summer	Carrot	Sludge-fertilizer-application plot (AP)	0.55 ^{Xb)}	(0.02) ^{c)}	0.51 ^{XY}	(0.04)	0.47 ^{XY}	(0.01)	0.42 ^Y	(0.004)
			Standard plot(SP)	0.46 ^Z	(0.03)	0.43 ^Z	(0.01)	0.42 ^Z	(0.02)	0.42 ^Z	(0.04)

a) Content in the dry matter

b) There is no significant difference between the same codes (Tukey test, significance level 5 %)

c) Standard deviation ($n = 2$)

(5) 作物体のカドミウム濃度及び吸収量

2009年夏作から2016年夏作までの各試験での作物体のカドミウム濃度及び吸収量の推移を Table 18 及び Fig.12 に示した。

2011年以降, 冬作ホウレンソウのカドミウム濃度は, 汚泥肥料施用区が標準区に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。これは, 汚泥肥料施用区ではホウレンソウが吸収可能な形態のカドミウム濃度が標準区と比較して高い状態が2011年冬作以降続いていることが原因と考えられる。しかし, 作物体中のカドミウム濃度は Codex 基準値に比べて低い濃度で推移している。

Table 18 Absorption and the amount of cadmium concentration of each crops in 2009~2016

Year	Season	Test Crops	Part	Cadmium Concentration ^{a)}				Quantity of cadmium uptake			
				AP ^{b)} (mg/kg)	SP ^{c)} (mg/kg)	Significance test	Rate ^{d)} (%)	AP ^{b)} (mg/plot)	SP ^{c)} (mg/plot)	Significance test	Rate ^{d)} (%)
2009	Summer	Carrot	Root	0.12	0.11	N.S. ^{f)}	103.3	0.21	0.20	N.S.	108.8
				(0.01) ^{e)}	(0.02)			(0.02)	(0.03)		
			Leaf	0.24	0.22	N.S.	109.2	0.32	0.31	N.S.	105.3
			Total	-	-			0.54	0.50	N.S.	106.7
								(0.03)	(0.04)		
2009	Winter	Spinach	Edible portion	0.62	0.61	N.S.	102.2	1.18	1.34	N.S.	88.1
				(0.01)	(0.02)			(0.004)	(0.02)		
2010	Summer	Spinach	Edible portion	1.40	1.56	N.S.	89.7	0.72	0.96	N.S.	74.9
				(0.10)	(0.07)			(0.04)	(0.01)		
2010	Winter	Qing geng cai	Edible portion	0.20	0.17	Signifi- cance ^{g)}	113.1	0.21	0.21	N.S.	101.5
				(0.01)	(0.01)			(0.01)	(0.01)		
2011	Summer	Turnip	Root	0.08	0.08	N.S.	100.4	0.04	0.04	N.S.	99.3
				(0.01)	(0.002)			(0.003)	(0.00)		
			Leaf	0.16	0.17	N.S.	96.6	0.10	0.11	Pending ^{h)}	89.8
				(0.01)	(0.01)			(0.01)	(0.01)		
			Total	-	-			0.15	0.16	Pending	92.4
								(0.01)	(0.01)		
2011	Winter	Spinach	Edible portion	0.53	0.36	Signifi- cance	150.0	0.68	0.58	Signifi- cance	117.7
				(0.01)	(0.02)			(0.02)	(0.05)		

a) Content in the dry matter

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

d) AP/ SP

e) Standard deviation ($n=4$ (2×2) (repetition \times number of samples))

f) It was not significantly different for processing examination section

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition \times number of samples))

g) It was significantly different for processing examination section

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition \times number of samples))

h) It was pending decision to be significantly different for Standard plot and for interaction

(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition \times number of samples))

Table 18 Continue

Year	Season	Test Crops	Part	Cadmium Concentration ^{a)}			Quantity of cadmium uptake				
				AP ^{b)} (mg/kg)	SP ^{c)} (mg/kg)	Significance test	Rate ^{d)} (%)	AP ^{b)} (mg/plot)	SP ^{c)} (mg/plot)	Significance test	Rate ^{d)} (%)
2012	Summer	Carrot	Root	0.24 (0.01)	0.23 (0.01)	Pending	106.3	0.32 (0.01)	0.30 (0.02)	Pending	106.5
			Leaf	0.31 (0.01)	0.29 (0.02)	Pending	107.5	0.41 (0.005)	0.38 (0.04)	Pending	107.3
			Total	-	-			0.73 (0.02)	0.68 (0.06)	Pending	106.9
2012	Winter	Spinach	Edible portion	0.56 (0.02)	0.47 (0.03)	Signifi- cance	119.2	0.75 (0.01)	0.75 (0.08)	N.S.	100.6
2013	Summer	Carrot	Root	0.18 (0.02)	0.15 (0.02)	N.S.	117.4	0.22 (0.02)	0.17 (0.004)	Signifi- cance	134.3
			Leaf	0.33 (0.02)	0.28 (0.03)	Signifi- cance	117.4	0.24 (0.01)	0.18 (0.01)	Pending	133.3
			Total	-	-			0.46 (0.03)	0.34 (0.01)	Signifi- cance	133.8
2013	Winter	Spinach	Edible portion	0.45 (0.02)	0.30 (0.03)	Signifi- cance	152.1	0.73 (0.06)	0.53 (0.07)	Signifi- cance	136.4
2014	Summer	Carrot	Root	0.17 (0.01)	0.13 (0.01)	Signifi- cance	129.6	0.16 (0.01)	0.13 (0.010)	Signifi- cance	127.4
			Leaf	0.25 (0.00)	0.18 (0.02)	Pending	137.3	0.22 (0.00)	0.16 (0.03)	Pending	137.3
			Total	-	-			0.38 (0.01)	0.29 (0.04)	Pending	132.9
2014	Winter	Spinach	Edible portion	0.43 (0.02)	0.28 (0.03)	Signifi- cance	151.2	0.65 (0.02)	0.42 (0.06)	Pending	153.8
2015	Summer	Carrot	Root	0.19 (0.03)	0.15 (0.02)	Pending	128.0	0.14 (0.02)	0.10 (0.004)	Pending	139.5
			Leaf	0.23 (0.03)	0.19 (0.02)	Signifi- cance	124.0	0.22 (0.01)	0.15 (0.01)	Signifi- cance	143.9
			Total	-	-			0.36 (0.03)	0.26 (0.02)	Signifi- cance	142.1
2015	Winter	Spinach	Edible portion	0.35 (0.02)	0.30 (0.03)	Signifi- cance	116.2	0.71 (0.04)	0.59 (0.06)	Signifi- cance	120.0
2016	Summer	Carrot	Root	0.16 (0.05)	0.16 (0.04)	N.S.	100.6	0.14 (0.02)	0.14 (0.022)	N.S.	102.9
			Leaf	0.28 (0.00)	0.21 (0.02)	Pending	131.7	0.09 (0.02)	0.06 (0.01)	Signifi- cance	169.7
			Total	-	-			0.23 (0.03)	0.19 (0.03)	Signifi- cance	122.2
The sum total				-	-			8.49 (0.24)	7.81 (0.39)	Pending	108.7

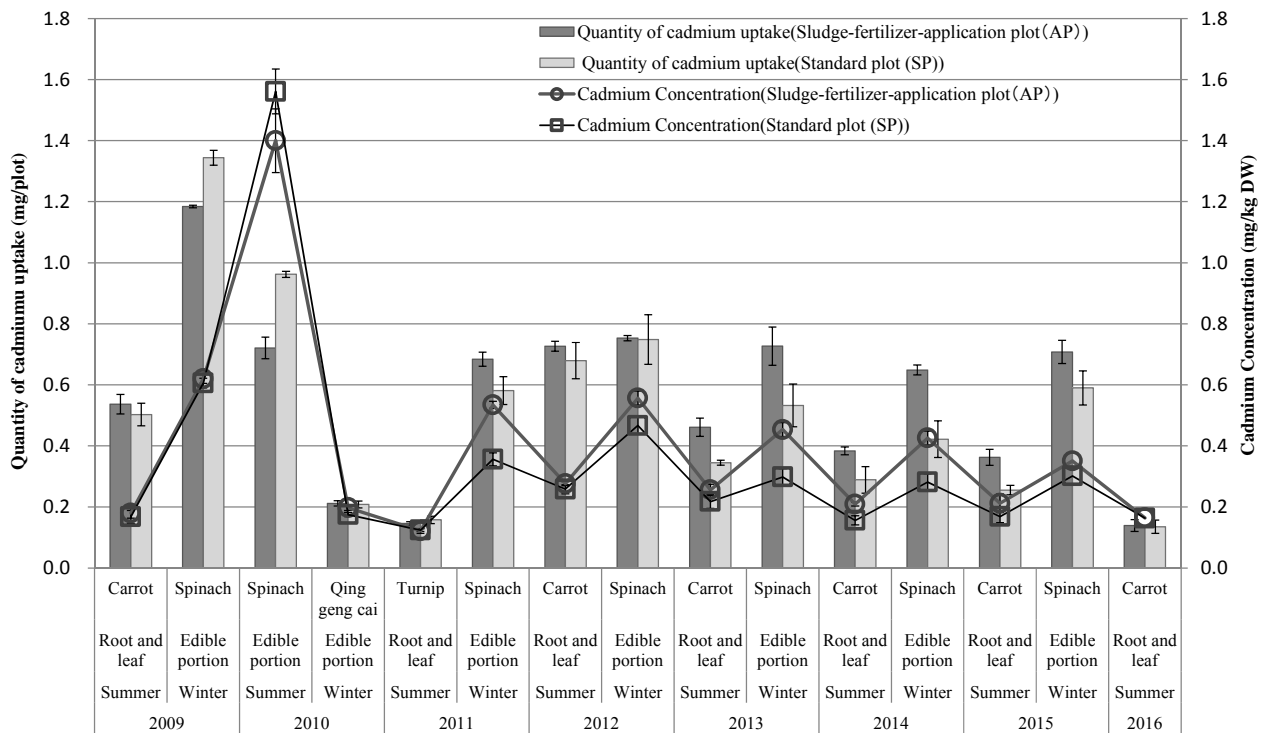


Fig.12 Cadmium concentration and absorption amount of each crops in 2009~2016
(The error bar indicating the standard deviation)

(6) カドミウム負荷量, 持出し量及び蓄積量

各試験での肥料由来のカドミウム負荷量, 作物体によるカドミウム持出し量, 土壌へのカドミウム蓄積量及び蓄積濃度の推移は Table 19 のとおりである. 施用肥料のカドミウム含有量に施用量を乗じて, 土壌へのカドミウム負荷量とした. カドミウム持出し量は, 収穫した作物体のカドミウム吸収量とした. 施用肥料によるカドミウム負荷量と作物体によるカドミウム持出し量の差をカドミウム蓄積量とした. カドミウム蓄積量を試験区当たりの土壌量(作土の深さ 15 cm, 土壌の仮比重 1.0 とし, 試験区 4 m²当たりの土壌量を 600 kg とした)で除して, 土壌へのカドミウム蓄積濃度とした. これは, 土壌の作土の深さ及び仮比重が常に一定で, かつ肥料由来のカドミウムが全て作土に蓄積したと仮定して算出した.

カドミウム持出し量については, これまで実施した 15 作の試験の合計は, 汚泥肥料施用区で 8.49 mg/試験区, 標準区で 7.81 mg/試験区であった.

汚泥肥料施用区では, 各試験において, カドミウム負荷量と比較して持出し量が少ないことから土壌のカドミウム収支がプラスとなるため, 汚泥肥料の連用によるカドミウム負荷量の増加に伴って土壌蓄積するカドミウムが高まる傾向であることが考えられる. 実測値においても跡地土壌の全カドミウム濃度の増加傾向が認められている(上記(4.4)). 過去 15 作の試験における汚泥肥料施用区のカドミウム負荷量は 91.04 mg/試験区 (227 g/ha), カドミウム蓄積濃度(カドミウム蓄積量と試験区土壌量から算出した理論上の土壌中カドミウムの上昇濃度)は 0.138 mg/kg となった (Table 19).

跡地土壌の全カドミウム濃度について, 2009 年夏作跡地からの実測値と理論値の推移を Table 20 及び Fig.13 に示した. 汚泥肥料施用区及び標準区の全カドミウム濃度の理論値は, 2009 年夏作跡地土壌の実測値を起点として, Table 20 で算出したカドミウム蓄積濃度を累積し算出した. 標準区は実測値と理論値がほぼ

一致して推移していた。一方、汚泥肥料施用区は、理論値と比較して実測値の方が低い傾向で推移していた。これは、後藤ら²⁴⁾や上記(4.5)の調査結果から、土壌中のカドミウムの水平方向への移行が認められたように、耕運により一部のカドミウムが作土に留まらないことによるものと考えられた。

Table 19 Changes of the 2009~2016 year of the quantity of cadmium load by fertilizer, quantity of peculating due to the crops body, and quantity of cadmium accumulation to the soil

Year	Season	Test Crops	Sludge-fertilizer-application plot (AP)				Standard plot (SP)			
			Quantity of cadmium ^{a)}			Concentration of cadmium accumulation ^{e)}	Quantity of cadmium ^{a)}			Concentration of cadmium accumulation ^{e)}
			Load ^{b)}	Removal ^{c)}	Accumulation ^{d)}		Load ^{b)}	Removal ^{c)}	Accumulation ^{d)}	
(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/kg)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/kg)			
2009	Summer	Carrot	4.84	0.54	4.30	0.007	0	0.50	-0.50	-0.001
2009	Winter	Spinach	4.40	1.18	3.22	0.005	0	1.34	-1.34	-0.002
2010	Summer	Spinach	3.30	0.72	2.58	0.004	0	0.96	-0.96	-0.002
2010	Winter	Qing geng cai	2.64	0.21	2.43	0.004	0	0.21	-0.21	-0.0003
2011	Summer	Turnip	3.30	0.15	3.15	0.005	0	0.16	-0.16	-0.0003
2011	Winter	Spinach	7.04	0.68	6.35	0.011	0	0.58	-0.58	-0.001
2012	Summer	Carrot	7.28	0.73	6.55	0.011	0	0.68	-0.68	-0.001
2012	Winter	Spinach	7.28	0.75	6.53	0.011	0	0.75	-0.75	-0.001
2013	Summer	Carrot	7.28	0.46	6.82	0.011	0	0.34	-0.34	-0.001
2013	Winter	Spinach	7.28	0.73	6.55	0.011	0	0.53	-0.53	-0.001
2014	Summer	Carrot	7.28	0.38	6.90	0.011	0	0.29	-0.29	-0.0005
2014	Winter	Spinach	7.28	0.65	6.63	0.011	0	0.42	-0.42	-0.001
2015	Summer	Carrot	7.28	0.36	6.92	0.012	0	0.26	-0.26	-0.0004
2015	Winter	Spinach	7.28	0.71	6.57	0.011	0	0.59	-0.59	-0.0010
2016	Summer	Carrot	7.28	0.23	7.05	0.012	0	0.19	-0.19	-0.0003
Total			91.04	8.49	82.55	0.138	0.00	7.81	-7.81	-0.0130

a) It show every test plot 4 m²

b) Quantity of cadmium load by fertilizer = Total cadmium concentration of the fertilizer × Amount of the fertilizer application

c) Quantity of peculating due to the crops body = Yield (dry weight) × Cadmium concentration (dry matter)

d) Quantity of cadmium accumulation to the soil = 2) - 3)

e) Concentration of cadmium accumulation to the soil = 4) / Amount of test plot soil (600 kg)

Table 20 Changes in the actual total-Cd concentration and the theoretical total-Cd concentration^{a)} of soil after harvest

Year	Season	Test Crops	Actual measurement		Theoretical value	
			AP ^{b)} (mg/kg)	SP ^{c)} (mg/kg)	AP ^{b)d)} (mg/kg)	SP ^{c)e)} (mg/kg)
2009	Summer	Carrot	0.51 (0.02) ^{f)}	0.48 (0.03)	0.51	0.48
2010	Summer	Spinach	0.52 (0.01)	0.49 (0.03)	0.52	0.47
2011	Summer	Turnip	0.51 (0.02)	0.48 (0.02)	0.53	0.47
2012	Summer	Carrot	0.52 (0.02)	0.46 (0.03)	0.55	0.47
2013	Summer	Carrot	0.53 (0.01)	0.46 (0.03)	0.58	0.47
2014	Summer	Carrot	0.57 (0.03)	0.47 (0.03)	0.60	0.47
2015	Summer	Carrot	0.57 (0.01)	0.46 (0.01)	0.62	0.47
2016	Summer	Carrot	0.54 (0.00)	0.45 (0.02)	0.64	0.47

- a) Total-Cd concentration in the drying soil
- b) Sludge-fertilizer-application plot
- c) Standard plot
- d) This value is the theoretical total-cadmium concentration of soil when assuming that there was accumulation of the whole quantity cadmium derived from fertilizer to the surface soil of the test plots in a starting point in summer 2009
- e) This value is the theoretical total-cadmium concentration of soil when assuming that there was not accumulation of cadmium derived from fertilizer to the surface soil of the test plots in a starting point in summer 2009
- f) Standard deviation ($n = 4$ (2×2) (repetition \times number of samples))

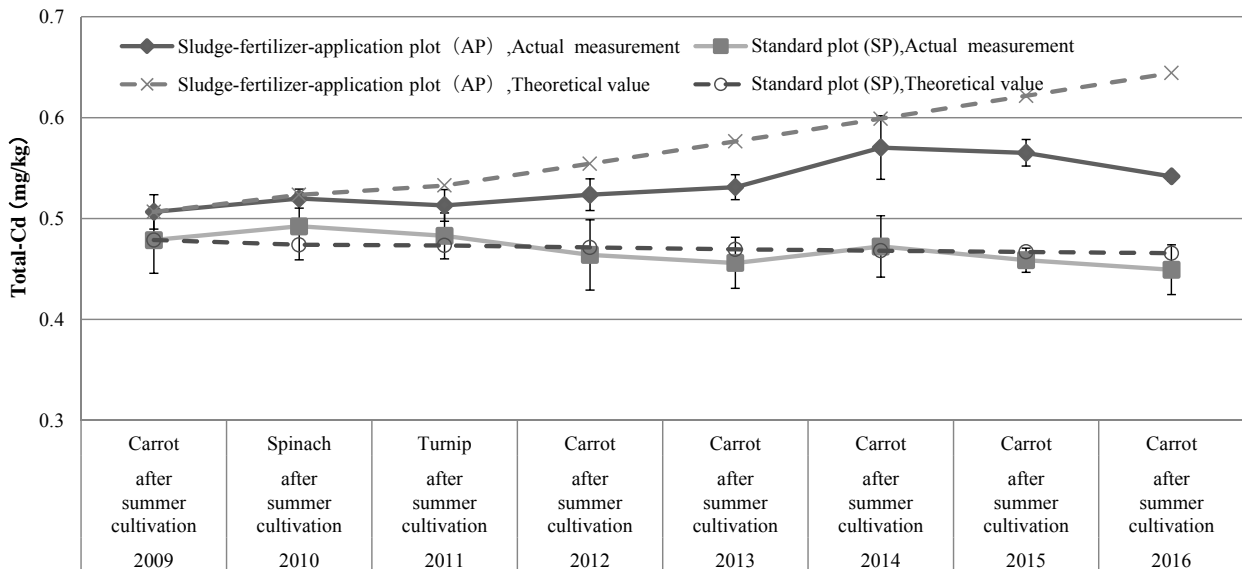


Fig.13 Changes in the actual total-Cd concentration and the theoretical total-Cd concentration of soil after harvest (The error bar indicating the standard deviation)

汚泥肥料施用区のカドミウム負荷量及び蓄積量と土壌中 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度の推移を Fig.14 に示した。

土壌中 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度は試験開始時から 2016 年夏作まで、ほぼ一定で推移しており、汚泥肥料の連用施用による有意な上昇又は下降傾向は認められなかった ($p > 0.05$)。

他の試験で高分子凝集剤を使用した汚泥肥料を用い 5 年 (5 作) 以上の黒ボク土圃場での連用試験を実施し、土壌の pH を 6.0~7.0 に維持した状態で作物を正常に生育させ、土壌中 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度の推移を確認した報告は見当たらない。類似の試験として黒ボク土に比べて腐植の少ない褐色森林土の圃場において水産系廃棄物由来堆肥を用い 5 年間 5 作の連用試験を実施した結果 (カドミウム総負荷量は 91.1 g/ha, 跡地土壌の pH は 6.0~6.7 の間で推移しており、本試験に近い条件となっている)、跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度は 0.15 mg/kg から 0.17 mg/kg にわずかに増加したことが報告されている²⁵⁾。

また、他機関の汚泥肥料の連用施用試験において、5 年又は 10 作程度の連用により汚泥肥料施用区の作物体カドミウム濃度が対照区に対して有意に高い傾向を示した報告は確認できない。本試験で有意差が確認されている要因として、供試汚泥肥料のカドミウム濃度が含有許容量付近と高いものを使用し対照とした標準区は施肥由来カドミウムがないように試薬を施肥しているため差を見やすい設計であること、1 試験区 4 m² と通常より小さい面積であるため均一な施肥・栽培管理が可能であること、耕耘作業には手押しの耕耘機を使用し更にガードプランツ区を設けていることから試験区外の土壌との交叉汚染が少ないこと、作物体のサンプリングを試験区の中央 1 m² 分全てを粉碎混合し分析用試料とし 2 点併行で分析しているためサンプリングによるばらつきが比較的小さいこと等、試験設計が要因となっている可能性も考えられる。

以上のことから、本試験で用いた土壌、し尿汚泥肥料及び作物等における連用施用においては、跡地土壌の全 Cd の増加傾向が認められており、今後、跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度が増加傾向となる可能性もあるため、推移を確認する必要があると考えられる。

一方、肥料由来のカドミウム負荷がない標準区において、土壌中 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度が減少傾向 ($p < 0.05$) となることは作物収穫による持出しによるものと考えられる。また、カドミウム負荷がある汚泥肥料施用区の土壌中 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度が、ほぼ一定で推移 ($p > 0.05$) していることは、作物収穫による持出しの他、土壌中に負荷されたカドミウムは水平移動により作土に留まらないものがあること^{26~27)} や、土壌や汚泥肥料中の有機物等と結合すること²⁰⁾ により 0.1 mol/L 塩酸には不溶な形態として作土中に蓄積していることが考えられる。

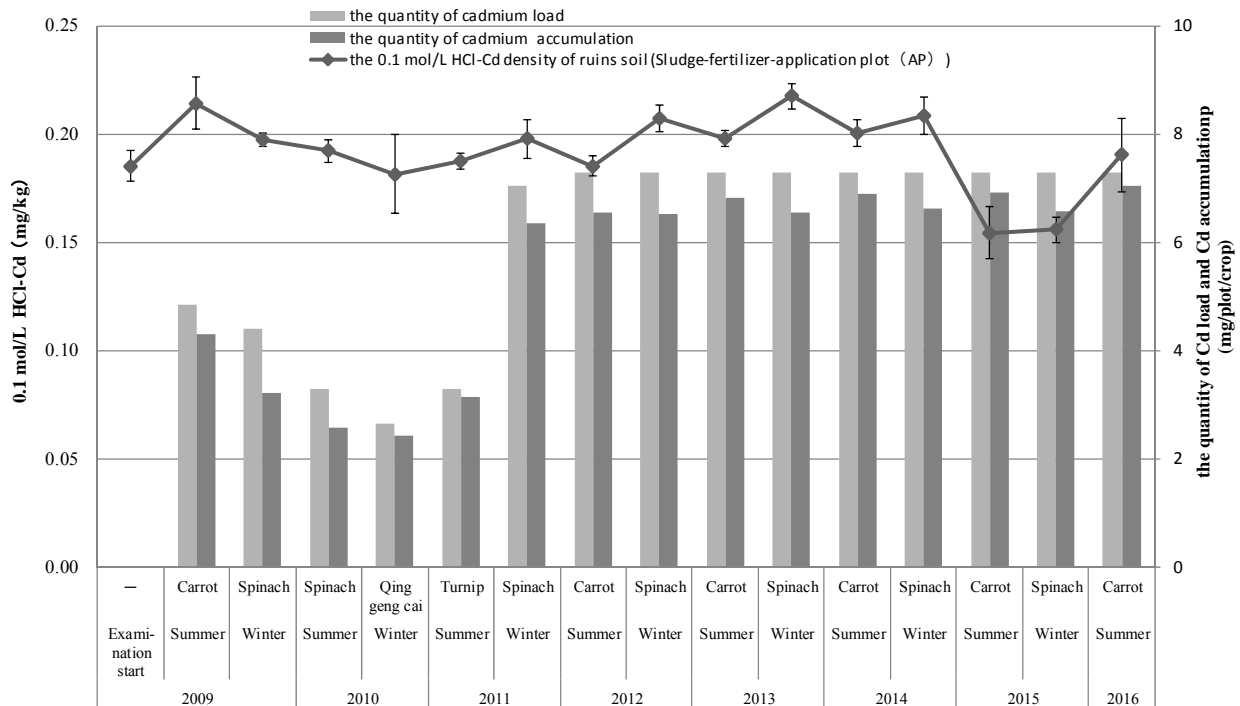


Fig.14 Changes of the 2009~2016 year of the quantity of cadmium load by fertilizer, the quantity of cadmium accumulation to soil, and the 0.1 mol/L HCl-Cd concentration of soil after harvest in sludge fertilizer application plot (AP) (The error bar indicating the standard deviation)

5. まとめ

肥料の有効性及び安全の確保に必要な課題に関する調査研究として、汚泥肥料の連用施用試験を2009年より引き続き行っており、汚泥肥料施用区及び汚泥肥料無施用の標準区の2試験区に、2015年冬作としてホウレンソウを、2016年夏作としてニンジン栽培し、土壌中のカドミウム濃度の変化及び作物体へのカドミウム吸収量を確認した。その結果、2016年夏作ニンジンの跡地土壌の全カドミウム濃度は汚泥肥料施用区が標準区に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。また、汚泥肥料施用区について、全カドミウムの水平分布を調査したところ系外への水平移動が認められた。作物体のカドミウム濃度は2015年冬作ホウレンソウで汚泥肥料施用区が標準区に比べて有意に高かった。作物体のカドミウム吸収量については、2015年冬作ホウレンソウ並びに2016年夏作ニンジンの葉部及び全体(葉+根)で、汚泥肥料施用区が標準区に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。また、作物体のカドミウム濃度はCodex基準値²³⁾未満であった。

試験開始時の2009年夏作から7年半15作の跡地土壌のカドミウム濃度及び作物体カドミウム濃度、吸収量の推移について整理した。跡地土壌の全カドミウム濃度は、汚泥肥料施用区で上昇傾向が認められ、標準区では一定で推移していることから、汚泥肥料の施用によりカドミウムが土壌蓄積していると考えられる。

汚泥肥料のカドミウム含有許容値付近(乾物濃度 4.9 mg/kg, 現物濃度 3.6 mg/kg)のし尿汚泥肥料を、2009年夏作~2011年冬作までの6作は1作当たりの施用量 181~483 kg/10 a(現物)を施用、2012年夏作~2016年夏作までの9作は500 kg/10a(現物)を施用し、年2作の試験を7年半、15作行った。これまでのところ、汚泥肥料を施用していない標準区の結果との比較から、汚泥肥料由来のカドミウムは作土中に蓄積し、作物に

吸収されていると考えられるが、作物体中のカドミウム濃度についても Codex 基準値に比べて低い濃度で推移している。本試験条件においてカドミウム負荷量年間 6~10 mg/4 m² (15~26 g/ha) での 2 年半及びカドミウム負荷量年間約 15 mg/4 m² (36 g/ha) での 5 年間の汚泥肥料連用施用であれば、カドミウムの作物体への吸収量が増大する可能性は低いと考えられる。しかし、更に長期に連用を継続した場合や、汚泥肥料施用量を増加させた場合又は黒ぼく土より有機物含有量の少ない土壌の場合における汚泥肥料由来のカドミウムの土壌中への蓄積及び作物体の吸収については知見を集積する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 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 28 年 12 月 19 日, 農林省告示第 2535 号 (2016)
- 2) 農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課 肥料企画班:汚泥肥料の規制のあり方に関する懇談会報告書 平成 21 年 3 月, (2009)
< http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_hiryo/odei_hiryo/pdf/honnbnun.pdf >
- 3) 廣井利明, 五十嵐総一, 鈴木時也, 橋本良美, 田中雄大, 阿部文浩, 加島信一:カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における汚泥肥料連用の影響(続報)ー2013 年冬作・2014 年夏作ー, 肥料研究報告, 8, 79~113, (2015)
- 4) 阿部進, 鈴木時也, 田中雄大, 阿部文浩, 橋本良美, 廣井利明, 加島信一:カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における汚泥肥料連用の影響(続報)ー2014 年冬作・2015 年夏作ー, 肥料研究報告, 9, 77~109, (2016)
- 5) 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/obj/shikhenho_2016.pdf >
- 6) 埼玉県ホームページ:主要農作物施肥基準 平成 25 年 3 月
< <http://www.pref.saitama.lg.jp/a0903/sehikijun.html> >
- 7) 農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課 肥料企画班:汚泥肥料の施用に係る指導実態等に関するアンケート結果(抜粋), (2008)
< http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_hiryo/odei_hiryo/pdf/03_data1.pdf >
- 8) 千葉県 農林水産技術推進会議農林部会:肥料価格高騰に伴う土壌管理・施肥適正化指導指針 平成 20 年 9 月, 20, (2008)
< <http://www.pref.chiba.lg.jp/ninaite/network/h21-fukyuu/documents/kakakukoutou.pdf> >
- 9) 栃木県 農作物施肥基準ー環境と調和のとれた土づくり・施肥設計の手引き 平成 18 年 1 月, 110, (2006)
< <http://www.pref.tochigi.lg.jp/g04/work/nougyou/keiei-gijyutsu/sehikijun.html> >
- 10) 群馬県 作物別施肥基準及び土壌診断基準 おでい肥料と土壌の重金属
< <http://www.aic.pref.gunma.jp/agricultural/management/technology/soil/01/index.html> >
- 11) 有機性汚泥の緑農地利用委員会:有機性汚泥の緑農地利用, 183, 博友社, 東京(1991)
- 12) 農林水産省:地力増進基本指針, 平成 20 年 10 月 16 日
< http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_dozyo/pdf/chi4.pdf >
- 13) Perkin Elmer 社:マイクロ波分解装置取扱説明書, 分解メソッド集, ホウレンソウ
- 14) 財団法人日本土壌協会:土壌, 水質及び植物体分析法, 東京(2001)
- 15) 農林省省令:農用地土壌汚染対策地域の指定要件に係るカドミウムの量の検定の方法を定める省令, 昭

和 46 年 6 月 24 日農林省令第 47 号, 最終改正平成 24 年 8 月 6 日環境省令第 22 号(2012)

- 16) 日本土壌肥料学会監修:土壌環境分析法, 215~219, 博友社, 東京(1997)
- 17) 戸上和樹, 吉住佳与, 工藤一晃, 青木和彦, 三浦憲蔵:Bland-Altman 分析による土壌 pH を考慮した野菜可食部カドミウム濃度予測のための土壌抽出法の検証, 日本土壌肥料学雑誌, 83(5), 564~573, (2012)
- 18) 農林水産技術会議事務局:農林水産省委託プロジェクト生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発, 技術情報集, 47, (2013)
- 19) 有機性汚泥の緑農地利用委員会:有機性汚泥の緑農地利用, 106, 博友社, 東京(1991)
- 20) 独立行政法人 農業環境技術研究所:農作物中のカドミウム低減対策技術集, 平成 23 年 3 月, p49, (2011)
- 21) 海老原武久, 山田要, 松村尉:汚泥の農用地への利用に関する研究 第Ⅱ報 汚泥連用が土壌・作物に及ぼす影響, 群馬県農業試験場報告, 22, 49~58, (1982)
- 22) 伊藤淳次, 田村明長, 山根忠昭:し尿処理汚泥の連用が作物および土壌に及ぼす影響, 島根農試報告, 25, 83~100, (1991)
- 23) 農林水産省ホームページ:コーデックス委員会が策定した国際基準値
< http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_cd/kizyunti/ >
- 24) 後藤茂子, 林浩昭, 山岸順子, 米山忠克, 茅野充男:下水汚泥コンポストの長期連用に伴う重金属の土壌への蓄積と水平方向への移行, 日本土壌肥料学雑誌, 73(4), 391~396, (2002)
- 25) 農林水産技術会議事務局:農林水産生態系における有害化学物質の総合管理技術の開発, 研究成果, 471, 210~216, (2009)
- 26) 有機性汚泥の緑農地利用委員会:有機性汚泥の緑農地利用, 124~127, 博友社, 東京(1991)
- 27) 岡本 保:下水汚泥の農業利用上の留意点, 再生と利用, 34(127), 74~81, (2010)

Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued Report)
- Winter 2015 and Summer 2016 -

Toshiharu YAGI¹, Tokiya SUZUKI², Yudai TANAKA¹, Fumihiro ABE¹, Yoshimi HASHIMOTO¹,
Naoko TAMARU¹ and Shin ABE³,

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Food Safety and Consumer Affairs Bureau

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Sendai Regional Center

The aim of this research is to monitor the change of cadmium dissolved with 0.1 mol/L hydrochloric acid (acid-solubility-Cd) and pH 7.0, 1 mol/L ammonium acetate solution (exchangeable-Cd) in the soil. We have been investigating the cadmium absorption by crop since 2009. We have tested in the upland fields in which the soil is composed of the Andosol. And we have used sludge fertilizer and chemical reagents. We cultivated spinach in winter 2015 and carrot in summer 2016. Those crops were cultivated in the standard plot (SP) and the sludge-fertilizer-application plot (AP). In the SP, we used only chemical reagents for the crops. In the AP, we used 500 kg/10 a (fresh weight) of the sludge fertilizer and chemical reagents for the crops. The amount of nitrogen, phosphorus and potassium applied to each plot was designed on the basis of the fertilization standard shown on the Saitama prefecture's web site. The concentration of total cadmium in the crop, acid-solubility-Cd and exchangeable-Cd in the soil after each of the harvests were measured by the inductivity coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). As a result, the soil in the AP after the harvests has indicated a high concentration of the acid-solubility-Cd and the exchangeable-Cd compared with the soil in the SP since winter 2011. The concentration of total-Cd in the soil (from summer 2009 to summer 2016) showed significant increasing trend in the AP. Although the concentration of the acid-solubility-Cd (from summer 2009 to summer 2016) and exchangeable-Cd (from winter 2009 to summer 2016) in the soil showed significant decreasing trend in the SP, the concentration of those Cd in the soil did not show significant fluctuations in the AP. The concentrations of cadmium in each crop harvested (from summer 2009 to summer 2016) in the SP and AP were less than that of the CODEX standard. We consider that it is necessary to be conducted further monitoring of the cadmium-transition in the soil from now on.

Key words sludge fertilizer, continuous application, cadmium

(Research Report of Fertilizer, **10**, 101~140, 2017)

8 2016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

伊藤浩平¹, 藤田敏史², 千田正樹², 鈴木孝一郎³, 筒井久司⁴,
松尾信吾⁵, 八木啓二⁶, 五十嵐総一⁷, 白井裕治¹, 今川俊明⁸

キーワード 外部精度管理, 化成肥料, 鉍さいけい酸質肥料, ISO/IEC 17043, zスコア

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 (JIS Q 17025)¹⁾の要求事項を参考にした試験成績の信頼性確保についての考え方が重視されている. その要求事項には, 他機関との試験成績の整合性確認及び外部機関による試験成績の信頼性の確保が必須となっており, 試験所は共通試料による試験室間の共同試験に参加して外部精度管理を実施する等, 試験の信頼性確保に努めている.

肥料生産事業場の品質管理室, 肥料検査機関の試験所等においても, 試験成績の信頼性維持及び分析技術の向上のために管理用試料又は肥料認証標準物質²⁾による内部精度管理が日常的になりつつある. 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC)においても立入検査で収去した肥料の主成分及び有害成分の調査分析は不可欠であり, その試験法には信頼性の確保が求められる.

外部精度管理としての共通試料による肥料の共同試験は, 2005年度まで全国6か所の肥料品質保全協議会が個々に試料調製及び解析を行ってきた. しかし, 試験成績数が増加することで解析精度の向上が図れることから, 2006年度より肥料品質保全協議会等の試験所を中心に全国共通の試料を用いた共同試験を実施している. 均質性試験及び共同試験成績については ISO/IEC 17043 (JIS Q 17043)³⁾を参考に解析し, 2016年度は化成肥料及び鉍さいけい酸質肥料について全国共通試料を調製し, 共同試験を実施したのでその結果を報告する.

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料調製

化成肥料は, 粉碎して目開き 500 µm の網ふるいを全通させ, 品質の安定を図るため約3ヶ月間常温で保管

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

² 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

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

⁵ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

⁶ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

⁷ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター (現)長崎県北振興局農林部

⁸ 公益財団法人日本肥糧検定協会

した。その後、試料をよく混合し、のし餅状に広げて短冊状に9等分し、1～9の区分番号を付して容器に移した。この中から表1の混合操作表の組合せに従い4区分を抽出し、よく混合したのち4等分して元の容器に戻した。この操作を7回繰り返した後、1～9の各区分の容器から一定量ずつ採取し、よく混合した後、1袋当たり約200g入りの試料220個を調製し、ポリエチレン製袋で密封して配付時まで常温保管した。

鉍さいけい酸質肥料は、粉碎して目開き212 μ mの網ふるいを全通させた。ふるいを通した試料は、よく混合した後、のし餅状に広げて短冊状に9等分し、1～9の区分番号を付して容器に移した。この中から表1の混合操作表の組合せに従い4区分を抽出し、よく混合したのち4等分して元の容器に戻した。この操作を7回繰り返した後、1～9の各区分の容器から一定量ずつ採取し、よく混合した後、1袋当たり約180g入りの試料160個を調製し、ポリエチレン製袋で密封して配付時まで常温保管した。

表1 混合操作表

混合回数	1	2	3	4	5	6	7
	1	2	6	4	5	9	8
区分番号	7	6	8	9	7	2	4
	3	9	4	3	1	6	7
	8	5	1	5	2	4	3

2) 均質性確認試験

IUPAC/ISO/AOACの技能試験プロトコル^{4, 5)}の均質性試験に従い、2.1)で調製した共同試験用試料から10試料ずつ抜き取り均質性確認用試料とした。化成肥料についてはく溶性りん酸(C-P₂O₅)及びく溶性苦土(C-MgO)、鉍さいけい酸質肥料についてはく溶性苦土(C-MgO)を各均質性確認用試料につき2点併行で試験して均質性確認試験の成績とした。

3) 配付

試料番号を付した試料、実施要領及び分析成績報告書を参加試験室に送付した。2016年度、化成肥料は132試験室、鉍さいけい酸質肥料は75試験室が参加した。

3. 共同試験成績の試験項目及び試験方法

1) 試験項目

化成肥料については、水分(Mois)、窒素全量(T-N)、アンモニア性窒素(A-N)、く溶性りん酸(C-P₂O₅)、水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)、く溶性苦土(C-MgO)、水溶性ほう素(W-B)、ひ素全量(T-As)及び尿素性窒素(U-N)の10項目を試験項目とした。また、鉍さいけい酸質肥料については、可溶性けい酸(S-SiO₂)、アルカリ分(AL)及びく溶性苦土(C-MgO)の3項目を試験項目とした。

2) 試験方法

肥料等試験法(2015)⁶⁾を次のとおり例示した。尿素性窒素については、肥料等試験法(2015)のほかに、FAMICホームページにてweb公開している参考法⁷⁾(以下参考法とする。)と肥料等試験法(2016)⁸⁾に記載されている方法を例示した。なお、その他の試験方法を採用した試験室には、その方法の概要の報告を求めた。

- (1) 水分は、肥料等試験法 3.1.a(乾燥器による乾燥減量法)の(3)により定量。但し、試料採取量、乾燥温度及び乾燥時間は備考 3. に従い、備考 4. の揮発物の補正は行わない。
- (2) 窒素全量は、肥料等試験法 4.1.1a(ケルダール法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)(4.3)により定量。又は、4.1.1.b(燃焼法)により定量。
- (3) アンモニア性窒素(A-N)は、肥料等試験法 4.1.2.b(ホルムアルデヒド法)により定量。又は、4.1.2.a(蒸留法)により定量。
- (4) く溶性りん酸(C-P₂O₅)は、肥料等試験法 4.2.3.a.(バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)(4.3)により定量。
- (5) 水溶性りん酸(W-P₂O₅)は、肥料等試験法 4.2.4.a.(バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)(4.3)により定量。
- (6) 水溶性加里(W-K₂O)は、肥料等試験法 4.3.3.a(フレイム原子吸光法又はフレイム光度法)の(4.1.2)により試料溶液を調製し、同項(4.2)により定量。
- (7) く溶性苦土(C-MgO)は、肥料等試験法 4.6.2.a(フレイム原子吸光法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)により定量。
- (8) 水溶性ほう素(W-B₂O₃)は、肥料等試験法 4.8.2.a(アズメチン H 法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)(4.3)により定量。
- (9) ひ素全量(T-As)は、肥料等試験法 5.2.a(水素化物発生原子吸光法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)により定量。又は、5.2.b(ジエチルジチオカルバミン酸銀吸光光度法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)(4.3)により定量。
- (10) 尿素性窒素(U-N)は、肥料等試験法 6.3.a(ウレアーゼ法)の(4.1.1)(4.2)により試料溶液を調製し、同項(4.2)(4.3)により定量。又は、参考法及び肥料等試験法(2016)6.3.b(高速液体クロマトグラフ法)の(4.1.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)により定量。
- (11) 可溶性けい酸(S-SiO₂)は、肥料等試験法 4.4.1.a(ふっ化カリウム法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)により定量。
- (12) アルカリ分(AL)は、肥料等試験法 4.5.4.a(エチレンジアミン四酢酸塩法(以下「EDTA 法」という)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)により定量。
- 又は、同様の方法で試料溶液を調製、可溶性石灰(S-CaO)(肥料等試験法 4.5.2.a)及び可溶性苦土(S-MgO)(肥料等試験法 4.6.1.a)を測定し、肥料等試験法 4.5.4.a(フレイム原子吸光法)の(2)により算出。
- (13) く溶性苦土(C-MgO)は、肥料等試験法 4.6.2.a(フレイム原子吸光法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)により定量。

4. 統計解析方法及び試験成績の評価方法

1) 報告された試験成績の評価

(1) ロバスト法による \bar{x} スコアの求め方

まず、全体の値の中央値(Median)を求めた。次に、上四分位数及び下四分位数を求め、(a)式により四分位範囲(IQR)を算出した。

$$IQR = \text{下四分位数} - \text{上四分位数} \quad \cdots (a)$$

標準化された四分位範囲(*NIQR*)を(b)式により算出した。正規分布の場合、*NIQR*と標準偏差は一致する。

$$NIQR = IQR \times 0.7413 \quad \dots (b)$$

z スコア(*z*)を(c)式により算出した。*z* スコアは、各試験室の試験成績(x_i)の Median からの隔たり度合いを示す指標である。

$$z = (x_i - \text{Median}) / NIQR \quad \dots (c)$$

(2) *z*スコアによる評価

データの解析手法として、ISO/IEC 17043 (JIS Q 17043)³⁾を用い、各試験室の試験成績の *z* スコアより次のように評価を行った。

$ z \leq 2$	・・・ 満足
$2 < z < 3$	・・・ 疑わしい
$ z \geq 3$	・・・ 不満足

2) 試験成績全体を評価する統計量

各成分の報告された試験成績全体を評価するため、次の統計量を求めた。

- (1) 参加試験室数(データ数: *N*)。
- (2) *z*スコアによる評価が $|z| \leq 2$ (満足)、 $2 < |z| < 3$ (疑わしい)及び $|z| \geq 3$ (不満足)となった試験室数及びその割合(%)。
- (3) 外れ値を棄却しない全データの平均値(Mean)。
- (4) 全体の値の中央値(Median)。
- (5) *NIQR*を標準偏差とみなした Median の拡張不確かさ($U_{95\%}$) (包含係数: $k=2$)を(d)式により算出。

$$U_{95\%} = 2 \times NIQR / \sqrt{N} \quad \dots (d)$$

- (6) 全データの標準偏差(*s*)。
- (7) 標準化された四分位範囲(*NIQR*)を(b)式により算出した。正規分布の場合、*NIQR*は*s*と一致する。
- (8) ロバスト法から求めた相対標準偏差(RSD_{rob})を、(e)式により算出した。

$$RSD_{\text{rob}} = NIQR / \text{Median} \quad \dots (e)$$

(9) 肥料等試験法⁶⁾で共同試験の精度の目安として示されている室間再現相対標準偏差($CRSD_R$)。肥料等試験法において、共同試験の精度は、目安である $CRSD_R$ の値以内であることが推奨されており、これらの 1.5 倍までを許容している。この精度の目安は、クロマトグラフ法とクロマトグラフ法以外の方法で分けて設定されている。また、水分等の経験的分析法には適用されない。

5. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

2.2)において10試料を2点併行で分析した均質性試験の成績の総平均値(\bar{x})及びその成績について一元配置分散分析から得られた統計量を用いて算出した併行標準偏差(s_r), 試料間標準偏差(s_{bb}), 併行精度を含む試料間標準偏差(s_{b+r})を表2に示した. 更に, 肥料等試験法(2015)⁶⁾に示されている室間再現精度の目安($CRSD_R$)並びにそれらから算出(式1)した推定標準偏差($\hat{\sigma}_R$)を表2に示した.

均質性の判定は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル(2006)⁵⁾の手順を参考に実施した. まず, 試験成績の等分散性を確認するため, 試験成績について Cochran 検定を実施した. その結果, すべての成分において外れ値は認められなかったため, これらの成績について一元配置分散分析を実施した. 一元配置分散分析の結果は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル(1993)⁴⁾の判定式(式2)を用いて均質性の判定を行った. その結果, すべての成分において判定式(式2)を満たしていたことから, 分析用試料は均質であることを確認した. なお, 参考のため, 式5によって併行精度を含む試料間標準偏差(s_{b+r})を算出したところ, いずれの成分も $\hat{\sigma}_R$ と比較して十分に小さい値であった.

$$\hat{\sigma}_R = CRSD_R \times \bar{x} / 100 \quad \dots (式1)$$

$$s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R \quad \dots (式2)$$

$$s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2} \quad \dots (式3)$$

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$: 肥料等試験法(2015)に示されている室間再現精度(室間再現相対標準偏差(%))の目安

\bar{x} : 総平均値

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_{b+r} : 併行精度を含む試料間標準偏差

s_r : 併行標準偏差

s_{bb} : 試料間標準偏差

表2 均質性確認試験の結果

肥料の種類	分析成分	試料数	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	s_r ^{c)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{d)} (%) ^{b)}	s_{b+r} ^{e)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{f)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{g)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}
化成肥料	C-P ₂ O ₅	10	18.42	0.05	0.08	0.10	3	0.55	0.17
	C-MgO	10	2.47	0.03	0.01	0.03	4	0.10	0.03
鉍さいけい酸質肥料	C-MgO	10	7.18	0.08	0.04	0.09	4	0.29	0.09

a) 総平均定量値(試料数×2点併行分析)

b) 質量分率

c) 併行標準偏差

d) 試料間標準偏差

e) 併行精度を含む試料間標準偏差

$$s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2}$$

f) 肥料等試験法で示されている室間再現精度(室間再現相対標準偏差)の目安

g) 室間再現精度の目安から算出した併行標準偏差の推定値 $\hat{\sigma}_R = CRSD_R \times \bar{x} / 100$ h) 均質性の判定(s_{bb} の評価)のためのパラメータ

2) 試験成績の解析結果

4.2) (1)～(2)の試験室数及びzスコアで評価された各試験室数及びその割合を表3に示した。各成分の試験成績で「満足」との評価を受けた試験室の割合は、化成肥料中の尿素性窒素が96%と最も高く、鉍さいけい酸質肥料中のく溶性苦土が78%と最も低い割合を示した。一方、「不満足」と評価を受けた試験室の割合は、化成肥料ではく溶性りん酸の11%、鉍さいけい酸質肥料中ではく溶性苦土の14%がそれぞれ最も高い結果であった。直近の昨年度及び今年度と同じ化成肥料を用いた平成26年度と比較すると、「満足(|z|≤2)」と評価された試験室の割合は昨年度が77%～91%、平成26年度が72%～97%、「不満足(|z|≥3)」と評価された試験室の割合は昨年度が2%～17%、平成26年度が0%～17%であった。

4.2) (3)～(9)で求めた統計量を表4に示した。多くの成分で全体のMeanはMedianとほぼ一致したが、一部でMeanとMedianの差が大きい試験項目もみられた。また、全体の標準偏差sは、ロバスト法によって得られたNIQRと比較して基本的に大きな値を示す傾向が見られ、外れ値の影響を受けていることが考えられた。RSD_{rob}と各試験成分の濃度レベルにおけるCRSD_R及びCRSD_Rの1.5倍の値との関係を図1に示した。ここで、肥料等試験法のCRSD_Rはクロマトグラフ法とクロマトグラフ法以外の方法を分けて設定されており、尿素性窒素の試験成績についてはどちらの方法も混在していたため、これらを分けて整理した。HPLC法以外の方法で測定された尿素性窒素についてのみCRSD_Rの1.5倍を超えており、試験室間の成績のばらつきが比較的大きいことが推察された。その他の試験成分は、RSD_{rob}は肥料等試験法で精度として許容されているCRSD_Rの1.5倍の範囲内であった。

2006～2016年度に実施した試験項目のMedian, NIQR, RSD_{rob}及びCRSD_R等について、化成肥料は表5-1に、鉍さいけい酸質肥料は表5-2に示した。また、本年度7試験室以上報告のあった試験方法別のMedian, NIQR, RSD_{rob}及びCRSD_R等を表6に示した。

表3 zスコアによる試験成績の評価

試験項目	参加 試験 室数	$ z \leq 2$ ^{a)}		$2 < z < 3$ ^{b)}		$3 \leq z $ ^{c)}	
		試験 室数	割合 (%)	試験 室数	割合 (%)	試験 室数	割合 (%)
(化成肥料)							
Mois	118	110	93	4	3	4	3
T-N	117	107	91	3	3	7	6
A-N	114	101	89	8	7	5	4
C-P ₂ O ₅	114	95	83	6	5	13	11
W-P ₂ O ₅	120	102	85	13	11	5	4
W-K ₂ O	115	99	86	6	5	10	9
C-MgO	115	104	90	6	5	5	4
W-B ₂ O ₃	91	81	89	6	7	4	4
T-As	45	38	84	5	11	2	4
U-N	52	50	96	2	4	0	0
(鉱さいけい酸質肥料)							
S-SiO ₂	58	53	91	1	2	4	7
AL	66	55	83	7	11	4	6
S-CaO	52	43	83	5	10	4	8
S-MgO	52	44	85	1	2	7	13
C-MgO	73	57	78	6	8	10	14

a) zスコアによる評価が満足 ($|z| \leq 2$)となった試験室数及びその割合(%)

b) zスコアによる評価が疑わしい ($2 < |z| < 3$)となった試験室数及びその割合(%)

c) zスコアによる評価が不満足 ($3 \leq |z|$)となった試験室数及びその割合(%)

表4 共同試験成績の統計量

試験項目	試験室数	Mean ^{a)} (%, mg/kg) ⁱ⁾	Median ^{b)} (%, mg/kg) ⁱ⁾	$U_{95\%}$ ^{c)} (%, mg/kg) ⁱ⁾	s ^{d)} (%, mg/kg) ⁱ⁾	$NIQR$ ^{e)} (%, mg/kg) ⁱ⁾	RSD_{rob} ^{f)} (%)	$CRSD_R$ ^{g)} (%)	$1.5 \times CRSD_R$ ^{h)} (%)
(化成肥料)									
Mois	118	1.81	1.51	0.11	1.07	0.60	40.0	- ^{j)}	- ^{j)}
T-N	117	14.87	14.90	0.03	0.23	0.15	1.0	3	4.5
A-N	114	11.86	11.94	0.05	0.47	0.26	2.2	3	4.5
C-P ₂ O ₅	114	18.13	18.21	0.03	0.58	0.14	0.8	3	4.5
W-P ₂ O ₅	120	13.74	13.68	0.04	0.47	0.23	1.7	3	4.5
W-K ₂ O	115	14.98	14.97	0.05	0.54	0.24	1.6	3	4.5
C-MgO	115	2.39	2.40	0.02	0.14	0.08	3.4	4	6
W-B ₂ O ₃	91	0.163	0.162	0.002	0.013	0.007	4.6	6	9
T-As	45	9.38	9.68	0.30	1.34	0.99	10.3	16	24
U-N	52	2.48	2.54	0.10	0.36	0.37	14.7	- ^{k)}	- ^{k)}
〈HPLC法〉	7	2.91	2.92	0.003	0.06	0.01	0.4	8	12
〈HPLC法以外の方法〉	45	2.42	2.46	0.085	0.35	0.31	12.9	4	6
(鉱さいけい酸質肥料)									
S-SiO ₂	58	34.46	34.62	0.14	0.96	0.54	1.6	2.5	3.8
AL	66	50.21	50.42	0.25	1.98	1.03	2.1	2.5	3.8
S-CaO	52	39.85	40.01	0.28	1.76	1.03	2.6	2.5	3.8
S-MgO	52	7.37	7.45	0.04	0.59	0.15	2.0	4	6
C-MgO	73	7.21	7.36	0.03	0.74	0.13	1.8	4	6

- a) 全体の平均値
- b) 全体の中央値
- c) 全体の中央値の不確かさ
- d) 全体の標準偏差
- e) ロバスト標準偏差
- f) ロバスト相対標準偏差
- g) 肥料等試験法で精度の目安として推奨されている室間再現相対標準偏差
- h) 肥料等試験法で精度として許容されている室間再現相対標準偏差
- i) T-Asはmg/kg, その他の成分は%(質量分率)
- j) $CRSD_R$ は水分測定のような経験的分析法には適用されない。
- k) $CRSD_R$ はクロマトグラフ法とそれ以外の方法に分けて設定されているが、U-Nの統計量はどちらの試験成績も含んでいるため適用できない。

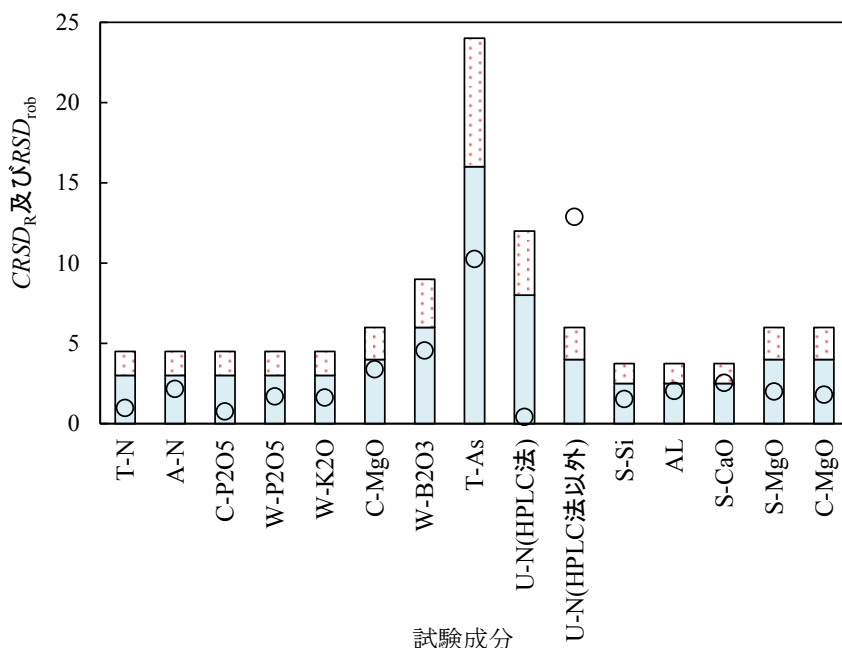


図1 各試験成績の $CRSD_R$ と RSD_{rob} の関係
 □ $1.5 \times CRSD-R$ □ $CRSD-R$ ○ $RSD-rob$

表5-1 複合肥料における2006～2016年度の共同試験成績の統計量

試験項目	実施年	試験項目に由来する 主な原料名	参加試験 室数	Median ^{a)} (%,mg/kg) ^{f)}	NIQR ^{b)} (%,mg/kg) ^{f)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
Mois	2006		147	1.70	0.30	17.7	- ^{g)}	- ^{g)}
	2007		146	4.99	0.35	7.0	- ^{g)}	- ^{g)}
	2008		145	2.87	0.24	8.5	- ^{g)}	- ^{g)}
	2009		145	3.53	0.15	4.2	- ^{g)}	- ^{g)}
	2010		143	1.58	0.41	26.0	- ^{g)}	- ^{g)}
	2011		137	1.00	0.12	12.0	- ^{g)}	- ^{g)}
	2013		136	2.93	0.84	28.7	- ^{g)}	- ^{g)}
	2014		133	1.78	0.16	8.7	- ^{g)}	- ^{g)}
	2016		118	1.51	0.60	40.0	- ^{g)}	- ^{g)}
T-N	2006	尿素	158	14.60	0.13	0.9	3	4.5
	2007	有機質肥料	145	8.74	0.07	0.8	4	6
	2010	尿素	140	14.11	0.11	0.8	3	4.5
	2014	有機質肥料	126	9.13	0.11	1.2	4	6
	2015	尿素	111	6.57	0.19	2.9	4	6
	2016	尿素	117	14.90	0.15	1.0	3	4.5
A-N	2006	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	150	11.46	0.10	0.9	3	4.5
	2007	硫酸アンモニア	143	6.20	0.09	1.4	4	6
	2008	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	147	12.56	0.16	1.2	3	4.5
	2009	硝酸アンモニア,硝酸アンモニア石灰肥料	144	5.56	0.07	1.3	4	6
	2010	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	128	11.53	0.18	1.6	3	4.5
	2011	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	138	13.49	0.18	1.3	3	4.5
	2012		130	2.39	0.04	1.9	4	6
	2013	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	136	9.92	0.74	7.5	4	6
	2014	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	122	7.99	0.12	1.5	4	6
	2015	りん酸アンモニア,硝酸アンモニア	106	2.33	0.08	3.4	4	6

a) 全体の中央値

b) ロバスト標準偏差

c) ロバスト相対標準偏差

d) 肥料等試験法で精度の目安として推奨されている室間再現相対標準偏差

e) 肥料等試験法で精度として許容されている室間再現相対標準偏差

f) T-As及びT-Cdはmg/kg, その他成分は%(質量分率)

g) CRSD_Rは水分測定のような経験的分析法には適用されない。h) CRSD_Rはクロマトグラフ法とそれ以外の方法に分けて設定されているが, U-Nの統計量はどちらの試験成績も含んでいるため適用できない。

表5-1 (続き)

試験項目	実施年	試験項目に由来する 主な原料名	参加試験 研究室数	Median ^{a)} (%,mg/kg) ^{f)}	NIQR ^{b)} (%,mg/kg) ^{f)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
A-N	2016	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	114	11.94	0.26	2.2	3	4.5
N-N	2009	硝酸アンモニア,硝酸アンモニア石灰肥料	123	3.62	0.11	3.2	4	6
	2012		115	2.17	0.10	4.8	4	6
	2015	硝酸アンモニア	92	1.29	0.07	5.5	4	6
T-P ₂ O ₅	2007	有機質肥料	140	10.35	0.10	0.9	3	4.5
C-P ₂ O ₅	2007	りん酸アンモニア	143	9.81	0.13	1.3	4	6
	2008	りん酸アンモニア	146	15.82	0.13	0.8	3	4.5
	2010	りん酸アンモニア	141	14.59	0.18	1.2	3	4.5
	2013	りん酸アンモニア, 過りん酸石灰	129	20.60	0.20	1.0	3	4.5
	2014	りん酸アンモニア, 過りん酸石灰	126	10.41	0.12	1.2	3	4.5
	2016	りん酸アンモニア, 重過りん酸石灰	114	18.21	0.14	0.8	3	4.5
S-P ₂ O ₅	2006	過りん酸石灰, りん酸アンモニア	144	10.88	0.11	1.0	3	4.5
	2009	過りん酸石灰	125	6.37	0.12	1.9	4	6
	2011	りん酸アンモニア, 過りん酸石灰	114	17.44	0.22	1.3	3	4.5
W-P ₂ O ₅	2006	過りん酸石灰, りん酸アンモニア	157	9.02	0.12	1.3	4	6
	2007	りん酸アンモニア	143	7.02	0.23	3.2	4	6
	2008	りん酸アンモニア	149	9.16	0.24	2.7	4	6
	2009	過りん酸石灰	144	4.57	0.08	1.8	4	6
	2010	りん酸アンモニア	144	11.56	0.52	4.5	3	4.5
	2011	りん酸アンモニア, 過りん酸石灰	133	14.51	0.19	1.3	3	4.5
	2012		131	2.86	0.06	2.1	4	6
	2013	りん酸アンモニア, 過りん酸石灰	134	12.09	0.38	3.1	3	4.5
	2014	りん酸アンモニア, 過りん酸石灰	132	5.34	0.12	2.2	4	6
	2015	りん酸アンモニア	126	6.15	0.07	1.1	4	6
	2016	りん酸アンモニア, 重過りん酸石灰	120	13.68	0.23	1.7	3	4.5
C-K ₂ O	2011	硫酸加里	122	10.41	0.23	2.2	3	4.5
W-K ₂ O	2006	塩化加里	156	12.38	0.22	1.8	3	4.5
	2007	硫酸加里	145	8.43	0.15	1.8	4	6
	2008	塩化加里	147	11.39	0.15	1.3	3	4.5

表5-1 (続き)

試験項目	実施年	試験項目に由来する 主な原料名	参加試験 室数	Median ^{a)} (%,mg/kg) ^{f)}	NIQR ^{b)} (%,mg/kg) ^{f)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
W-K ₂ O	2009	硫酸加里	145	8.35	0.13	1.5	4	6
	2010	塩化加里	142	14.72	0.17	1.2	3	5
	2011	塩化加里	132	10.17	0.17	1.7	3	4.5
	2012		131	2.43	0.06	2.4	4	6
	2013	塩化加里, 硫酸加里苦土	132	11.74	0.35	3.0	3	4.5
	2014	硫酸加里	130	8.80	0.16	1.8	4	6
	2015	塩化加里	124	6.27	0.10	1.7	4	6
	2016	塩化加里	115	14.97	0.24	1.6	3	4.5
C-MgO	2007	副産苦土肥料	137	3.41	0.07	2.2	4	6
	2008	水酸化苦土肥料	142	4.62	0.12	2.5	4	6
	2010	副産苦土肥料	137	3.11	0.07	2.4	4	6
	2011	水酸化苦土肥料	128	2.48	0.07	2.8	4	6
	2013	副産苦土肥料, 硫酸加里 苦土	129	6.18	0.13	2.2	4	6
	2014	副産苦土肥料	122	3.37	0.08	2.4	4	6
	2016	副産苦土肥料	115	2.40	0.08	3.4	4	6
W-MgO	2011	水酸化苦土肥料	119	1.94	0.09	4.6	4	6
	2012		116	1.68	0.05	3.1	4	6
	2013	硫酸加里苦土	120	3.79	0.68	18.0	4	6
	2014	副産苦土肥料	120	1.89	0.18	9.5	4	6
	2015	塩化マグネシウム	118	1.15	0.04	3.1	4	6
C-MnO	2009	熔成微量元素複合肥料	126	0.54	0.02	3.6	6	9
	2013	熔成微量元素複合肥料	115	0.51	0.01	2.8	6	9
W-MnO	2012		112	1.25	0.03	2.4	4	6
	2015	硫酸マンガン	107	0.09	0.00	2.8	8	12
C-B ₂ O ₃	2009	熔成微量元素複合肥料	120	0.28	0.02	5.6	6	9
	2013	熔成微量元素複合肥料	104	0.25	0.01	5.5	6	9
W-B ₂ O ₃	2006	ほう酸塩肥料	132	0.40	0.02	4.2	6	9
	2008	ほう酸塩肥料	119	0.26	0.01	2.9	6	9
	2010	ほう酸塩肥料	116	0.29	0.01	3.4	6	9
	2012		103	0.24	0.01	3.6	6	9
	2015	ほう酸塩肥料	97	0.126	0.004	3.5	6	9
	2016	ほう酸塩肥料	91	0.162	0.007	4.6	6	9
W-Ca	2015	塩化カルシウム	95	0.223	0.020	8.8	6	9
Fe	2012		86	0.240	0.013	5.4	6	9
Cu	2012		88	0.0545	0.0014	2.6	8	12
Zn	2012		87	0.0595	0.0029	4.8	8	12
Mo	2012		52	0.210	0.010	4.7	6	9

表5-1 (続き)

試験項目	実施年	試験項目に由来する 主な原料名	参加試験 室数	Median ^{a)} (%,mg/kg) ^{f)}	NIQR ^{b)} (%,mg/kg) ^{f)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
T-As	2006		84	1.89	0.19	10.1	16	24
	2007		68	3.84	0.38	9.8	16	24
	2008		65	4.14	0.41	9.8	16	24
	2009		59	4.31	0.60	13.9	16	24
	2010		61	3.62	0.36	9.8	16	24
	2011		52	4.74	0.61	12.9	16	24
	2013		52	10.31	0.99	9.6	11	16.5
	2014		47	2.64	0.32	12.2	16	24
	2016		45	9.68	0.99	10.3	16	24
T-Cd	2006		95	1.26	0.11	9.1	16	24
	2007		85	1.24	0.12	9.6	16	24
	2008		86	2.60	0.15	5.9	16	24
	2009		73	0.47	0.08	17.3	22	33
	2010		79	1.22	0.08	6.7	16	24
	2011		74	2.03	0.09	4.4	16	24
	2013		65	3.02	0.24	8.1	16	24
	2014		61	0.55	0.08	13.8	22	33
U-N	2016	尿素	52	2.54	0.37	14.7	- ^{h)}	- ^{h)}

表5-2 鉍さいけい酸質肥料における2006～2016年度の共同試験成績の統計量

試験項目	実施年	参加 試験室数	Median ^{a)} (%) ^{f)}	NIQR ^{b)} (%) ^{f)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
S-SiO ₂	2006	66	33.92	0.60	1.8	2.5	3.8
	2007	67	28.25	0.87	3.1	2.5	3.8
	2008	68	33.35	0.49	1.5	2.5	3.8
	2009	69	32.67	0.62	1.9	2.5	3.8
	2010	67	33.52	0.57	1.7	2.5	3.8
	2011	59	30.69	0.75	2.4	2.5	3.8
	2012	67	36.15	0.48	1.3	2.5	3.8
	2013	60	35.18	0.55	1.6	2.5	3.8
	2014	63	34.10	0.36	1.1	2.5	3.8
	2015	62	32.34	0.71	2.2	2.5	3.8
2016	58	34.62	0.54	1.6	2.5	3.8	

a) 全体の中央値

b) ロバスト標準偏差

c) ロバスト相対標準偏差

d) 肥料等試験法で精度の目安として推奨されている室間再現相対標準偏差

e) 肥料等試験法で精度として許容されている室間再現相対標準偏差

f) 質量分率

表5-2 (続き)

試験項目	実施年	参加 試験室数	Median ^{a)} (%) [†]	NIQR ^{b)} (%) [†]	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
AL	2006	75	50.56	0.64	1.3	2.5	3.8
	2007	83	48.70	0.76	1.6	2.5	3.8
	2008	86	50.90	0.71	1.4	2.5	3.8
	2009	85	39.03	0.92	2.4	2.5	3.8
	2010	85	49.26	0.80	1.6	2.5	3.8
	2011	76	49.48	0.68	1.4	2.5	3.8
	2012	77	49.95	0.71	1.4	2.5	3.8
	2013	78	36.79	0.95	2.6	2.5	3.8
	2014	77	50.83	1.03	2.0	2.5	3.8
	2015	77	50.43	0.76	1.5	2.5	3.8
	2016	66	50.42	1.03	2.1	2.5	3.8
S-CaO	2009	58	32.68	0.90	2.8	2.5	3.8
	2010	56	41.64	0.78	1.9	2.5	3.8
	2011	55	40.78	0.23	0.6	2.5	3.8
	2012	57	40.53	0.60	1.5	2.5	3.8
	2013	61	30.09	0.70	2.3	2.5	3.8
	2014	58	42.79	1.14	2.7	2.5	3.8
	2015	57	41.02	1.02	2.5	2.5	3.8
	2016	52	40.01	1.03	2.6	2.5	3.8
S-MgO	2009	58	4.48	0.10	2.3	4	6
	2010	56	5.38	0.08	1.5	4	6
	2011	55	6.24	0.12	1.9	4	6
	2012	56	6.86	0.14	2.0	4	6
	2013	61	4.62	0.16	3.4	4	6
	2014	58	5.78	0.13	2.2	4	6
	2015	58	6.60	0.16	2.4	4	6
	2016	52	7.45	0.15	2.0	4	6
C-MgO	2006	78	6.18	0.13	2.0	4	6
	2007	86	3.17	0.21	6.6	4	6
	2008	89	5.80	0.14	2.4	4	6
	2009	87	2.34	0.20	8.7	4	6
	2010	88	5.42	0.11	2.1	4	6
	2011	78	3.36	0.23	6.8	4	6
	2012	81	6.77	0.19	2.8	4	6
	2013	79	3.77	0.14	3.6	4	6
	2014	79	5.71	0.17	3.1	4	6
	2015	80	4.87	0.25	5.2	4	6
	2016	73	7.36	0.13	1.8	4	6

表6 試験方法別の共同試験成績の統計量

試験項目	試験方法	報告試験室数	Median ^{a)} (%, mg/kg) ^{f)}	NIQR ^{b)} (%, mg/kg) ^{f)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
(化成肥料)							
Mois	乾燥機による乾燥減量法	116	1.51	0.57	38.0	4	6
T-N	ケルダール法	104	14.90	0.14	0.9	3	4.5
	燃焼法	9	14.88	0.20	1.3	3	4.5
A-N	ホルムアルデヒド法	30	12.15	0.11	0.9	3	4.5
	蒸留法	80	11.84	0.24	2.1	3	4.5
C-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法	113	18.21	0.14	0.8	3	4.5
W-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法	120	13.68	0.23	1.7	3	4.5
W-K ₂ O	フレイム原子吸光法	86	15.00	0.28	1.8	3	4.5
	フレイム光度法	27	14.96	0.15	1.0	3	4.5
C-MgO	フレイム原子吸光法	110	2.40	0.08	3.4	4	6
W-B ₂ O ₃	アゾメチンH法	88	0.160	0.007	4.6	6	9
T-As	水素化物発生原子吸光法	18	9.81	0.87	8.9	16	24
	ジエチルジチオカルバミン酸銀法	21	9.37	1.35	14.4	16	24
U-N	ウレアーゼ法	43	2.46	0.32	13.0	8	12
	高速液体クロマトグラフ法	7	2.92	0.01	0.4	8	12
(鉱さいけい酸質肥料)							
S-SiO ₂	ふっ化カリウム法	42	34.63	0.50	1.4	2.5	3.8
	過塩素酸法	15	34.44	0.60	1.7	2.5	3.8
AL	エチレンジアミン四酢酸塩法	14	50.96	0.98	1.9	2.5	3.8
	フレイム原子吸光法	49	50.36	0.81	1.6	2.5	3.8
S-CaO	フレイム原子吸光法	48	40.01	0.80	2.0	2.5	3.8
S-MgO	フレイム原子吸光法	49	7.45	0.14	1.9	4	6
C-MgO	フレイム原子吸光法	67	7.38	0.13	1.8	4	6

a) 全体の中央値

d) 肥料等試験法で精度の目安として推奨されている室間再現相対標準偏差

b) ロバスト標準偏差

e) 肥料等試験法で精度として許容されている室間再現相対標準偏差

c) ロバスト相対標準偏差

f) T-Asはmg/kg, その他の成分は%(質量分率)

3) 試験成績の傾向

同一の試験室において報告された異なる試験成績のzスコアの関係を図2-1～図2-6に示した。具体的には、同一の共同試験用試料について同様の抽出方法で異なる成分(化成肥料中のC-P₂O₅とC-MgO等)、同一の共同試験用試料について異なる抽出方法で同一の成分(化成肥料中のS-MgOとC-MgO等)、そして同様の抽出方法及び同一の成分で異なる共同試験用試料(化成肥料及び鉱さいけい酸質肥料中のC-MgO等)の関係を示している。

更に、zスコアが同じ値となる点線を書き加えた。この直線に平行方向のプロットは同様の抽出方法又は同一の成分の測定方法において系統的な偏りの要因があると考えられる。

なお、2) 及び 3)を参考に「4) 成分別の試験成績の評価」で各成分別の試験成績を評価することとする。

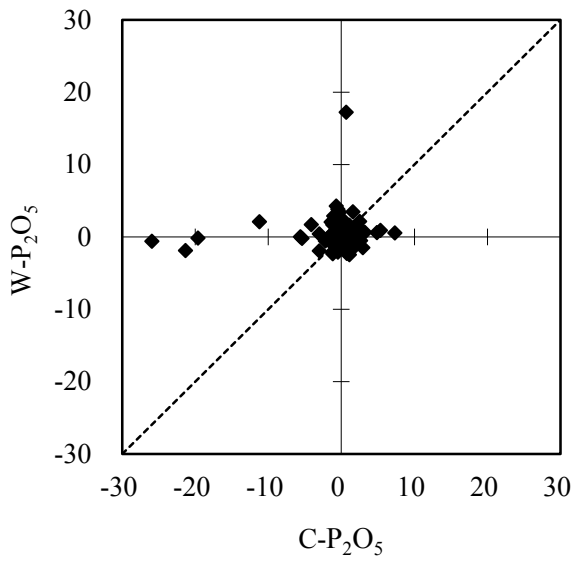


図2-1 化成肥料中のC-P₂O₅—
W-P₂O₅のzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット
----- 線形 (zスコアが同じ値を示す直線)

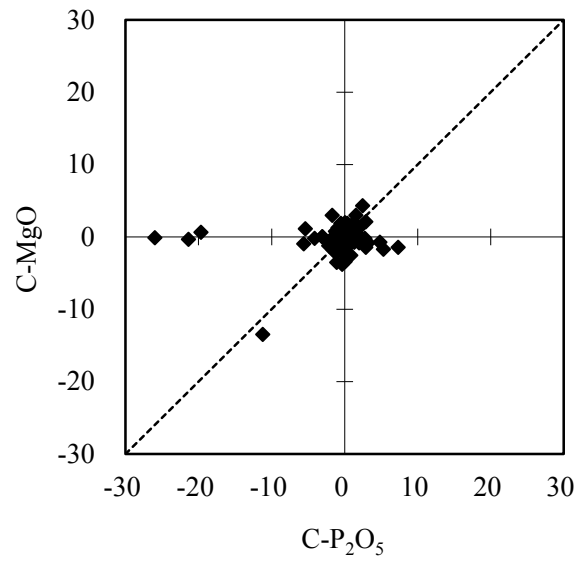


図2-2 化成肥料中のC-P₂O₅—
C-MgOのzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット
----- 線形 (zスコアが同じ値を示す直線)

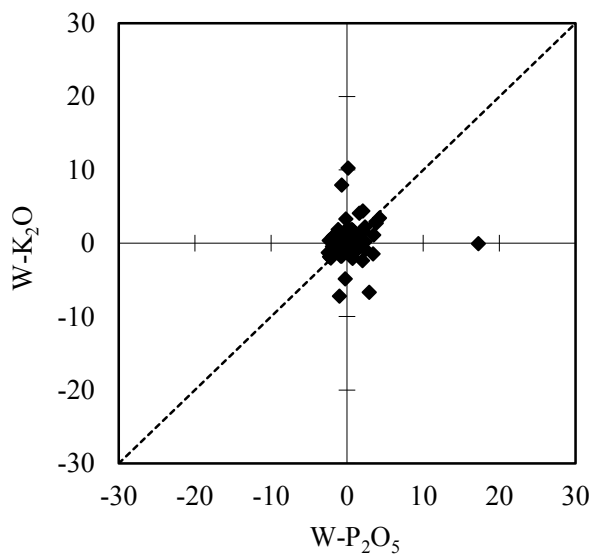


図2-3 化成肥料中のW-P₂O₅—
W-K₂Oのzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット
----- 線形 (zスコアが同じ値を示す直線)

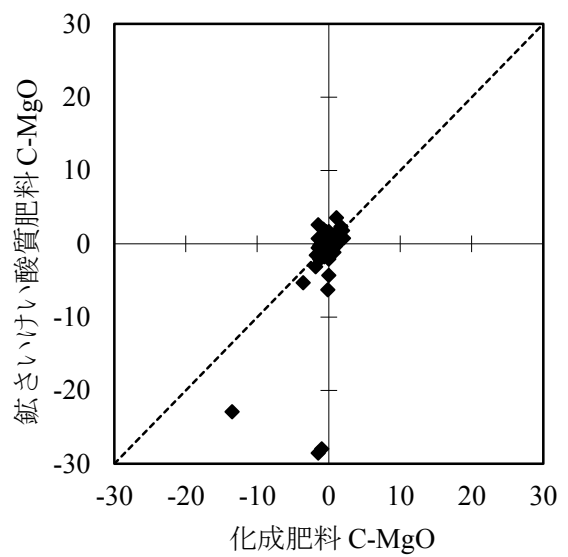


図2-4 化成肥料中及び鉍さいけい酸質
肥料中のC-MgOのzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット
----- 線形 (zスコアが同じ値を示す直線)

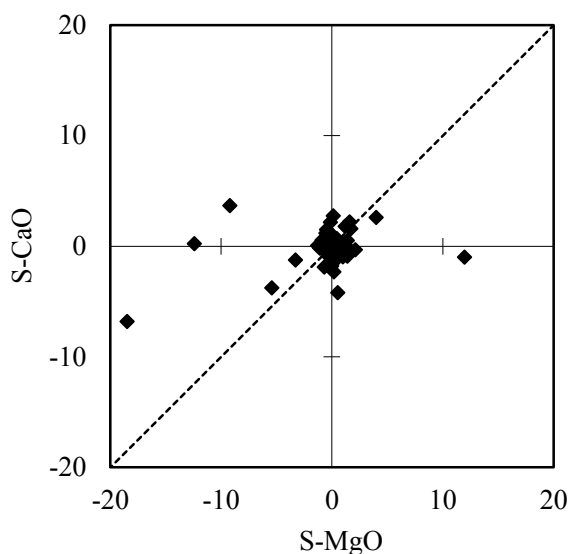


図2-5 鉍さいけい酸質肥料中の
S-MgO—S-CaOのzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット
----- 線形 (zスコアが同じ値を示す直線)

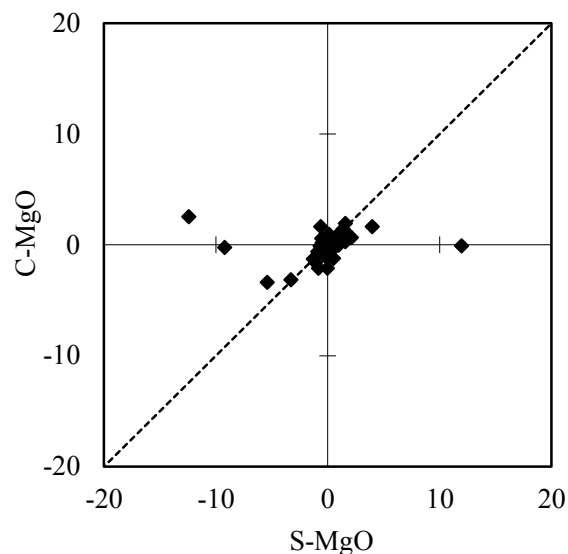


図2-6 鉍さいけい酸質肥料中の
S-MgO—C-MgOのzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット
----- 線形 (zスコアが同じ値を示す直線)

4) 成分別の試験成績の評価

(1) 化成肥料中の水分 (Mois)

参加 118 試験室のうち、116 試験室が乾燥器による乾燥減量法、2 試験室が水分計による乾燥減量法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-1 に示す。平均値は 1.81 % (質量分率)、Median は 1.51 % (質量分率)、NIQR は 0.60 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 93 % となる 110 試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 3 % である 4 試験室が該当した。Median に対して NIQR が大きく、 RSD_{rob} は 40.0 % と分析成績のばらつきが大きい結果となった。度数分布においてもピークが 2 つ確認された。この原因としては、乾燥温度及び乾燥時間が異なっていた可能性、あるいは 75°C 4 時間の乾燥条件で減量が不安定な物質が含まれていたこと等が考えられる。詳解肥料分析法⁹⁾によると、尿素は 85°C 以上で分解に基づく著しい減量が認められるため、75°C 4 時間の条件で乾燥することとされている。しかしながら、試験を実施するに当たって各試験室へ当初配布した実施要領の乾燥条件に 100 °C 3 時間と誤りが記載されており、配布後修正した経緯があった。このため万が一誤った条件のまま測定を行った試験室が複数あった場合、実施要領の誤りがばらつきの一因となっている可能性がある。また、今回使用した試料は、原料として化成肥料のりん安が 35 % 以上用いられている肥料であった。リン酸二アンモニウムは 100°C 以下の温度でリン酸一アンモニウムとアンモニアに分解するため、これを含有する肥料では処理前後の窒素全量を測定してその差を揮発物であるアンモニアに換算して乾燥減量から差し引くこととしている⁹⁾。今回は揮発物の補正はしておらず、75°C 4 時間の条件では揮発の程度にばらつきが生じた可能性も考えられる。水分測定の際は適切な方法及び条件を選択することに注意する必要がある。

(2) 化成肥料中の窒素全量 (T-N)

参加 114 試験室のうち、104 試験室がケルダール法、9 試験室が燃焼法、3 試験室が自動分析装置、1 試験

室が硫酸一過酸化水素分解法を用いた。試験成績の度数分布を図3-2に示す。平均値は14.87%(質量分率)、Medianは14.90%(質量分率)、NIQRは0.15%(質量分率)であり、 z スコアにより「満足」と評価された試験室は全体の91%となる107試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の6%である7試験室が該当した。そのうち6試験室がケルダール法、1試験室が燃焼法を用いていた。ケルダール法及び燃焼法の分析成績について平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準5%で有意な差は認められなかった。

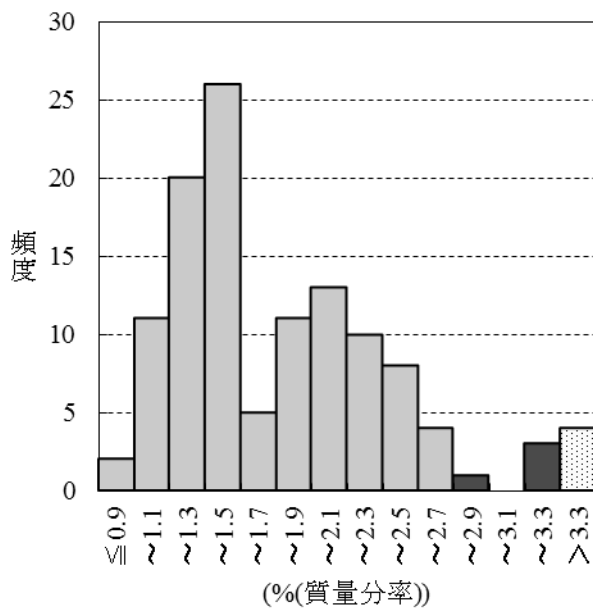


図3-1 化成肥料中の水分の分析成績

■ 満足 ■ 疑わしい ■ 不満足

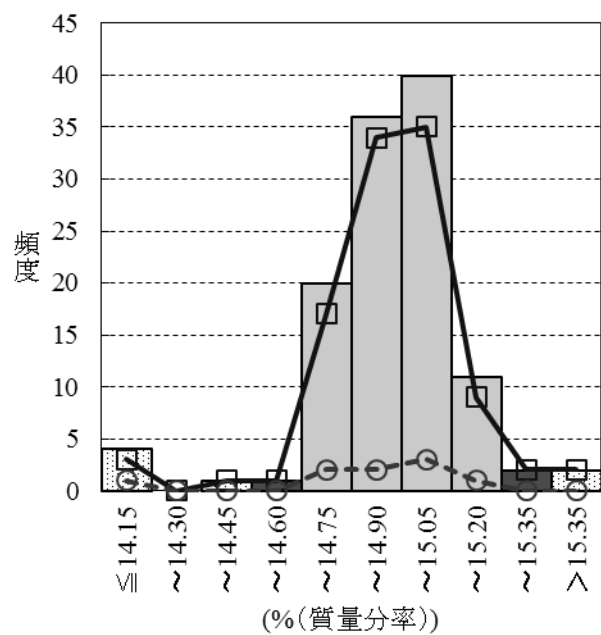


図3-2 化成肥料中の窒素全量の分析成績

■ 不満足 ■ 満足 -○- 燃焼法 ■ 疑わしい □ ケルダール法

(3) 化成肥料中のアンモニア性窒素(A-N)

参加114試験室のうち、30試験室がホルムアルデヒド法、80試験室が蒸留法、3試験室が自動分析装置、1試験室がインドフェノール法を用いた。試験成績の度数分布を図3-3に示した。平均値は11.86%(質量分率)、Medianは11.94%(質量分率)、NIQRは0.26%であり、 z スコアにより「満足」と評価された試験室は全体の89%となる101試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の4%である5試験室が該当し、これらは蒸留法を用いた試験室であった。ホルムアルデヒド法及び蒸留法による分析成績について平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準1%で差が認められ、ホルムアルデヒド法の分析成績が有意に高かった。ホルムアルデヒド法の値が高値となったか、蒸留法の値が低値となったか、または両方の要因が重なって生じている可能性も考えられる。ホルムアルデヒド法については、りん酸による誤差を生じるために塩化アルミニウム溶液等の添加によるりん酸除去操作や、ホルムアルデヒド溶液を添加する前のpH調整操作、滴定の終点の見極め等の個々の分析操作を正確に行うことに注意する必要がある。蒸留法は、蒸留操作初期にアンモニアの流出が多く低値の原因となるため、アルカリ剤の添加後は蒸留フラスコを素早く蒸留装置に装着することによって注意する必要がある。

(4) 化成肥料中のく溶性りん酸(C-P₂O₅)

参加 114 試験室のうち、113 試験室がバナドモリブデン酸アンモニウム法、1 試験室が ICP 発光分光分析法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-4 に示す。平均値は 18.13 % (質量分率)、Median は 18.21 % (質量分率)、NIQR は 0.14 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 83 % となる 95 試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 11 % にあたる 13 試験室が該当し、これらはバナドモリブデン酸アンモニウム法を用いた試験室であった。く溶性りん酸の測定時には、試料液中及び標準液中のくえん酸量を同一とし、発色後は 30～120 分の間に測定を終了させることに注意する必要がある。

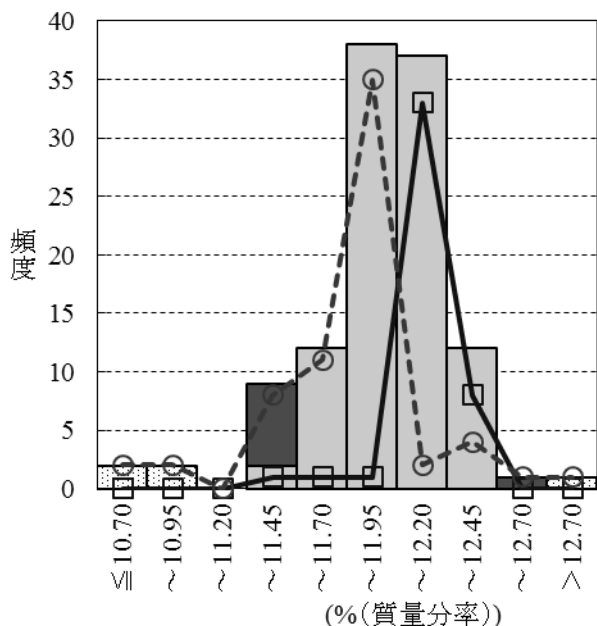


図3-3 化成肥料中のアンモニア性窒素の分析成績

不満足
 満足
 疑わしい
 ホルムアルデヒド法
 蒸留法

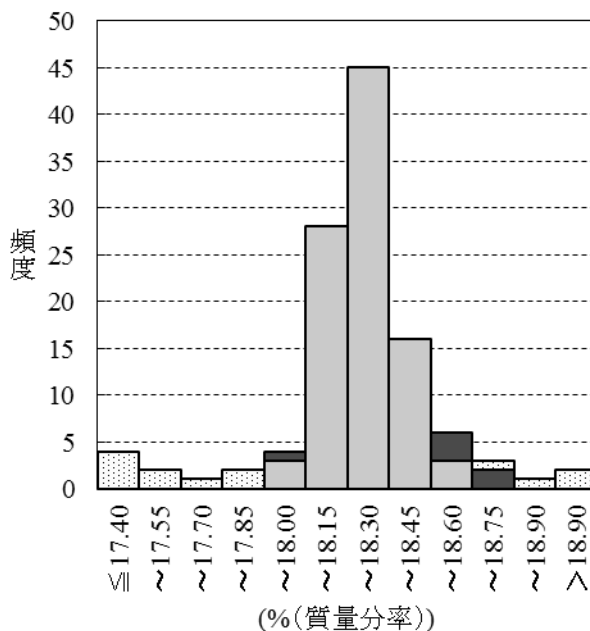


図3-4 化成肥料中のく溶性りん酸の分析成績

不満足
 満足

(5) 化成肥料中の水溶性りん酸(W-P₂O₅)

参加 120 試験室のうち、全ての試験室がバナドモリブデン酸アンモニウム法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-5 に示す。平均値は 13.74 % (質量分率)、Median は 13.68 % (質量分率)、NIQR は 0.23 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 85 % となる 102 試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 4 % にあたる 5 試験室が該当した。

(6) 化成肥料中の水溶性加里(W-K₂O)

参加 115 試験室のうち、86 試験室がフレイム原子吸光法、27 試験室がフレイム光度法、1 試験室が ICP 発光分光分析法、1 試験室がテトラフェニルホウ酸ナトリウム容量法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-6 に示す。平均値は 14.98 % (質量分率)、Median は 14.97 % (質量分率)、NIQR は 0.24 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 86 % となる 99 試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 9 % にあたる 10 試験室が該当し、これらはフレイム原子吸光法を用いた試験室であった。原子吸光法及びフレイム光度法による試験成績について平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準 5 % で差は認

められなかった。フレイム光度法及び原子吸光測光法で測定する際は検量線の直線性に留意し、調製した標準液についても、時間の経過とともに濃度変化が生じることがあるので定期的に調製する必要がある。

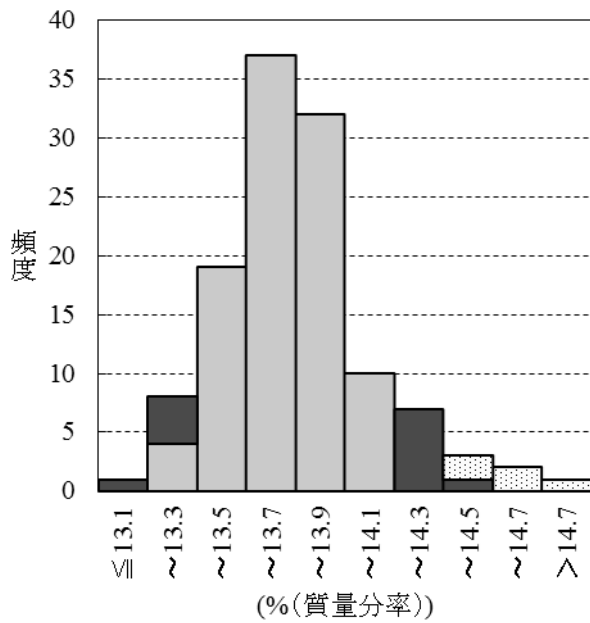


図3-5 化成肥料中の水溶性りん酸の分析成績

不満足 疑わしい 満足

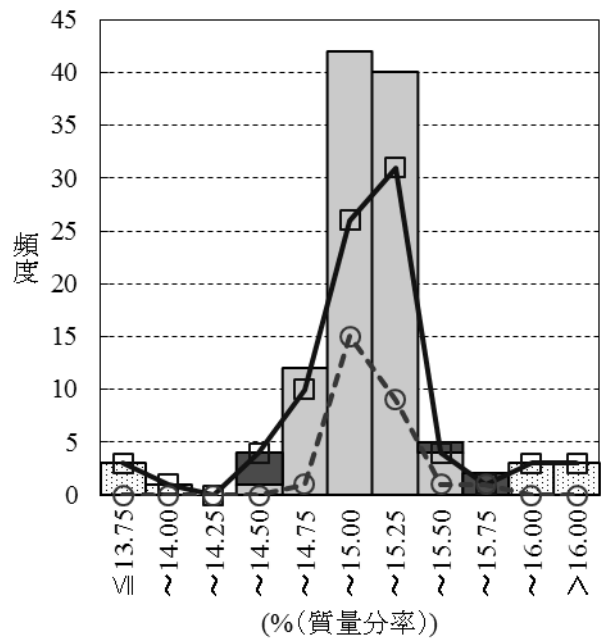


図3-6 化成肥料中の水溶性加里の分析成績

不満足 疑わしい 満足
フレイム原子吸光法
フレイム光度法

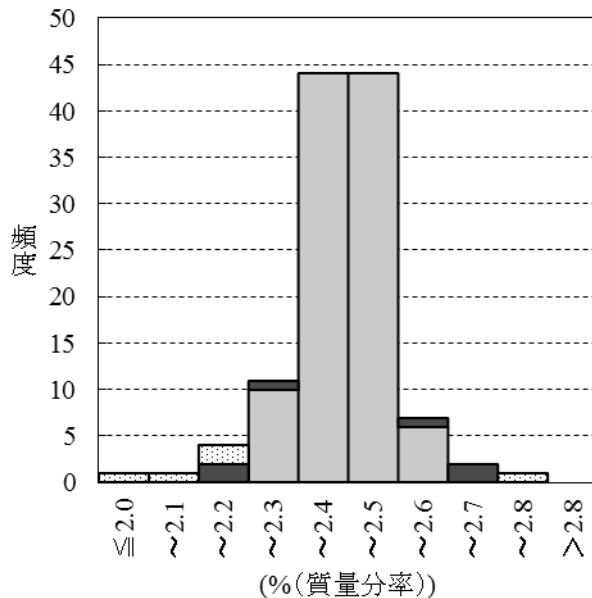


図3-7 化成肥料中の水溶性マグネシウムの分析成績

不満足 疑わしい 満足

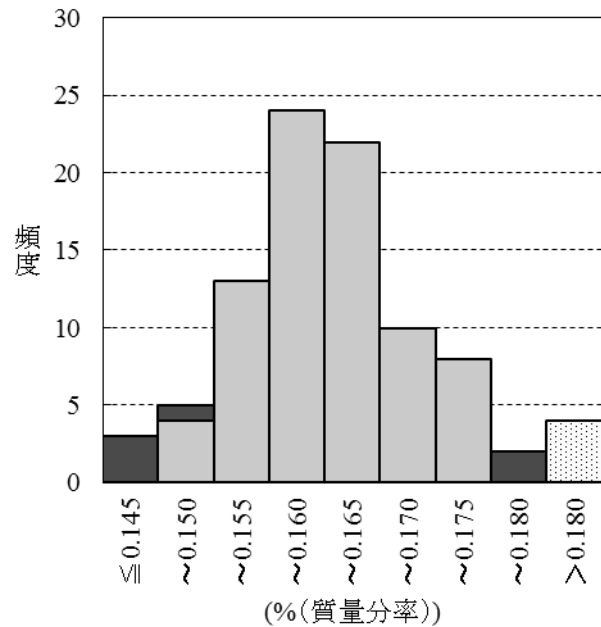


図3-8 化成肥料中の水溶性ほう素の分析成績

不満足 疑わしい 満足

(7) 化成肥料中のく溶性苦土(C-MgO)

参加 115 試験室のうち、110 試験室がフレイム原子吸光法、3 試験室が ICP 発光分光分析法、2 試験室が EDTA 法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-7 に示す。平均値は 2.39 % (質量分率)、Median は 2.40 % (質量分率)、NIQR は 0.08 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 90 % となる 104 試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 4 % にあたる 5 試験室が該当し、内訳は原子吸光法が 4 試験室、EDTA 法が 1 試験室であった。

(8) 化成肥料中の水溶性ほう素(W-B₂O₃)

参加 91 試験室のうち、88 試験室がアゾメチン H 法、3 試験室が ICP 発光分光分析法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-8 に示す。平均値は 0.163 % (質量分率)、Median は 0.162 % (質量分率)、NIQR は 0.007 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 91 % となる 81 試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 4 % にあたる 4 試験室が該当し、これらはアゾメチン H 法を用いた試験室であった。

(9) 化成肥料中のひ素全量(T-As)

参加 45 試験室のうち、18 試験室が水素化物発生原子吸光法、21 試験室がジエチルジチオカルバミン酸銀法、4 試験室が ICP 発光分光分析法、2 試験室が ICP 質量分析法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-9 に示す。平均値は 9.38 mg/kg、Median は 9.68 mg/kg、NIQR は 0.99 mg/kg であり、「満足」と評価された試験室は全体の 84 % となる 38 試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 4 % にあたる 2 試験室が該当し、水素化物発生原子吸光法とジエチルジチオカルバミン酸銀法が 1 試験室ずつであった。水素化物発生原子吸光法及びジエチルジチオカルバミン酸銀法による試験成績について平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準 5 % で有意な差は認められなかった。

(10) 化成肥料中の尿素性窒素(U-N)

参加 52 試験室のうち、44 試験室がウレアーゼ法、6 試験室が HPLC 法、2 試験室がジメチルアミノベンズアルデヒド法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-10 に示す。平均値は 2.48 % (質量分率)、Median は 2.54 % (質量分率)、NIQR は 0.37 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 96 % となる 50 試験室であった。「不満足」と評価された試験室はなかった。ウレアーゼ法による分析成績とその他の 2 方法による分析成績について平均値の差による検定を行ったところ、有意水準 1 % で差が認められ、ウレアーゼ法の分析成績が有意に低かった。ウレアーゼ法は、ウレアーゼにより尿素を分解し、生じたアンモニア性窒素を測定する方法であるため、ウレアーゼが分解に作用する際の温度や pH 等の条件を整える点が重要と考えられる。特にウレアーゼ添加前の指示薬としてメチルレッドを用いた pH 調整について、正確に終点(黄赤色で pH6.0 程度)を見極めることに注意する必要がある。また、ウレアーゼの抽出液空試験は必ず未分解の試験溶液を調製し、A-N の測定を行うことに注意する。

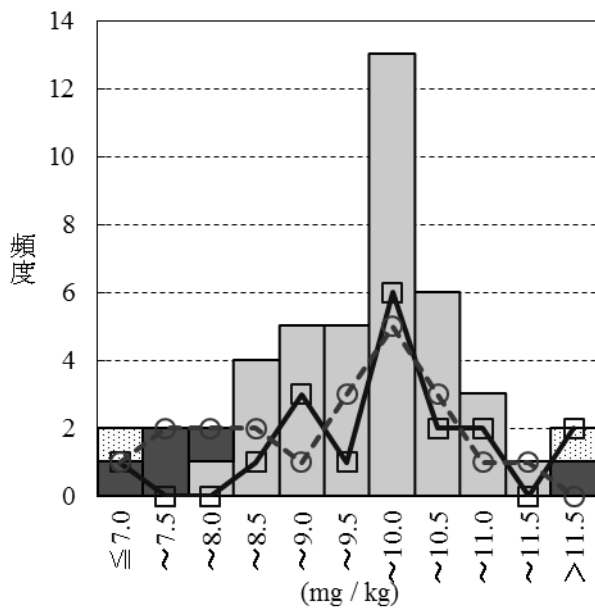


図3-9 化成肥料中のひ素全量の分析成績

- 不満足
- 疑わしい
- 満足
- 水素化物発生原子吸光法
- ジエチルジチオカルバミン酸銀法

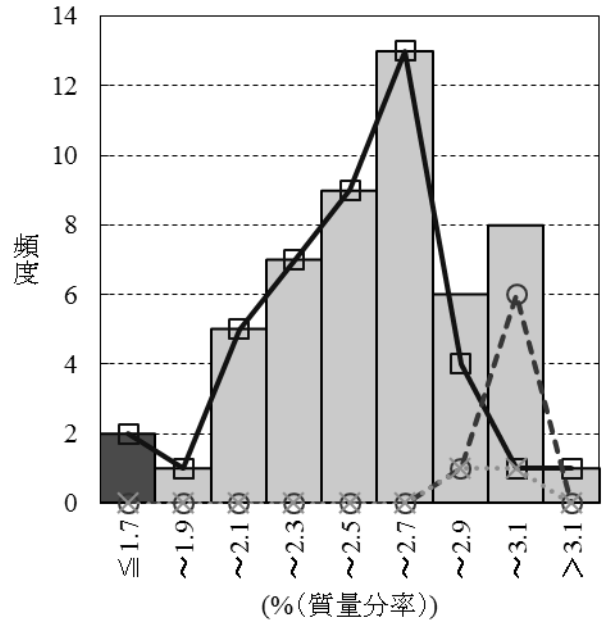


図3-10 化成肥料中の尿素性窒素の分析成績

- 不満足
- 疑わしい
- 満足
- ウレアーゼ法
- HPLC法
- 吸光度法

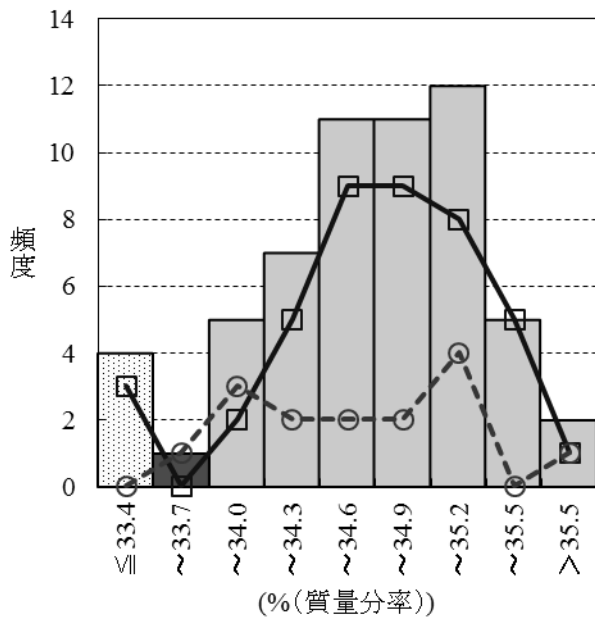


図4-1 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性けい酸の分析成績

- 不満足
- 疑わしい
- 満足
- ふっ化カリウム法
- 過塩素酸法

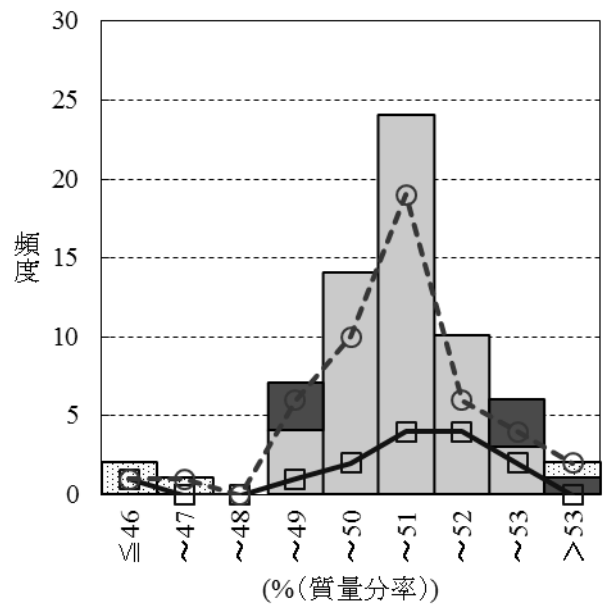


図4-2 鉍さいけい酸質肥料中のアルカリ分の分析成績

- 不満足
- 疑わしい
- 満足
- EDTA法
- フレイム原子吸光法

(11) 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性けい酸(S-SiO₂)

参加58試験室のうち、42試験室がふっ化カリウム法、15試験室が過塩素酸法、1試験室が塩酸法を用いた。試験成績の度数分布を図4-1に示す。平均値は34.40%(質量分率)、Medianは34.62%(質量分率)、NIQRは0.54%(質量分率)であり、「満足」と評価された試験室は全体の91%となる53試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の7%にあたる4試験室であり、ふっ化カリウム法が3試験室、塩酸法が1試験室であった。ふっ化カリウム法及び過塩素酸法による試験成績について平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準5%で有意な差は認められなかった。

(12) 鉍さいけい酸質肥料中のアルカリ分(AL)

参加66試験室のうち、14試験室がEDTA法、49試験室がフレイム原子吸光法、2試験室がICP発光分光分析法、1試験室が可溶性石灰をフレイム原子吸光法で測定した可溶性石灰とEDTA法で測定した可溶性苦土から算出する方法を用いた。試験成績の度数分布を図4-2に示す。平均値は50.21%(質量分率)、Medianは50.42%(質量分率)、NIQRは1.03%(質量分率)であり、「満足」と評価された試験室は全体の83%となる55試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の6%にあたる4試験室が該当し、EDTA法が1試験室、フレイム原子吸光法が3試験室であった。EDTA法及びフレイム原子吸光法による分析成績について平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準5%で有意な差は認められなかった。

アルカリ分の分析成績の報告に際して、可溶性石灰及(S-CaO)び可溶性苦土(S-MgO)を測定している試験室からは各成分の分析成績について報告を受けた。S-CaOは52試験室から報告があり、48試験室がフレイム原子吸光法、2試験室がICP-OES法、1試験室がEDTA法、1試験室がEDTA法により測定したアルカリ分と可溶性苦土から算出する方法を用いた。試験成績の度数分布を図4-3に示す。平均値は39.85%(質量分率)、Medianは40.01%(質量分率)、NIQRは1.03%(質量分率)であり、「不満足」と評価された試験室は全体の8%にあたる4試験室であった。S-MgOは52試験室から報告があり、49試験室がフレイム原子吸光法、2試験室がICP-OES法及び1試験室がEDTA法を用いた。試験成績の度数分布を図4-4に示す。平均値は7.37%(質量分率)、Medianは7.45%(質量分率)、NIQRは0.15%(質量分率)であり、「不満足」と評価された試験室は全体の13%にあたる7試験室であった。

アルカリ分の分析は、試料溶液調製時に塩酸による煮沸抽出を行う際、分析試料がビーカーの底部に固結すると抽出不十分となり低値の要因となるため、注意する必要がある。

(13) 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土(C-MgO)

参加73試験室のうち、67試験室がフレイム原子吸光法を用い、EDTA法及びICP発光分光分析法を各3試験室が用いた。試験成績の度数分布を図4-5に示す。平均値は7.21%(質量分率)、Medianは7.36%(質量分率)、NIQRは0.13%(質量分率)であり、「満足」と評価された試験室は全体の78%となる57試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の14%にあたる10試験室が該当し、フレイム原子吸光法が8試験室、EDTA法が2試験室であった。

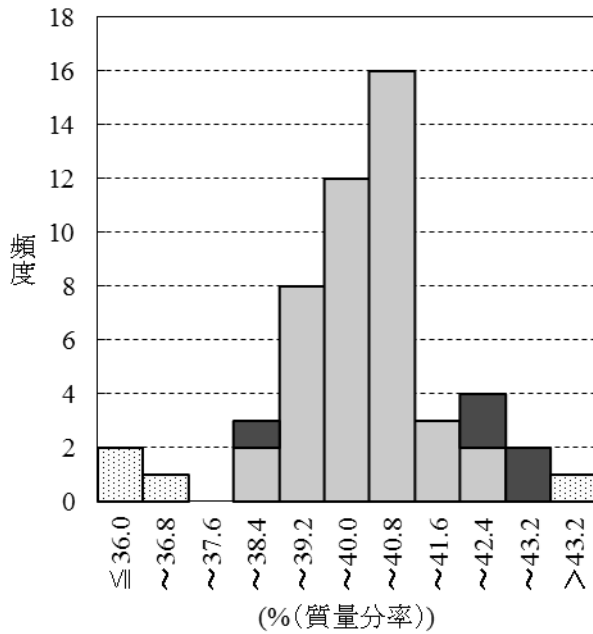


図4-3 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性石灰の分析成績

■ 不満足 ■ 疑わしい ■ 満足

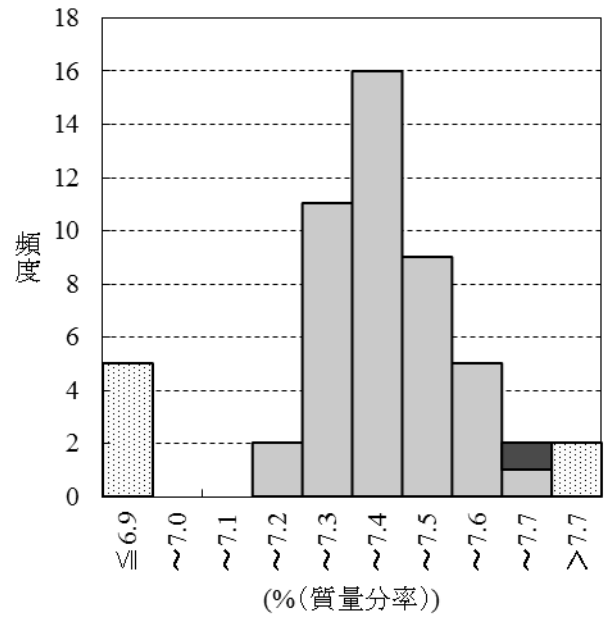


図4-4 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土の分析成績

■ 不満足 ■ 疑わしい ■ 満足

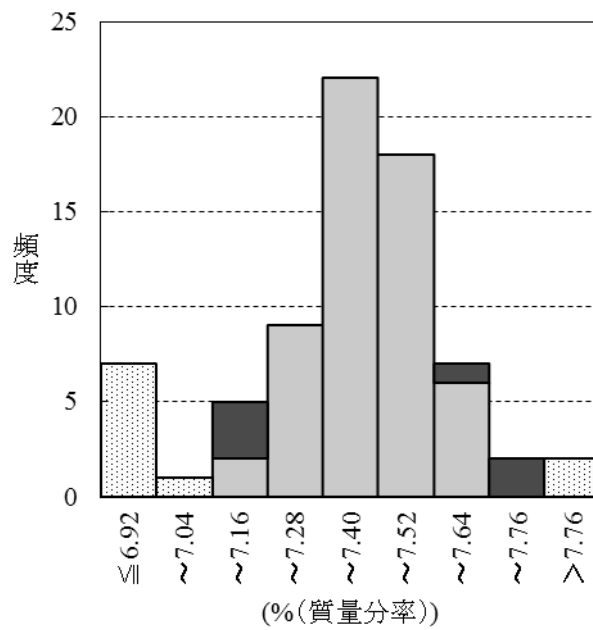


図4-5 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土の分析成績

■ 不満足 ■ 疑わしい ■ 満足

表7 内部品質管理試験状況

	回答数	内部品質管理に用いた管理試料(複数回答可)		
		認証標準物質	過去の共通試料	独自の管理資料
内部品質管理試験実施	88	49	49	11
内部品質管理試験不実施	52	-	-	-
無回答	6	-	-	-

表8 独自の管理試料とその判断基準の事例

成分	独自の管理試料	判断基準
AL	自社生産後に分析済みの炭酸カルシウム肥料	直近分析値との比較
A-N	硫酸アンモニウム	理論値との比較
W-P ₂ O ₅ ・W-K ₂ O	りん酸二水素カリウム	理論値との比較
W-B ₂ O ₃	ほう酸	理論値との比較
W-MgO	硫酸マグネシウム	理論値との比較
U-N	尿素	添加回収率

5) 内部品質管理と評価結果の傾向

この外部精度管理試験で行った分析について、肥料認証標準物質等を用いた内部品質管理試験の実施状況を調査した。表7のとおり、140試験室(全体の95%)から回答があった。88試験室(全体の60%)が何らかの標準物質を用いて内部品質管理を実施しており、52試験室(全体の35%)が実施していなかった。また、内部品質管理のための管理試料として、49試験室(全体の33%)が認証標準物質、49試験室(全体の33%)が過去の共通試料、11試験室(全体の7%)が独自の管理試料を用いていた(複数回答可)。

併せて管理試料の測定値に対する評価方法を調査したところ、肥料認証標準物質を用いた試験室の80%以上は認証標準物質の使い方¹⁰⁾に記載されている警戒限界・処置限界で判断する方法をとっていた。また、過去の共通試料を用いた試験室の90%以上はzスコアで評価する方法を用いていた。その他、独自の管理試料により内部品質管理をしている試験室において使用していた管理試料及び判断基準の事例を表8に示した。硫酸アンモニウム等の試薬を利用し、含有成分の理論値と比較するという方法を用いている事例が多いことがうかがえた。

今回の調査では、各試験成分毎に使用した管理試料の種類やその測定値の調査も行っている。この結果と今回実施した共通試料のzスコアを比較した。まず、各共通試料のそれぞれの試験成分毎に内部品質管理試験の実施の有無と試験成績の関係を調査した。化成肥料と鉱さいけい酸質肥料における調査結果を表9及び表10に示した。W-B₂O₃、T-As、AL等の一部の成分を除いて、内部品質管理を実施したほうが試験成績について不満足と評価される試験室が少ない傾向がみられた。また、内部品質管理試験を実施している試験室でも、不満足と評価された試験室の中には、肥料認証標準物質の測定値が処置限界の範囲を超えていたり、過去の共通試料の測定値が $|z| \geq 3$ となっているものが確認された。内部品質管理試験の成績が処置線の範囲を超えたり $|z| \geq 3$ となった場合は、その一連の試験を不適合とし、再試験を実施することが望まれる¹⁰⁾。

表9 化成肥料における内部品質管理試験の実施状況と試験成績

成分	内部品質管理 試験の実施	試験室数		不満足 の割合 (%) ^{a)}
		回答	不満足 ($ z \geq 3$)	
T-N	無	66	6	9
	有	51	1 ^{b)}	2
A-N	無	53	5	9
	有	61	0	0
C-P ₂ O ₅	無	59	8	14
	有	55	5 ^{b)}	9
W-P ₂ O ₅	無	66	4	6
	有	54	1	2
W-K ₂ O	無	44	9	20
	有	71	3 ^{b)}	4
C-MgO	無	61	4	7
	有	54	1	2
W-B ₂ O ₃	無	69	3	4
	有	22	1	5
T-As	無	25	0	0
	有	20	2	10

a) 不満足割合 (%) = 不満足と評価された試験室数 / 回答のあった試験室数 × 100

b) 内部品質管理試験結果が不適切(処置限界範囲外等)だった試験室を含む。

表10 鉍さいけい酸質肥料における内部品質管理試験の実施状況と試験成績

成分	内部品質管理 試験の実施	試験室数		不満足 の割合 (%) ^{a)}
		回答	不満足 ($ z \geq 3$)	
S-SiO ₂	無	32	3	9
	有	26	1	4
AL	無	40	2	5
	有	26	2 ^{b)}	8
S-CaO	無	28	3	11
	有	24	1 ^{b)}	4
S-MgO	無	29	6	21
	有	23	1	4
C-MgO	無	46	8	17
	有	27	1	4

a) 不満足割合 (%) = 不満足と評価された試験室数 / 回答のあった試験室数 × 100

b) 内部品質管理試験結果が不適切(処置限界範囲外等)だった試験室を含む。

6. 総 括

2016年度外部精度管理のための共同試験は、化成肥料10成分に132試験室、鉍さいけい酸質肥料3成分に75試験室が参加した。各成分において、平均値 Mean と中央値 Median は近い値であったが一部でやや乖離した項目もみられ、外れ値の影響を受けていることが考えられた。各試験成績をロバスト法による z スコアを用

いて評価したところ、「満足 ($|z| \leq 2$)」と評価された試験室の割合は 78 %~96 %、「不満足 ($|z| \geq 3$)」と評価された試験室の割合は 0 %~13 %であった。複数の試験法による報告で 7 試験室以上が採用した方法間について平均値の差を検定したところ、アンモニア性窒素 (A-N) においてホルムアルデヒド法と蒸留法の方法間で有意な差が認められた (有意水準 1 %)。また、尿素性窒素については、ウレアーゼ法とそれ以外の方法間で有意な差が認められた (有意水準 1 %)。この差の原因については今後も検討が必要と考えられ、操作、試料、試験法のいずれかに起因するのか今後注意していく必要がある。また、内部品質管理に関わる調査では、約 6 割の試験室が何らかの標準物質を用いた内部品質管理を行っていることがわかった。また、内部品質管理試験を実施している試験室は、実施していない試験室と比較して、 z スコアによる不満足の評価を受ける試験室が少ない傾向が見られ、内部品質管理の重要性がうかがえた。

肥料分析は熟練を要する実験操作が多く、機器の扱い等を含めて日々練度の向上に努める必要がある。更に危機管理の側面から、内部品質管理試験を取り入れて分析成績の管理を行うことで、一層試験室の信頼性は高まると考えられる。

謝 辞

この共同試験を実施するにあたり、試料の準備・調製、均質性試験等多大なご協力を賜りました、エムシー・ファーティコム株式会社宇部工場及び清水工業株式会社市橋工場の関係者各位に深く感謝致します。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2005, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料認証標準物質の配布申請手続き
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6.html>>
- 3) ISO/IEC 17043 (2010): “Conformity assessment—General requirements for proficiency testing” (JIS Q 17043 : 2011, 「適合性評価—技能試験に対する一般要求事項」)
- 4) Thompson, Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **65** (9), 2123~2144 (1993)
- 5) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemical Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78** (1), 145~196 (2006)
- 6) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法(2015)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikengo_2015.pdf>
- 7) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 高速液体クロマトグラフ法による肥料中の尿素性窒素試験法 (参考法) <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/sub9_5.pdf>
- 8) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法(2016), p442~444
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikengo_2016.pdf>
- 9) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.20~26, 養賢堂, 東京 (1988)
- 10) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 本認証標準物質の使い方
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/tukaikata_14b.pdf>

Result of Proficiency Testing for Determination of Major Components and Harmful Elements in Ground Fertilizers Conducted in Fiscal Year 2016

Kohei ITO¹, Toshifumi FUJITA², Masaki CHIDA², Koichiro SUZUKI³, Hisashi TSUTSUI⁴, Shingo MATSUO⁵, Keiji YAGI⁶, Souichi IGARASHI⁷, Yuji SHIRAI¹ and Toshiaki IMAGAWA⁸

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

⁴ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

⁵ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

⁶ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

⁷ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

(Now) Nagasaki Prefecture Kenhoku Development Bureau Agriculture & Forestry Department

⁸ Japan Fertilizer and Feed Inspection Association

A proficiency testing of analytical laboratories was conducted in fiscal year 2016, using reference materials of ground compound fertilizer and silicate slag fertilizer based on ISO/IEC 17043, "Conformity assessment—General requirements for proficiency testing". Moisture (Mois), total nitrogen (T-N), ammonium nitrogen (A-N), citric acid-soluble phosphorus (C-P₂O₅), water-soluble phosphorus (W-P₂O₅), water-soluble potassium (W-K₂O), citric acid-soluble magnesium (C-MgO), water-soluble boron (W-B₂O₃), total arsenic and urea nitrogen (U-N) were analyzed using a compound fertilizer sample. Acid-soluble silicon (S-SiO₂), alkalinity (AL) and citric acid-soluble magnesium (C-MgO) were analyzed using a silicate slag fertilizer sample. Two homogenized samples were sent to the participants. From the 132 participants which received a liquid compound fertilizer sample, 45~120 results were returned for each element. From the 75 participants which received a silicate slag fertilizer sample, 58~73 results were returned for each element. Data analysis was conducted according to the harmonized protocol for proficiency testing, revised cooperatively by the international standardizing organizations IUPAC, ISO, and AOAC International (2006). The ratios of the number of *z* scores between -2 and +2 to that of all scores were 78 %~96 % and the results from the satisfactory participants were almost normally distributed. The mean and the median of all elements slightly differed from each other. Where more than 7 results were returned, no significant distribution difference was observed between the different methods used except for 2 element (A-N and U-N).

Key words proficiency testing, compound fertilizer, silicate slug fertilizer, ISO/IEC 17043, *z* score

(Research Report of Fertilizer, **10**, 141~167, 2017)

9 2016年度 肥料認証標準物質の開発

—高度化成肥料 FAMIC-A-10, 普通化成肥料 FAMIC-B-10, 汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2,
高度化成肥料 FAMIC-A-13 及び普通化成肥料 FAMIC-B-14 の長期安定性評価—

稲葉茂幸¹, 木村康晴¹, 伊藤 潤¹,
松尾信吾¹, 青山恵介², 船木紀夫¹, 白井裕治³

キーワード 認証標準物質, 肥料, 主成分, 有害成分, ISO Guide 35, 長期安定性

1. はじめに

安全な肥料の流通を確保するために独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)が行っている立入検査において取去した肥料の主成分および有害成分の分析は不可欠であり, その試験法には信頼性の確保が求められている. 従前から, 肥料生産事業場の品質管理室, 生産事業場から分析依頼を受けた民間分析機関, 肥料検査機関等の試験所では, 試験成績の信頼性維持及び分析技術の向上のために管理用試料又は肥料認証標準物質¹⁾による内部品質管理が日常的に行われている. 近年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)²⁾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. その要求事項には, 「認証標準物質の定期的な使用」を実施することが推奨されている.

また, 現在 FAMIC においては, 肥料認証標準物質 A (高度化成肥料 FAMIC-A-10 及び FAMIC-A-13), 同 B (普通化成肥料 FAMIC-B-10 及び FAMIC-B-14) 及び同 C (汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2) (以下, それぞれ「標準物質 A-10」「標準物質 A-13」「標準物質 B-10」「標準物質 B-14」「標準物質 C-12-2」という.) を調製^{3~7)}, 販売しており(表 1) (「標準物質 A-10」及び「標準物質 B-10」は, 販売終了.), これらの調製については国際的整合性確保のため ISO Guide 34:2009 (JIS Q 0034:2012)⁸⁾の「5 技術及び生産に関する要求事項」を参考に調製することとし, ISO Guide 35:2006 (JIS Q 0035:2008)⁹⁾を参考に解析を行った上で ISO Guide 31:2000 (JIS Q 0031:2002)¹⁰⁾を参考に認証書及びラベルを作成しているところである. 2016 年度は, 標準物質 A-10, B-10, C-12-2, A-13 及び B-14 の長期安定性について, 在庫試料を用い認証値設定時からの認証成分のモニタリングを実施したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 安定性のモニタリング

(1) 試験計画

ISO Guide 35:2006 (JIS Q 0035:2008)⁸⁾では, 認証標準物質の保管期間中, モニタリングを実施して安定性を確認することが望まれている. 安定性の検討については, 終了時点でのデータを提供する同時期測定型安定性試験及び保存期間中にデータが得られる従来型安定性試験の二つの基本的実験方法がある. 同時に調製

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター (現) 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

した認証標準物質の保存期間の経時的なデータが必要なことから、後者の方法を長期安定性のモニタリングの方法として選択した。この従来型安定性試験を実施するため、次の a)～f) を FAMIC 神戸センターで計画した。

a) 分析用試料・・・標準物質 A-10, B-10, C-12-2, A-13 及び B-14 の在庫から、それぞれランダムに 1 本を抜き取った試料。

b) 試験成分・・・認証されたすべての成分(表 1 参照)。

c) 試験方法・・・認証値設定の共同試験で使用された肥料等試験法¹¹⁾(表 2A, 表 2B 及び表 2C を参照)。

d) 試験時期・・・標準物質 A-10 及び B-10 は、認証値設定のための共同試験実施後における認証値設定時、12 ヶ月後、20 ヶ月後、24 ヶ月後、28 ヶ月後、32 ヶ月後、38 ヶ月後、44 ヶ月後、50 ヶ月後(A-10 除く)、56 ヶ月後及び 68 ヶ月後。標準物質 C-12-2 は、認証値設定のための共同試験実施後における認証値設定時、8 ヶ月後、14 ヶ月後、20 ヶ月後、26 ヶ月後、32 ヶ月後、38 ヶ月後、44 ヶ月後及び 50 ヶ月後。標準物質 A-13 は、認証値設定のための共同試験実施後における認証値設定時、7 ヶ月後、13 ヶ月後、19 ヶ月後、25 ヶ月後、31 ヶ月後及び 37 ヶ月後。標準物質 B-14 は、認証値設定のための共同試験実施後における認証値設定時、4 ヶ月後、10 ヶ月後、16 ヶ月後及び 22 ヶ月後。

e) 試験室・・・単一試験室(FAMIC 神戸センター)。

f) 安定性の評価・・・分析時の調製日から経過時間(月数)及びその測定時の分析値の平均値について、JIS Q 0035:2008 付属書 B.5 を参考に解析。

表 1 肥料認証標準物質の概要

名称	種類	原料組成	認証成分	有効期限
FAMIC-A-10	高度化成肥料	尿素, 硫酸アンモニア, リン酸アンモニア, 塩化加里, 副産苦土肥料, 熔成微量元素複合肥料, リン酸, アンモニア	窒素全量, アンモニア性窒素, <溶性りん酸, 水溶性加里, <溶性苦土, <溶性マンガ, <溶性ほう素(全7成分)	2015年 6月末
FAMIC-B-10	普通化成肥料	硫酸アンモニア, 過りん酸石灰, 塩化加里	アンモニア性窒素, 可溶性りん酸, 水溶性りん酸, 水溶性加里, ひ素, カドミウム, 水銀, ニッケル, 鉛(全9成分)	2015年 6月末
FAMIC-C-12-2	汚泥発酵肥料	下水汚泥, 食品工業汚泥, 動物質原料	窒素全量, リン酸全量, 加里全量, 銅全量, 亜鉛全量, 石灰全量, 有機炭素, ひ素, カドミウム, 水銀, ニッケル, クロム, 鉛(全13成分)	2020年 6月末
FAMIC-A-13	高度化成肥料	尿素, 硫酸アンモニア, リン酸アンモニア, 塩化加里, 副産苦土肥料, 熔成微量元素複合肥料, リン酸, アンモニア	窒素全量, アンモニア性窒素, <溶性りん酸, 水溶性加里, <溶性苦土, <溶性マンガ, <溶性ほう素(全7成分)	2018年 6月末
FAMIC-B-14	普通化成肥料	硫酸アンモニア, 過りん酸石灰, 塩化加里	アンモニア性窒素, 可溶性りん酸, 水溶性りん酸, 水溶性加里, ひ素, カドミウム, ニッケル(全7成分)	2019年 6月末

(2) モニタリングの実施

FAMIC 神戸センターにおいて標準物質 A-10 及び標準物質 B-10 を 2010 年 7 月～9 月, 2011 年 7 月～9 月, 2012 年 4 月～5 月, 2012 年 7 月～9 月, 2012 年 12 月～2013 年 1 月, 2013 年 4 月～5 月, 2013 年 10 月～11 月, 2014 年 4 月～5 月, 2014 年 10 月～11 月 (標準物質 A-10 を除く), 2015 年 6 月～7 月及び 2016 年 6 月～7 月の計 11 回 (標準物質 A-10 は 10 回), 標準物質 C-12-2 を 2012 年 8 月～10 月, 2013 年 4 月～5 月, 2013 年 10 月～11 月, 2014 年 4 月～5 月, 2014 年 10 月～11 月, 2015 年 4～5 月, 2015 年 10～11 月, 2016 年 4 月～5 月及び 2016 年 10 月～11 月の計 9 回, 標準物質 A-13 を 2013 年 9 月～11 月, 2014 年 4 月～5 月, 2014 年 10 月～11 月, 2015 年 4～5 月, 2015 年 10～11 月, 2016 年 4 月～5 月, 2016 年 10 月～11 月の計 7 回, 標準物質 B-14 を 2014 年 12 月～2015 年 1 月, 2015 年 4 月～5 月, 2015 年 10 月～11 月, 2016 年 4 月～5 月, 2016 年 10～11 月の計 5 回試験を実施した。

各試験時とも未開封の標準物質 A-10, B-10, C-12-2, A-13 及び B-14 各 1 瓶を用いて, 試験成分毎に 2 点併行試験を行った。

報告値の桁数は, 標準物質 A-10, B-10, A-13 及び B-14 については, 有害成分 (As, Cd, Hg, Ni, Pb), C-MnO 及び C-B₂O₃ の試験成績は有効数字 3 桁, それ以外の成分は, 小数点以下 2 桁とした。標準物質 C-12-2 については, T-Cu 及び T-Zn の試験成績は整数, それ以外の成分について有効数字 3 桁とした。また, 報告値は, 現状の認証値と同様に水分換算しない濃度 (有姿濃度) とした。

表2A 標準物質A-10, A-13の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ^{a)}	試験法の概要	
		試料液調製方法	測定方法
窒素全量 (T-N)	4.1.1.a	ケルダール分解－蒸留	中和滴定法
	4.1.1.b	－	燃焼法
アンモニア性窒素 (A-N)	4.1.2.b	塩酸 (1+20) 抽出	ホルムアルデヒド添加/ 中和滴定法
＜溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	4.2.3.a	＜えん酸 (20 mg/mL) 抽出	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色/吸光光度法
水溶性加里 (W-K ₂ O)	4.3.3.a	水抽出	フレイム原子吸光法 又はフレイム光度法
＜溶性苦土 (C-MgO)	4.6.2.a	＜えん酸 (20 mg/mL) 抽出	フレイム原子吸光法
＜溶性マンガン (C-MnO)	4.7.2.a	＜えん酸 (20 mg/mL) 抽出	フレイム原子吸光法
＜溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	4.8.1.a	＜えん酸 (20 mg/mL) 抽出	アゾメチンH発色/ 吸光光度法

a) 肥料等試験法の試験項目番号

表2B 標準物質B-10, B-14の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ^{a)}	試験法の概要	
		試料液調製方法	測定方法
アンモニア性窒素 (A-N)	4.1.2.a	蒸留	中和滴定法
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	4.2.2.a	水抽出／ペーテルマンくえん 酸塩溶液抽出	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色／吸光光度法
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	4.2.4.a	水抽出	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色／吸光光度法
水溶性加里 (W-K ₂ O)	4.3.3.a	水抽出	フレイム原子吸光法 又はフレイム光度法
ひ素 (As)	5.2.a	硫酸－硝酸－過塩素酸分解	水素化物発生原子吸光法
カドミウム (Cd)	5.3.a	王水分解	フレイム原子吸光法
水銀 (Hg)	5.1.a	硝酸－過塩素酸分解	還元気化原子吸光法
ニッケル (Ni)	5.4.a	王水分解	フレイム原子吸光法
鉛 (Pb)	5.6.a	王水分解	フレイム原子吸光法

脚注は表2Aを参照

標準物質B-14は水銀、鉛を除く。

表2C 標準物質C-12-2の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ^{a)}	試験法の概要	
		試料液調製方法	測定方法
窒素全量 (T-N)	4.1.1.a	ケルダール分解－蒸留	中和滴定法
	4.1.1.b	－	燃焼法
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	4.2.1.a	ケルダール硫酸分解／王水 分解	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色／吸光光度法
加里全量 (T-K ₂ O)	4.3.1.a	王水分解／塩酸煮沸	フレイム原子吸光法又はフレイム 光度法
石灰全量 (T-CaO)	4.5.1.a	王水分解／塩酸煮沸	フレイム原子吸光法
有機炭素 (O-C)	4.11.1.a	二クロム酸酸化	酸化還元滴定法
銅全量 (T-Cu)	4.10.1.	王水分解	フレイム原子吸光法
亜鉛全量 (T-Zn)	4.9.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法
ひ素 (As)	5.2.a	硫酸－硝酸－過塩素酸分解	水素化物発生原子吸光法
カドミウム (Cd)	5.3.a	王水分解	フレイム原子吸光法
水銀 (Hg)	5.1.a	硝酸－過塩素酸分解	還元気化原子吸光法
ニッケル (Ni)	5.4.a	王水分解	フレイム原子吸光法
クロム (Cr)	5.5.a	王水分解	フレイム原子吸光法
鉛 (Pb)	5.6.a	王水分解	フレイム原子吸光法

脚注は表2Aを参照。

3. 結果

1) 安定性のモニタリング

(1) モニタリング成績

標準物質 A-10, B-10, C-12-2, A-13 及び B-14 の試験成分の安定性試験成績を表 3A①～表 3C に示した。ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2006)²⁾では、肥料認証標準物質を用いて試験所の日常の内部品質管理又は試験所が開発した試験方法の妥当性確認を実施することが推奨されている。FAMIC では、肥料認証標準物

質を用いた試験成績の真度評価を実施している。標準物質 A-10 及び標準物質 B-10 の試験期間の 68 ヶ月後並びに標準物質 C-12-2 の試験期間の 50 ヶ月後並びに標準物質 A-13 の試験期間の 37 ヶ月後並びに標準物質 B-14 の試験期間の 22 ヶ月後までに実施した各経過月及び各試験成分の試験成績の平均値を図 1A①～図 1C に示し、更に警戒限界及び処置限界を描いた。但し、図 1C 標準物質 C-12-2 の水銀及び鉛は、2016 年 1 月 29 日の再認証により、認証値設定 44 ヶ月後の警戒限界及び処置限界から変更した。技能評価のための標準偏差、警戒限界及び処置限界は、内部品質管理のために実施した併行試験の繰返し数 (n) 並びに認証値 (μ)、室内標準偏差 (s_W) 及び室間再現標準偏差 (s_R) を用いて (a) 式、(b) 式及び (c) 式により求めた¹²⁾。その結果、標準物質 A-10、B-10、C-12-2、A-13 及び B-14 の安定性試験成績の平均値は、いずれの試験成分も警戒限界の範囲内であった。

$$\text{技能評価のための標準偏差}(\sigma) = \sqrt{(s_R^2 - s_W^2) + \frac{s_W^2}{n}} \quad \cdots (a)$$

$$\text{平均値に対する警戒限界} = \mu \pm 2\sigma \quad \cdots (b)$$

$$\text{平均値に対する処置限界} = \mu \pm 3\sigma \quad \cdots (c)$$

n : 長期安定試験の併行試験数

s_R : 共同試験で得られた室間再現標準偏差

s_W : 共同試験で得られた室内標準偏差

μ : 認証値

表3A① 認証標準物質A-10の安定性モニタリング試験成績 (質量分率 %)

経過月	窒素全量 (T-N)		アンモニア性 窒素 (A-N)		く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)		水溶性加里 (W-K ₂ O)	
0	14.83	14.95	10.59	10.62	10.09	10.14	13.18	13.56
12	14.80	14.80	10.78	10.90	10.11	10.14	13.63	13.72
20	14.77	14.91	10.89	10.91	9.88	10.23	13.70	13.74
24	14.50	14.53	10.69	10.75	9.96	10.04	13.48	13.83
28	14.62	14.63	10.71	10.74	10.01	10.06	13.64	13.75
32	14.55	14.56	10.72	10.75	10.07	10.07	13.45	13.56
38	14.69	14.70	10.71	10.73	9.99	10.04	13.36	13.48
44	14.70	14.75	10.64	10.71	10.06	10.13	13.38	13.49
56	14.57	14.62	10.68	10.74	10.04	10.04	13.41	13.49
68	14.62	14.69	10.67	10.88	9.98	10.13	13.45	13.50

表3A① (続き)

(質量分率 %)

経過月	〈溶性苦土 (C-MgO)		〈溶性マンガン (C-MnO)		〈溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	
	0	3.20	3.44	0.389	0.414	0.204
12	3.29	3.35	0.397	0.398	0.200	0.206
20	3.30	3.41	0.388	0.388	0.208	0.210
24	3.32	3.38	0.397	0.400	0.211	0.217
28	3.33	3.36	0.412	0.420	0.213	0.218
32	3.28	3.44	0.385	0.389	0.198	0.219
38	3.44	3.44	0.397	0.406	0.203	0.218
44	3.28	3.44	0.398	0.402	0.206	0.207
56	3.25	3.39	0.391	0.397	0.205	0.209
68	3.35	3.36	0.404	0.405	0.209	0.210

表3A② 認証標準物質A-13の安定性モニタリング試験成績

(質量分率 %)

経過月	窒素全量 (T-N)		アンモニア性 窒素 (A-N)		〈溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)		水溶性加里 (W-K ₂ O)	
	0	14.90	14.94	10.58	10.60	10.74	10.77	13.00
7	14.80	14.82	10.22	10.54	10.68	10.81	13.04	13.14
13	14.80	14.83	10.44	10.49	10.85	10.87	12.87	12.89
19	14.87	14.93	10.72	10.77	10.72	10.76	13.02	13.11
25	14.74	15.06	10.39	10.70	10.67	10.80	13.12	13.27
31	14.65	14.75	10.53	10.58	10.66	10.70	12.93	13.01
37	14.70	14.79	10.51	10.52	10.80	10.89	12.90	12.92

表3A② (続き)

(質量分率 %)

経過月	〈溶性苦土 (C-MgO)		〈溶性マンガン (C-MnO)		〈溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	
	0	3.18	3.29	0.359	0.381	0.214
7	3.16	3.27	0.357	0.368	0.194	0.208
13	3.26	3.35	0.348	0.370	0.196	0.204
19	3.17	3.22	0.363	0.363	0.201	0.203
25	3.11	3.19	0.345	0.367	0.207	0.214
31	3.23	3.26	0.371	0.388	0.192	0.202
37	3.12	3.17	0.329	0.347	0.199	0.206

表3B① 標準物質B-10の安定性モニタリング試験成績 (質量分率 %)

経過月	アンモニア性窒素 (A-N)		可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)		水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)		水溶性加里 (W-K ₂ O)	
	0	8.33	8.49	7.99	8.03	6.88	6.94	8.59
12	8.27	8.30	8.11	8.11	7.01	7.01	8.81	8.84
20	8.24	8.31	8.08	8.09	6.99	7.00	8.65	8.70
24	8.17	8.18	8.09	8.17	6.96	6.98	9.02	9.04
28	8.32	8.33	8.14	8.17	6.94	6.96	8.96	9.05
32	8.21	8.22	8.16	8.17	6.94	6.98	8.64	8.68
38	8.36	8.39	8.02	8.08	7.00	7.01	8.71	8.79
44	8.18	8.23	8.03	8.09	6.94	6.97	8.63	8.66
50	8.27	8.28	8.11	8.13	6.96	7.02	8.66	8.68
56	8.20	8.46	8.08	8.11	6.97	7.00	8.71	8.73
68	8.37	8.45	8.18	8.19	7.05	7.06	8.82	8.86

表3B① (続き)

(mg/kg)

経過月	砒素 (As)		カドミウム (Cd)		水銀 (Hg)		ニッケル (Ni)		鉛 (Pb)	
	0	2.60	2.63	5.83	5.84	0.881	0.890	42.4	45.5	23.7
12	2.32	2.48	5.93	5.95	0.885	0.889	47.3	47.3	25.8	26.9
20	2.25	2.25	5.86	5.89	0.856	0.871	44.8	45.6	24.8	26.9
24	2.38	2.39	5.99	6.01	0.891	0.892	45.1	46.5	25.7	26.3
28	2.27	2.32	5.87	5.99	0.933	0.945	46.8	46.9	21.5	22.9
32	2.28	2.34	5.82	5.82	0.888	0.916	43.6	44.8	24.6	25.6
38	2.34	2.42	5.76	5.85	0.868	0.873	46.1	46.1	21.6	25.9
44	2.21	2.28	5.73	5.76	0.876	0.906	44.4	44.7	24.8	25.4
50	2.38	2.55	6.14	6.15	0.858	0.879	46.5	46.8	24.0	25.2
56	2.51	2.54	5.86	5.87	0.784	0.788	44.7	45.1	26.8	28.3
68	2.40	2.48	5.85	5.92	0.853	0.859	44.0	44.3	25.6	26.6

表3B② 標準物質B-14の安定性モニタリング試験成績 (質量分率 %)

経過月	アンモニア性窒素 (A-N)		可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)		水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)		水溶性加里 (W-K ₂ O)	
	0	7.94	8.09	9.13	9.14	6.66	6.74	8.18
4	7.98	7.98	9.18	9.23	6.77	6.79	8.15	8.16
10	7.96	8.01	9.12	9.13	6.65	6.67	8.28	8.29
16	8.01	8.05	9.19	9.26	6.65	6.66	8.23	8.27
22	8.02	8.06	9.25	9.33	6.72	6.77	8.17	8.47

表3B② (続き)

(mg/kg)

経過月	砒素 (As)		カドミウム (Cd)		ニッケル (Ni)	
	0	3.01	3.23	3.92	4.11	36.7
4	2.96	3.07	4.26	4.27	37.7	37.7
10	2.93	2.96	4.15	4.19	36.9	37.8
16	2.88	2.97	4.17	4.19	36.9	37.1
22	2.91	2.98	3.95	3.99	38.1	39.0

表3C 標準物質C-12-2の安定性モニタリング試験成績

(質量分率 %)

経過月	窒素全量 (T-N)		りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)		加里全量 (T-K ₂ O)		石灰全量 (T-CaO)		有機炭素 (O-C)	
	0	4.77	4.79	8.64	8.64	0.607	0.619	5.99	6.03	20.4
8	4.57	4.75	8.46	8.49	0.553	0.561	5.76	5.82	20.0	20.1
14	4.71	4.78	8.52	8.53	0.560	0.564	6.03	6.08	20.1	20.9
20	4.67	4.72	8.59	8.59	0.538	0.541	5.84	6.17	20.7	20.8
26	4.67	4.69	8.56	8.61	0.572	0.573	6.20	6.30	20.2	20.3
32	4.79	4.80	8.62	8.63	0.583	0.588	5.62	5.66	20.1	20.3
38	4.80	4.81	8.72	8.76	0.610	0.614	5.90	5.95	20.2	20.4
44	4.62	4.69	8.53	8.57	0.524	0.532	5.42	5.44	20.4	20.9
50	4.63	4.66	8.73	8.76	0.611	0.623	5.78	5.78	19.0	19.2

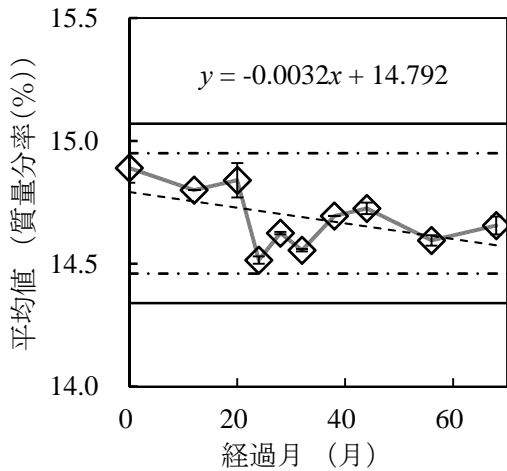
表3C (続き)

(mg/kg)

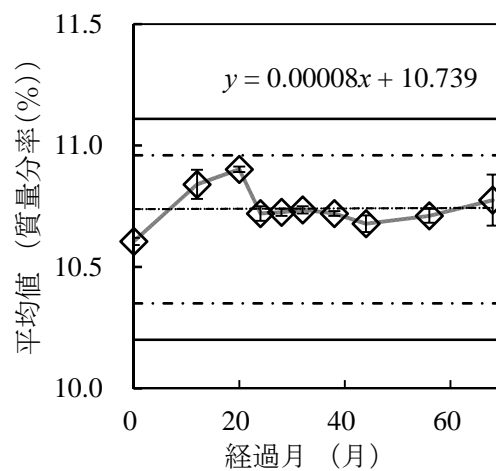
経過月	銅全量 (T-Cu)		亜鉛全量 (T-Zn)		砒素 (As)		カドミウム (Cd)	
	0	583	587	963	991	22.1	22.5	1.81
8	575	591	991	992	19.2	20.3	1.83	1.85
14	567	586	1,015	1,015	20.7	21.1	1.79	1.82
20	582	582	982	988	21.8	22.1	1.78	1.78
26	545	547	991	996	22.9	23.1	1.84	1.90
32	561	575	1,000	1,004	22.4	22.9	1.82	1.82
38	570	571	985	996	22.7	22.9	1.77	1.79
44	567	569	981	992	21.7	21.9	1.83	1.83
50	571	579	1001	1003	19.8	20.0	1.82	1.88

表3C (続き)

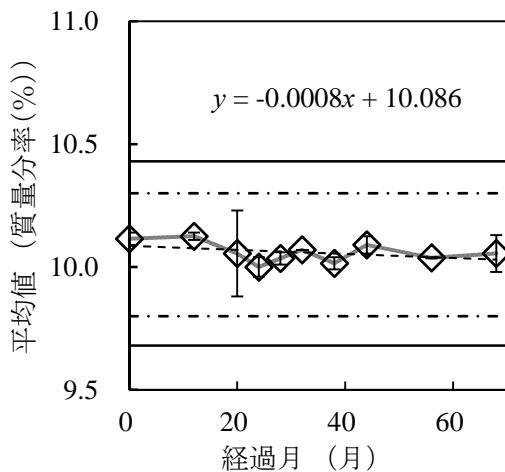
経過月	水銀 (Hg)		ニッケル (Ni)		クロム (Cr)		鉛 (Pb)	
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
0	0.464	0.470	73.3	74.3	78.6	81.2	36.4	36.5
8	0.448	0.478	74.2	74.6	80.5	80.5	35.1	35.1
14	0.443	0.473	78.3	78.7	75.4	79.4	36.1	36.9
20	0.511	0.514	72.7	74.3	81.8	82.9	35.3	35.3
26	0.501	0.503	73.3	73.4	86.6	88.5	35.4	35.9
32	0.462	0.479	77.3	77.4	80.4	81.2	36.0	36.0
38	0.506	0.514	74.7	74.9	79.1	79.4	35.3	35.8
44	0.488	0.509	71.6	72.6	79.5	80.2	35.3	35.7
50	0.483	0.520	75.9	76.3	83.1	84.0	35.5	36.0



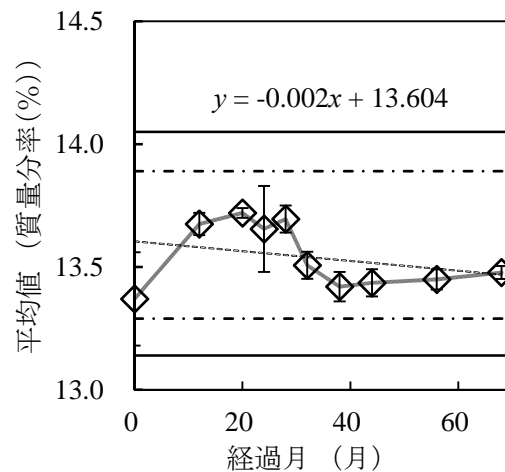
1. 標準物質A10(窒素全量)



2. 標準物質A10(アンモニア性窒素)



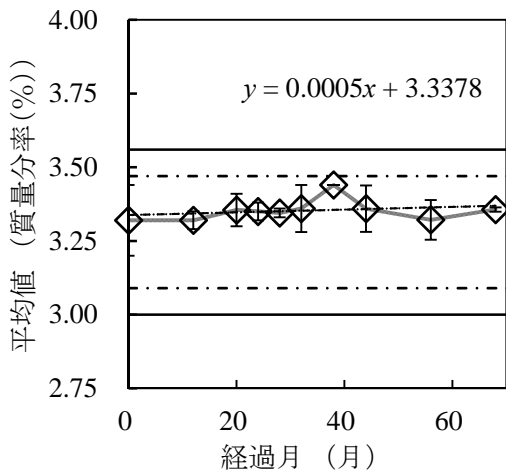
3. 標準物質A10(く溶性りん酸)



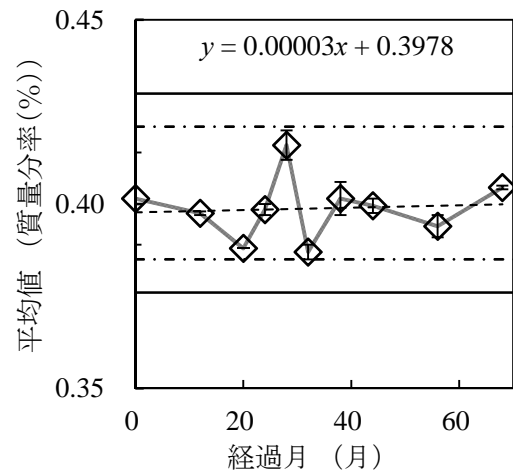
4. 標準物質A10(水溶性加里)

図 1A① 標準物質 A10 のモニタリング試験成績

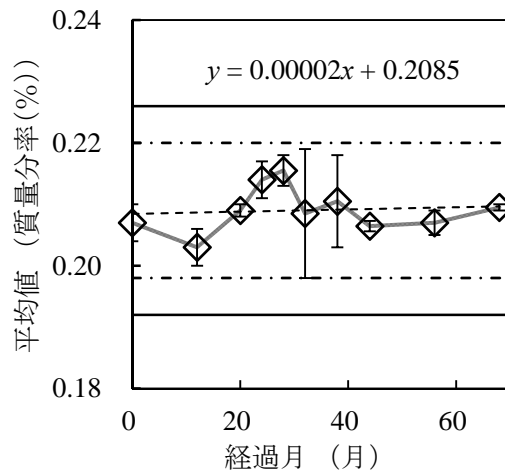
◇: 平均値 エラーバー: 測定値の幅 破線: 回帰直線
 実線: 上下処置限界 一点鎖線: 上下警戒限界



5. 標準物質A10(く溶性苦土)

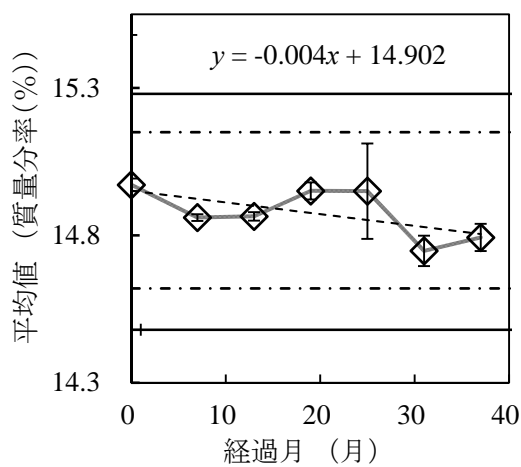


6. 標準物質A10(く溶性マンガ)

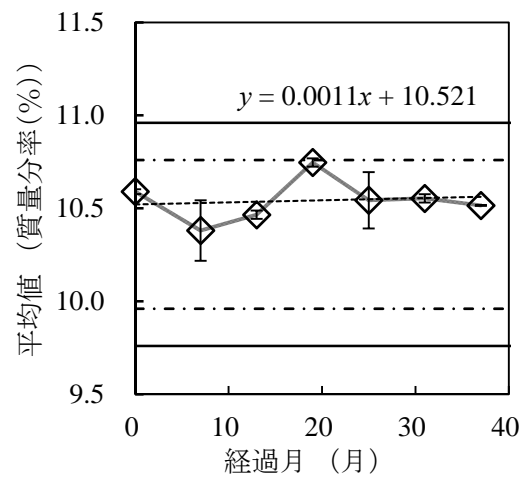


7. 標準物質A10(く溶性ほう素)

図 1A① (続き)



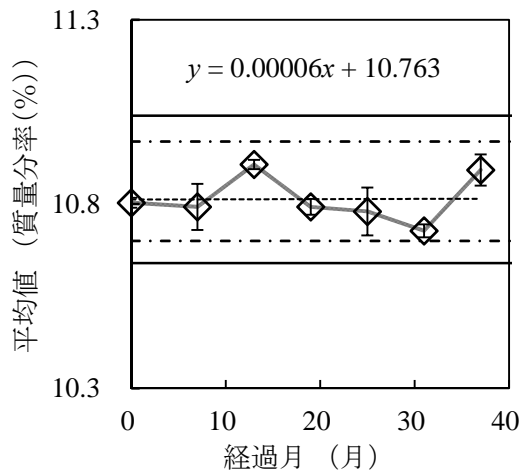
1. 標準物質A13(窒素全量)



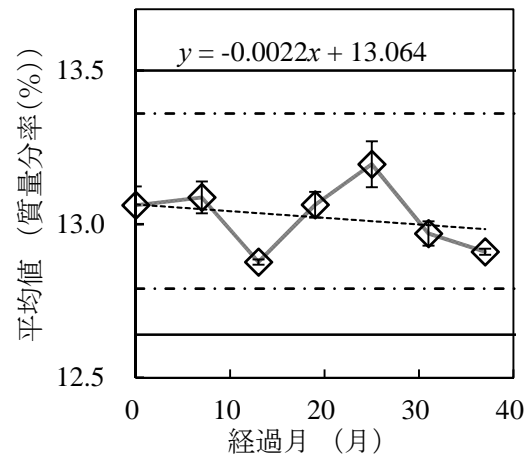
2. 標準物質A13(アンモニア性窒素)

図 1A② 標準物質 A13 のモニタリング試験成績

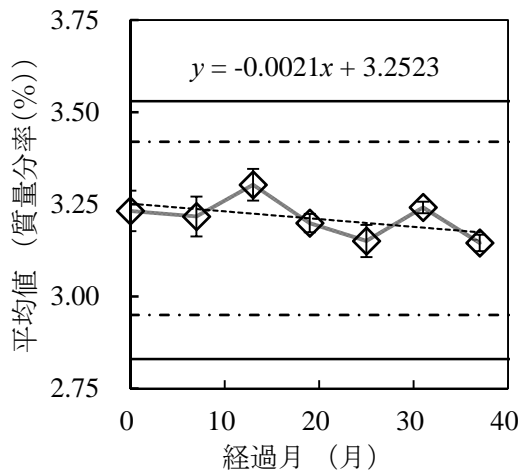
(脚注は図 1A①参照)



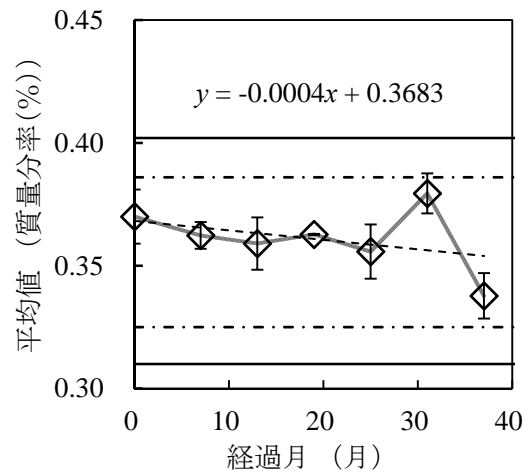
3. 標準物質A13(く溶性りん酸)



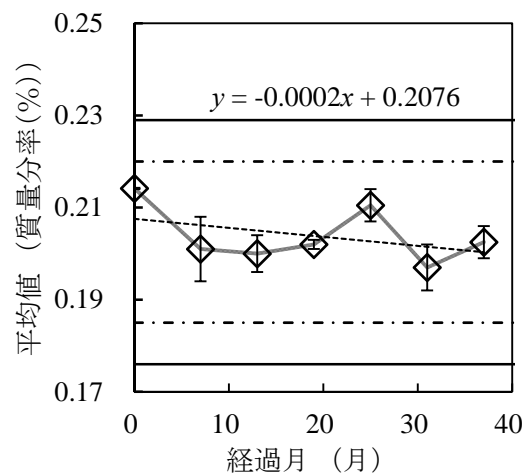
4. 標準物質A13(水溶性加里)



5. 標準物質A13(く溶性苦土)

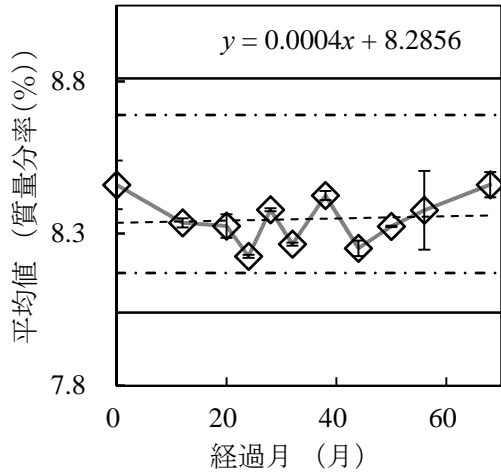


6. 標準物質A13(く溶性マンガン)

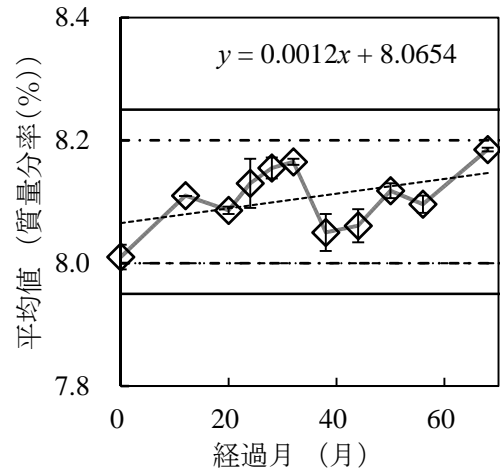


7. 標準物質A13(く溶性ほう素)

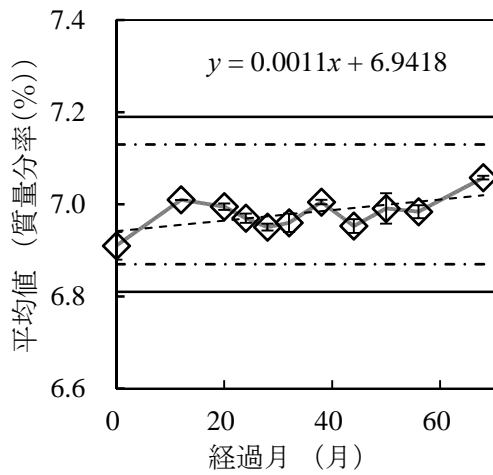
図 1A② (続き)



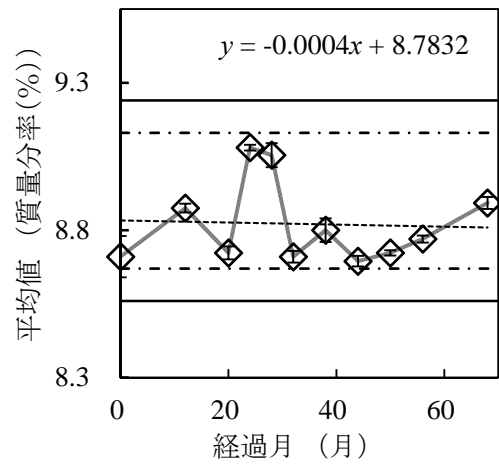
1. 標準物質B10(アンモニア性窒素)



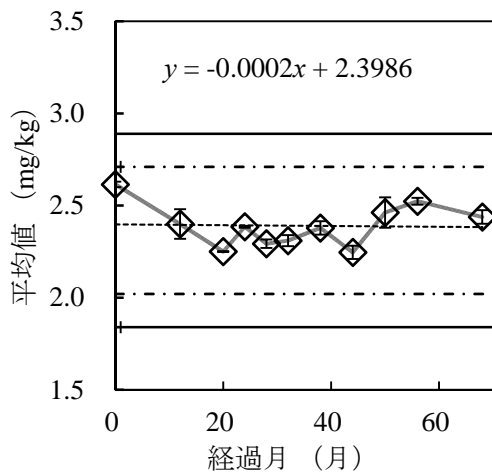
2. 標準物質B10(可溶性りん酸)



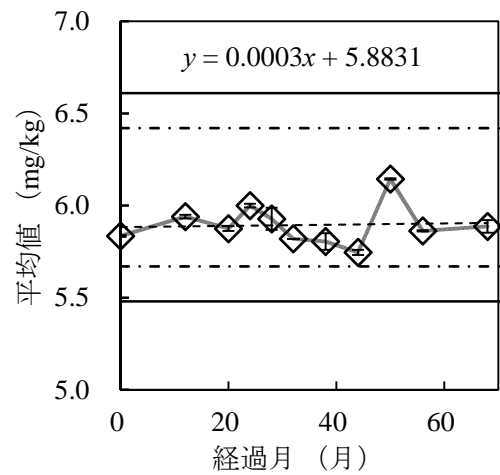
3. 標準物質B10(水溶性りん酸)



4. 標準物質B10(水溶性加里)

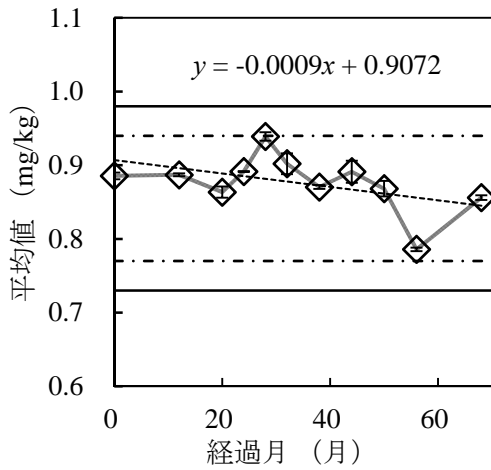


5. 標準物質B10(ひ素)

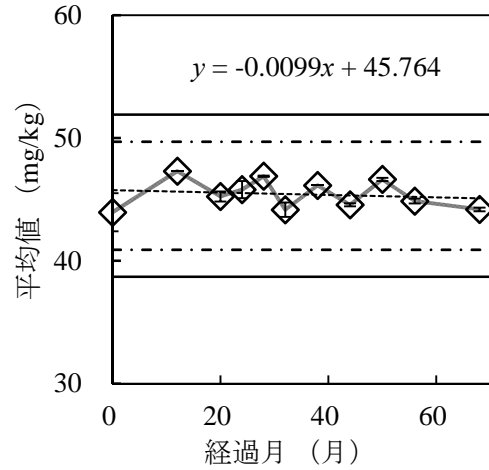


6. 標準物質B10(カドミウム)

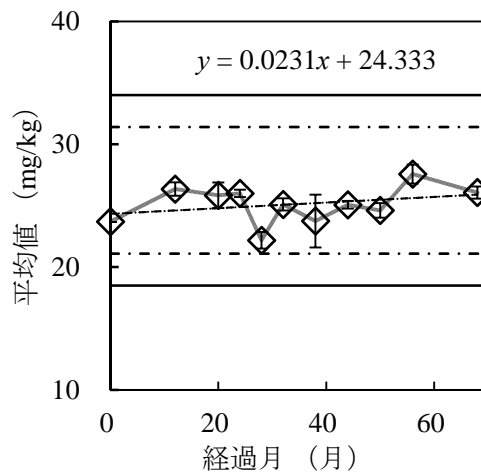
図 1B① 標準物質 B10 のモニタリング試験成績
(脚注は図 1A①参照)



7. 標準物質B10(水銀)

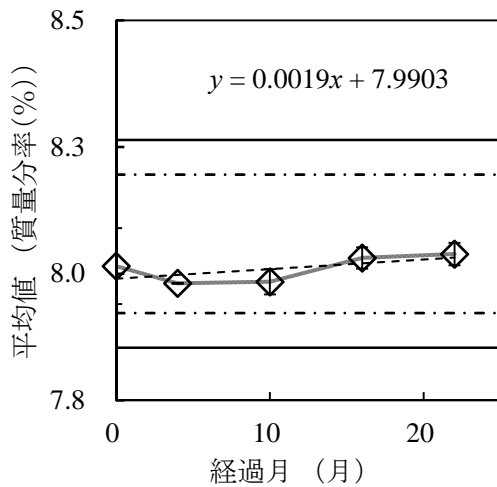


8. 標準物質B10(ニッケル)

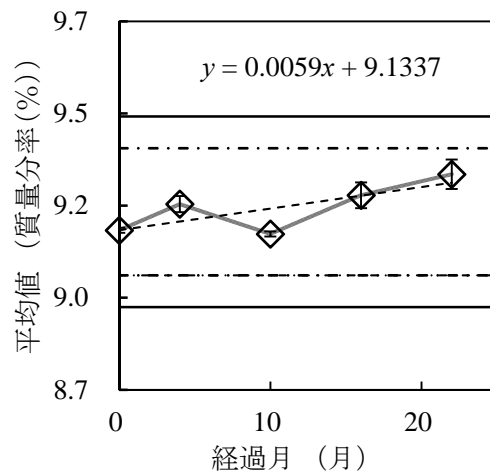


9. 標準物質B10(鉛)

図 1B① (続き)



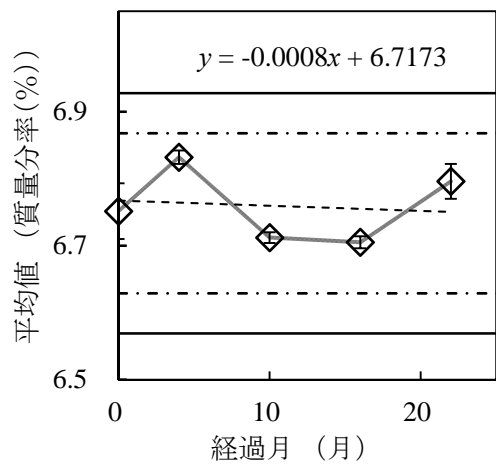
1. 標準物質B14(アンモニア性窒素)



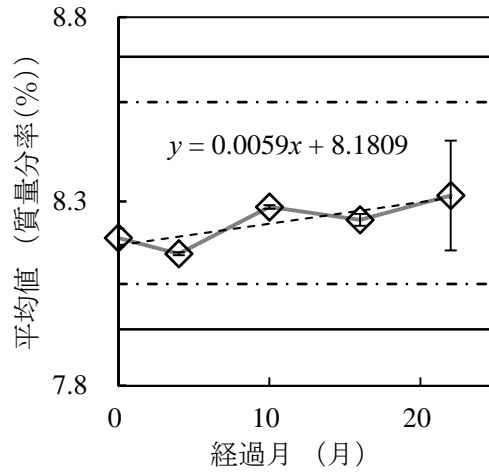
2. 標準物質B14(可溶性りん酸)

図 1B② 標準物質 B14 のモニタリング試験成績

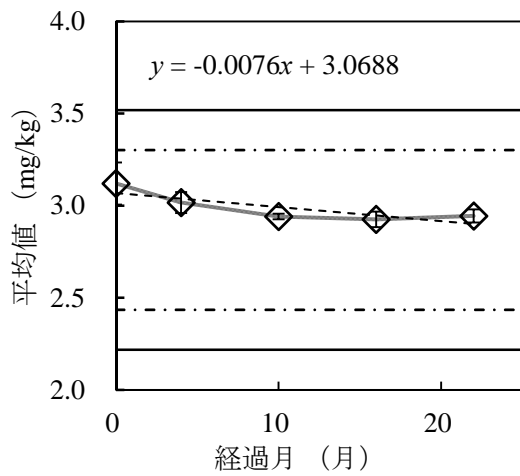
(脚注は図 1A①参照)



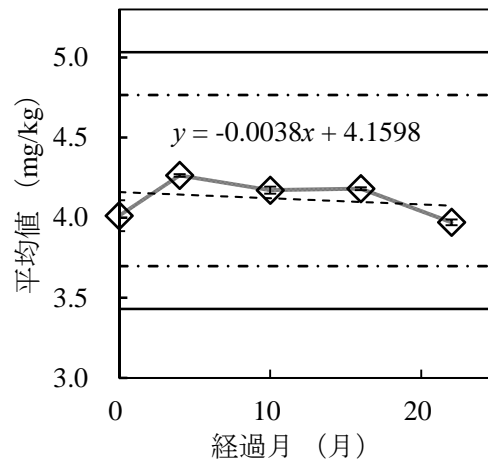
3. 標準物質B14(水溶性りん酸)



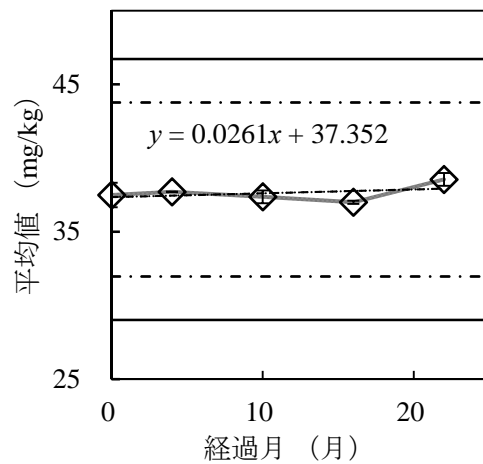
4. 標準物質B14(水溶性加里)



5. 標準物質B14(ひ素)

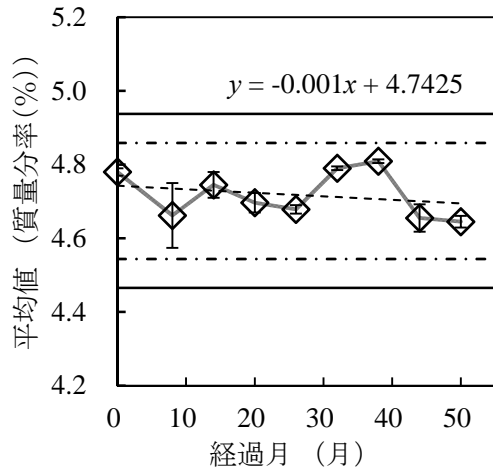


6. 標準物質B14(カドミウム)

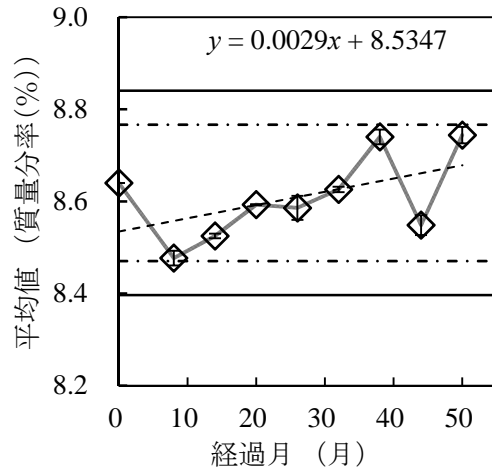


7. 標準物質B14(ニッケル)

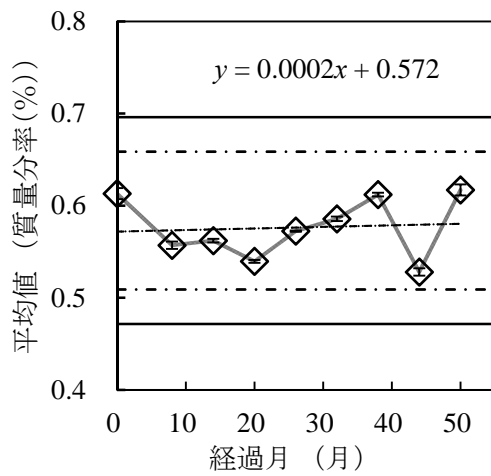
図 1B② (続き)



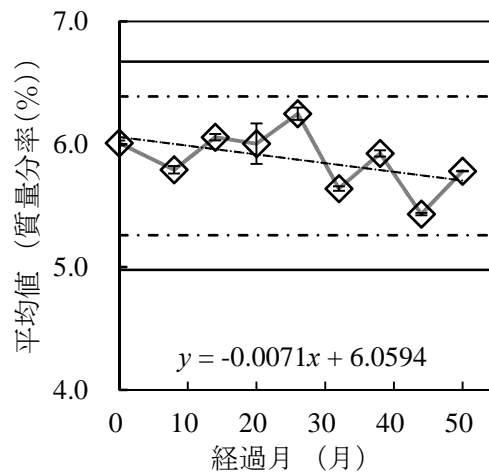
1. 標準物質C12-2(窒素全量)



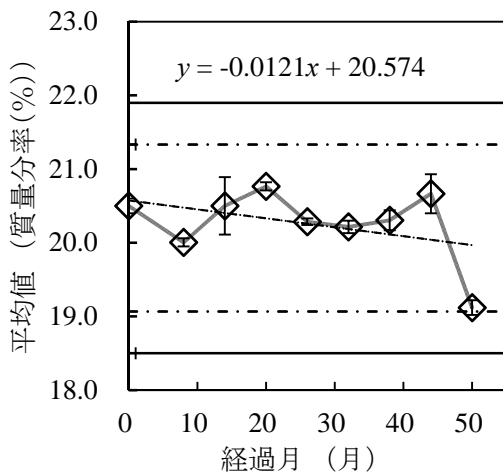
2. 標準物質C12-2(りん酸全量)



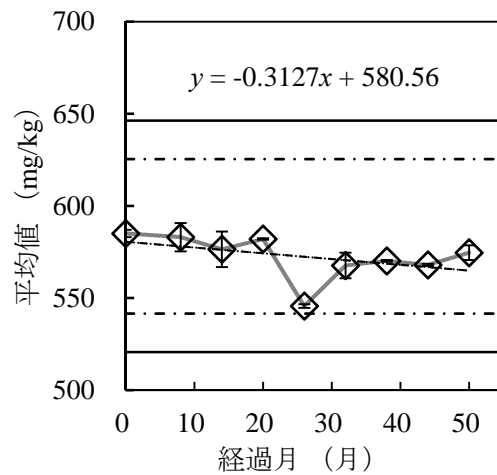
3. 標準物質C12-2(加里全量)



4. 標準物質C12-2(石灰全量)



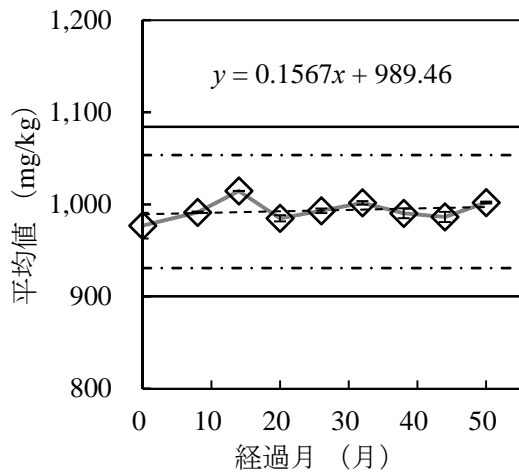
5. 標準物質C12-2(有機炭素)



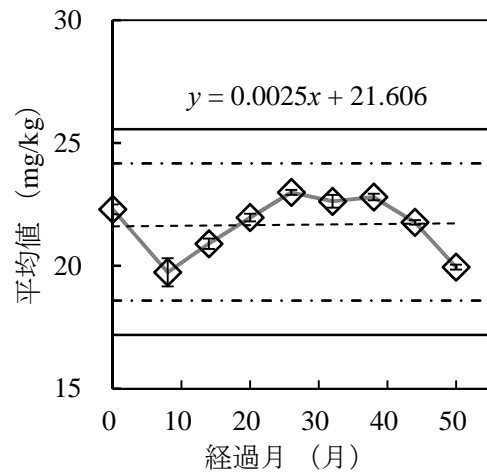
6. 標準物質C12-2(銅)

図 1C 標準物質 C12-2 のモニタリング試験成績

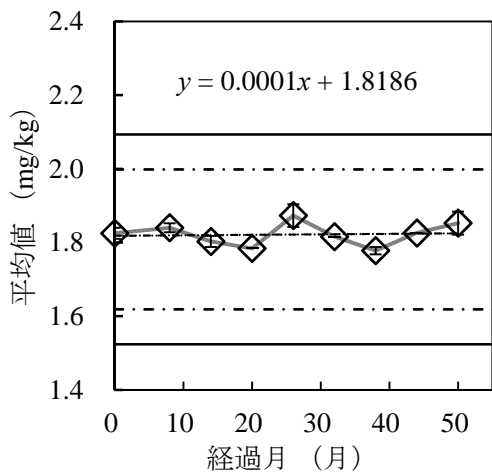
(脚注は図 1A①参照)



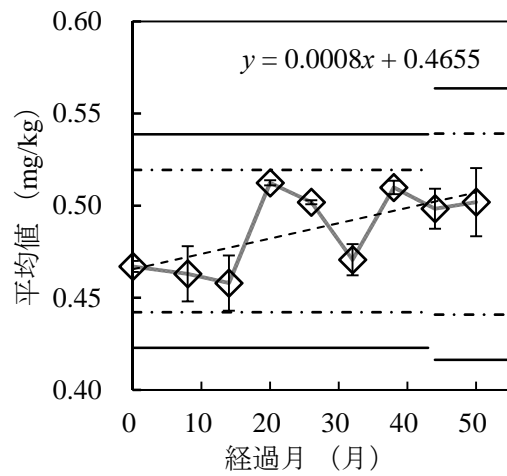
7. 標準物質C12-2(亜鉛)



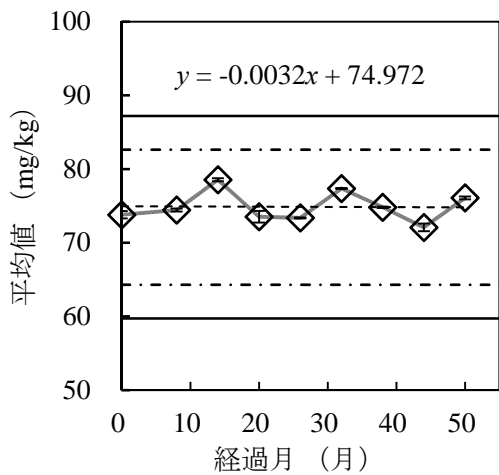
8. 標準物質C12-2(ヒ素)



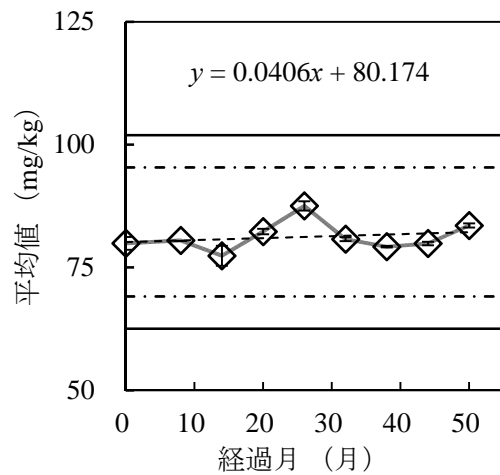
9. 標準物質C12-2(カドミウム)



10. 標準物質C12-2(水銀)

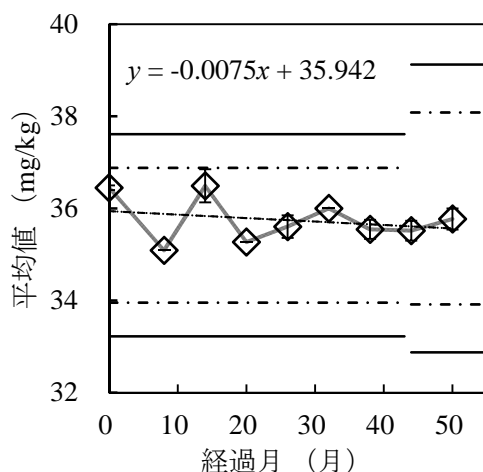


11. 標準物質C12-2(ニッケル)



12. 標準物質C12-2(クロム)

図 1C (続き)



13. 標準物質C12-2(鉛)

図 1C (続き)

2) 肥料認証標準物質の長期安定性評価

標準物質 A-10 及び標準物質 B-10 の認証値設定時(0ヶ月), 12ヶ月後, 20ヶ月後, 24ヶ月後, 28ヶ月後, 32ヶ月後, 38ヶ月後, 44ヶ月後, 50ヶ月後(標準物質 B-10 のみ), 56ヶ月後及び68ヶ月後, 標準物質 C-12-2 の認証値設定時(0ヶ月), 8ヶ月後, 14ヶ月後, 20ヶ月後, 26ヶ月後, 32ヶ月後, 38ヶ月後, 44ヶ月後及び50ヶ月後, 標準物質 A-13 の認証値設定時(0ヶ月), 7ヶ月後, 13ヶ月後, 19ヶ月後, 25ヶ月後, 31ヶ月後及び37ヶ月後並びに標準物質 B-14 の認証値設定時(0ヶ月), 4ヶ月後, 10ヶ月後, 16ヶ月後及び22ヶ月後までの経過月並びに各回の測定の平均値並びに安定性試験の評価結果を表 4-1 及び表 4-2 に示した. 安定性の評価は, 経過月の平均値と各回の測定の平均値を用いて ISO Guide 35:2006(JIS Q 0035:2008)を参考に次の手順で行った. まず, (d)式及び(e)式より, 経過月及び分析値との回帰直線の傾き(b_1)及び切片(b_0)を求めた. 次に, (f)式及び(g)式より, 予測の標準誤差(s)及び回帰直線の傾きの標準誤差(s_{b_1})を求めた. 回帰直線の傾きの標準誤差(s_{b_1})と t 値($t_{0.95, T-2}$)を乗じた値と傾きの絶対値($|b_1|$)を比較した.

その結果, 標準物質 A-10, B-10, C-12-2, A-13 及び B-14 の全ての認証成分において, $|b_1| < s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$ となり, 傾きは有意とは認められなかった. これにより標準物質 A-10, B-10, C-12-2, A-13 及び B-14 の認証成分は, モニタリング試験実施時から5年8ヶ月, 5年8ヶ月, 4年2ヶ月, 3年1ヶ月, 1年10ヶ月間安定であった.

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^T (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^T (x_i - \bar{x})^2} \quad \dots (d)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad \dots (e)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{T-2} \sum_{i=1}^T (y_i - \hat{y}_i)^2} = \sqrt{\frac{1}{T-2} \sum_{i=1}^T (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2} \quad \dots (f)$$

$$s_{b_1} = s / \sqrt{\sum_{i=1}^T (x_i - \bar{x})^2} \quad \cdots (g)$$

判定基準: $|b_1| < s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$ \cdots 有意でない(安定)
 $|b_1| \geq s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$ \cdots 有意である(不安定)

T : 試験実施回数(A-10(10回), A-13(7回), B-10(11回), C-12-2(9回), B-14(5回))

x_i : 調製後初回の試験実施日からモニタリング実施日までの経過時間(月)

\bar{x} : x_i の平均値(月)

y_i : モニタリング実施日の測定値の平均値

\bar{y} : y_i の試験成績の総平均値

b_1 : 回帰直線の傾き

b_0 : 回帰直線の切片

s : 予測の標準誤差(推定残差($y_i - \hat{y}_i$))の標準偏差

\hat{y}_i : x_i に対する y_i の予測値

s_{b_1} : 回帰直線の傾きの標準誤差

$t_{0.95, T-2}$: t 値(両側有意水準 $\alpha = 0.05$, 自由度 $T - 2$)

表4-1 標準物質の安定性のモニタリング^{a)}成績の評価結果

試験成分	\bar{x} ^{b)} (mon.)	\bar{y} ^{c)} (%) ^{j)}	回帰分析結果				S_{b_1} ^{g)} ($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 基準 ^{h)} ($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 ⁱ⁾
			b_1 ^{d)}	b_0 ^{e)}	s ^{f)}				
			($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	(%) ^{j)}	(%) ^{j)}				
(標準物質A-10)									
窒素全量 (T-N)	32.2	14.69	-0.0032	14.79	0.11	0.002	0.004	○	
アンモニア性窒素 (A-N)	32.2	10.74	0.0001	10.74	0.09	0.001	0.003	○	
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	32.2	10.06	-0.0008	10.09	0.04	0.001	0.002	○	
水溶性加里 (W-K ₂ O)	32.2	13.54	-0.0020	13.60	0.13	0.002	0.005	○	
く溶性苦土 (C-MgO)	32.2	3.35	0.0005	3.34	0.04	0.0006	0.0013	○	
く溶性マンガン (C-MnO)	32.2	0.399	3.19E-05	0.398	0.009	0.0001	0.0003	○	
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	32.2	0.209	1.79E-05	0.208	0.004	0.0001	0.0001	○	
(標準物質A-13)									
窒素全量 (T-N)	18.9	14.827	-0.0040	14.90	0.074	0.0023	0.0059	○	
アンモニア性窒素 (A-N)	18.9	10.542	0.0011	10.521	0.123	0.0038	0.0098	○	
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	18.9	10.764	0.0001	10.763	0.070	0.0022	0.0056	○	
水溶性加里 (W-K ₂ O)	18.9	13.023	-0.0022	13.064	0.117	0.0036	0.0093	○	
く溶性苦土 (C-MgO)	18.9	3.213	-0.0021	3.252	0.052	0.0016	0.0041	○	
く溶性マンガン (C-MnO)	18.9	0.361	-0.00039	0.368	0.013	0.0004	0.0010	○	
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	18.9	0.204	-0.0002	0.208	0.006	0.0002	0.0005	○	
(標準物質B-10)									
アンモニア性窒素 (A-N)	33.8	8.30	0.0004	8.29	0.08	0.001	0.003	○	
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	33.8	8.11	0.0012	8.07	0.05	0.001	0.002	○	
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	33.8	6.98	0.0011	6.94	0.03	0.0005	0.0012	○	
水溶性加里 (W-K ₂ O)	33.8	8.77	-0.0004	8.78	0.15	0.002	0.005	○	

a) 標準物質A-10及び標準物質B-10は調製後の試験実施日から起算して

68ヶ月後までモニタリング

標準物質C-12-2は調製後の試験実施日から起算して50ヶ月後までモニタリング

標準物質A-13は調製後の試験実施日から起算して37ヶ月後までモニタリング

標準物質B-14は調製後の試験実施日から起算して22ヶ月後までモニタリング

b) 調製後初回の試験実施日からモニタリング実施日までの経過時間の平均値(月)

c) 標準物質A-10の試験成績の総平均値(データ数 = 試験実施回数(10) × 併行試験数(2))

標準物質B-10の試験成績の総平均値(データ数 = 試験実施回数(11) × 併行試験数(2))

標準物質C-12-2の試験成績の総平均値(データ数 = 試験実施回数(9) × 併行試験数(2))

標準物質A-13の試験成績の総平均値(データ数 = 試験実施回数(7) × 併行試験数(2))

標準物質B-14の試験成績の総平均値(データ数 = 試験実施回数(5) × 併行試験数(2))

d) 回帰直線の傾き

e) 回帰直線の切片

f) 予測の標準誤差

g) 回帰直線の傾きの標準誤差

h) $S_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$

i) ○は次式に適合して傾きは有意とは認められず, 安定と評価した成分

$$|b_1| < S_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$$

j) 表中の%は質量分率

表4-1 (続き)

試験成分	\bar{x} ^{b)} (mon.)	\bar{y} ^{c)} (%) ^{j)}	回帰分析結果			s_{b_1} ^{g)} ($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 基準 ^{h)} ($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 ⁱ⁾
			b_1 ^{d)}	b_0 ^{e)}	s ^{f)}			
			($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	(%) ^{j)}	(%) ^{j)}			
(標準物質B-14)								
アンモニア性窒素 (A-N)	10.4	8.01	0.0019	7.99	0.02	0.001	0.004	○
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	10.4	9.19	0.0059	9.13	0.05	0.003	0.009	○
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	10.4	6.71	-0.0008	6.72	0.06	0.004	0.011	○
水溶性加里 (W-K ₂ O)	10.4	8.24	0.0059	8.18	0.04	0.002	0.008	○
(標準物質C-12-2)								
窒素全量 (T-N)	25.8	4.72	-0.0010	4.74	0.07	0.001	0.003	○
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	25.8	8.61	0.0029	8.53	0.08	0.002	0.004	○
加里全量 (T-K ₂ O)	25.8	0.58	0.0002	0.57	0.04	0.001	0.002	○
石灰全量 (T-CaO)	25.8	5.88	-0.0071	6.06	0.23	0.005	0.011	○
有機炭素 (O-C)	25.8	20.26	-0.0121	20.57	0.47	0.010	0.024	○

表4-2 標準物質の安定性のモニタリング^{a)}成績の評価結果

試験成分	\bar{x} ^{b)} (mon.)	\bar{y} ^{c)} (mg/kg)	回帰分析結果			s_{b_1} ^{g)} ($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 基準 ^{h)} ($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 ⁱ⁾
			b_1 ^{d)}	b_0 ^{e)}	s ^{f)}			
			($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$) ^{j)}	(mg/kg)	(mg/kg)			
(標準物質B-10)								
ひ素 (As)	33.8	2.39	-0.0002	2.40	0.12	0.002	0.004	○
カドミウム (Cd)	33.8	5.89	0.0003	5.88	0.11	0.002	0.004	○
水銀 (Hg)	33.8	0.88	-0.0009	0.91	0.03	0.001	0.001	○
ニッケル (Ni)	33.8	45.4	-0.0099	45.8	1.24	0.02	0.04	○
鉛 (Pb)	33.8	25.1	0.0231	24.3	1.51	0.02	0.05	○
(標準物質B-14)								
ひ素 (As)	10.4	2.99	-0.0076	3.07	0.05	0.003	0.01	○
カドミウム (Cd)	10.4	4.12	-0.0038	4.16	0.14	0.01	0.02	○
ニッケル (Ni)	10.4	37.6	0.0261	37.4	0.61	0.03	0.11	○
(標準物質C-12-2)								
銅全量 (T-Cu)	25.8	572	-0.3127	581	11.5	0.24	0.57	○
亜鉛全量 (T-Zn)	25.8	994	0.1567	989	11.6	0.24	0.58	○
ひ素 (As)	25.8	21.7	0.0025	21.6	1.29	0.03	0.06	○
カドミウム (Cd)	25.8	1.82	0.0001	1.82	0.03	0.001	0.002	○
水銀 (Hg)	25.8	0.49	0.0008	0.47	0.02	0.0004	0.001	○
ニッケル (Ni)	25.8	74.9	-0.0032	75.0	2.21	0.05	0.11	○
クロム (Cr)	25.8	81.2	0.0406	80.2	3.06	0.06	0.15	○
鉛 (Pb)	25.8	35.7	-0.0075	35.9	0.50	0.01	0.02	○

脚注は表4-1を参照

3) 肥料認証標準物質の有効期限安定性確認期間

長期安定性モニタリング試験を行った結果、現段階で標準物質 A-10 及び標準物質 B-10 は認証値設定から 5 年 6 ヶ月間、標準物質 C-12-2 は認証値設定から 3 年 11 ヶ月間、標準物質 A-13 は認証値設定から 2 年 7 ヶ月間、B-14 は認証値設定から 1 年 7 ヶ月間の安定性が確認された。

4) ERM Application Note 1 による品質管理(参考)

認証標準物質の測定値と認証値を比較する方法として、それらの差をそれらの不確かさを用いて評価する方法が ERM Application Note 1¹³⁾に紹介されている。この評価方法は新しい測定方法の妥当性確認のために紹介されているが、参考のため、今回の標準物質 A-10, B-10, C-12-2, A-13 及び B-14 の長期安定性試験成績への適用を試みた。

まず、長期安定性試験成績の総平均値 (\bar{y}_{meas}) 及び認証値 (μ) とそれらの差の絶対値 (Δ_m) ((h) 式) 並びに (i) 式より認証標準物質の標準不確かさ (u_{CRM}) 及び (j) 式より総平均値の標準不確かさ (u_{meas}) を表 5 に示した。得られた u_{meas} 及び u_{CRM} を用いて (k) 式より Δ_m の合成標準不確かさ ($u_{\text{C}(\Delta_m)}$) を算出し、更に包含係数 ($k = 2$) を用いて (l) 式より拡張不確かさ ($U_{\text{C}(\Delta_m)}$) を算出して表 5 に示し、 Δ_m と $U_{\text{C}(\Delta_m)}$ を比較した (式 (m))。その結果、標準物質 A-10 (7 成分)、標準物質 B-10 (9 成分)、標準物質 C-12-2 (13 成分)、標準物質 A-13 (7 成分) 及び標準物質 B-14 (7 成分) の 43 成分のうち 39 成分は、 Δ_m が $U_{\text{C}(\Delta_m)}$ を超えていないことから、測定値の総平均値 (\bar{y}_{meas}) 及び認証値 (μ) の間に有意差は認められなかった。有意差が認められた 4 成分のうち、標準物質 A-10 のく溶性苦土の Δ_m (質量分率 0.07 %) は、認証値 (質量分率 3.28 %) に対して 2 % であり、拡張不確かさをわずかに 0.01 % 超えていた程度であった。標準物質 B-10 のカドミウムの Δ_m (質量分率 0.15 mg/kg) は、認証値 (質量分率 6.04 mg/kg) に対して 2 % であり、拡張不確かさをわずかに 0.03 mg/kg 超えていた程度であった。標準物質 A-13 のアンモニア性窒素の Δ_m (質量分率 0.18 %) は、認証値 (質量分率 10.36 %) に対して 2 % であり、拡張不確かさをわずかに 0.02 % 超えていた程度であった。標準物質 B-14 のアンモニア性窒素の Δ_m (質量分率 0.05 %) は、認証値 (質量分率 8.06 %) に対して 1 % であり、拡張不確かさをわずかに 0.005 % 超えていた程度であった。

また、2015 年度に標準物質 A-10 のく溶性苦土、標準物質 B-10 のカドミウム、アンモニア性窒素、標準物質 A-13 のアンモニア性窒素、く溶性ほう素、2014 年度に標準物質 A-10 のく溶性苦土、標準物質 B-10 のカドミウム、アンモニア性窒素、水銀、2013 年度に標準物質 A-10 のく溶性苦土、標準物質 B-10 のカドミウムに測定値の総平均値 (\bar{y}_{meas}) 及び認証値 (μ) の間に有意差が認められている。各年度で有意差が認められた標準物質 A-10 のく溶性苦土は、拡張不確かさをわずかに 0.01 % ~ 0.02 %、標準物質 B-10 のカドミウムは、拡張不確かさをわずかに 0.01 % ~ 0.03 mg/kg 超えている程度であった。これらのことは、同評価方法が長期安定性試験成績の総平均の不確かさを過小評価していることも要因と考えられ、同方法を標準物質 A-10, B-10, C-12-2, A-13 及び B-14 の長期安定性試験成績への評価方法として使用するのは困難であると考えられた。

$$\Delta_m = |\bar{y}_{\text{meas}} - \mu| \quad \dots (h)$$

$$u_{\text{CRM}} = \frac{U_{95\%}}{2} \quad \dots (i)$$

$$u_{\text{meas}} = \sqrt{\frac{s_{(T)}^2 + \frac{s_r^2}{n}}{T}} \quad \dots (j)$$

$$u_{\text{C}(\Delta_m)} = \sqrt{u_{\text{meas}}^2 + u_{\text{CRM}}^2} \quad \dots (k)$$

$$U_{\text{C}(\Delta_m)} = 2u_{\text{C}(\Delta_m)} \quad \dots (l)$$

$$\Delta_m \leq U_{\text{C}(\Delta_m)} \quad \dots (m)$$

\bar{y}_{meas} : 長期安定性試験成績の総平均値

μ : 認証値

Δ_m : 総平均値と認証値の差の絶対値

u_{CRM} : 認証値の標準不確かさ

$U_{95\%}$: 認証値の拡張不確かさ(包含係数 $k = 2$)

u_{meas} : 測定の標準不確かさ

$s_{(T)}$: 日間標準偏差

T : 試験回数(A-10(10), A-13(7), B-10(11),
B-14(5), C-12-2(9))

s_r : 併行標準偏差

n : 併行試験数(2)

$u_{C(\Delta_m)}$: Δ_m の合成標準不確かさ

$U_{C(\Delta_m)}$: Δ_m の拡張不確かさ(包含係数 $k = 2$)

表5 長期安定性試験成績の総平均値と認証値の比較

試験成分	単位	$\bar{y}_{meas}^a)$	$u_{meas}^b)$	$\mu^c)$	$u_{CRM}^d)$	$\Delta_m^e)$	$U_{C(\Delta_m)}^f)$
(標準物質A-10)							
窒素全量(T-N)	(%) ^{g)}	14.69	0.04	14.71	0.04	0.02	0.11
アンモニア性窒素(A-N)	(%) ^{g)}	10.74	0.03	10.66	0.05	0.08	0.11
く溶性りん酸(C-P ₂ O ₅)	(%) ^{g)}	10.06	0.02	10.05	0.04	0.01	0.08
水溶性加里(W-K ₂ O)	(%) ^{g)}	13.54	0.04	13.59	0.04	0.05	0.12
く溶性苦土(C-MgO)	(%) ^{g)}	3.35	0.02	3.28	0.02	0.07	0.06
く溶性マンガン(C-MnO)	(%) ^{g)}	0.399	0.003	0.403	0.003	0.000E+00	0.008
く溶性ほう素(C-B ₂ O ₃)	(%) ^{g)}	0.209	0.001	0.209	0.002	0.000E+00	0.004
(標準物質A-13)							
窒素全量(T-N)	(%) ^{g)}	14.83	0.03	14.83	0.05	0.00E+00	0.11
アンモニア性窒素(A-N)	(%) ^{g)}	10.54	0.04	10.36	0.07	0.18	0.16
く溶性りん酸(C-P ₂ O ₅)	(%) ^{g)}	10.76	0.02	10.79	0.02	0.03	0.06
水溶性加里(W-K ₂ O)	(%) ^{g)}	13.02	0.04	13.07	0.04	0.05	0.12
く溶性苦土(C-MgO)	(%) ^{g)}	3.21	0.02	3.18	0.04	0.03	0.09
く溶性マンガン(C-MnO)	(%) ^{g)}	0.361	0.005	0.356	0.005	0.000E+00	0.013
く溶性ほう素(C-B ₂ O ₃)	(%) ^{g)}	0.204	0.002	0.203	0.003	0.000E+00	0.007

a) 内部品質管理試験成績(標準物質A-10)の総平均値(データ数 = 試験回数(10) × 繰返し数(2))

内部品質管理試験成績(標準物質B-10)の総平均値(データ数 = 試験回数(11) × 繰返し数(2))

内部品質管理試験成績(標準物質C-12-2)の総平均値(データ数 = 試験回数(9) × 繰返し数(2))

内部品質管理試験成績(標準物質A-13)の総平均値(データ数 = 試験回数(7) × 繰返し数(2))

内部品質管理試験成績(標準物質B-14)の総平均値(データ数 = 試験回数(5) × 繰返し数(2))

b) 総平均値の標準不確かさ

c) 認証値

d) 認証値の標準不確かさ

e) 平均値と認証値の差の絶対値

f) 平均値と認証値の差の合成拡張不確かさ(包含係数: $k = 2$)

g) 質量分率

表5 (続き)

試験成分	単位	$\bar{y}_{\text{meas}}^{\text{a)}$	$u_{\text{meas}}^{\text{b)}$	$\mu^{\text{c)}$	$u_{\text{CRM}}^{\text{d)}$	$\Delta_{\text{m}}^{\text{e)}$	$U_{\text{C}(\Delta_{\text{m}})}^{\text{f)}$
(標準物質B-10)							
アンモニア性窒素(A-N)	(%) ^{g)}	8.30	0.02	8.38	0.03	0.08	0.09
可溶性りん酸(S-P ₂ O ₅)	(%) ^{g)}	8.11	0.02	8.10	0.01	0.01	0.04
水溶性りん酸(W-P ₂ O ₅)	(%) ^{g)}	6.98	0.01	7.00	0.02	0.02	0.05
水溶性加里(W-K ₂ O)	(%) ^{g)}	8.77	0.04	8.85	0.04	0.08	0.11
ひ素(As)	(mg/kg)	2.39	0.03	2.36	0.05	0.03	0.12
カドミウム(Cd)	(mg/kg)	5.89	0.03	6.04	0.05	0.15	0.12
水銀(Hg)	(mg/kg)	0.88	0.01	0.86	0.01	0.02	0.03
ニッケル(Ni)	(mg/kg)	45.4	0.4	45.3	0.6	0.1	1.4
鉛(Pb)	(mg/kg)	25.1	0.5	26.2	0.7	1.1	1.7
(標準物質B-14)							
アンモニア性窒素(A-N)	(%) ^{g)}	8.01	0.02	8.06	0.02	0.050	0.045
可溶性りん酸(S-P ₂ O ₅)	(%) ^{g)}	9.19	0.03	9.18	0.02	0.01	0.07
水溶性りん酸(W-P ₂ O ₅)	(%) ^{g)}	6.71	0.02	6.70	0.02	0.01	0.06
水溶性加里(W-K ₂ O)	(%) ^{g)}	8.24	0.03	8.32	0.03	0.08	0.09
ひ素(As)	(mg/kg)	2.99	0.04	2.87	0.06	0.12	0.13
カドミウム(Cd)	(mg/kg)	4.12	0.06	4.23	0.07	0.11	0.18
ニッケル(Ni)	(mg/kg)	37.6	0.3	37.9	0.9	0.3	1.8
(標準物質C-12-2)							
窒素全量(T-N)	(%) ^{g)}	4.72	0.02	4.70	0.02	0.02	0.06
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	(%) ^{g)}	8.61	0.03	8.62	0.02	0.01	0.08
加里全量(T-K ₂ O)	(%) ^{g)}	0.58	0.01	0.58	0.01	0.00E+00	0.03
石灰全量(T-CaO)	(%) ^{g)}	5.88	0.08	5.82	0.08	0.06	0.23
有機炭素(O-C)	(%) ^{g)}	20.3	0.2	20.2	0.1	0.1	0.4
銅全量(T-Cu)	(mg/kg)	572	4	583	6	11	15
亜鉛全量(T-Zn)	(mg/kg)	994	4	992	9	2	19
ひ素(As)	(mg/kg)	21.7	0.4	21.4	0.4	0.3	1.2
カドミウム(Cd)	(mg/kg)	1.82	0.01	1.81	0.03	0.01	0.06
水銀(Hg)	(mg/kg)	0.49	0.01	0.49	0.01	0.003	0.02
ニッケル(Ni)	(mg/kg)	75	1	73	1	2	3
クロム(Cr)	(mg/kg)	81	1	82	2	1	5
鉛(Pb)	(mg/kg)	36	0.2	36	1	0.3	1

4. まとめ

FAMICは、肥料認証標準物質として標準物質A(高度化成肥料FAMIC-A-10)、標準物質B(普通化成肥料FAMIC-B-10)、標準物質C(汚泥発酵肥料FAMIC-C-12-2)、標準物質A(高度化成肥料FAMIC-A-13)及び標準物質B(普通化成肥料FAMIC-B-14)の有効期限を確認するためにモニタリングによる長期安定性試験を実施した。この結果、標準物質A-10、B-10、C-12-2、A-13及びB-14の各試験日毎の試験成績の平均値は、いずれの成分も内部品質管理の警戒限界を超えることはなかった。また、試験成績をISO Guide 35:2006(JIS Q 0035:2008)⁸⁾を参考に統計解析し、安定性を評価したところ、標準物質A-10、B-10、C-12-2、A-13及びB-14について認証値設定後、各々5年6ヶ月間、5年6ヶ月間、3年11ヶ月間、2年7ヶ月間、1年7ヶ月間の全ての

認証成分の安定性が確認された。

肥料認証標準物質の認証成分の長期安定性を確認することは、利用者の利便性向上に寄与するものと考えられる。一方、肥料の認証標準物質は、国内には他に作製している例はない。更に、国外で利用されている肥料認証標準物質は我が国の特有の肥料成分及びその試験方法が網羅されておらず、また、我が国向けの肥料認証標準物質も作製されていない。このような観点から、この標準物質の利用促進が、肥料分析の信頼性確保に貢献するところは大きいものと期待される。

文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料分析標準試料の配布申請手続き
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6.html>>
- 2) 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」)
- 3) 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－高度化成肥料 FAMIC-A-10 及び普通化成肥料 FAMIC-B-10－, 肥料研究報告, **4**, 107~121, (2009)
- 4) 秋元里乃, 廣井利明, 八木寿治, 顯谷久典, 舟津正人, 矢野愛子, 坂東悦子, 藤田真理子, 白井裕治, 柴田政人:2012 年度 肥料認証標準物質の開発－汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12－, 肥料研究報告, **6**, 84~100 (2013)
- 5) 加島信一, 八木寿治, 顯谷久典, 秋元里乃, 矢野愛子, 藤田真理子, 橋本良美, 廣井利明, 白井祐治, 久保明:2013 年度 肥料認証標準物質の開発－高度化成肥料 FAMIC-A-13－, 肥料研究報告, **7**, 95~104(2014)
- 6) 阿部進, 秋元里乃, 坂井田里子, 八木寿治, 伊藤浩平, 田中雄大, 加島信一, 廣井利明, 鈴木時也, 佐久間健太, 橋本良美, 白井祐治:2014 年度 肥料認証標準物質の開発－普通化成肥料 FAMIC-B-14 の調製－, 肥料研究報告, **8**, 140~152 (2015)
- 7) 秋元里乃, 阿部進, 八木寿治, 長谷川正憲, 佐久間健太, 白井祐治:2015 年度 肥料認証標準物質の開発－汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12 の再認証－, 肥料研究報告, **9**, 145~169 (2016)
- 8) ISO Guide 34 (2009): “General requirements for the competence of reference material producers” (JIS Q 0034: 2012, 「標準物質生産者の能力に関する一般要求事項」)
- 9) 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」)
- 10) ISO Guide 31 (2000): “Reference materials—Contents of certificates and labels” (JIS Q 0031 : 2002, 「標準物質－認証書及びラベルの内容」)
- 11) 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(2014)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2014.pdf>
- 12) ISO 5725-6 (1994): “Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 6: Use in practice of accuracy values” (JIS Z 8402-6: 1999, 「測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度)－第6部:精確さに関する値の実用的な使い方」)
- 13) Thomas Linsinger : “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)

<http://www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_1/Documents/erm_application_note_1_english_rev3.pdf>

Long-term Stability Evaluation of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-10) and Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-10) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-12-2) and High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-13) and Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-14)

Shigeyuki INABA¹, Yasuharu KIMURA¹, Jun ITOU¹, Shingo MATSUO¹,
Keisuke AOYAMA², Norio FUNAKI¹ and Yuji SHIRAI³

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now) Fertilizer and Feed Inspection Department

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) has performed long-term stability examinations to confirm shelf life of fertilizer certified reference materials (CRMs), high-analysis compound fertilizer (FAMIC-A-10 and FAMIC-A-13), ordinary compound fertilizer (FAMIC-B-10 and FAMIC-B-14) and composted sludge fertilizer (FAMIC-C-12-2) for analysis of major components and harmful elements. FAMIC-A-10 and FAMIC-A-13 are certified for the contents of total nitrogen (T-N), ammonium nitrogen (A-N), citric acid-soluble phosphorus (C-P₂O₅), water-soluble potassium (W-K₂O), citric acid-soluble magnesium (C-MgO), citric acid-soluble manganese (C-MnO) and citric acid-soluble boron (C-B₂O₃). FAMIC-B-10 and FAMIC-B-14 is certified for the concentrations of ammonium nitrogen (A-N), citrate-soluble phosphoric acid (S-P₂O₅), water-soluble phosphoric acid (W-P₂O₅), water-soluble potassium (W-K₂O), arsenic (As), cadmium (Cd), lead (Pb) (only FAMIC-B-10), nickel (Ni) and mercury (Hg) (only FAMIC-B-10). FAMIC-C-12-2 is certified for the concentrations of total nitrogen (T-N), total phosphoric acid (T-P₂O₅), total potassium (T-K₂O), total calcium (T-CaO), total copper (T-Cu), total zinc (T-Zn), organic carbon (O-C), arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg), nickel (Ni), chromium (Cr), and lead (Pb). The monitoring long-term stability was evaluated by a statistical analysis of the results of monitoring stability examination on the chemical analysis of the stock CRMs. The data was performed a statistical analysis in reference to ISO Guide 35: 2006. It shows evidence that there were no need to update the certified value and its uncertainty. From these results of the statistical analysis, the all certified values of the CRMs of high-analysis compound fertilizer (FAMIC-A-10) and ordinary compound fertilizer (FAMIC-B-10) and composted sludge fertilizer (FAMIC-C-12-2) and high-analysis compound fertilizer (FAMIC-A-13) and ordinary compound fertilizer (FAMIC-B-14) were stable for each five years six months (66 months) after preparation and five years six months (66 months) after preparation and three years eleven months (47 months) after preparation and two years seven months (31 months) after preparation and one year seven months (19 months) after preparation. It was compared the certification level with the measurements of CRMs by an introduced evaluation method in ERM Application Note 1 by reference. The CRMs were expected to be useful for the quality assurance and the quality control in the analysis of major components and harmful elements in compound fertilizers.

Key words certified reference material (CRM), fertilizer, major component, harmful elements, ISO Guide 35, long-term stability

(Research Report of Fertilizer, **10**, 168~194, 2017)

10 尿素性窒素試験法(ウレアーゼ法)の性能調査

藤田敏文¹, 加藤公栄¹, 新見豊和¹, 木村康晴³, 伊藤浩平², 白井裕治²

キーワード 尿素性窒素, ウレアーゼ法, 単一試験室の妥当性確認

1. はじめに

公定規格¹⁾においてアセトアルデヒド縮合尿素等の緩効性肥料の制限事項に尿素の最大含有量が規定されている。また、尿素性窒素は速効性成分であり、肥料としての性格を明らかにする上では複合肥料中の尿素性窒素の定量は重要である²⁾。したがって、公定規格に制限事項が規定されていない肥料の尿素性窒素の定量法も性能調査が必要とされていることから、高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素の測定法³⁾が開発された。しかしながら、HPLCを保有していない試験室もあることから、従来のウレアーゼ法^{4, 5)}について試験法の性能調査を実施した。また、ウレアーゼ法で用いている回転振り混ぜ機は肥料の分析特有の抽出機器であることから、HPLC法で用いている汎用的抽出機器(マグネチックスターラー)の適用を確認したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 試料の収集及び調製

流通肥料のうち、尿素及び尿素を含む複合肥料として計15点(尿素3点、被覆窒素肥料3点、化成肥料4点、配合肥料3点及び指定配合肥料2点)、尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料として計10点(アセトアルデヒド縮合尿素(以下、「CDU」という。)2点、イソブチルアルデヒド縮合尿素(以下、「IB」という。)1点、ホルムアルデヒド加工尿素(以下、「UF」という。)2点及び化成肥料5点)を試験品として収集し、それぞれ粉砕機で目開き500 µmの網ふるいを通過するまで粉砕して分析用試料を調製した。添加回収試験及び定量下限の確認に用いたIB及びCDUは、分析用試料約10 gをそれぞれはかりとり、ロート上ろ紙(3種)に入れ、抽出溶媒のりん酸塩溶液を(3L)を加えて洗浄し、ろ紙上に残った残留物を乾燥し、洗浄済みIB及び洗浄済みCDUとした。

2) 装置及び器具

- (1) 回転振り混ぜ機: 上下転倒式回転振り混ぜ機
- (2) マグネチックスターラー: AS ONE HS-6AN
- (3) 恒温水槽: THERMO F-0030
- (4) 電位差滴定装置: 京都電子工業 AT-510
- (5) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): Waters alliance シリーズ

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

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神戸センター

- (6) カラム: Asahipak ES-502C 7C: 長さ 100 mm L×内径 7.5 mm I.D., 粒径 9 μm
 ハミルトン PRP-X200: 長さ 150 mm L×内径 4.1 mm I.D., 粒径 10 μm

3) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 相当の水
 (2) リン酸塩溶液: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 3.63 g 及び JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 5.68 g を水 1000 mL に溶かした
 (3) 水酸化ナトリウム溶液 (5 g/L): JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 5 g を水に溶かして 1000 mL とした
 (4) 塩酸: JIS K 8180 に規定する試薬
 (5) 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 エタノール (95) 100 mL に溶かした
 (6) 硫酸: JIS K 8951 に規定する試薬
 (7) ウレアーゼ: 和光純薬工業製
 (8) 酸化マグネシウム: JIS K 8432 に規定する試薬
 (9) 尿素: JIS K 8731 に規定する試薬
 (10) 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: 関東化学製容量分析用滴定液
 (11) 0.25 mol/L 硫酸: 関東化学製容量分析用滴定液

4) 試料溶液調製方法

- (1) 回転振り混ぜ機を用いる方法 (以下, 「回転振り混ぜ機法」という.)
 (1.1) 尿素及び尿素を含む複合肥料
 分析試料 5.00 g をはかりとり, 全量フラスコ 500 mL に入れ, 水約 400 mL を加え 30~40 回転/分で約 30 分間振り混ぜた後標線まで水を加えた. ろ紙 3 種でろ過し, 試料溶液とした (図 1).
 (1.2) 尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料
 分析試料 1.00 g をはかりとり, 全量フラスコ 250 mL に入れ, リン酸塩溶液 200 mL を加え 30~40 回転/分 (25 °C) で約 30 分間振り混ぜた後標線まで水を加えた. ろ紙 3 種でろ過し, 試料溶液とした (図 2).

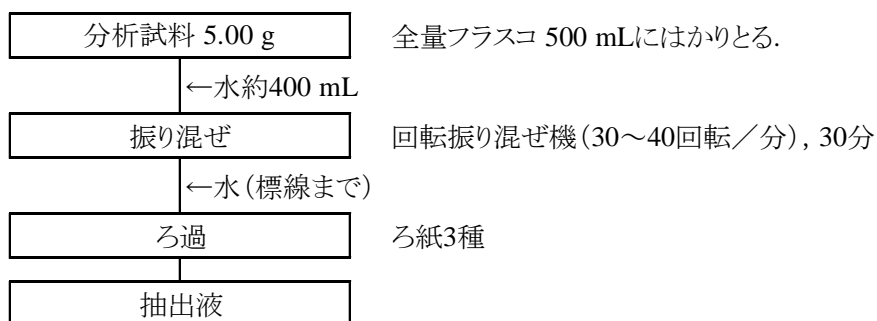


図1 回転振り混ぜ機法 (尿素及び尿素を含む複合肥料)

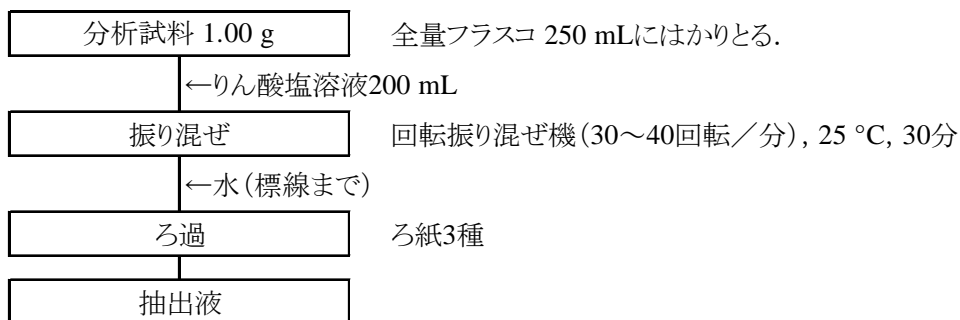


図2 回転振り混ぜ機法(尿素化合物及び尿素化合物含む複合肥料)

(2) マグネチックスターラーを用いる方法(以下、「スターラー法」という.)

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、水 100 mL を加え約 10 分間かき混ぜた後、ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とした(図 3).

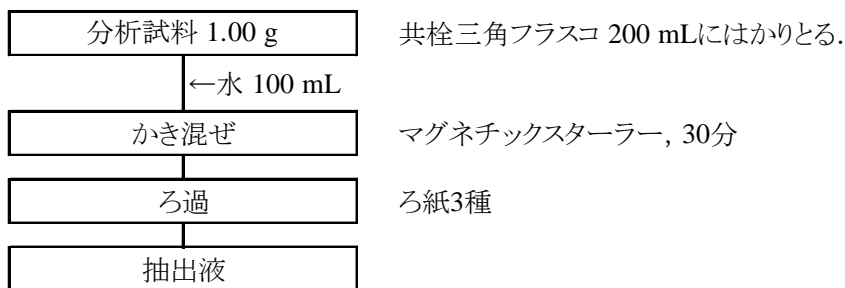


図3 スターラー法

5) 測定方法

(1) ウレアーゼ法(図 4)

(1.1) 加水分解

抽出液の一定量(U-Nとして 10 mg 相当量以上, Nとして 10 mg~100 mg 相当量)を蒸留フラスコ 300 mL に入れ、水を加えて液量を約 50 mL とした. メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)数滴加え、溶液の色がうすい黄赤色になるまで塩酸(1+200)又は水酸化ナトリウム溶液(5 g/L)を加えた. 抽出液中の尿素を分解するために十分な量(0.2 g)のウレアーゼを加え、密栓して 40 °C の水浴中で1時間加温した後、放冷して試料溶液とした. 抽出液空試験として、別の蒸留フラスコを用いてウレアーゼを加えずに同様の操作を実施し、未分解試験溶液を調製した. また、ウレアーゼ空試験として、別の蒸留フラスコを用いて抽出液を水に替えて同様の操作を実施し、空試験溶液を調製した.

(1.2) 蒸留

0.25 mol/L 硫酸を 10 mL を受器にはかりとり、この受器を水蒸気蒸留装置に連結した. 試料溶液の入った蒸留フラスコに酸化マグネシウム 2 g~3 g を加え、この蒸留フラスコを水蒸気蒸留装置に連結した. 水蒸気を蒸留フラスコに送り、蒸留フラスコ内の溶液を加熱し、留出速度 5 mL/min~7 mL/min で蒸留を行い、120 mL~160 mL が留出したら蒸留を止め、受器内の溶液と接した水蒸気蒸留装置の部分を少量の水で洗い、洗液を留出液と合わせた. 未分解試験溶液及びウレアーゼ空試験溶液を同様に操作して空試験溶液の留出液を得た.

(1.3) 滴定

留出液を電位差滴定装置を用いて 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。0.25 mol/L 硫酸空試験, 未分解試験溶液及びウレアーゼ空試験溶液も同様に滴定した。

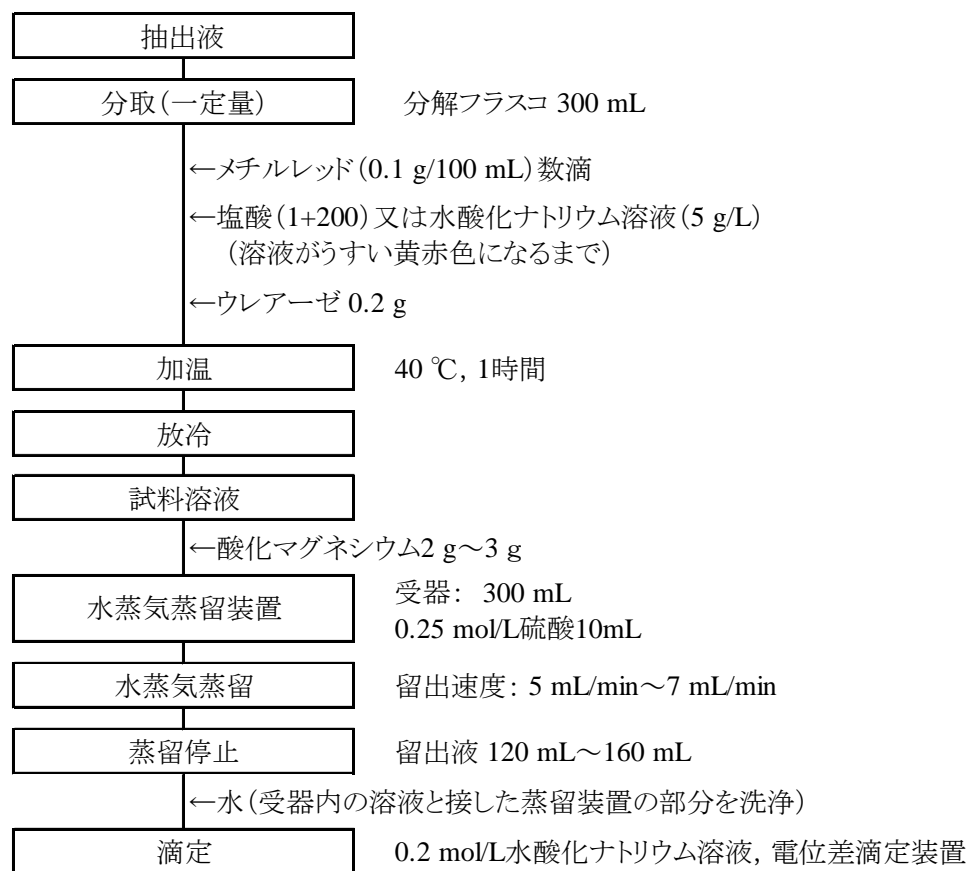


図4 加水分解、蒸留及び滴定操作

(2) HPLC 法

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, 水 100 mL を加え, マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜた。静置後, 上澄み液を共栓遠心沈殿管 1.5 mL にとり, 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を試料溶液とした。この試料溶液を HPLC により測定した(図 5)。

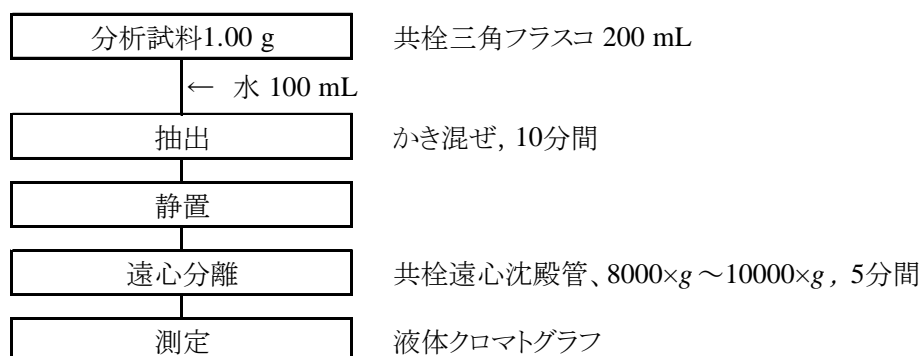


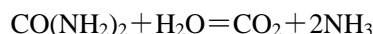
図5 HPLC法

3. 結果及び考察

1) 試験操作の確認

(1) ウレアーゼによる加水分解操作

ウレアーゼは加水分解酵素の一つであり、尿素に対して選択的に作用し、以下に示す化学反応式により二酸化炭素とアンモニアに分解する。したがって、尿素性窒素の定量は試料溶液中の尿素を完全に分解するのに十分なウレアーゼを添加する必要がある。



しかし、市販品のウレアーゼは活性が一定でないものがあり、保存中に低下しやすいことから添加量は、「尿素を分解するのに十分な量のウレアーゼ(約 0.2 g)」⁶⁾、「温度 40 °C 反応時間 1 時間の場合尿素態窒素 50 mg～60 mg を分解するにウレアーゼ 0.3 g が安全であった。」⁷⁾、「0.1 g～0.5 g」⁸⁾又は「0.5 g 以下で尿素 0.25 g を完全に分解するもの」^{2～4, 8)}と概算的に示されているに過ぎず、分析を行う前にウレアーゼの活性又は加水分解能力を測定する必要がある。

近年、和光純薬工業(株)が、あらかじめウレアーゼの活性値を保証したウレアーゼを販売していることから、試料中の尿素を完全に分解するウレアーゼの最小添加量を確認するために、ウレアーゼ(活性値 140 Unit)をそれぞれ 0.1 g, 0.2 g 及び 0.3 g 加えて、回転振り混ぜ機法により CDU を用いて測定したところ、ウレアーゼの添加量が 0.1 g の場合は定量できなかったが、0.2 g 及び 0.3 g では測定値間に大きな差違は認められなかった(表 1)。また、ウレアーゼは製造ロットごとに活性値が異なることから、異なる活性値間の比較が必要である。このため、活性値 130 Unit～150 Unit のウレアーゼを用いて同様に測定したところ大きな差違は認められなかった(表 2)。

表1 ウレアーゼ添加量別定量値

ウレアーゼ添加量 (g)	定量値 ^{a)b)} (%) ^{c)}
0.1	N.D.
0.2	1.63
0.3	1.59

a) ウレアーゼ活性値 140 Unit

b) 2点併行試験の平均値

c) 質量分率

表2 ウレアーゼ活性値別定量値

ウレアーゼ活性値 (Unit)	定量値 ^{a)b)} (%) ^{c)}
130	1.59
140	1.65
150	1.63

a) ウレアーゼ添加量 0.2 g

b) 2点併行試験の平均値

c) 質量分率

(2) 抽出操作方法

ウレアーゼ法が昭和 32 年(1957 年)公定法⁸⁾(試験法 I(表 3))に採用されて以降、試料溶液の抽出方法に種々の改良が加えられていた。「詳解肥料分析法」⁸⁾(試験法 I(表 3))では採用当時の分析法の解説が記述されており、いずれの肥料も水で抽出している。山添らの報告(試験法 II(表 3))⁹⁾では、尿素化合物又は尿素化合物を含む複合肥料の試料の抽出に加水分解を防止するために、20 °C 雰囲気下で抽出溶媒にりん酸塩溶液(冷緩衝液)を使用していた。「第二改訂詳解肥料分析法」²⁾(試験法 III(表 3))では抽出温度を 25 °C に変更している。また、「肥料分析法(1992 年版)」⁴⁾(試験法 IV(表 3))には尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料の抽出方法が記載されていないが、「肥料等試験法(2016)」⁵⁾のウレアーゼ法(試験法 V(表 3))では試験法

III 及び試験法 IV を参考に書き替えられた方法が記載されている。ウレアーゼ法の抽出方法は、対象とする肥料別に抽出操作が多岐にわたっており、抽出装置として肥料の分析に特有な回転振り混ぜ機を用いている。このことから、ウレアーゼ法においても「肥料等試験法(2016)」の高速液体クロマトグラフ法(試験法 VI(表 3))による抽出操作(抽出装置:マグネチックスターラー, 抽出溶媒:水, 抽出温度:室温)をウレアーゼ法へ適用することの適否を確認することとした。

表3 各試験法の抽出操作

分析法 ^{a)}	対象肥料 ^{b)}	抽出機器	抽出溶媒	抽出温度	抽出時間
試験法I	A	—	水	—	—
	B	回転振り混ぜ機	水	—	30分間
	C	—	水	—	—
	D	—	—	—	—
試験法II	A, B	—	—	—	—
	C, D	回転振り混ぜ機	りん酸塩溶液	20 °C	30分間
試験法III	A	—	水	—	—
	B	回転振り混ぜ機	水	—	30分間
	C, D	回転振り混ぜ機	りん酸塩溶液	25 °C	30分間
試験法IV	A	—	水	—	—
	B	回転振り混ぜ機	水	—	30分間
	C, D	—	—	—	—
試験法V	A, B	回転振り混ぜ機	水	—	30分間
	C, D	回転振り混ぜ機	りん酸塩溶液	—	30分間
試験法VI	A~D	マグネチックスターラー	水	—	10分間

a) 試験法I: 詳解肥料分析法(1962年)

試験法II: 緩効性窒素肥料の分析法に関する研究(第1報)尿素性窒素および可溶性窒素の定量について(1965年)

試験法III: 第二改訂詳解肥料分析法(1988年)

試験法IV: 肥料分析法(1992年版)

試験法V: 肥料等試験法(2016) 6.3.a ウレアーゼ法

試験法VI: 肥料等試験法(2016) 6.3.b 高速液体クロマトグラフ法

b) A: 尿素

B: 尿素を含む複合肥料

C: 尿素化合物

D: 尿素化合物を含む複合肥料

回転振り混ぜ機法は、(A)尿素及び(B)尿素を含む複合肥料は①抽出溶媒として水を用い室温、また、(C)尿素化合物及び(D)尿素化合物を含む複合肥料は②抽出溶媒としてりん酸塩溶液を用い 25 °Cで振り混ぜた。マグネチックスターラー法はいずれの試料も抽出溶媒として水を用い室温でかき混ぜた。尿素について回転振り混ぜ機法とスターラー法の測定値の関係及びそれら測定値の対応のある t 検定により求めた t 絶対値を表 4 に示した。その結果、有意水準 5 % で抽出法方法間の測定値に有意な差は認められなかった。

表4 異なる抽出方法による測定値の比較

試料の種類	回転振り混ぜ機 ^{a)}	スターラー ^{c)}
	(%) ^{b)}	(%) ^{b)}
被覆窒素肥料	38.63	38.66
被覆窒素肥料	39.61	39.53
尿素	43.23	43.78
尿素	44.34	44.82
尿素	44.03	44.44
被覆窒素肥料	35.44	35.01
平均値	40.88	41.04
<i>t</i> 値 ^{d)}		1.014
<i>t</i> 境界値 ^{e)}		2.571

a) 回転振り混ぜ機を用いて抽出した測定値

b) 質量分率

c) スターラーを用いて抽出した測定値

d) 対応のある測定値の平均値の差の検定により求めた *t* 絶対値

e) 5%有意水準(両側)の *t* 境界値

尿素性窒素として質量分率 10%以下の尿素を含む複合肥料並びに尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料について回転振り混ぜ機法とスターラー法の測定値の関係を図 6 に示した。その回帰式の回帰係数の 95%信頼区間は 1 を含み、切片の 95%信頼区間は 0(原点)を含んでいた。相関係数は $r=0.995$ であり、いずれも肥料等試験法の推奨規準を満たしていた。また、回転振り混ぜ機法の抽出条件①の測定値はプロット「□」、また、抽出条件②の測定値はプロット「○」で図 6-2 に示した。スターラー法の測定値に対する回転振り混ぜ機法の抽出条件別の分布に差は認められなかった。山添ら⁹⁾は、IB(1 点)を水で抽出した尿素性窒素の測定値がりん酸塩溶液で抽出した測定値よりも高かったため、抽出溶媒中で加水分解を起こした結果、測定値に正の誤差を与えていると報告している。IB は、水への溶解度が 0.09 g/100 g 水 (25 °C)¹⁰⁾ であり、pH 4 以下の酸性領域において急速に加水分解が起きる¹¹⁾。しかしながら、化成肥料等の水での抽出は、中性領域であり、抽出時間が 10 分間と比較的短いことから、定量値への影響は認められなかった。

このことから、スターラー法を本法として、以下の真度、精度等の性能評価を実施することとした。

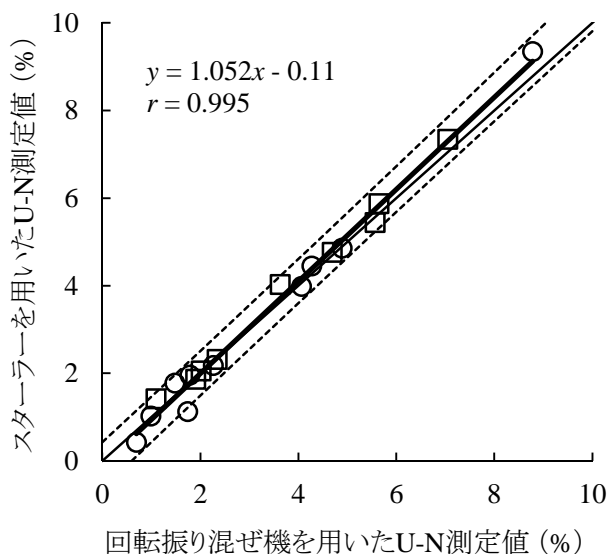


図6 回転振り混ぜ機及びスターラーを用いた抽出方法の U-N 測定値の比較

□: 尿素を含む複合肥料

回転振り混ぜ機(抽出溶媒:水)ースターラー(抽出溶媒:水)

○: 尿素化合物及びそれを含む複合肥料

回転振り混ぜ機(抽出溶媒:りん酸塩溶液)ースターラー(抽出溶媒:水)

太線: 回帰直線, 破線: 予測区間, 細線: $y=x$

(%): 質量分率

2) 調製試料による真度の評価

本法の真度を確認するため、尿素性窒素として質量分率 40 %、10 %、3 % 及び 1 % 相当量の尿素を添加した調製試料(マトリックス: 硫黄, 化成肥料, 洗浄済み IB, UF 入り化成肥料)を用い 3 点併行で尿素性窒素を試験した結果を表 5 に示した。なお、UF 入り化成肥料は尿素性窒素が質量分率 0.53 % 含有していたことから、その含量を用いて回収率を算出した。

尿素性窒素平均定量値が質量分率 1.58 % ~ 39.96 % で、回収率は 98.7 % ~ 103.7 % であり、いずれの回収率もこれらの濃度範囲における肥料等試験法が示している真度(回収率)の目標以内であった。

表5 試料中の尿素性窒素の真度確認試験成績

基材に用いた肥料	尿素添加量 ^{a)} (%) ^{b)}	尿素性窒素含有量 ^{c)} (%) ^{b)}	定量値 ^{d)} (%) ^{b)}	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)	回収率の目標 ^{e)} (%) ^{b)}
硫黄	85.7	40	39.96	99.9	1.4	98~102
化成肥料	21.4	10	9.95	99.5	2.8	97~103
洗浄済みIB	6.4	3	2.96	98.7	2.2	97~103
UF入り化成肥料 ^{f)}	2.1	1.52 ^{g)}	1.58	103.7	1.9	96~104

a) 基材として利用した肥料に試薬特級の尿素を混合した割合

b) 質量分率

c) 調製した試料中の尿素性窒素含有量

d) 3点併行試験の平均値

e) 肥料等試験法が要求する真度(回収率)の目標

f) 尿素性窒素として質量分率0.53%含有

g) 基材由来の尿素性窒及び尿素由来の尿素性窒素の含量

3) 併行精度及び中間精度の評価

本法の併行精度及び中間精度を確認するため、尿素及びUF入り化成肥料を用いて、尿素を2点併行で日を変えて5回試験して得られた結果を表6-1に示した。また、この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を表6-2に示した。尿素の平均値は質量分率43.17%で、併行相対標準偏差は0.8%、中間相対標準偏差は1.0%であった。また、UF入り化成肥料の平均値は質量分率2.39%で、併行相対標準偏差は2.9%、中間相対標準偏差は5.2%であった。

尿素の併行相対標準偏差及び中間相対標準偏差は、肥料等試験法に示されているその平均値の濃度における併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安以内の推奨範囲であり、UF入り化成肥料の併行相対標準偏差及び中間相対標準偏差は同精度の目安の1.5倍以内の許容範囲であったことから、本法は十分な精度を有していることが確認された。

表6-1 日を変えての中間精度確認試験成績 (% (質量分率))

試験日	尿素		UF入り化成肥料	
	1	43.32	42.59	2.54
2	43.21	42.98	2.25	2.38
3	43.95	43.58	2.37	2.29
4	43.50	42.76	2.45	2.59
5	42.97	42.80	2.27	2.27

表6-2 中間精度確認試験成績の統計解析結果

試験品	平均値 ^{a)} (%) ^{b)}	併行精度			中間精度		
		s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	$s_{I(T)}$ ^{f)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)}	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)}
		(%) ^{b)}	(%)	(%)	(%) ^{b)}	(%)	(%)
尿素	43.17	0.36	0.8	1	0.43	1.0	2
UF入り化成肥料	2.39	0.07	2.9	2	0.12	5.2	3.5

a) 総平均値(試験日数(5)×2点併行分析)

b) 質量分率

c) 併行標準偏差

d) 併行相対標準偏差

e) 併行精度(併行相対標準偏差)の目安

f) 中間標準偏差

g) 中間相対標準偏差

h) 中間精度(中間相対標準偏差)の目安

4) 定量下限等の確認

本法の定量下限を確認するため、洗浄済み CDU に尿素性窒素として質量分率 0.28 % 相当量の尿素を添加した試料を用いて、7 点併行で試験した結果を表 7 に示した。尿素性窒素の平均定量値は質量分率 0.30 % であり、その標準偏差は質量分率 0.04 % であった。なお、定量下限は標準偏差×10、検出下限は標準偏差×2× $t(n-1,0.05)$ を用いて算出¹²⁾したところ、本法の定量下限は質量分率 0.4 % 程度、検出下限は質量分率 0.2 % 程度と推定された。

肥料公定規格における CDU 等のその他の制限事項には「尿素性窒素は、3.0 % 以下であること」と記述されており、推定した定量下限値(質量分率 0.4 %)はこの制限事項の記述の 1/5 以下であった。このことから、本法は、肥料等試験法が示している定量下限の推奨基準を満たしていることを確認した。

表7 定量下限確認試験の成績

試験品	添加量 ^{a)} (%) ^{b)}	定量値 ^{c)} (%) ^{b)}	回収率 (%)	標準偏差 (%) ^{b)}	推定定量	推定検出
					下限値 ^{d)}	下限値 ^{e)}
					(%) ^{b)}	(%) ^{b)}
CDU	0.28	0.30	105.6	0.04	0.4	0.2

a) 尿素性窒素としての添加量

b) 質量分率

c) 7点併行試験の平均値

d) 標準偏差×10

e) 標準偏差×2× $t(n-1,0.05)$

5) 流通肥料の分析

2.1) で収集した流通肥料について 3.1) (2) の検討で本法の試験操作への適合を確認したところ、定量を阻害する現象は認められなかった。また、これらの流通肥料を用いて、HPLC 法と本法の測定値の相関を図 7 に示した。また、それぞれの定量値の関係の回帰式を求め、相関係数を算出した。また、尿素性窒素における本法の

95%予測区間を回帰直線の周囲に描いた。その結果、予測区間に若干の広がり認められたものの、回帰式の傾き(1.014)及び切片(0.10)の95%信頼区間は0.948~1.080及び-0.18~0.37であり、肥料等試験法の推奨範囲であった。このことから、HPLC法と本法の測定値は概ね一致し、同様の傾向を示すものであった。

このことから、本法は尿素を含む複合肥料及び尿素化合物中の尿素性窒素の試験に適用できるものであった。

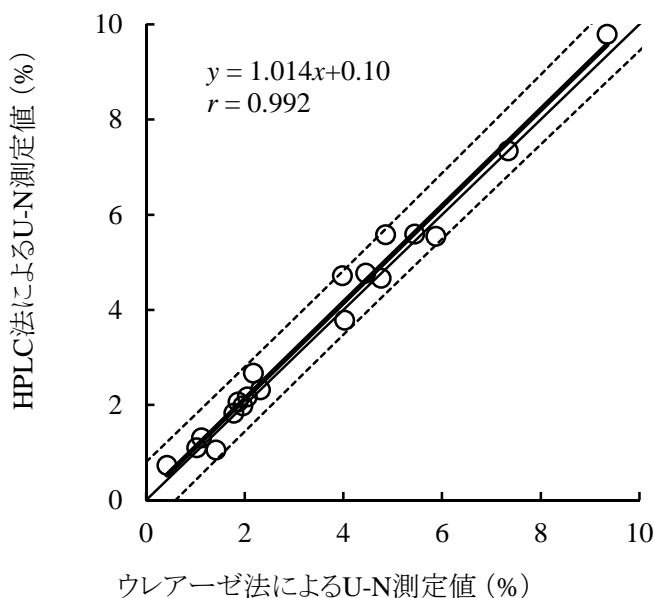


図7 ウレアーゼ法及びHPLC法によるU-N測定値の比較

○: 尿素を含む複合肥料, 尿素化合物及びそれを含む複合肥料
 太線: 回帰直線, 破線: 予測区間, 細線: $y=x$
 (%): 質量分率

4. まとめ

尿素性窒素試験法(ウレアーゼ法)について、試料溶液の調製方法を確認及び一部変更して性能調査を実施したところ、次の結果を得た。

(1) 抽出溶液の加水分解に用いるウレアーゼの必要量は、ウレアーゼ活性値 130 Unit, 140 Unit 及び 150 Unit の場合 0.2 g 以上であった。

(2) 試料溶液調製方法の検討を行い、既存の回転振り混ぜ機を用いる方法とマグネチックスターラーを用いる方法と比較検討した結果、十分な相関を確保できたので汎用的な複合肥料の抽出機器のマグネチックスターラーを用いることとした。なお、既存の方法では、りん酸緩衝液及び抽出温度条件が規定されていたが、水を用いて室温で十分抽出できることを確認した。

(3) 調製試料を用いて回収試験を実施した結果、尿素性窒素の平均値が質量分率 1.58 %~39.96 % の範囲で平均回収率は 98.7 %~103.7 % であり、肥料等試験法の真度の目標を満たしていた。

(4) 併行精度及び中間精度の確認を行った結果、併行相対標準偏差は 0.8 %~2.9 % , 中間相対標準偏差は 1.0 %~5.2 % であり、肥料等試験法に示されている精度の許容範囲であった。

(5) 定量下限等の確認を行った結果、本法における定量下限は質量分率 0.4 % 程度と推定された。

(6) 流通肥料について本法の試験操作への適合を確認したところ、定量を阻害する現象は認められなかつ

た。また、HPLC 法と本法の測定値は概ね一致した。このことから、本法は尿素、尿素を含む複合肥料及び尿素化合物中の尿素性窒素の試験に適用できるものであった。

文 献

- 1) 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件:改正平成 28 年 12 月 19 日, 農林水産省告示第 2535 号
- 2) 越野正義編:第二改訂詳解肥料分析法, p.56~59(1988)
- 3) 恵智正宏, 木村康晴, 白井裕治:高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 -単一試験室の妥当性確認-, 肥料研究報告, **10**, 72~85(2017)
- 4) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992 年版), p.22~23, 日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
- 5) 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 (2016)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2016.pdf >
- 6) 農林省名古屋肥飼料検査所:実用試料検査法, p.73~74(1972)
- 7) 杉野喜一郎:肥料分析法, p.44~47(1947)
- 8) 中村輝雄監修:詳解肥料分析法, p.50-52(1962)
- 9) 山添文雄, 樋口太重:緩効性窒素質肥料の分析法に関する研究(第 1 報)尿素性窒素および可溶性窒素の定量について, 農技研肥料科学資料, **97**, 1~32(1965)
- 10) 尾和尚人, 木村真人, 越野正義, 三枝正彦, 但野利秋, 長谷川功, 吉羽雅昭編集:肥料の辞典, p.136 (2006)
- 11) 加茂誠一, 石丸恒夫:IB 肥料の分析法について, 肥検回報, 1964 年第 3 号, 33~43(1964)
- 12) Codex:“Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009(2009)

Determination Method for Urea Nitrogen in Fertilizer by Urease

Toshifumi FUJITA¹, Kimie KATO¹, Toyokazu NIIMI¹, Yasuharu KIMURA³, Kohei ITO² and Yuji SHIRAI²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

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

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

An Urease method for determination of urea nitrogen in fertilizer containing urea and urea compounds was validated as a single-laboratory validation. In the case of the activity for 130, 140 and 150 Unit of the urease, the minimum additive amount for the hydrolysis of the sample solution was 0.2 g. There are two methods of extraction process of the determination for urea nitrogen. One is using the upside down rotary shaker with phosphate buffer under 25°C. The other is using magnetic starrer with water under normal temperature. The comparison tests were conducted between two methods in extraction process. The extracting instrument could substitute magnetic starrer for the upside down rotary shaker. In addition, the extracting solvent and atmosphere could also substitute phosphate water under normal temperature for buffer solution under 25°C. As a result of 3 replicate analysis of 4 fertilizer samples spiked with urea nitrogen at the range from 1.58 % to 39.96% (mass fraction), the mean recovery of urea nitrogen was 98.7 % ~ 103.7 %. In the train of duplicate analysis per 5 days, the repeatability and intermediate precision of urea nitrogen were 0.8 % ~ 2.9 % and 1.0 % ~ 5.2 %, respectively. On the basis of 7 replicate measurements of urea nitrogen added to samples, the *LOQ* value was estimated 0.4 %. These results demonstrated that this method was valid for the determination of urea nitrogen in urea and, complex fertilizer containing urea and urea compounds.

Key words urea nitrogen, urease method, single-laboratory validation

(Research Report of Fertilizer, **10**, 195~207, 2017)

11 コマツナの生理障害 — 亜鉛 —

五十嵐総一¹, 平田絵理香², 添田英雄², 加島信一²

キーワード 植害試験, コマツナ, 硫酸亜鉛, 硝酸亜鉛, 硫酸銅, 硝酸銅, 過剰症状, 黄化症状

1. はじめに

肥料中の有害成分による植物の異常症状の有無を判定する手段として、植物に対する害に関する栽培試験(以下、「植害試験」という)の方法が農林水産省農蚕園芸局長通知¹⁾により定められている。普通肥料の公定規格²⁾では、副産肥料や汚泥肥料等で植害試験の結果、植物に害の認められないことが求められている。植害試験では、原則として供試作物にコマツナを用い、その生育状況から肥料中の植物に有害な成分の有無を判定する。しかし、試験中に発生する異常症状には、有害成分の他にも、病虫害、必須成分の欠乏又は過剰、多量施肥等様々な要因がある。発生した症状が、有害成分によるものか、他の要因によるものかを判別することは難しい。また、窒素、りん酸等植物の必須成分の欠乏又は過剰に起因する症状を生理障害というが、コマツナを対象として生理障害の詳細を記した文献は少ない。

そこで、独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)では、植害試験中に発生する症状を的確に判定することを目的として、意図的にコマツナの生理障害を発生させて、その症状を観察・記録した資料の作成を行っている。加えて、今後FAMICで作成を予定している植害試験法の詳細な手順及び解説書の基礎データとして蓄積する。今回は植物に対して亜鉛(以下、「Zn」という)の効果を目的に肥料材料として使用される試薬による過剰症状確認試験を実施したので、その結果を報告する。つまり、Zn そのものの過剰症状を特定するのではなく、Zn 材料の過剰施用によるコマツナの異常症状を確認することを目的とした。

なお、Zn 材料の欠乏症状は植害試験条件下では発生する可能性がきわめて低いと考えられること、及びその誘発が困難であると判断したため亜鉛欠乏症状確認試験は省略した。

2. 材料及び方法

1) 亜鉛過剰症状確認試験

(1) 供試土壌

供試土壌は灰色低地土を選定した。灰色低地土はZnを固定する腐植が他の土壌より比較的低含量であると考えられるため、亜鉛過剰症状確認試験に適している。土壌中のZnや銅(以下、「Cu」という)の溶解・利用度はpHに大きな影響を受けることが一般的に知られており、Znの過剰症状を発現させるには供試土壌のpHを概ねpH 5.0~pH 6.5³⁾とする必要がある。さらに供試作物のコマツナの最適pHは5.5~6.5⁴⁾であり、供試土壌のpHはこの条件内にある。供試土壌の理化学性を表1に示した。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター (現)長崎県北振興局農林部

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

表1 供試土壌の理化学性

土壌の種類	土性	水分 (%)	pH (H ₂ O) ^{a)}	EC ^{b)} (dS/m)	容積重 ^{c)} (g/500 mL)	最大容水量 ^{d)} (%)	S-Zn ^{d)e)} (mg/kg)	S-Cu ^{d)e)} (mg/kg)
灰色低地土	CL	8.5	6.44	0.09	529	59	7	10

a) 土壌1:水5の懸濁液を測定

b) 電気伝導率, 土壌1:水5の懸濁液を測定

c) 風乾土値

d) 乾土値

e) 0.1 mol/L塩酸抽出液を測定

(2) 供試試薬

供試した Zn は硫酸亜鉛七水和物(以下,「硫酸亜鉛」という)及び硝酸亜鉛六水和物(以下,「硝酸亜鉛」という),また,比較対照に Cu を含有する硫酸銅(Ⅱ)五水和物(以下,「硫酸銅」という)及び硝酸銅(Ⅱ)三水和物(以下,「硝酸銅」という)を使用した. 供試試薬について表 2 に示した.

肥料材料として流通肥料に使用実績のあるこれらを選定した.

表2 供試試薬

供試試薬名	化学式	規格
硫酸亜鉛七水和物	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	特級
硝酸亜鉛六水和物	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	特級
硫酸銅(Ⅱ)五水和物	CuSO ₄ ·5H ₂ O	特級
硝酸銅(Ⅱ)三水和物	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	特級

(3) 供試作物

コマツナ(品種名:夏楽天)

(4) 試験規模

1/10000 a ノイバウエルポットを用い, 1 試験区 2 連とした.

(5) 試験区の構成及び施用量

植物に対する生理障害の過剰症状確認試験では目的の元素による害の他, 供試試薬中のカウンターイオンによる塩類障害が発生する可能性が高いと考えられる⁵⁾. このため, 表 2 に掲げる供試試薬はカウンターイオンが同一のもの(硫酸イオン及び硝酸イオン)を選定した. Zn 及び Cu の負荷量は予備調査の結果から, 生育途中の過剰症状が観察されるよう Zn または Cu として 100 mg/pot, 250 mg/pot, 400 mg/pot とした. これは各々乾土当たり 207 mg/kg, 516 mg/kg, 826 mg/kg に相当する負荷濃度となる.

なお, 農用地における Zn の管理基準値は乾土当たり 120 mg/kg⁶⁾以下とされ, Cu では農用地(田に限る)で 125 mg/kg 未滿とする必要がある⁷⁾ことから, 当該試験の負荷濃度は Zn 及び Cu による過剰症状を誘発する可能性を有している. 表 3 に試験区の構成及び施用量についてまとめた.

表3 試験区の構成

供試 試薬 ^{a)}	施肥 方法 ^{b)}	負荷量				供試試薬 施用量 (g/pot)	供試試薬 由来窒素量 (mg/pot)	Zn or Cu 負荷濃度 (mg/kg 乾土)
		Zn (mg/pot)	Cu (mg/pot)	硫酸 ^{c)} (mg/pot)	硝酸 ^{c)} (mg/pot)			
硫酸亜鉛	(a)	100	-	147	-	0.44	-	207
		250	-	367	-	1.10	-	516
		400	-	588	-	1.76	-	826
硫酸銅	(a)	-	100	151	-	0.39	-	207
		-	250	378	-	0.98	-	516
		-	400	605	-	1.57	-	826
硝酸亜鉛	(b)	100	-	-	95	0.45	43	207
		250	-	-	237	1.14	107	516
		400	-	-	379	1.82	171	826
硝酸銅	(b)	-	100	-	98	0.38	44	207
		-	250	-	244	0.95	110	516
		-	400	-	390	1.52	176	826
標準区		-	-	-	-	-	-	

- a) 各試験区には窒素, リン酸, 加里が各100 mg/potとなるよう硫酸, 過石, 塩加を施用
ただし, 供試試薬窒素由来量を勘案して窒素100 mg/potに満たない場合は硫酸を添加,
超える場合は硫酸無添加
- b) 2. 1) (6) 施肥方法に示す(a) 土壌混合法, (b) 水溶液浸透法
- c) ZnもしくはCu以外の化学グループの施用量

(6) 施肥方法

植害試験の方法¹⁾には施肥の方法の項目に「肥料は, 試験容器全体の土壌と均一になるようよく混合して施用する。」と記載されている. しかしながら, 2.1) (2)に掲げる硝酸亜鉛及び硝酸銅は潮解性を有す物質の特徴があるため, 通常の土壌混合が困難であると思われた. このため硫酸亜鉛及び硫酸銅は次に示す(a) 土壌混合法, 硝酸亜鉛及び硝酸銅は(b) 水溶液浸透法の施肥方法とした(図1).

(a) 土壌混合法

- ① ビニール袋に, 供試土壌(風乾土), ZnもしくはCuを含む供試試薬及び肥料(硫酸, 過石, 塩加)を入れる.
- ② ビニール袋を密封して振とう, 十分混合させる.
- ③ 試験容器に土壌水分を最大容水量の60%に設定するのに必要な量の水を入れ, さらに②を入れる.
この全層施肥による方法を土壌混合法とした.

(b) 水溶液浸透法

- ① ビニール袋に, 供試土壌(風乾土)及び肥料(硫酸, 過石, 塩加)を入れる.
- ② ビニール袋を密封して振とう, 十分混合させる.
- ③ 土壌水分を最大容水量の60%に設定するのに必要な量の水にZnもしくはCuを含む供試試薬を溶解させ, 試験容器に入れる.
- ④ ③のZnもしくはCuを含む供試試薬水溶液を入れた試験容器に②を入れる.

この施肥方法を水溶液浸透法とした。

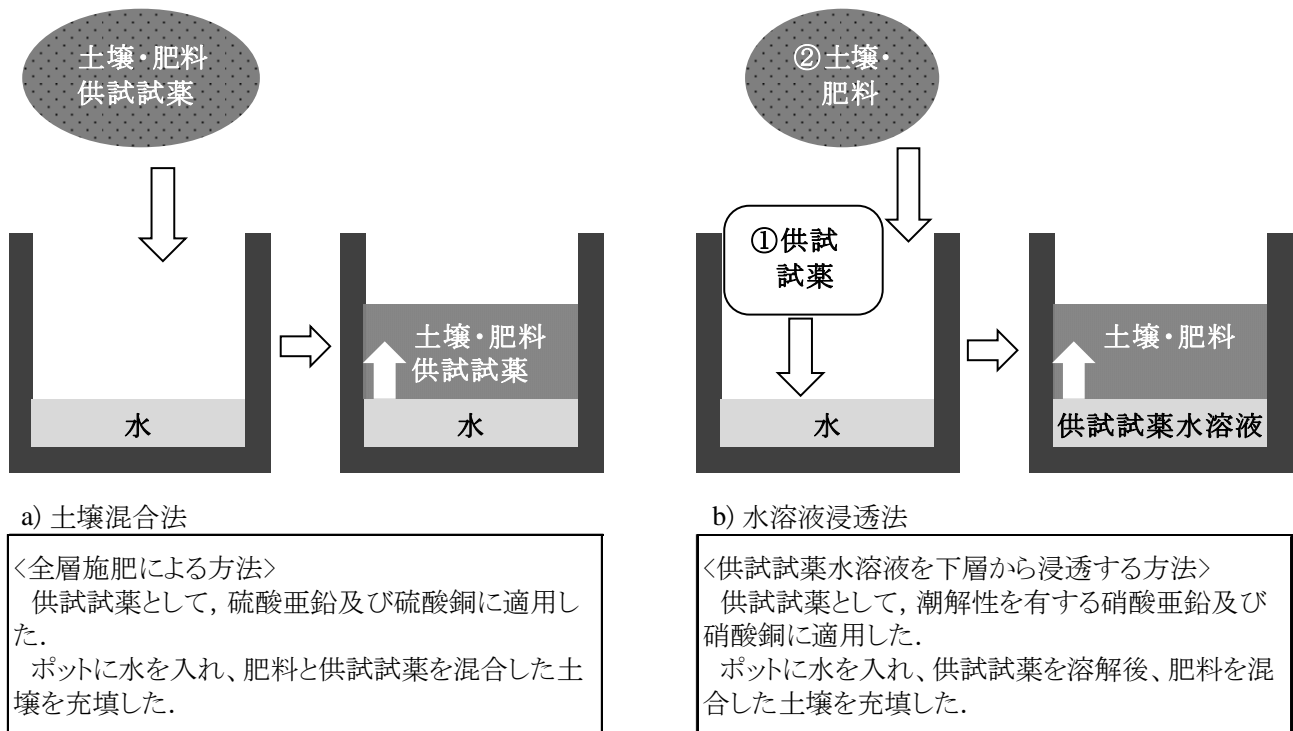


図1 施肥方法

(7) 栽培方法

耕種概要を表4に示した。栽培期間は通常の植害試験の方法に準拠して21日間とした。ノイバウエルポットに、容積重 529 g/500 mL (表1)の供試土壌をポット底から約5 cmまで充填し、供試作物のコマツナを20粒播種した。栽培条件は、人工気象装置(小糸工業製 コイトロン GC-K3AH)内で照度約 25000 lx, 照明時間12時間, 気温昼間 25 °C, 夜間 15 °C, 湿度 70 %の一定とした。灌水は最大容水量の60%を目安に重量で管理し、休日はローラーポンプ式自動給水装置(古江サイエンス製 RP-MRF)による灌水とした。栽培条件を均一にするため、人工気象装置内でのポットの配置は休日を除き、毎日無作為に換えた。

表4 耕種概要

施肥	播種	発芽率確認		収穫
		1回目	2回目	
平成28年9月16日	9月16日	9月19日	9月23日	10月7日

(8) 調査項目

発芽率, 葉長, 収穫物の葉体重量(生体重, 乾物重), 異常症状の確認, 跡地土壌の pH, EC, 作物体の Zn, Cu, 鉄(以下, 「Fe」という)及びりん(以下, 「P」という)含有率について調査した。

(9) 作物体の分析方法

収穫後, 生体重を測定したコマツナを定温乾燥機にて 80 °Cで3日間乾燥した。乾物重を測定し, 高速粉砕器(大阪ケミカル製 ラボミルサー LM-PLUS)で粉砕した。試料に硝酸 5 mL 及び塩酸 15 mL を添加し, 約

170 °Cで王水分解後、酸を揮発させ、塩酸(1+5) 25 mLで溶解、定量フラスコ 50 mLに水で定容し試料溶液とした。試料溶液中の Zn, Cu, Fe 含有率を原子吸光分光光度計 (SOLAAR M5 mk II :Thermo Fisher SCIENRIFIC)で、P 含有率を紫外可視分光光度計 (UVmini-1240:島津製作所)で各成分 2 点併行による分析を実施した。なお、分析供試量は 0.5 g としたが、生育不良のため 0.5 g を確保できない区はその全量を供し、1 点分析とした。

(10) 跡地土壌の分析

後述する 3.2) (3) のことから次の操作を実施した。作物体を収穫後、試験容器内の跡地土壌を 60°Cで約 2 時間乾燥し、試験容器から土壌を取り出した。土壌は高さ約 4 cm の円筒状となり、これを中心約 2 cm のところで切り分け、上層及び下層に分けた。なお、作物体の生育不良によって根張りが弱い区は跡地土壌を試験容器から取り出した際、円筒状が崩れる場合があったため、層の区別の判別が困難な土塊は除外し、確実に区別できる土塊を上層及び下層に分けた。風乾後、2 mm の篩いを通し、各層の Zn 全量、Cu 全量、pH、EC を測定した。

Zn 全量及び Cu 全量は、跡地土壌 0.5 g に硝酸 5 mL 及び過酸化水素水 2 mL を加えマイクロ波分解装置 (Multiwave 3000:Perkin Elmar)で分解したものを定量フラスコ 50 mL に定容し試料溶液とした。測定は ICP 質量分析装置 (ICPM-8500 :島津製作所)により実施した。

土壌 pH 及び EC は風乾土壌 10 g に対して純水 50 mL を加え 1 時間振とう後、pH はガラス電極計 (SevenEasy pH:METTLER TOLEDO)により、EC は電気伝導率計 (CM-11P:東亜電波工業)により測定した。

2) 施肥方法の違いによる検証試験

後述する 3.2) (3) のことから、施肥方法の違いで害症状に相違が生じる可能性が示唆されたため、2.1) 亜鉛過剰症状確認試験に基づいた検証試験を実施した。

(1) 試験区の構成及び施用量

2.1) (6) 施肥方法に示す (a) 土壌混合法、(b) 水溶液浸透法の比較は硝酸塩では潮解性の特徴を有すことから困難であると判断したため、供試試薬に硫酸亜鉛及び硫酸銅を選定した。施用量は 2.1) (5) にある負荷濃度の中間とし、Zn もしくは Cu として 250 mg/pot (516 mg/kg 乾土)とした (表 5)。なお、1 試験区 2 連とした。

表5 検証試験区の構成

供試 試薬 ^{a)}	施肥 方法 ^{b)}	負荷量			供試試薬 施用量 (g/pot)	Zn or Cu 負荷濃度 (mg/kg 乾土)
		Zn (mg/pot)	Cu (mg/pot)	硫酸 ^{c)} (mg/pot)		
硫酸亜鉛	(a)	250	-	367	1.10	516
	(b)	250	-	367	1.10	516
硫酸銅	(a)	-	250	378	0.98	516
	(b)	-	250	378	0.98	516
標準区		-	-	-	-	-

a) 各試験区には窒素, リン酸, 加里が各 100 mg/pot となるよう硫酸, 過石, 塩加を施用

b) 2.1) (6) 施肥方法に示す (a) 土壌混合法, (b) 水溶液浸透法

c) Zn もしくは Cu 以外の化学グループの施用量

(2) 栽培方法

2.1) (7)と同様とした。耕種概要は表 6 のとおりである。

表6 検証試験の耕種概要

施肥	播種	発芽率確認		収穫
		1回目	2回目	
平成28年11月18日	11月18日	11月22日	11月28日	12月9日

(3) 調査項目

発芽率, 葉長, 収穫物の葉体重量(生体重, 乾物重), 異常症状の確認, 跡地土壌の pH, EC, 作物体の Zn, Cu, Fe 及び P 含有率について調査した。

(4) 作物体の分析方法

2.1) (9)と同様とした。

(5) 跡地土壌の分析方法

土壌調製法は 2.1) (10)と同様とした。各層の土壌中 Zn 及び Cu は比較的簡易な 0.1 mol/L 塩酸浸出法による方法⁸⁾で分析した。土壌 10 g に 0.1 mol/L 塩酸を 50 mL 添加し, 約 30 °C で 1 時間振とう後, ろ過し, 試料溶液とした。試料溶液中の Zn, Cu 含有率を原子吸光分光光度計 (SOLAAR M5 mk II :Thermo Fisher SCIENTIFIC) で測定, その結果を S-Zn 及び S-Cu とした。

3. 結果

1) 亜鉛の生理作用

植物必須要素のうち, Zn は微量元素に分類される。植物の Zn 吸収形態は 2 価のイオン (Zn²⁺) であり, 植物体内の酵素の構成元素となる。またその活動を活性化, 植物体内の酸化還元反応を触媒するものとされている⁹⁾。生体内における Zn の活動範囲は広く, 活性酸素を消去するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) や気体の二酸化炭素を可溶性の炭酸水素イオンに変換するカーボニックアンヒドラーゼに Zn が関与しており, DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼは Zn を必要とすることから細胞分裂には Zn が不可欠といえる¹⁰⁾。過剰の Zn 吸収は植物の生育を損ない, 拮抗作用による Fe 欠乏を誘発し, 葉の黄化症状(クロロシス)が上位葉を中心に発現することが知られている¹¹⁾。また, 植物体中の Zn 含有率は 20 mg/kg 程度であり, 亜鉛過剰症状は水稻に比べると畑作で発生することが多いとされる¹²⁾。

2) 亜鉛過剰症状確認試験

(1) 作物体の分析結果

亜鉛過剰症状確認試験における作物体の調査・分析結果を表 7 及び表 8 に示した。異常症状の有無は標準区との比較時に外見的異常がある場合, 異常症状ありと判断した(表 7)。

硫酸亜鉛区, 硝酸亜鉛区及び硝酸銅区は発芽率が 95 % ~ 100 % と良好であったのに対し, 硫酸銅 250 mg/pot (Cu 516 mg/kg 乾土) 区及び 400 mg/pot (Cu 826 mg/kg 乾土) 区では 15 % ~ 75 % と劣っていた。この他,

硫酸銅区は生育不良が明確であり、葉長及び生体重指数は他供試試薬区と比較して低値だった。

作物体の元素分析結果において、硫酸亜鉛区及び硝酸亜鉛施用区では作物体中の Zn 濃度が 936 mg/kg ~3602 mg/kg の範囲で定量され、作物体の顕著な Zn 吸収が見られた。Cu 材料では硫酸銅区で Cu 濃度が 69 mg/kg ~217 mg/kg の範囲だったことに対し、硝酸銅区は 15 mg/kg ~40 mg/kg の範囲だったことから異なる傾向が見られた。また、Cu は通常作物体中に乾物当たり 10 mg/kg 程度含有するものと考えられる¹³⁾が、本試験では標準区で 75 mg/kg と高い濃度が検出された。

作物体中の Fe 含有率は Zn もしくは Cu の負荷量に伴って硫酸銅区及び硝酸亜鉛区で高濃度になる傾向が見られたが、硫酸亜鉛区及び硝酸銅区ではその傾向は見られなかった。作物体中の P 含有率は硫酸銅区以外の区で Zn もしくは Cu の負荷量に伴って低濃度となる傾向が見られた。

表7 栽培調査結果

供試 試薬	施肥 方法 ^{a)}	負荷量		ポット No.	発芽率 ^{b)}		葉長 (cm)	生体重 (g/pot)	乾物重 (g/pot)	生体重 指数 ^{c)}	乾物重 指数 ^{c)}	異常 症状	
		Zn (mg/pot)	Cu (mg/pot)		1回目 (%)	2回目 (%)							
硫酸 亜鉛	(a)	100	-	1	45	100	9.4	26	2.0	87	80	なし	
				2	45	100	9.6	24	1.8	80	72		
				平均	45	100	10	25	1.9	83	76		
		250	-	1	20	100	1.9	1.2	0.29	4	12	有	
				2	15	100	2.0	2.1	0.27	7	11		
				平均	18	100	2.0	1.7	0.28	6	11		
	400	-	1	10	100	1.2	1.3	0.21	4	8	有		
			2	10	95	1.3	1.0	0.22	3	9			
			平均	10	98	1.3	1.2	0.21	4	9			
	硫酸 銅	(a)	-	100	1	5	100	8.5	20	1.8	67	75	有
					2	5	80	7.7	18	1.7	60	71	
					平均	5	90	8.1	19	1.8	63	73	
-			250	1	0	75	2.3	2.2	0.24	7	10	有	
				2	0	50	2.3	0.9	0.12	3	5		
				平均	0	63	2.3	1.5	0.18	5	7		
-		400	1	0	35	0.8	0.23	0.041	0.8	2	有		
			2	0	15	0.5	0.12	0.031	0.4	1			
			平均	0	25	0.7	0.18	0.036	1	1			
硝酸 亜鉛		(b)	100	-	1	30	95	9.8	31	2.6	103	107	なし
					2	20	100	9.0	32	2.6	107	107	
					平均	25	98	9.4	32	2.6	105	107	
	250		-	1	20	100	7.6	21	1.7	70	71	有	
				2	25	100	7.9	22	1.9	73	77		
				平均	23	100	7.8	22	1.8	72	74		
	400	-	1	5	100	7.2	18	1.4	60	59	有		
			2	0	100	7.5	16	1.3	53	54			
			平均	3	100	7.4	17	1.4	57	56			
	硝酸 銅	(b)	-	100	1	40	100	9.7	31	2.8	103	116	なし
					2	25	100	9.6	32	2.9	107	118	
					平均	33	100	9.7	32	2.8	105	117	
-			250	1	10	100	8.6	30	2.5	100	104	なし	
				2	0	100	9.9	32	2.6	107	108		
				平均	5	100	9.3	31	2.6	103	106		
-		400	1	25	100	9.7	36	2.6	120	106	なし		
			2	15	100	10.7	33	2.4	110	101			
			平均	20	100	10.2	35	2.5	115	103			
標準 区		-	-	1	25	100	9.4	29	2.2	97	90	なし	
				2	30	100	8.8	31	2.7	103	110		
				平均	28	100	9.1	30	2.4	100	100		

a) 2. 1) (6) 施肥方法に示す(a) 土壌混合法, (b) 水溶液浸透法

b) 発芽率は(発芽した個体 / は種数 20 粒)×100 によって算出

c) 標準区2連の平均値をを100として算出

表8 作物体分析結果

供試 試薬	施肥 方法 ^{a)}	負荷量		ポットNo.	乾物重 (g/pot)	作物体の元素濃度 ^{b)}			
		Zn (mg/pot)	Cu (mg/pot)			Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	P (%)
硫酸亜鉛	(a)	100	-	1	2.0	1143	43	132	0.53
				2	1.8	1353	36	171	0.57
				平均	1.9	1248	40	152	0.55
		250	-	1*	0.29	3149	29	96	0.28
				2*	0.27	3197	32	140	0.28
				平均	0.28	3173	31	118	0.28
		400	-	1*	0.21	3834	29	787	0.25
				2*	0.22	3370	53	213	0.22
				平均	0.21	3602	41	500	0.24
硫酸銅	(a)	-	100	1	1.8	62	175	144	0.55
				2	1.7	108	24	167	0.52
				平均	1.8	85	100	156	0.54
		-	250	1*	0.24	51	70	221	0.23
				2*	0.12	69	68	214	0.29
				平均	0.18	60	69	218	0.26
		-	400	1*	0.041	40	395	596	0.44
				2*	0.031	N.D.	39	903	0.68
				平均	0.036	40	217	750	0.56
硝酸亜鉛	(b)	100	-	1	2.6	924	27	129	0.51
				2	2.6	948	57	104	0.49
				平均	2.6	936	42	117	0.50
		250	-	1	1.7	2262	30	117	0.45
				2	1.9	1997	62	181	0.45
				平均	1.8	2129	46	149	0.45
		400	-	1	1.4	2120	105	174	0.37
				2	1.3	1844	116	189	0.35
				平均	1.4	1982	110	181	0.36
硝酸銅	(b)	-	100	1	2.8	58	50	103	0.42
				2	2.9	48	29	78	0.43
				平均	2.8	53	40	90	0.42
		-	250	1	2.5	31	16	127	0.30
				2	2.6	34	15	103	0.30
				平均	2.6	32	15	115	0.30
		-	400	1	2.6	34	18	83	0.28
				2	2.4	34	16	94	0.27
				平均	2.5	34	17	89	0.27
標準区	-	-	1	2.2	59	84	195	0.60	
			2	2.7	53	67	171	0.55	
			平均	2.4	56	75	183	0.58	

a) 2. 1) (6) 施肥方法に示す(a) 土壌混合法, (b) 水溶液浸透法

b) 乾物値 $n=2$ (*を付した区は生育不良のため $n=1$)

(2) 跡地土壌の分析結果

跡地土壌分析結果を表9とした。土壌中のZn全量及びCu全量は土壌混合法の場合と比較すると、水溶液浸透法の場合では、下層で高濃度になる傾向が見られた。

pHは100 mg/pot (Zn 207 mg/kg 乾土)を除いた硫酸亜鉛区及び硝酸亜鉛区各区で下層の方が高く、硫酸銅区及び硝酸銅区では上層の方が高い結果が得られた。

ECは100 mg/pot (Zn 207 mg/kg 乾土)を除いた硫酸亜鉛区, 100 mg/pot (Cu 207 mg/kg 乾土)を除いた硫酸銅区及び硝酸銅区で上層の方が高いが, 硝酸亜鉛区においては下層の方が高い傾向であった。

表9 跡地土壌分析結果

供試 試薬	施肥 方法 ^{a)}	負荷量		ポット No.	Zn全量 ^{b)}		Cu全量 ^{b)}		pH (H ₂ O) ^{c)}		EC ^{d)}	
		Zn (mg/pot)	Cu (mg/pot)		上層 (mg/kg)	下層 (mg/kg)	上層 (mg/kg)	下層 (mg/kg)	上層	下層	上層 (dS/m)	下層 (dS/m)
硫酸 亜鉛	(a)	100	-	1	313	303	67	67	5.88	5.63	0.13	0.57
				2	285	283	68	68	5.83	5.63	0.24	0.58
				平均	299	293	67	68	5.86	5.63	0.19	0.57
		250	-	1	627	550	68	67	5.48	5.64	0.90	0.62
				2	623	626	68	71	5.63	5.72	0.96	0.76
				平均	625	588	68	69	5.56	5.68	0.93	0.69
		400	-	1	923	871	68	67	5.59	5.64	0.99	0.80
				2	943	707	67	58	5.53	5.62	1.30	0.71
				平均	933	789	67	62	5.56	5.63	1.15	0.75
硫酸 銅	(a)	-	100	1	193	181	283	274	5.74	5.72	0.07	0.43
				2	130	111	284	280	5.65	5.68	0.11	0.38
				平均	161	146	283	277	5.70	5.70	0.09	0.41
		-	250	1	216	131	643	545	5.54	5.65	0.20	0.38
				2	131	131	591	511	5.63	5.78	0.26	0.38
				平均	173	131	617	528	5.59	5.72	0.23	0.38
		-	400	1	132	197	968	871	5.39	5.50	0.24	0.75
				2	132	163	934	843	5.34	5.44	0.70	0.49
				平均	132	180	951	857	5.37	5.47	0.47	0.62
硝酸 亜鉛	(b)	100	-	1	159	388	67	66	6.10	5.98	0.46	0.61
				2	161	459	72	68	6.21	5.81	0.58	0.55
				平均	160	424	70	67	6.16	5.90	0.52	0.58
		250	-	1	336	803	65	66	6.25	5.92	0.89	0.68
				2	320	944	68	65	6.28	6.03	1.16	0.54
				平均	328	873	66	65	6.27	5.98	1.02	0.61
		400	-	1	488	1198	66	65	6.12	5.72	1.21	0.73
				2	574	1229	67	66	5.97	5.75	1.22	0.80
				平均	531	1213	67	66	6.05	5.74	1.21	0.77
硝酸 銅	(b)	-	100	1	119	113	123	380	6.03	5.88	0.14	0.44
				2	143	199	200	351	6.06	5.92	0.18	0.39
				平均	131	156	162	366	6.05	5.90	0.16	0.41
		-	250	1	165	135	184	1053	6.54	5.83	0.19	0.25
				2	193	177	172	1095	6.48	5.86	0.24	0.20
				平均	179	156	178	1074	6.51	5.85	0.22	0.22
		-	400	1	110	154	205	1373	6.63	5.74	0.32	0.27
				2	109	106	196	1384	6.62	5.56	0.36	0.32
				平均	110	130	200	1379	6.63	5.65	0.34	0.29
標準 区			1	99	92	67	65	5.68	5.56	0.13	0.67	
			2	96	98	66	69	5.80	5.50	0.12	0.57	
			平均	98	95	67	67	5.74	5.53	0.13	0.62	

a) 2. 1) (6) 施肥方法に示す(a) 土壌混合法, (b) 水溶液浸透法

b) 乾物値 $n=1$

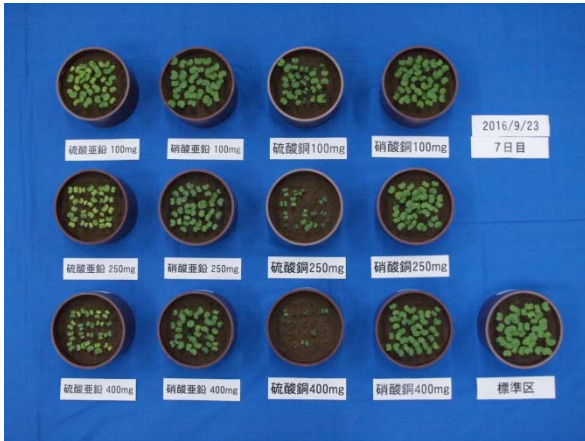
c) pH (H₂O)は土壌1:水5の懸濁液を測定

d) EC (電気伝導率)は土壌1:水5の懸濁液を測定

(3) 異常症状の確認

播種7日後に硫酸銅区の著しい発芽障害が確認され(写真1), 特に250 mg/pot区及び400 mg/pot区で症

状が顕著であった。既報¹³⁾では、硫酸銅をCuとして1600 mg/pot添加した区の発芽率は90%と良好であったが、今回はこの6分の1程度の施用量にも係わらず、発芽率は50%~75%と低かった。原因究明した結果、土壌と肥料を混合する際の施肥方法の違いで害症状に相違が生じる可能性が推察された。すなわち、既報は2.1(6)に示す水溶液浸透法としたが、今回は硫酸亜鉛区及び硫酸銅区は土壌混合法としたことで発芽率に差異が生じものと考えられた。このことから、2.2)に掲げる検証試験を実施し、施肥方法の違いによるZnの害症状の確認を行った。この際、比較対照にCuの害症状も確認することとした。また、土層のZn及びCuの分布を確認するため、層別の分析が必要であると判断した。



(写真 1)

播種 7 日後の様子。硫酸銅区で発芽障害が確認された。配置された施用区は次のとおり。

右下:標準区

左側第 1 列:硫酸亜鉛区, 左側第 2 列:硝酸亜鉛区

左側第 3 列:硫酸銅区, 左側第 4 列:硝酸銅区

上段:100 mg/pot (207 mg/kg 乾土)

中段:250 mg/pot (516 mg/kg 乾土)

下段:400 mg/pot (826 mg/kg 乾土)



(写真 2)

播種 14 日後の様子。硫酸亜鉛区及び硫酸銅区で生育不良が確認され、供試試薬施用量が 250 mg/pot 及び 400 mg/pot で症状が顕著だった。



(写真 3)

播種 21 日後の様子。播種 14 日後に確認された生育不良は栽培最終日まで回復しなかった。

(3.1) 硫酸亜鉛による過剰症状

硫酸亜鉛による過剰症状として、(1)生育不良、(2)子葉の黄化症状、(3)子葉の下垂、(4)本葉の黄化症状、(5)子葉裏の赤紫色化、(6)本葉葉縁の黄化症状の症状が確認された。播種 7 日後頃には硫酸亜鉛を Zn とした施用量 250 mg/pot 区及び 400 mg/pot 区で生育不良が明確であった(写真 1,4)。その後、生育が回復することにはなかった(写真 2,3)。また、播種 7 日後頃に子葉の黄化症状が観察され(写真 4,5)、特徴的な下垂が見られた(写真 6)。生育中期(概ね播種 12 日後)以降になると本葉が黄化症状を呈し(写真 7)、本葉第二葉の葉縁に沿った黄化症状が見られた(写真 8)。収穫後の個体を観察すると、子葉裏の赤紫色化が見られた(写真 9)。植害試験の条件下において硫酸亜鉛による過剰症状は子葉を中心に特徴的な症状が発現することがわかった。



(写真 4)

播種 10 日後の様子。硫酸亜鉛の Zn としての添加量は次のとおりである。

上段：標準区

下段左：100 mg/pot 区 (Zn 207 mg/kg 乾土)

下段中：250 mg/pot 区 (Zn 516 mg/kg 乾土)

下段右：400 mg/pot 区 (Zn 826 mg/kg 乾土)



(写真 5)

播種 10 日後の様子。

左：400 mg/pot (Zn 826 mg/kg 乾土)

右：標準区

標準区と比較すると子葉の黄化症状が確認できる。



(写真 6)

400 mg/pot (Zn 826 mg/kg 乾土) の播種 10 日後の様子。標準区には見られない特徴的な子葉の下垂が見られた。



(写真 7)

400 mg/pot (Zn 826 mg/kg 乾土) の播種 20 日後の様子。本葉第一葉に黄化症状が発現している。

また、本葉第一葉が成長せず、枯死に近い個体も見られる。



(写真 8)

播種 20 日後の 100 mg/pot (Zn 207 mg/kg 乾土) の様子である。本葉第二葉の葉縁に薄い黄化症状が見られた。



(写真 9)

左が 400 mg/pot (Zn 826 mg/kg 乾土)、右が 250 mg/pot (Zn 516 mg/kg 乾土) の個体である。

左の個体の子葉裏葉縁部の赤紫色化が見られた。

(3.2) 硝酸亜鉛による過剰症状

硝酸亜鉛による過剰害症状として、(1)生育不良、(2)子葉の黄化症状、(3)子葉葉縁の黄化症状、(4)本葉の黄化症状が確認された。播種 10 日後頃になると、硝酸亜鉛を Zn として 250 mg/pot, 400 mg/pot 添加した区で生育不良が見られ(写真 10,11)、個体の一部に生育が停滞し子葉が黄化症状したものが確認された(写真 12)。この症状は硫酸亜鉛による過剰症状に類似していた(写真 5)。播種 19 日後に硝酸亜鉛を Zn として 400 mg/pot 添加した区で子葉葉縁の黄化症状が見られた(写真 13)。生育後期の播種 20 日後頃になると、本葉の黄化症状が発現した(写真 14)。なお、跡地土壌の根域を観察すると、硝酸銅は土層の上層に根域が制限されていたことに対し、硝酸亜鉛区では根域制限は見られず、下層にまで根域が拡大していた(写真 15)。硝酸亜鉛による過剰症状は作物体の生育不良及び葉の黄化症状に特徴があることがわかった。



(写真 10)

播種 10 日後の様子. 試験区の配置は次のとおりである.

上段:硝酸亜鉛区, 下段:硝酸銅区

右下:標準区

左列:100 mg/pot 区(207 mg/kg 乾土)

中列:250 mg/pot 区(516 mg/kg 乾土)

右列:400 mg/pot 区(826 mg/kg 乾土)

硝酸銅区と比較すると硝酸亜鉛区の生育不良が判る.



(写真 11)

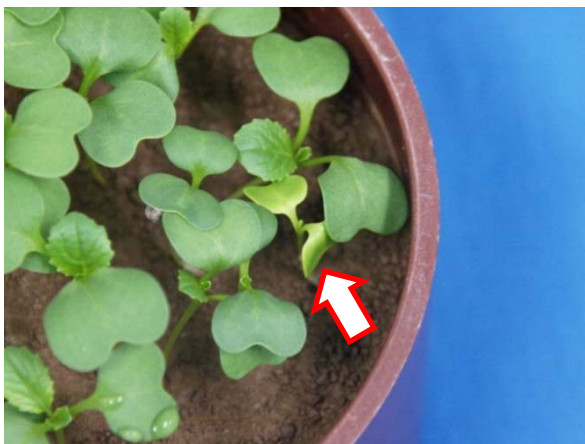
播種 21 日後の様子. 硝酸亜鉛の添加量に伴って生育不良となっている. 試験区の配置は次のとおりである.

上段:標準区

下段左:100 mg/pot 区(Zn 207 mg/kg 乾土)

下段中:250 mg/pot 区(Zn 516 mg/kg 乾土)

下段右:400 mg/pot 区(Zn 826 mg/kg 乾土)



(写真 12)

播種 10 日後の様子. 400 mg/pot 区(Zn 826 mg/kg 乾土)の一部個体で, 生育が停滞し子葉の黄化症状が見られた. 硫酸亜鉛の過剰症状で見られた特徴的な下垂を呈していた.



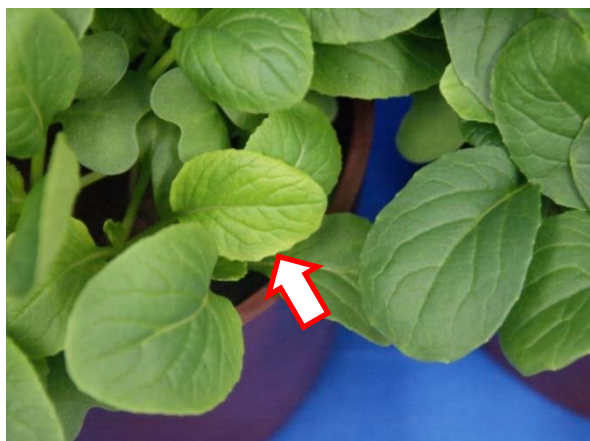
(写真 13)

播種 19 日後の様子.

左:400 mg/pot 添加区(Zn 826 mg/kg 乾土)

右:標準区

硝酸亜鉛区の子葉が標準区と比較すると葉縁が黄化症状を呈していることがわかる.



(写真 14)

播種 20 日後の様子.

左:250 mg/pot 添加区 (Zn 516 mg/kg 乾土)

右:標準区

硝酸亜鉛区の本葉が標準区と比較すると黄化症状を呈していることがわかる. 上位葉で症状が顕著だった.



(写真 15)

跡地土壌の観察の様子. 配置した試験区は次のとおりである.

左:硝酸亜鉛 100 mg/pot 区 (Zn 207 mg/kg 乾土)

中:硝酸銅 100 mg/pot 区 (Cu 207 mg/kg 乾土)

右:標準区

なお, 写真の土層上面が試験容器内土壌時の下層に該当する. 硝酸亜鉛区は下層にまで根域が拡大していた.

(3.3) 硫酸銅による過剰症状

硫酸銅による過剰症状は, (1) 発芽障害, (2) 本葉の黄化症状, (3) 本葉裏の赤紫色化が確認された. 発芽障害は播種後, 生育初期の播種 4 日後頃にかけて顕著に現れた(写真 16,17). その後, 硫酸銅を Cu として 250 mg/pot 施用区に本葉第一葉の黄化症状が発現した(写真 18). なお, 硫酸亜鉛及び硝酸亜鉛で特徴的であった子葉の黄化症状(写真 5,12)は見られなかった. 生育後期(概ね播種 17 日後以降)になると生育が停滞する個体も見られたが, 成長を続ける個体は本葉第二, 三葉にかけて黄化症状が見られた(写真 19). その際, 黄化症状は葉柄部分から葉先にかけて進行していた. 収穫後の葉裏を確認すると, 一部に赤紫色化が観察され(写真 20), この症状は硫酸亜鉛の過剰症状(写真 9)と類似していた. 硫酸銅による過剰症状は著しい発芽障害と本葉の黄化症状に特徴があることがわかった. Zn 材料の過剰症状とは異なり, 子葉黄化症状の特徴は見られなかった.



(写真 16)

硫酸銅を Cu として 400 mg/pot (Cu 826 mg/kg 乾土) 播種 4 日後の様子。

子葉が展開する前に枯死する個体がいくつか見られた。



(写真 17)

播種後 10 日目の様子. 硫酸銅の添加量に伴って発芽障害が顕著となることがわかる. 硫酸銅を Cu としたときの施用量は次のとおりである.

上段 : 標準区

下段左 : 100 mg/pot 区 (Cu 207 mg/kg 乾土)

下段中 : 250 mg/pot 区 (Cu 516 mg/kg 乾土)

下段右 : 400 mg/pot 区 (Cu 826 mg/kg 乾土)



(写真 18)

250 mg/pot (Cu 516 mg/kg 乾土) 播種 11 日後の様子. 本葉第一葉に黄化症状が確認された。

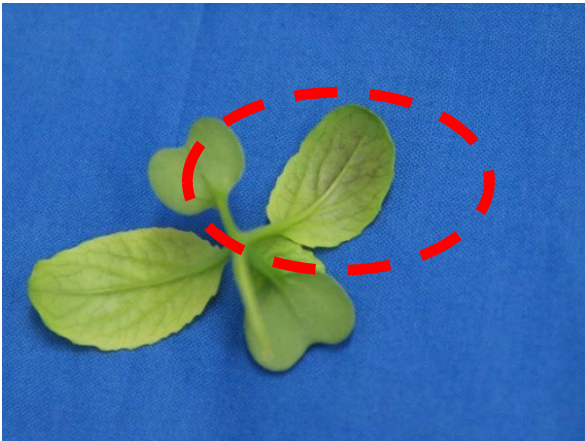


(写真 19)

播種 17 日後の様子.

黄化症状は本葉第一葉から呈していき, 本葉第二葉, 第三葉へと進行している.

なお, 症状は葉柄部から葉の先端にかけて進行していることが確認された.



(写真 20)

250 mg/pot (Cu 516 mg/kg 乾土) 播種 21 日後, 収穫した個体の様子.

葉裏の葉脈に沿って赤紫色化していることがわかる.

(3.4) 硝酸銅による過剰症状

硝酸銅による過剰症状は特段確認されなかった(写真 21). しかしながら, 跡地土壌を観察すると, 特徴的な根域制限が見られた. すなわち, コマツナの根は試験容器内土層の上層に集中しており, 下層には根張りがほとんど見られなかった(写真 22,23).



(写真 21)

播種 21 日後の様子である.

硝酸銅による作物体への害症状は確認されなかった. 硝酸銅を Cu としたときの施用量は次のとおりである.

上段: 標準区

下段左: 100 mg/pot 区 (Cu 207 mg/kg 乾土)

下段中: 250 mg/pot 区 (Cu 516 mg/kg 乾土)

下段右: 400 mg/pot 区 (Cu 826 mg/kg 乾土)



(写真 22)

収穫後, 跡地土壌の根域を観察すると, 100 mg/pot (Cu 207 mg/kg 乾土) で土壌下層に根張りがほとんど見られなかった.

なお, 写真にある土層上部の面が試験容器内では土壌下層面となる.



(写真 23)

100 mg/pot (Cu 207 mg/kg 乾土) の跡地土壌. コマツナの根張りが上層に集中している.

なお, 写真にある土層上部の面が試験容器内では土壌下層面となる.

3) 施肥方法の違いによる検証試験

(1) 作物体の分析結果

施肥方法の違いによる検証試験における作物体の調査・分析結果を表 10 及び表 11 に示した.

硫酸亜鉛区及び硫酸銅区どちらも水溶液浸透法の場合に比べて土壌混合法で明確な生育不良が確認され, 3.2) (1) で得た結果と同じ傾向が見られた. 硫酸亜鉛区で水溶液浸透法の場合は異常症状が確認された一方で, 硫酸銅区の水溶液浸透法では異常症状が確認されない結果となった. このことから, 土壌混合法における作物に対する影響は硫酸銅の方が硫酸亜鉛よりも大きく, 水溶液浸透法の場合は硫酸亜鉛の方が硫酸銅よりも大きいことがわかった.

作物体分析結果(表 11)から硫酸亜鉛区では作物体中の Zn 濃度が土壌混合法で 3090 mg/kg であるのに対し, 水溶液浸透法では 1630 mg/kg と大きな差異が生じた. 硫酸銅区でも同様に土壌混合法で作物体中の Cu 濃度は 45 mg/kg であるのに対し, 水溶液浸透法では 12 mg/kg と差異が生じていた. また, 作物体中の Fe 濃度は硫酸亜鉛区の土壌混合法のみ標準区より低い値となった. 作物体中の P は水溶液浸透法の場合, 土壌混合法より高濃度となる傾向が見られた.

表10 検証試験調査結果

供試 試薬	施肥 方法 ^{a)}	負荷量		ポット No.	発芽率 ^{b)}		葉長 (cm)	生体重 (g/pot)	乾物重 (g/pot)	生体重 指数 ^{c)}	乾物重 指数 ^{c)}	異常 症状
		Zn (mg/pot)	Cu (mg/pot)		1回目 (%)	2回目 (%)						
硫酸 亜鉛	(a)	250	-	1	95	100	2.3	2.1	0.33	7	10	有
				2	95	100	3.2	3.3	0.48	11	14	
				平均	95	100	2.8	2.7	0.41	9	12	
硫酸 銅	(b)	250	-	1	100	100	8.1	25	2.52	84	74	有
				2	100	100	8.5	25	2.30	83	68	
				平均	100	100	8.3	25	2.41	83	71	
硫酸 銅	(a)	-	250	1	55	65	1.8	1.1	0.13	4	4	有
				2	30	60	2.7	1.8	0.34	6	10	
				平均	43	63	2.3	1.4	0.24	5	7	
標準 区	-	-	-	1	100	100	7.7	26	3.28	86	96	なし
				2	100	100	7.7	25	2.99	84	88	
				平均	100	100	7.7	25	3.13	85	92	
標準 区	-	-	-	1	100	100	9.2	30	3.37	100	99	なし
				2	95	100	8.9	30	3.44	100	101	
				平均	98	100	9.0	30	3.40	100	100	

a) 2. 1) (6) 施肥方法に示す(a) 土壌混合法, (b) 水溶液浸透法

b) 発芽率は(発芽した個体 / は種数 20 粒)×100 によって算出

c) 標準区2連の平均値を100として算出

表11 検証試験作物体分析結果

供試 試薬	施肥 方法 ^{a)}	負荷量		ポット No.	乾物重 (g/pot)	作物体の元素濃度 ^{b)}			
		Zn (mg/pot)	Cu (mg/pot)			Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	P (%)
硫酸 亜鉛	(a)	250	-	1*	0.33	3252	16	81	0.27
				2*	0.48	2929	17	52	0.26
				平均	0.41	3090	17	66	0.26
硫酸 銅	(b)	250	-	1	2.52	1577	9	137	0.43
				2	2.30	1684	10	151	0.49
				平均	2.41	1630	10	144	0.46
硫酸 銅	(a)	-	250	1*	0.13	63	46	81	0.21
				2*	0.34	29	43	164	0.18
				平均	0.24	46	45	122	0.20
標準 区	-	-	-	1	3.28	51	12	99	0.34
				2	2.99	40	12	110	0.35
				平均	3.13	45	12	104	0.34
標準 区	-	-	-	1	3.37	40	13	128	0.33
				2	3.44	29	8	77	0.28
				平均	3.40	35	10	103	0.30

a) 2. 1) (6) 施肥方法に示す(a) 土壌混合法, (b) 水溶液浸透法

b) 乾物値 n=2 (*を付した区は生育不良のためn=1)

(2) 跡地土壌の分析結果

施肥方法の違いによる検証試験における跡地土壌の分析結果を表 12 に示した。

水溶液浸透法による場合, 3.2) (2)の結果と同様に 0.1 mol/L 塩酸抽出による S-Zn 及び S-Cu は跡地土壌の下層が上層よりも高濃度の結果が得られた。土壌混合法における pH は下層の方が高い傾向があり, EC は逆に上層の方が高い傾向が見られた。水溶液浸透法の場合, pH は上層の方が高い傾向があり, EC は下層の方が高い傾向が見られ, 土壌混合法の場合と逆の傾向にあった。

表12 検証試験跡地土壌分析結果

供試 試薬	施肥 方法 ^{a)}	負荷量		ポット No.	S-Zn ^{b,c)}		S-Cu ^{b,c)}		pH(H ₂ O) ^{d)}		EC ^{e)}	
		Zn (mg/pot)	Cu (mg/pot)		上層 (mg/kg)	下層 (mg/kg)	上層 (mg/kg)	下層 (mg/kg)	上層	下層	上層 (dS/m)	下層 (dS/m)
硫酸 亜鉛	(a)	250	-	1	459	449	9	9	5.47	5.67	0.96	0.77
				2	464	440	9	9	5.78	5.82	0.92	0.71
				平均	462	444	9	9	5.63	5.75	0.94	0.74
	(b)	250	-	1	229	619	10	9	5.61	5.16	0.36	0.82
				2	172	635	10	9	5.57	5.37	0.35	0.79
				平均	201	627	10	9	5.59	5.27	0.35	0.81
硫酸 銅	(a)	-	250	1	7	8	524	429	5.34	5.55	1.13	0.58
				2	6	6	504	438	5.46	5.54	1.00	0.61
				平均	7	7	514	433	5.40	5.55	1.06	0.60
	(b)	-	250	1	6	6	154	647	5.33	5.12	0.50	0.82
				2	6	6	31	848	5.21	5.10	0.62	0.73
				平均	6	6	92	748	5.27	5.11	0.56	0.78
標準 区	-	-	1	6	6	9	8	5.61	5.55	0.06	0.55	
			2	6	6	9	8	6.00	5.47	0.06	0.52	
			平均	6	6	9	8	5.81	5.51	0.06	0.54	

a) 2. 1) (6) 施肥方法に示す(a) 土壌混合法, (b) 水溶液浸透法

b) 0.1規定塩酸抽出液を測定

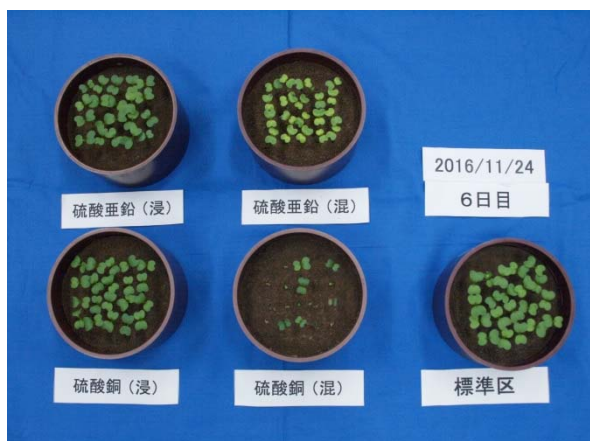
c) 乾物値 $n=1$

d) pH(H₂O)は土壌1:水5の懸濁液を測定

e) EC(電気伝導率)は土壌1:水5の懸濁液を測定

(3) 異常症状の確認

施肥方法の違いによる害症状を確認するため試験を実施したところ, (1)発芽率, (2)異常症状, (3)生育具合に明確な相違が確認された(写真 24~26)。つまり, 2.1) (6)に示す土壌混合法は水溶液浸透法と比較して, 作物体に与える影響が大きいことから異常症状の発現に差異を生じていることがわかった。



(写真 24)

播種 6 日後の様子. 配置した試験区は次のとおり.

右下: 標準区

上段: 硫酸亜鉛 250 mg/pot (Zn 516 mg/kg)

下段: 硫酸銅 250 mg/pot (Cu 516 mg/kg)

左第一列: 施肥方法 2.1) (6) に示す水溶液浸透法

・・・「左写真のラベルに(浸)と表示」

左第二列: 施肥方法 2.1) (6) に示す土壌混合法

・・・「左写真のラベルに(混)と表示」



(写真 25)

播種 14 日後の様子.

硫酸銅区の土壌混合法は発芽した個体に一部のみ生育が進行した. その生育スピードは硫酸亜鉛区の土壌混合法のものと比較すると早かった.



(写真 26)

播種 21 日後の様子. 硫酸亜鉛区及び硫酸銅区の水溶液浸透法は生育が標準区よりやや劣る程度であるように見えた.

(3.1) 硫酸亜鉛による過剰症状

3.2) (3) (3.1) に土壌混合法による硫酸亜鉛の過剰害症状を示したのでここでは水溶液浸透法による結果を記す. 硫酸亜鉛を Zn として 250 mg/pot (516 mg/kg 乾土) 施用した区では, (1) 生育不良, (2) 本葉の黄化症状, (3) 子葉葉縁の黄化症状, (4) 本葉葉縁の黄化症状が確認された. 初期生育は標準区と同等程度であったが (写真 23), 生育中期 (概ね播種 14 日後頃) になると生育が標準区 > 水溶液浸透法のもの > 土壌混合法のものとなり, 収穫日までにその差は改善されなかった (写真 25, 26). 生育中期から後期にかけて本葉の黄化症状が発現し, 本葉の一部が湾曲する症状が観察された (写真 27). また, 生育後期に子葉葉縁に黄化症状が見られ (写真 28), この症状は施肥方法が同じ硫酸銅区では観察されなかった. 本葉の葉縁にも黄化症状が見られ, 一部が白化しているように見えた (写真 29).



(写真 27)

播種 17 日後の様子.

左: 250 mg/pot (Zn 516 mg/kg 乾土)

右: 標準区

標準区と比較すると本葉が黄化症状を呈していることがわかる. また, 本葉の一部が湾曲しているように見える.



(写真 28)

播種 21 日後の様子. 子葉葉縁の特に先端部分に沿って黄化症状が見られた.



(写真 29)

播種 17 日後の様子. 本葉第二葉の葉縁に薄い黄化症状が観察され, 一部は白化しているように見える.

(3.2) 硫酸銅による過剰症状

2.1 (6) に示す水溶液浸透法で硫酸銅を Cu として 250 mg/pot (516 mg/kg 乾土) 施用した場合, 標準区に比べてやや生育が劣っていた (写真 26) が, 特段の害症状は確認されなかった (写真 30).

一方, 土壌混合法による区では (写真 20) と同様の本葉葉裏の赤紫色化が確認され, 土壌混合法による硫酸亜鉛区ではこの症状は確認されなかった (写真 31).

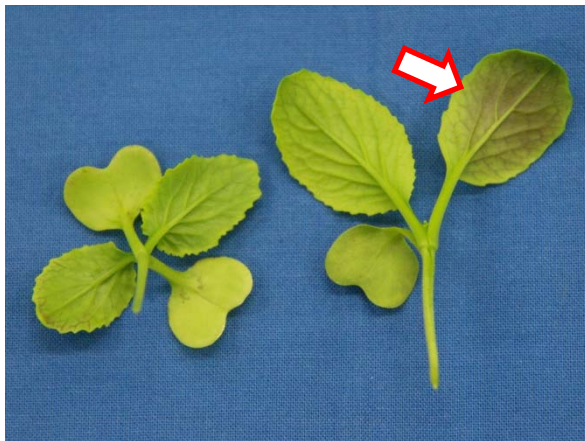


(写真 30)

播種 21 日後の様子。
コマツナを収穫後、標準区の個体と比較したが、特段の害症状は見られなかった。

右:標準区

左:250 mg/pot (Cu 516 mg/kg 乾土)



(写真 31)

収穫後の個体の比較。

右:硫酸銅 250 mg/pot (Cu 516 mg/kg 乾土)

左:硫酸亜鉛 250 mg/pot (Zn 516 mg/kg 乾土)

どちらもとも土壤混合法によるものである。

4. 考察

1) 亜鉛過剰症状確認試験

(1) 作物体の調査・分析結果

(1-1) 生育と異常症状

表7に掲げた各区の乾物重と発芽率の関係を図示した(図2)。この結果、硫酸銅区における著しい生育不良と発芽率の低さが明確であり、特に250 mg/pot区、400 mg/pot区で顕著だった。硫酸亜鉛区の発芽率は100%と良好であったが、硫酸銅区と同様に250 mg/pot区、400 mg/pot区に著しい生育不良が見られた。一方、硝酸亜鉛区はこれと同じ傾向が見られたが、生育不良の程度は軽く、硝酸銅区は標準区と比較して同等以上の生育が見られた。硫酸亜鉛区及び硫酸銅区と硝酸亜鉛区及び硝酸銅区で過剰症状に差異が生じた理由は施肥方法の違いによる影響が大きいと推察された。つまり、土壤混合法の場合は水溶液浸透法に比べて播種後、種子周辺に存在するZnもしくはCu濃度が高くなることが予想された。植物の金属元素含量に関するデータ集録¹⁾によると、Cuの害作用は生育初期に著しいとされており、初期生育における作物体へのCuの影響が大きいものと思われる。本試験結果から土壤混合法の場合、ZnにおいてもCuと同様に初期生育に害作用を及ぼすものと考えられた。その際、250 mg/pot(516 mg/kg)以上で生育不良が顕著に現れることが推察される。なお、供試土壌は異なるが硫酸亜鉛を乾土当たり150 mg/kg及び300 mg/kg 負荷させた土壌でコマツナ栽培した報告¹⁴⁾によると、150 mg/kg 負荷区で黄化症状は発現しないが収量は低下し、300 mg/kg 負荷区では黄化症状が発現したうえ収量がZn無添加区の35%に低下したとある。このことから、コマツナに対する硫酸亜鉛の過剰症状は乾土当たり300 mg/kg以上の施用量で著しい異常症状が発現すると推定される。

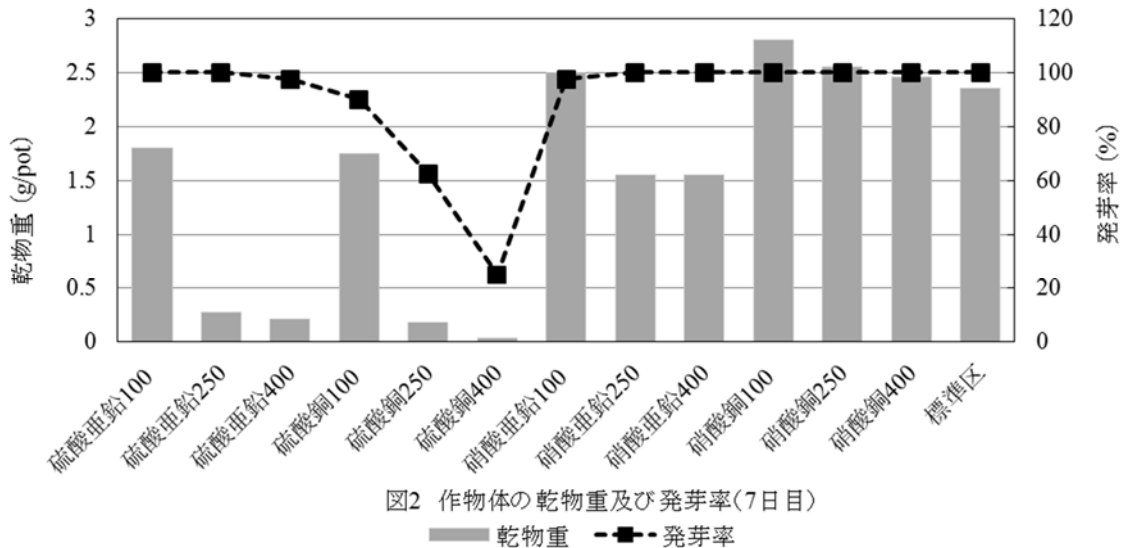


図2 作物体の乾物重及び発芽率(7日目)

■ 乾物重 -■- 発芽率

(1-2) Zn 及び Cu の吸収

本試験ではサンプル数が少ないが、硫酸亜鉛区及び硝酸亜鉛区の作物体の Zn 濃度は、Zn 負荷量に伴い、高くなる傾向が示唆された(図 3)。一方、硫酸銅区及び硝酸銅区では Cu 負荷量に伴って作物体中の Cu が必ずしも高まることは無かった(図 4)。このことから、コマツナは Cu に比べて Zn を積極的に吸収する可能性が考えられる。

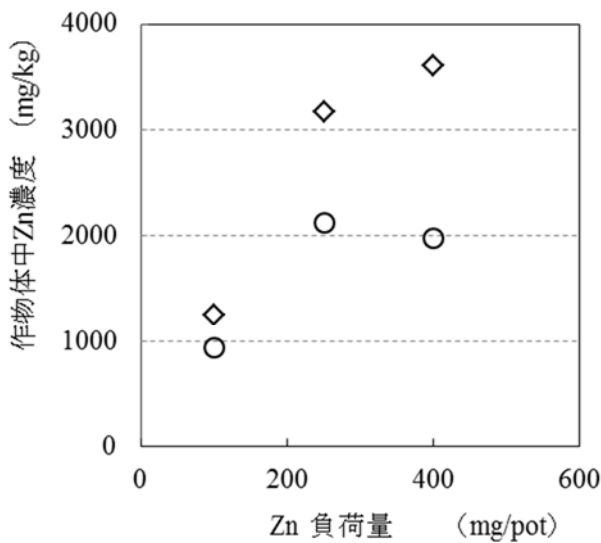


図3 亜鉛材料による作物体Zn濃度

◇ 硫酸亜鉛 ○ 硝酸亜鉛

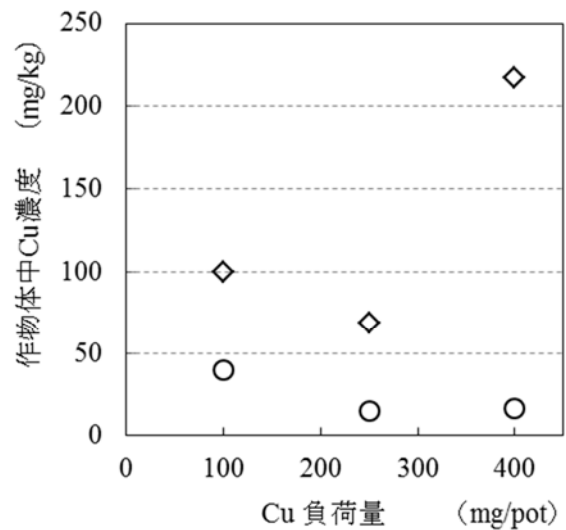


図4 銅材料による作物体Cu濃度

◇ 硫酸銅 ○ 硝酸銅

(1-3) 作物体中 Zn 及び Cu の P との関係

Zn は P と拮抗作用があると思われる⁹⁾ため、硫酸亜鉛区、硝酸亜鉛区、標準区における Zn と P の関係を調べたところ、負の相関が得られた(図 5)が、硫酸銅区、硝酸銅区、標準区における Cu と P に同様の関係性は見られなかった(図 6)。硫酸銅区では著しい生育不良が見られたこと、硝酸銅区では根域制限によって Cu の吸収を軽減したと思われることから、作物体における Cu と P の拮抗作用を明確にするには負荷濃度を変更するなど別試験で追究する必要があると思われる。

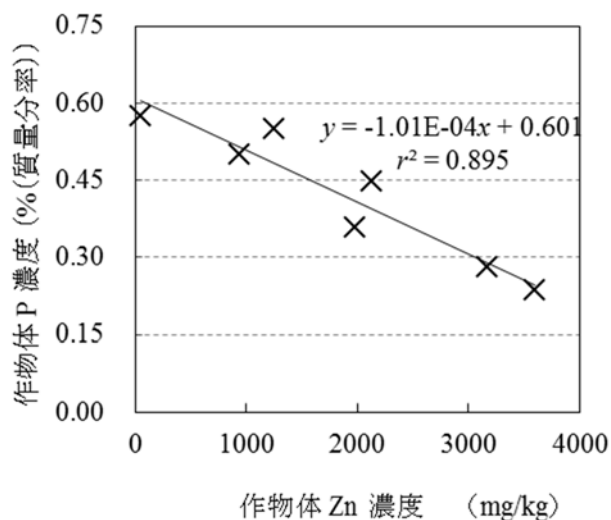


図5 作物体 Zn及びP濃度の関係

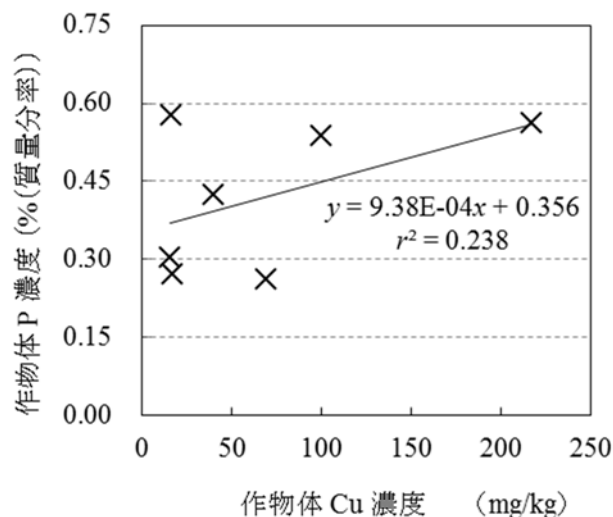


図6 作物体 Cu及びP濃度の関係

(1-4) 作物体中 Cu 及び Fe との関係

既報¹³⁾では硫酸銅, 硝酸銅, EDTA 銅の過剰施用によるコマツナの異常症状を確認し, これらの負荷量の増加に伴い作物体中の Cu 濃度だけではなく Fe 濃度が増加することを示した. 通常, Cu と Fe は拮抗作用があるとされるが, 植害試験の条件下では Cu 材料の負荷量増加に伴う硫酸根等の影響により, 土壌粒子に吸着されていた Fe が交換的に脱着され, 作物体に吸収された可能性が示唆された.

本試験においても表 8 に掲げた各ポットの作物体中 Cu 濃度及び Fe 濃度の関係を図示した(図 7).

この結果, 既報¹³⁾と同様に作物体中の Cu 濃度及び Fe 濃度は, 一部を除いてほぼ比例する関係があることがわかった. 硝酸銅区以外は Zn や Cu の負荷量増加に伴い, 作物体中 Fe 濃度が増え, これとともに Cu 濃度も増えていた. さらに標準区は Fe 濃度や Cu 濃度が比較的高濃度検出されたことに加え, Fe 濃度に相応する作物体中 Cu 濃度を示していた. 標準区は Zn や Cu を負荷していないことから作物体中の Fe 濃度や Cu 濃度が比較的高濃度検出された原因について調査を実施したが, 原因特定には至らなかった. 肥料として標準区に施用した硫安の NH_4^+ や塩加の K^+ が作用している可能性や供試土壌の特質が影響している可能性が考えられるが, 詳細な究明には別調査が必要であると判断された. 植害試験条件下で Fe と Cu が拮抗作用を示さず, 逆に吸収促進に働く原因や施肥成分による作物体中 Fe 濃度が高まるか否か確認することが必要だと考えられる.

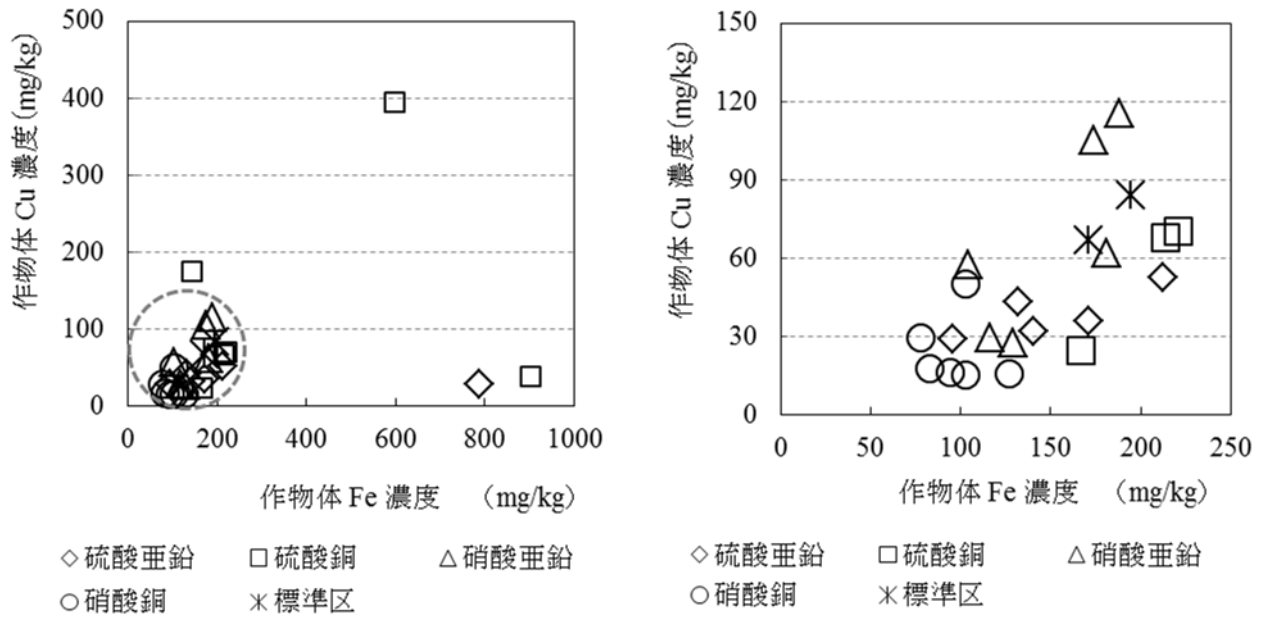


図7 作物体中 Fe 濃度と Cu 濃度との関係
(右図は左図の灰色破線で囲んだ部分を拡大したもの)

(2) 跡地土壌の分析結果

跡地土壌分析結果は表 9 に示した. 2.1) (6) に示す水溶液浸透法とした硝酸亜鉛区及び硝酸銅区は負荷した Zn 及び Cu は上層と比較すると, 下層に高濃度存在していることがわかった. 一方, 土壌混合法とした硫酸亜鉛区及び硫酸銅区ではこのような傾向は見られなく, 施肥方法の違いで土壌中の Zn 及び Cu の分布に大きな差異が生じると考えられた. 土壌の重金属保持力は通常 Zn よりも Cu の方が強いとされ, Cu の土壌中における移動性及び栽培作物への移行性は Zn に比べて低いものと考えられる¹⁵⁾ため, 本試験における水溶液浸透法とした硝酸亜鉛区及び硝酸銅区の跡地土壌下層における Zn 及び Cu 濃度は Cu の方が Zn よりも高濃度になる傾向になったと考えられる(図 8, 図 9).

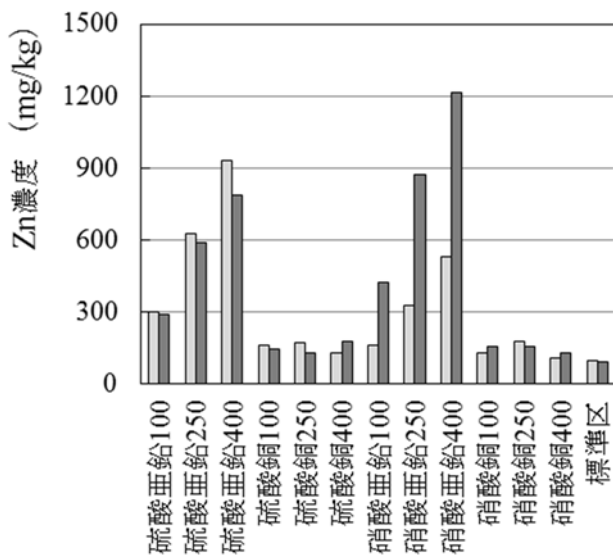


図8 層別の Zn 濃度
□ 上層 ■ 下層

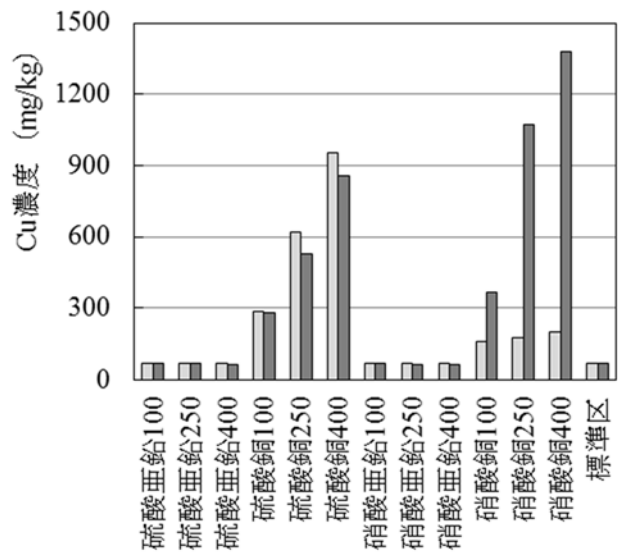


図9 層別の Cu 濃度
□ 上層 ■ 下層

(3) 異常症状の観察

(3-1) カウンターイオンによる影響

Zn 材料及び Cu 材料の過剰施用により生じる異常症状は負荷した Zn や Cu の影響だけでなく、供試試薬に付随するカウンターイオンによる害も想定される。今回の試験で生育不良が顕著だった硫酸亜鉛区及び硫酸銅区は供試試薬由来の硫酸(SO_4^{2-})を含んでおり、その負荷量は表 5 のとおりである。コマツナを供試作物として硫酸加里を過剰施用した加里の生理障害確認試験⁵⁾では硫酸加里を K_2O として 100 mg/pot~2800 mg/pot 施用しており、100 mg/pot~1200 mg/pot の施用量であれば生育は良好で異常症状は確認されなかったと報告している。このことから、 K_2O として 1200 mg/pot の硫酸加里施用(硫酸加里として 2.265 g/pot)に付随する硫酸(SO_4^{2-})は 1248 mg/pot と算出され、1248 mg/pot 以下の硫酸(SO_4^{2-})であれば異常症状は生じないものと推定される。

本試験で設定した硫酸亜鉛及び硫酸銅の施用量に付随する硫酸は 605 mg/pot 以下であることから(表 3)、害症状の原因が硫酸(SO_4^{2-})による可能性は低いと思われる。硫酸亜鉛区及び硫酸銅区で生じた異常症状は負荷された Zn 及び Cu による直接的な要因や拮抗作用による養分バランスの乱れが Zn 及び Cu 材料の過剰症状を発現させた原因になったと考えられる。

なお、硫酸亜鉛区と硫酸銅区の生育を比較すると(写真 3)、硫酸亜鉛区の生育は Zn 負荷量に伴い不良となるが、硫酸銅区ではむしろ Cu 負荷量に伴って生育が良好だった。つまり、硫酸亜鉛区では高濃度の Zn を吸収し、生育不良になった一方、硫酸銅区は Cu を標準区より高濃度吸収することがなく、カウンターイオンの硝酸(NO_3^-)は硝酸態窒素として栄養に供されたものと思われる。さらにコマツナは好硝酸性植物に分類される¹⁶⁾ことを考慮すると当該試験による硝酸(NO_3^-)の過剰症状が発現した可能性は低いと考えられる。

(3-2) 拮抗作用による影響

一般的な作物に対する Zn 及び Cu の過剰症状は拮抗作用による Fe 欠乏症状、特に上位葉の黄化症状(クロロシス)が挙げられる¹¹⁾。本試験では硫酸亜鉛区及び硫酸銅区にこの症状が発現した(写真 7,19)。しかしながら、上位葉の黄化症状が発現した作物体中の Fe 濃度はむしろ標準区より高く、Zn 及び Cu を過剰施用したことによって生じる Fe 欠乏症状以外の要因が存在する可能性が示唆された。

コマツナに対するりん酸の生理障害確認試験¹⁷⁾によると、りん酸欠乏症状として葉裏の赤紫色化が確認されている(写真 32)。この症状は作物体中のりん酸が欠乏し、炭水化物がエネルギー源として利用されなくなり、糖分とアントシアニンが結合して色素であるアントシアニンを生成したことにより生じるものとされている。本試験の硫酸亜鉛 400 mg/pot 区及び硫酸銅 250 mg/pot 区で見られた葉裏の赤紫色化はこの症状と類似していた。

Zn もしくは Cu の拮抗作用による P の欠乏症状が疑われたが、葉の表皮細胞におけるアントシアニンの合成にはりん酸欠乏以外にも、無機養分の欠乏、過剰、アンバランス、温度ストレス、病害等の複数の要因が関与するとされ、これらの光合成抑制作用によってアントシアニン合成が促進される¹⁸⁾。このことから直接的な要因の特定は困難であるが、本試験における硫酸亜鉛区及び硫酸銅区の葉裏の赤紫色化は、Zn もしくは Cu の過剰施用による何らかの光合成抑制作用が働いたことでアントシアニンが生成されたものだと考えられる。

(3-3) 跡地土壌の観察

跡地土壌の観察で見られた硫酸銅区の根域制限(写真 23)は、まず水溶液浸透法としたため下層に高濃度の Cu が存在したこと、次に初期生育は良好に進んだが、生育が進むにつれ根が下層付近にさしかかると高濃度の Cu を根が察知し、比較的 Cu が低濃度である上層に根を拡大せざるを得ない状況であったと予想されること、以上のことが下層に根域が見られず、上層に集中した原因と推察される。



(写真 32)

切り取って葉裏を観察したところ、葉脈を中心としてアントシアニンによる赤紫色への変色がみられた。

コマツナの生理障害-りん酸¹⁷⁾から抜粋

2) 施肥方法の違いによる検証試験

(1) 作物体の分析結果

(1-1) Zn 及び Cu の影響

作物体の分析結果によると硫酸亜鉛区では作物体中の Zn 濃度が水溶液浸透法と比較すると土壌混合法の場合、およそ倍の Zn 濃度が検出された。このことから施肥方法の違いによって、作物体中の Zn 濃度が大きく異なることがわかった。これは土壌混合法の場合、水溶液浸透法よりも上層に高濃度の Zn が分布すると考えられる(図 10)ことから、生育初期の作物体へ対する影響に差異が生じたことが原因と思われる。さらに土壌混合法の方が水溶液浸透法よりも作物体中の Zn が高濃度であったこと(図 11)、及び生育不良のため生育中期頃から生育が停滞していたことを考慮すると生育初期に高濃度の Zn を吸収したものと推察される。作物体中の Zn もしくは Cu 濃度と乾物重の関係から、施肥方法の違いによる生育不良の傾向に差異が現れることも明らかとなった(図 12)。硫酸銅区でも施肥方法の違いで同様の傾向(図 10,図 11)があったことから、土壌混合法とした場合、生育初期に高濃度の Cu を吸収したものと考えられる。

したがって、土壌混合法は水溶液浸透法と比較して土壌上層の可溶性金属濃度を上昇させ、これが作物体中の Zn 及び Cu 濃度の上昇を促し、作物体の生育不良を誘発したものと考えられる。

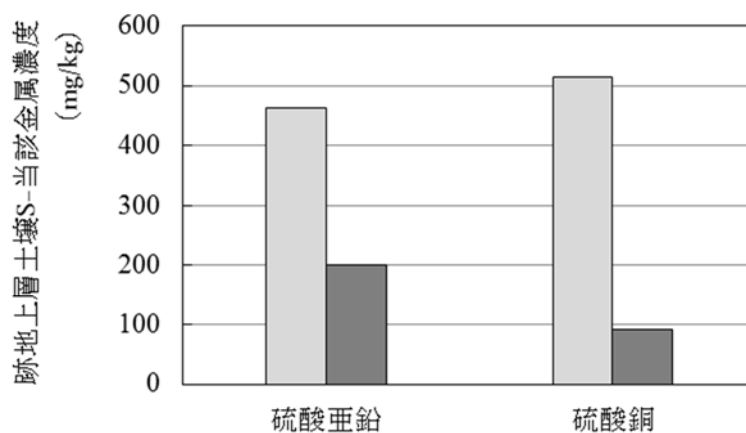


図10 施肥方法の違いによる跡地上層土壌中の可溶性金属の差異

□(a)土壌混合法 ■(b)水溶液浸透法

※ 表12に示す 上層の平均値を使用

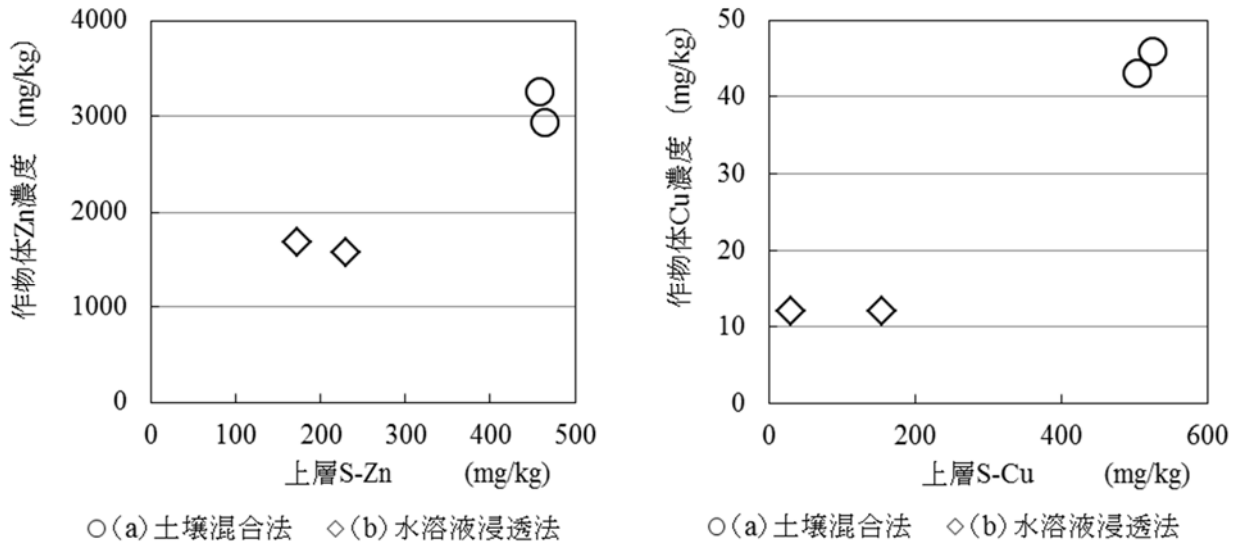


図 11 跡地上層土壌中の可溶性金属濃度と作物体中濃度との関係
(表 11 及び表 12 に示した各ポットの値を使用)

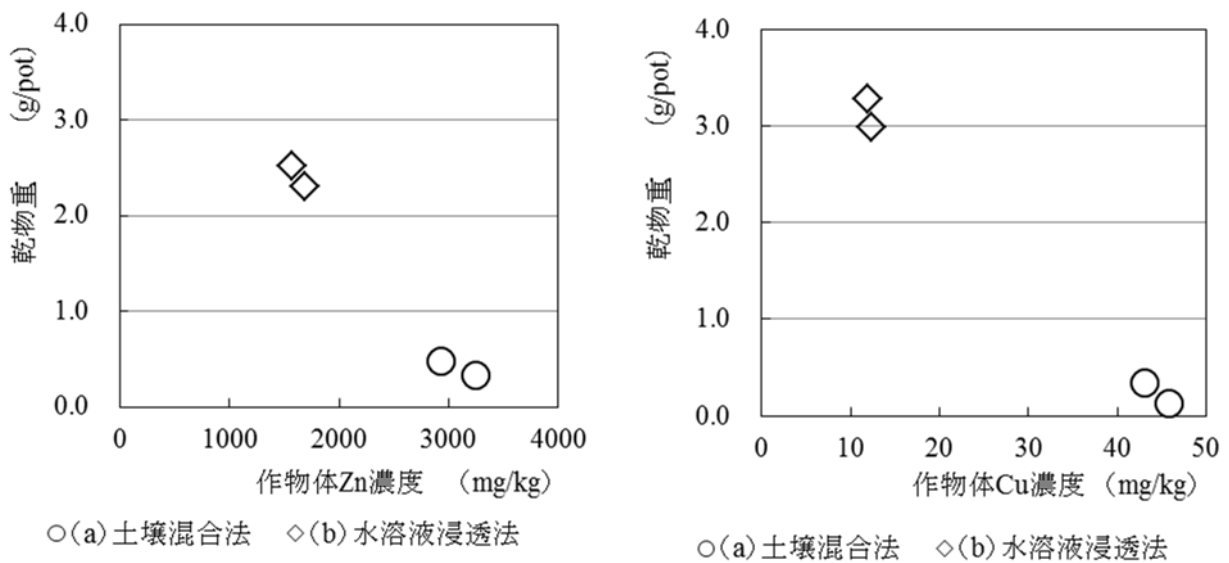


図 12 作物体中当該金属濃度と乾物重との関係
(表 11 及び表 12 に示した各ポットの値を使用)

(1-2) 根域への影響

硫酸亜鉛区で水溶液浸透法とした場合、作物体中の Zn は標準区と比較すると約 45 倍の濃度差が見られた。一方、硫酸銅区で同様の施肥方法とした場合、標準区との差はほとんど見られなく、4.1 (3) に示したとおり、高濃度の Cu が分布する下層に根域を拡大しなかったことが硫酸亜鉛区と硫酸銅区における作物体中の Zn もしくは Cu 濃度の傾向に差が生じた原因と考えられる。換言すると、下層に高濃度の Zn が存在した状況下でもコマツナの根は上層に留まることなく下層に根域を拡大し(写真 14)、土壌中の Zn を積極的に吸収したものと思われる。

(1-3) 拮抗作用による影響

硫酸亜鉛区の土壌混合法の場合、作物体中の Fe 濃度が標準区より低かったが、水溶液浸透法の場合は標準区より高濃度であったことから Fe 欠乏症状による症状とは断定できなかった。

生育不良となった土壌混合法による硫酸亜鉛区及び硫酸銅区では標準区と比較して作物体中の P が低くなる拮抗作用の傾向が見られた。一方、水溶液浸透法による硫酸亜鉛区は Zn を高濃度吸収したが、標準区以上の P 濃度が検出されているうえ、りん酸欠乏症状の異常症状も確認されなかった。このことから植害試験条件下では必ずしも Zn と P が拮抗作用にはならないことが本試験結果から考えられた。

(2) 跡地土壌の分析結果

(2-1) 0.1 mol/L 塩酸抽出による Zn 及び Cu

0.1 mol/L 塩酸抽出による Zn 及び Cu (S-Zn 及び S-Cu) は土壌混合法に比べて水溶液浸透法の場合、下層に高濃度存在し(表 11), 4.1 (2)に示した Zn 全量及び Cu 全量と同じ傾向にあった。さらに、水溶液浸透法の場合、硫酸亜鉛区よりも硫酸銅区の方が、上層と比較して下層で高濃度となる傾向が強く(図 13, 図 14), 硫酸亜鉛区の S-Zn 濃度は上層が 201 mg/kg, 下層が 627 mg/kg であり、硫酸銅区の S-Cu 濃度は上層が 92 mg/kg, 下層が 748 mg/kg の分析結果が得られた。すなわち、水溶液浸透法において硫酸亜鉛区の上層中 Zn 濃度は下層の 1/3 程度であるが、硫酸銅区の場合は、上層中 Cu 濃度は下層の 1/8 程度しか分布していないことがわかった。栽培期間中の灌水による影響を考慮すべきであるが、土壌中の Cu は Zn に比較して上方移動が困難であることが推察された。これは土壌中の Zn は Cu よりもイオン化傾向が高いことに加え、土壌の重金属保持力は Cu の方が高いと考えられる¹⁹⁾ことから、Zn と Cu における土壌中の濃度分布に差異が生じたと思われる。このため、本試験の水溶液浸透法における作物体中の Zn 濃度が Cu 濃度よりも Zn 負荷量に伴い顕著に高まったと推察される。

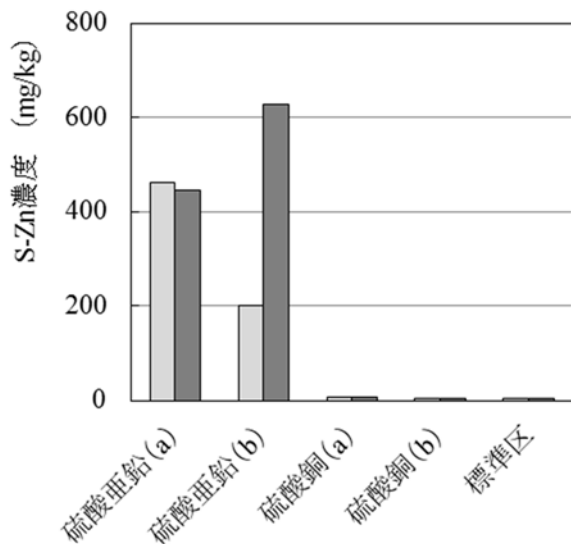


図13 層別のS-Zn濃度
□ 上層 ■ 下層

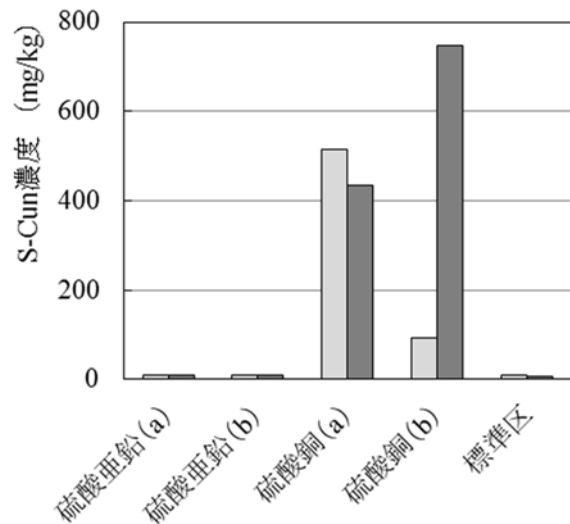


図14 層別のS-Cu濃度
□ 上層 ■ 下層

(2-2) 硫酸根の分布

pH は土壌混合法の場合、上層より下層が高い傾向にある一方、水溶液浸透法では逆に下層より上層が高い結果となった。EC は土壌混合法の場合、下層より上層が高く、水溶液浸透法では逆に上層より下層が高くなる

結果が得られた。土壌中で供試試葉の硫酸亜鉛及び硫酸銅は解離し、硫酸根(SO_4^{2-})を生じると考えられる。土壌はマイナスに帯電しているため、陰イオンは陽イオンと比較すると土壌中で移動しやすいものと思われ、栽培期間中の灌水によって下層へ移動することが想定された。水溶液浸透法では硫酸根(SO_4^{2-})が下層に蓄積されたと予想されることから、pH が上層よりも低く、EC が高くなったと思われる。

一方、土壌混合法の場合は土壌下層よりもむしろ上層の方で pH が低くなり、EC が高くなる測定結果が得られた。このことから下層以上に上層に硫酸根(SO_4^{2-})が存在するものと考えられた。すなわち、栽培期間中の灌水による硫酸根の下層移動が想定されていたが否定された結果となった。土壌中の腐植物質が正電荷を持つともいわれており²⁰⁾、供試土壌中の腐植物質等が施肥時にはすでに硫酸根を保持している可能性が示唆される。つまり、施用方法の違いで硫酸根の分布にも相違が生じるものと予想される。

(3) 異常症状の確認

土壌混合法とした硫酸亜鉛区及び硫酸銅区を比較すると、発芽率は硫酸亜鉛で 100 %と良好であったのに対し硫酸銅では 63 %と低く、乾物重の比較でも硫酸銅区が劣っていた。このことから、コマツナに対する重金属の害は Cu の方が Zn よりも強い傾向であると考えられる。さらに、発芽障害が特徴的だった硫酸銅に対して硫酸亜鉛はその特徴がないが、子葉を中心に黄化症状が発現する特徴が見られ、同濃度の負荷量であれば双方による過剰害症状は判別が可能であると考えられる。

また、重金属塩化物の添加による土壌微生物活性の抑制効果に関する調査によると、Cu、Zn 及び Mn の順に土壌微生物の抑制効果が大きく、作物の生育に及ぼす影響力と同じ傾向であるとされているが²¹⁾、本試験のコマツナについても Cu の方が Zn よりも生育が悪い結果であった。生育不良には土壌微生物活性の影響も要因に挙げられる。ただし、植害試験の条件下ではコマツナの生育上、施用した Zn 及び Cu 間で根域拡大に相違が生じることから、水溶液浸透法の場合は Zn の方が生育が悪い結果であった。

以上のことから、施肥方法の違いでコマツナの生育や発現する異常症状が大きく異なることが判明した。さらに、土壌への親和性によりその影響の発現程度まで異なるものと予測されたことから、植害試験の方法に施肥方法の指定が必要であるとともに、供試肥料の植物に対する害を正確に判定するためには現場圃場等における供試肥料の実際の施肥方法を十分考慮した施肥方法の選定が重要であると考えられた。

5. まとめ

植害試験におけるコマツナの異常症状の正確な判定に役立つ基礎資料を作成するため、供試試葉として流通肥料に使用実績のある硫酸亜鉛及び硝酸亜鉛を選定し、Zn の効果を目的に使用される肥料材料のコマツナに対する過剰症状確認試験を実施した。Zn 材料に加えて既に過剰症状を確認した Cu 材料を対照にし、硫酸銅区及び硝酸銅区を設定した。供試土壌は灰色低地土とし、供試試葉の硫酸亜鉛、硝酸亜鉛、硫酸銅、硝酸銅を段階的に施用、人工気象装置内で 21 日間栽培した。結果、供試試葉の施肥方法の違いで過剰害症状に相違が生じる可能性が推察された。このため、全層施肥による方法を土壌混合法、供試試葉水溶液を土壌下層から上層に向けて浸透させる方法を水溶液浸透法とし、硫酸亜鉛及び硫酸銅を用いて検証試験を実施したところ、施肥方法の違いで害症状に相違が生じることが判明した。植害試験における害症状を正確に判定するためには、供試肥料が実際の圃場でどのような施肥方法とされるか十分考慮し、植害試験上の施肥方法を選定する必要があるとともに、植害試験の方法に施肥方法の指定が必要であると考えられた。

Zn 材料及び Cu 材料による過剰害症状は次のとおりであった。いずれも 250 mg/pot(516 mg/kg 乾土)以上の施用量で症状が顕著となった。

土壌混合法による硫酸亜鉛区では(1)生育不良, (2)子葉の黄化症状, (3)子葉の下垂, (4)本葉の黄化症状, (5)子葉裏の赤紫色化, (6)本葉葉縁の黄化症状の症状が施用量 100 mg/pot (207 mg/kg 乾土), 250 mg/pot (Zn 516 mg/kg 乾土) 及び 400 mg/pot (Zn 826 mg/kg 乾土) で発現し, 水溶液浸透法による場合は(1)生育不良, (2)本葉の黄化症状, (3)子葉葉縁の黄化症状, (4)本葉葉縁の黄化症状の症状が発現することを施用量 250 mg/pot (Zn 516 mg/kg 乾土) で確認した。

水溶液浸透法による硝酸亜鉛区では(1)生育不良, (2)子葉の黄化症状, (3)子葉葉縁の黄化症状, (4)本葉の黄化症状が施用量 250 mg/pot (Zn 516 mg/kg 乾土) 及び 400 mg/pot (Zn 826 mg/kg 乾土) で確認された。

土壌混合法による硫酸銅区は(1)発芽障害, (2)本葉の黄化症状, (3)本葉裏の赤紫色化が施用量 250 mg/pot (Cu 516 mg/kg 乾土) 及び 400 mg/pot (Cu 826 mg/kg 乾土) で発現した。水溶液浸透法による硫酸銅区では, 特段異常症状は確認されず, この原因は跡地土壌の観察において根域制限が見られたこと, 上層に比べて下層に Cu が高濃度検出されたことから, コマツナの根が上層に留まり, Cu による害を軽減できたためと考えられた。

謝 辞

本試験の実施にあたり, 日本大学生物資源科学部生命化学科野口章教授に多大な御指導を賜りました。ここに衷心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省農蚕園芸局長通知:肥料取締法の一部改正に伴う今後の肥料取締りについて, 別添 1, 植物に対する害に関する栽培試験, 昭和 59 年 4 月 18 日, 59 農蚕第 1943 号 (1984)
- 2) 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 28 年 12 月 19 日, 農林水産省告示第 2535 号 (2016)
- 3) HENRY D. FOTH: 土壌肥料学の基礎 江川友治監訳, p.189~191, 養賢堂, 東京 (1986)
- 4) 農林水産省: 都道府県施肥基準等
<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyohozen_type/h_sehi_kizyun/pdf/siry03.pdf>
- 5) 藤田卓: コマツナの生理障害—加里—, 肥料研究報告, 8, 182~200 (2015)
- 6) 環境庁水質保全局長通知: 農用地における土壌中の重金属等の蓄積防止に係る管理基準について, 昭和 59 年 11 月 8 日, 環水土 149 号
- 7) 総理府: 農用地の土壌の汚染防止等に関する法律施行令, 昭和 46 年 6 月 24 日, 総理府政令第 204 号「第二条第一項第三号」
- 8) 財団法人日本土壌協会: 土壌機能モニタリング調査のための土壌, 水質及び植物体分析法, 東京 (2001)
- 9) ポケット肥料要覧 2013/2014, p.94~95 農林統計協会 (2015)
- 10) 渡辺和彦, 後藤逸男, 小川吉雄, 六本木和夫: 環境・資源・健康を考えた土と施肥の新知識, p.211~222, 社団法人 農山漁村文化協会, 東京 (2012)
- 11) 独立行政法人農業環境技術研究所: 植物の金属元素含量に関するデータ集録, p.167~168, 昭和 52 年 2 月 農林水産技術会議事務局 <<http://www.niaes.affrc.go.jp/techdoc/hvymetal/14cumnzn.pdf>>
- 12) 藤原俊六郎, 安西徹郎, 小川吉雄, 加藤哲郎: 新版 土壌肥料用語辞典 第 2 版, p.106, p.121, 社団法人

農山漁村文化協会, 東京 (2010)

- 13) 五十嵐総一, 八木啓二, 添田英雄, 有隅孝子, 加島信一: コマツナの生理障害－銅－, 肥料研究報告, **9**, 170~184 (2016)
- 14) 伊藤淳次, 田村明長, 山根忠昭: し尿処理汚泥の連用が作物および土壌に及ぼす影響, 島根農試報告, **25**, 83~100 (1991)
- 15) 萩山慎一, 坂本一憲, 鈴木弘行, 牛尾進吾, 安西徹郎, 犬伏和之: 家畜ふんコンポストを施用した各種畑土壌におけるコマツナによる亜鉛と銅の吸収, 日本土壌肥料学雑誌, **76** (3), 293~297 (2005)
- 16) 池田英男: 養液栽培の新技术－その現状と展望－, 作物の栄養特性からみた培養液管理, 養賢堂, 東京 (1998)
- 17) 藤田卓: コマツナの生理障害－りん酸－, 肥料研究報告, **6**, 117~129 (2013)
- 18) 一般社団法人 日本植物生理学会, みんなのひろば 植物 Q&A, (2009)
< https://jspp.org/hiroba/q_and_a/detail.html?id=1903&key=1903&target=number >
- 19) King, D.L.: Retention of metals by several soils of the southeastern United States. *Environ. Qual.*, **17**, 239~246 (1988)
- 20) 藤原俊六郎, 安西徹郎, 小川吉雄, 加藤哲郎: 新版 土壌肥料用語辞典 第 2 版, p.63, 社団法人 農山漁村文化協会, 東京 (2010)
- 21) 駒井豊, 山田研一, 山口益郎: 多量に添加した重金属塩が土壌の二酸化炭素発生・無機態窒素の有機化・ウレアーゼ活性におよぼす影響, 日本土壌肥料学雑誌, **52** (4), 305~310 (1981)

Physiological disorder of Komatsuna - Zinc -

Souichi IGARASHI¹, Erika HIRATA², Hideo SOETA², Shinichi KASHIMA²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

(Now) Nagasaki Prefecture Kenhoku Development Bureau Agriculture & Forestry Department

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

This study was intended to accurately judge the symptoms that occur in the vegetation test on the harm against plants. The physiological disorder confirmation test, in which it was occurred the material containing zinc excessive symptoms about Komatsuna (*Brassica rapa var. perviridis*) intentionally, was undertaken. Not only two of the reagents containing zinc were chosen under this study, but also two of the reagents containing cooper were chosen as a reference. Which these were zinc sulfate, zinc nitrate, cooper sulfate and cooper nitrate, and are used generally to raise fertilizer quality for aiming at the purpose of zinc's and copper's physiological effects against plants. As a result, it was found excessive symptoms about Komatsuna depends on the difference of the fertilization methods. We verified two methods which the reagents containing zinc or cooper mix with the soil total volume in the plastic bag (as the method named all layer fertilization), and the aqueous solutions dissolved each reagents penetrates from under soil layer to upper soil layer in test container (as the method named penetrating aqueous solutions fertilization) . Excessive symptoms about Komatsuna occurred extremely by all layer fertilization compared to penetrating aqueous solutions fertilization. It is necessary to specify the designation of the fertilization method to the official regulation of vegetation test on the harm against plants. As excessive symptoms confirmation examination using zinc sulfate by all layer fertilization, it was observed (1) the poor growth of leaves, (2) cotyledon changed yellow color, (3) cotyledon sagging, (4) upper leaves changed yellow color, (5) the backside of cotyledon changed in purple-red color, (6) edge of upper leaves changed yellow color lightly. In the case of penetrating aqueous solutions fertilization, (1) the poor growth of leaves, (2) upper leaves changed yellow color, (3) edges of cotyledon changed yellow color lightly, (4) upper leaves changed yellow color were observed. The case using zinc nitrate by penetrating aqueous solutions fertilization, it was observed (1) the poor growth of leaves, (2) cotyledon changed yellow color, (3) edges of cotyledon changed yellow color lightly, (4) upper leaves changed yellow color. The case using copper sulfate by all layer fertilization, it was observed (1) germination failure, (2) upper leaves changed yellow color, (3) the backside of upper leaves changed in purple-red color. In the case of penetrating aqueous solutions fertilization, it was not observed any symptoms. The case using copper nitrate by penetrating aqueous solutions fertilization, it was not observed any symptoms.

Key words vegetation test on the harm against plants, komatsuna, zinc sulfate, zinc nitrate, copper sulfate, copper nitrate, excessive symptoms, yellowing of leaves

(Research Report of Fertilizer, **10**, 208~241, 2017)

12 試験紙による肥料成分の検出

齋藤晴文¹, 五十嵐総一², 佐久間健太¹, 橋本良美¹, 田丸直子¹, 平田絵理香³,
添田英雄³, 白井裕治¹

キーワード 定性試験, 定性試験紙, 肥料, アンモニア性窒素, 硝酸性窒素, リン酸, 加里

1. はじめに

従来, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) が実施してきた肥料の定性法は, 分析機器の測定と異なり, 経験及び知識による判定となり, 特殊な技術が必要である。

このことから, 今回, 市販のアンモニウムイオン, 硝酸イオン, リン酸イオン及びカリウムイオンを検出する試験紙について, アンモニア性窒素, 硝酸性窒素, リン酸及び加里的定性試験法としての利用の可否について検討した。

2. 材料及び方法

1) 供試試料

流通しているなたね油かす及び魚かすを目開き 1 mm のふるいを全通するまで粉砕したもの並びに流通肥料 (普通肥料 12 銘柄, 汚泥肥料 6 銘柄) を試料として用いた。また, 添加試験に用いた硫酸アンモニア, 塩化加里及び硝酸石灰並びにカリウムイオン用試験紙の偽陽性の原因の確認試験に用いた塩化アンモニア, 硫酸アンモニア, リン酸一アンモニア及びリン酸二アンモニアについては, 試薬を肥料の代わりに用いた。

なお, 機器分析により求めた流通肥料中の成分含量は表 1 のとおり。

2) 試薬

- (1) 水: JIS K0557 に規定する A3 の水
- (2) くえん酸溶液: 特級 (関東化学) のくえん酸一水和物 20 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (3) 塩酸: 有害物質分析用 (和光純薬工業)
- (4) 28 % アンモニア水: 特級 (関東化学又は和光純薬工業)
- (5) 硫酸ナトリウム: 残留農薬試験・PCB 試験用 (関東化学)

3) 器具及び装置

- (1) 試験紙: 試験に用いた試験紙, その検出対象イオン及びその測定濃度範囲は表 2 のとおり。

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

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター (現) 長崎県北振興局農林部

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

(2) 100 mL 三角フラスコ

(3) 10 mL ポリエチレンテレフタレート製チューブ

表1 流通肥料の機器分析値

(質量分率 %)

	肥料の種類	アンモニア 性窒素	硝酸性 窒素	水溶性 りん酸	水溶性 加里	く溶性 りん酸	く溶性 加里	塩酸可溶 性りん酸	塩酸可溶 性加里
グループ A ^{c)}	過りん酸石灰	— ^{a)}	—	12.3	—	—	—	—	—
	熔成りん肥	—	—	—	—	20.3	0.1	20.2	0.2
	けい酸加里肥料	—	—	—	—	0.3	19.1	0.3	20.4
	なたね油かす	N.D. ^{b)}	N.D.	0.4	1.2	0.9	1.4	0.9	1.5
	魚かす	0.2	N.D.	0.9	1.3	6.4	1.3	6.6	1.4
グループ B ^{d)}	指定配合肥料①	6.5	N.D.	12.3	7.7	—	—	—	—
	指定配合肥料②	4.1	0.03	6.4	6.5	—	—	—	—
	化成肥料	6.3	0.07	5.1	11.5	—	—	—	—
	硫酸苦土肥料	N.D.	N.D.	N.D.	0.1	—	—	—	—
	鉍さいけい酸質肥料	N.D.	N.D.	N.D.	0.1	—	—	—	—
グループ C ^{e)}	混合りん酸肥料	—	—	—	—	4.7	0.4	4.9	0.4
	鉍さいけい酸質肥料	—	—	—	—	0.1	0.4	0.2	0.4
	熔成りん肥	—	—	—	—	20.2	0.2	20.3	0.2
	成形複合肥料	—	—	—	—	10.7	11.3	10.6	11.4
グループ D ^{f)}	汚泥発酵肥料①	N.D.	N.D.	0.1	0.3	0.6	0.5	0.7	0.5
	汚泥発酵肥料②	0.4	N.D.	0.7	2.0	1.8	2.6	1.9	2.6
	汚泥発酵肥料③	N.D.	0.27	0.5	1.6	3.0	1.9	3.1	1.8
	工業汚泥肥料①	0.2	N.D.	0.4	0.2	4.5	0.3	4.8	0.3
	工業汚泥肥料②	0.5	N.D.	0.6	0.2	3.0	0.3	3.2	0.3
	し尿汚泥肥料	0.2	N.D.	0.6	0.3	1.3	0.4	1.3	0.4

a) 機器分析実施せず

b) 定量下限未満

c) 添加試験に用いた試料

d) 流通肥料(普通肥料)の試験(水による抽出)に用いた試料

e) 流通肥料(普通肥料)の試験(くえん酸溶液による抽出)に用いた試料

f) 流通肥料(汚泥肥料)の試験(水、くえん酸溶液及び塩酸(1+23)による抽出)に用いた試料

表2 試験に用いた試験紙, その検出対象イオン及びその測定濃度範囲

試験紙の種類	検出対象イオン	測定濃度範囲(mg/L)
MQuant TM Ammonium Test	アンモニウムイオン	10 ~ 400
MQuant TM Nitrate Test	硝酸イオン	10 ~ 500
QUANTOFIX [®] Nitrate/Nitrite		10 ~ 500
MQuant TM Phosphate Test	りん酸イオン	10 ~ 500
MQuant TM Potassium Test	カリウムイオン	250 ~ 1500
QUANTOFIX [®] Potassium		200 ~ 1500

4) 試験方法

(1) 抽出

(i) 水による抽出

ア 調製肥料

硫酸アンモニア、塩化加里及び過りん酸石灰のうち2種類を2.5 g ずつ秤量し、100 mL 三角フラスコに入れ、水平方向に振り混ぜ混合した。採取量の約20倍量の水を加え30秒間振り混ぜ試料溶液とした。

イ 調製肥料以外

分析試料0.5~5 gをはかりとり、10 mL ポリエチレンテレフタレート製チューブ又は100 mL 三角フラスコに入れた。採取量の約20倍量の水を加え30秒間振り混ぜ試料溶液とした。必要に応じてろ過した。

(ii) くえん酸溶液及び塩酸(1+23)による抽出

ア 調製肥料

硫酸アンモニア、塩化加里及び過りん酸石灰のうち2種類を2.5 g ずつ秤量し、100 mL 三角フラスコに入れ、水平方向に振り混ぜ混合した。採取量の約20倍量のくえん酸溶液又は塩酸(1+23)を加え、30秒間振り混ぜ又は1時間適宜振り混ぜ試料溶液とした。

イ 調製肥料以外

分析試料0.5~5 gをはかりとり、10 mL ポリエチレンテレフタレート製チューブ又は100 mL 三角フラスコに入れ、採取量の約20倍量のくえん酸溶液又は塩酸(1+23)を加え、30秒間振り混ぜ又は1時間適宜振り混ぜ試料溶液とした。必要に応じてろ過した。

(2) 定性反応操作及び判定

(i) アンモニウムイオン

試料溶液約5 mLを10 mLのプラスチック製チューブに入れ、付属の試薬10滴を加えて振り混ぜ、試験紙の反応部分をこの試薬液中に3秒間入れた。試験紙を取り出した後余分な水分を除き、10秒間静置した。試験紙が橙色に発色した場合、試料溶液にアンモニウムイオンが含まれていると判定した。

(ii) 硝酸イオン

試料溶液に試験紙の反応部分を1秒間入れ、試験紙を取り出した後余分な水分を除き、1分間静置した。試験紙が紫色に発色した場合、試料溶液に硝酸イオンが含まれていると判定した。

(iii) りん酸イオン

試料溶液に試験紙の反応部分を1秒間入れ、試験紙を取り出した後余分な水分を除き、付属の試薬1滴を試験紙の反応部に落とし、15秒間待った。余分な水分を除いた後、60秒間静置し、試験紙が藍色に発色した場合、試料溶液にりん酸イオンが含まれていると判定した。

(iv) カリウムイオン

ア MQuant™ Potassium Test

試料溶液に試験紙の反応部分を1秒間入れ、試験紙を取り出した後余分な水分を除き、付属の試薬1滴を試験紙の反応部に落とし、試験紙が橙色に発色した場合、試料溶液にカリウムイオンが含まれていると判定した。

イ QUANTOFIX® Potassium

試料溶液に試験紙の反応部分を1秒間入れ、試験紙を取り出した後余分な水分を除き、10 mL ポリエチレンテレフタレート製チューブに入れた付属の試薬に試験紙の反応部分を60秒間入れた。試験紙が橙色に発色した場合、試料溶液にカリウムイオンが含まれていると判定した。

3. 結果及び考察

1) 添加試験の結果(水による抽出)

なたね油かす、魚かす及び調製肥料に、硫酸アンモニア、硝酸石灰、過りん酸石灰及び塩化加里を、0.5 %及び2.0 % (質量分率、以下同じ。)相当量を添加し、2の4)(1)(i)水による抽出を行った溶液について2の4)(2)の各操作を実施した結果を表3及び写真1~6に示した。

添加試験ではMQuant™とQUANTOFIX®の定性結果は一致した。

硫酸アンモニア及び硝酸石灰の添加試験では、0.5 %、2.0 %ともにアンモニウムイオン及び硝酸イオンの定性反応を示した。(写真1~3)

過りん酸石灰の添加試験では、0.5 %、2.0 %ともにりん酸イオンの定性反応を示した。ただし、水溶性りん酸を多く含む魚かすについては、過りん酸石灰を添加しなくてもりん酸イオンの定性反応を強く示したため、添加の影響を確認出来なかった。(写真4)

塩化加里の添加試験では、水溶性加里を多く含むなたね油かす及び魚かすについて、塩化加里を添加しなくてもカリウムイオンの定性反応を強く示したため、添加の影響を確認出来ず、水溶性加里を含まない調製肥料においても、塩化加里を添加しなくてもカリウムイオンの定性反応を強く示したため、添加の影響を確認出来なかった。なお、肥料に添加したのと同量の試薬を水に加えたブランク試験において、0.5 %相当量(メーカー推奨測定対象範囲未満)の添加区では、カリウムイオンの定性反応を示さなかった。(写真5及び6)

表3 添加試験の結果(水による抽出)

添加成分 (検出対象イオン)	添加割合 (%) ^{a)}	ブランク	なたね油 かす	魚かす	調製肥料 (①+② ^{b)})	調製肥料 (②+③ ^{b)})	調製肥料 (①+③ ^{b)})
硫酸アンモニア (アンモニウム イオン)	2.0	+ ^{c)}	+	+	N.E. ^{d)}	+	N.E.
	0.5	+	+	+	N.E.	+	N.E.
	0	-	+ -	+ -	N.E.	-	N.E.
硝酸石灰 (硝酸イオン)	2.0	+	+	+	N.E.	+	N.E.
	0.5	+	+	+	N.E.	+	N.E.
	0	-	-	-	N.E.	-	N.E.
過りん酸石灰 (りん酸イオン)	2.0	+	+	+	N.E.	N.E.	+
	0.5	+	+	+	N.E.	N.E.	+
	0	-	+	+	N.E.	N.E.	-
塩化加里 (カリウムイオン)	2.0	+	+	+	+	N.E.	N.E.
	0.5	-	+	+	+	N.E.	N.E.
	0	-	+	+	+	N.E.	N.E.

a) 質量分率

b) ① 硫酸アンモニア, ② 過りん酸石灰, ③ 塩化加里, 混合割合は1:1

c) +: 定性試験陽性, +-: 定性試験陽性(微弱), -: 定性試験陰性

d) 試験実施せず

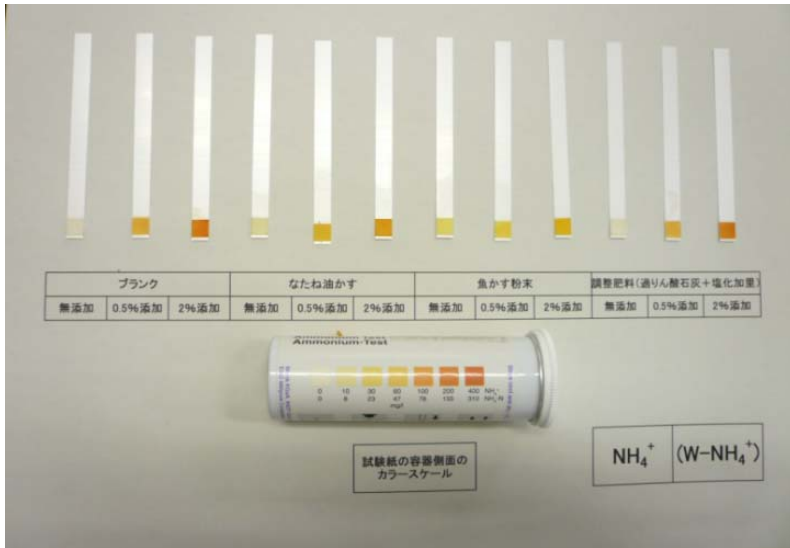


写真1 硫酸アンモニアの添加試験結果

試験紙

MQuant™ Ammonium Test

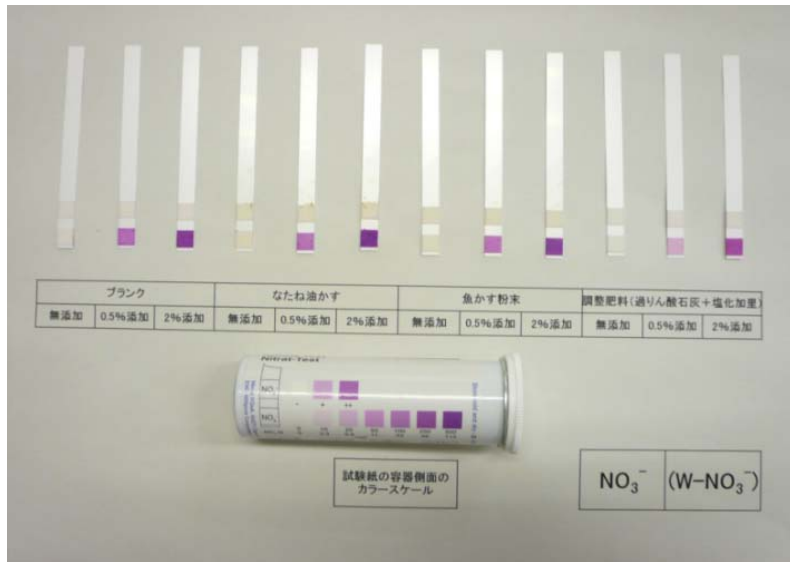


写真2 硝酸石灰の添加試験結果

試験紙

MQuant™ Nitrate Test

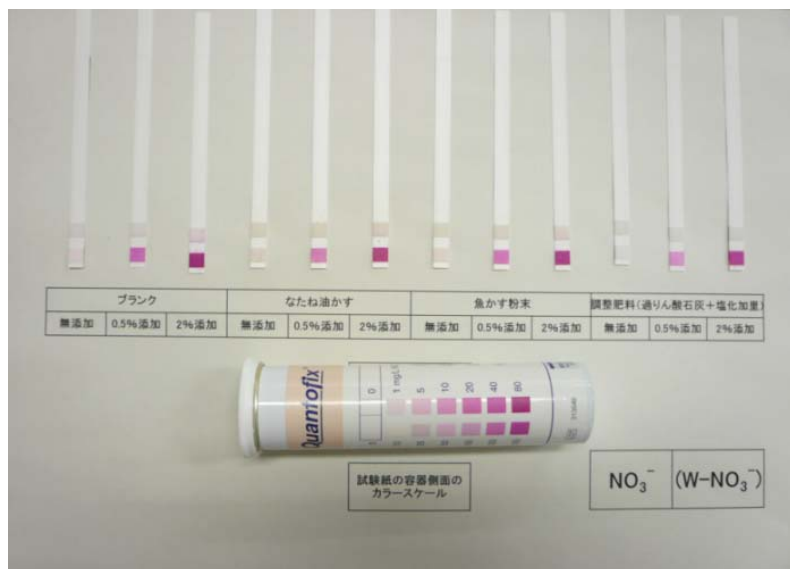


写真3 硝酸石灰の添加試験結果

試験紙

QUANTOFIX® Nitrate/Nitrite

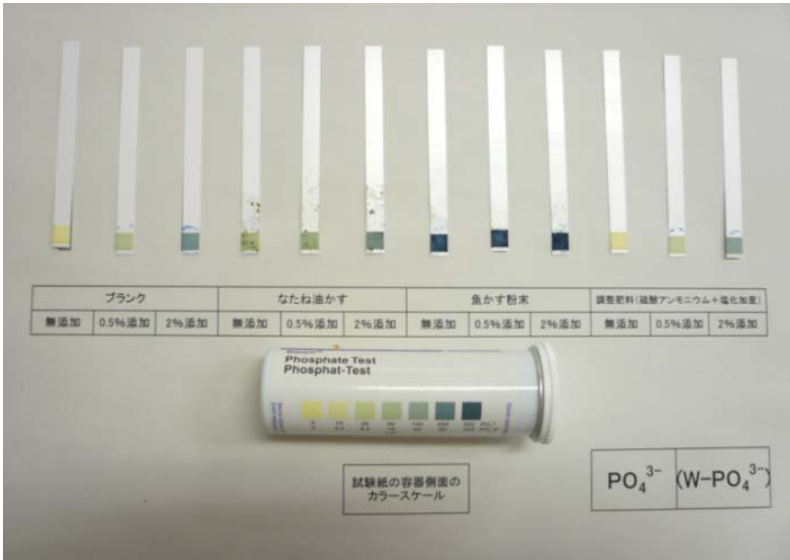


写真 4 過りん酸石灰の添加試験結果

試験紙

MQuant™ Phosphate Test

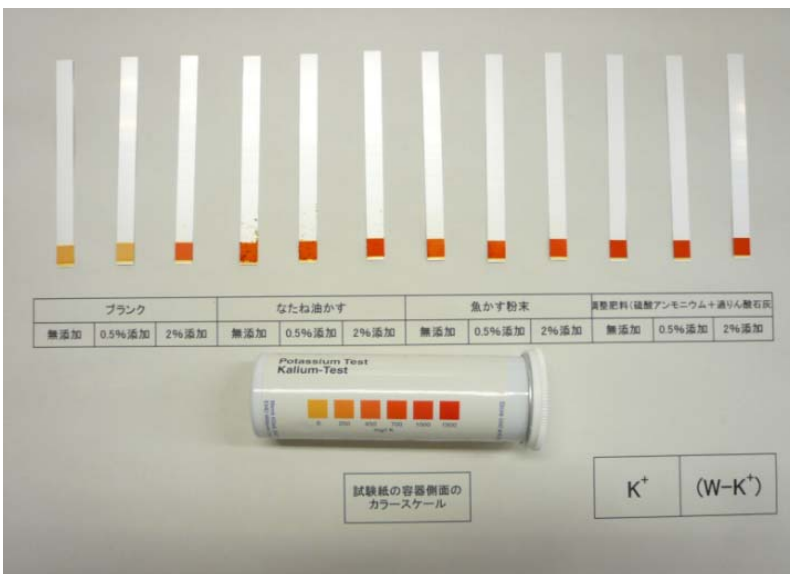


写真 5 塩化加里の添加試験結果

試験紙

MQuant™ Potassium Test

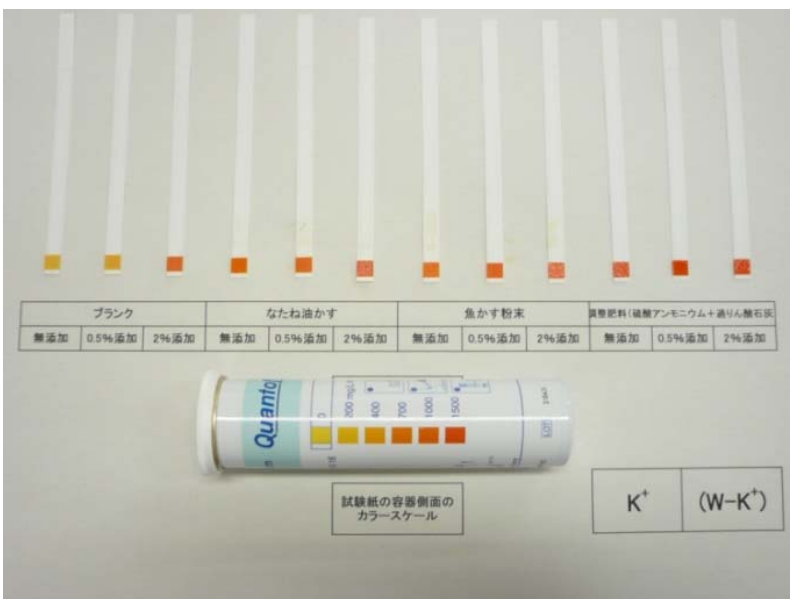


写真 6 塩化加里の添加試験結果

試験紙

QUANTOFIX® Potassium

2) 添加試験の結果(くえん酸溶液による抽出)

なたね油かす、魚かす及び調製肥料に、熔成りん肥及びけい酸加里肥料を、0.5 %及び 2.0 %相当量を添加し、2 の 4) (1) (ii)くえん酸溶液による抽出を行った溶液について 2 の 4) (2)の各操作を実施した結果を表 4 及び写真 7～12 に示した。熔成りん肥及びけい酸加里肥料が 30 秒間振とうでは溶解しない可能性を考慮し、1 時間静置し、その間適宜振とうを行う抽出方法との比較を行った。

添加試験では MQuant™と QUANTOFIX®の定性結果は一致した。

熔成りん肥の添加試験では、30 秒間振とうでりん酸イオンの定性反応を示さなかったが、1 時間適宜振とうではりん酸イオンの定性反応を示すものがあつた。なお、く溶性りん酸を多く含む魚かすについては、30 秒間振とう、1 時間適宜振とうのいずれも、熔成りん肥を添加しなくても強くりん酸イオンの定性反応を強く示したため、添加による差を確認出来なかつた。(写真 7 及び 8)

けい酸加里肥料の添加試験では、く溶性加里を多く含むなたね油かす及び魚かすについて、けい酸加里肥料を添加しなくてもカリウムイオンの定性反応を強く示したため、添加の影響を確認出来ず、まったく溶性加里を含まない調製肥料においても、けい酸加里肥料を添加しなくても強くカリウムイオンの定性反応を示したため、添加の影響を確認出来なかつた。なお、肥料に添加したのと同量の肥料を水に加えたブランク試験において、0.5 %及び 2.0 %相当量(メーカー推奨測定対象範囲未満)の添加区では、カリウムイオンの定性反応を示さなかつた。(写真 9～12)

表4 添加試験の結果(くえん酸溶液による抽出)

添加成分 (検出対象イオン)	添加割合 (%) ^{a)}	ブランク		なたね油かす		魚かす		調製肥料 (①+② ^{b)})		調製肥料 (①+③ ^{b)})	
		30 s ^{c)} 1 h ^{c)}		30 s	1 h	30 s	1 h	30 s	1 h	30 s	1 h
		熔成りん肥 (りん酸イオン)	2.0	+ ^{d)}	+	+	+	+	+	N.E. ^{e)}	N.E.
	0.5	-	+	+	+	+	+	N.E.	N.E.	-	-
	0	-	-	+	+	+	+	N.E.	N.E.	-	-
けい酸加里肥料 (カリウムイオン)	2.0	-	-	+	+	+	+	+	+	N.E.	N.E.
	0.5	-	-	+	+	+	+	+	+	N.E.	N.E.
	0	-	-	+	+	+	+	+	+	N.E.	N.E.

a) 質量分率

b) ① 硫酸アンモニア, ② 過りん酸石灰, ③ 塩化加里, 混合割合は1:1

c) 30 s: 30秒間振とう, 1 h: 1時間適宜振とう

d) +: 定性試験陽性, +-: 定性試験陽性(微弱), -: 定性試験陰性

e) 試験実施せず

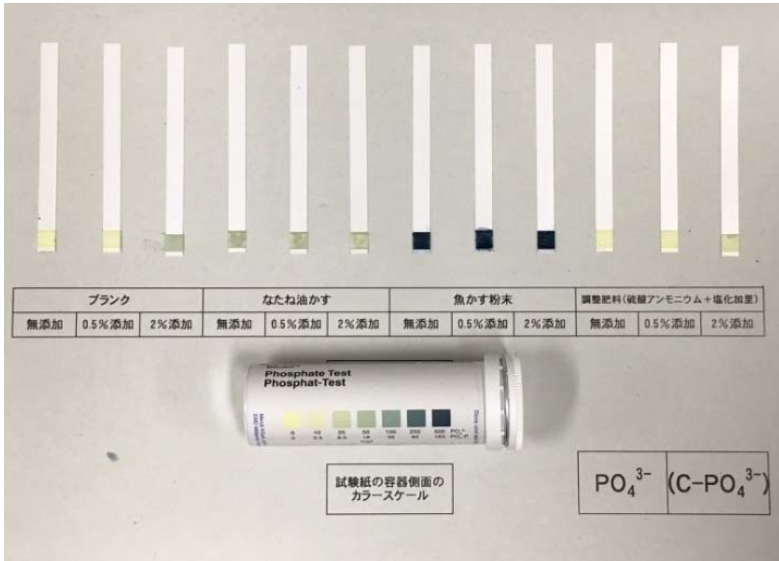


写真 7 熔成りん肥の添加試験結果

抽出方法

くえん酸溶液 30 秒間振とう

試験紙

MQuant™ Phosphate Test

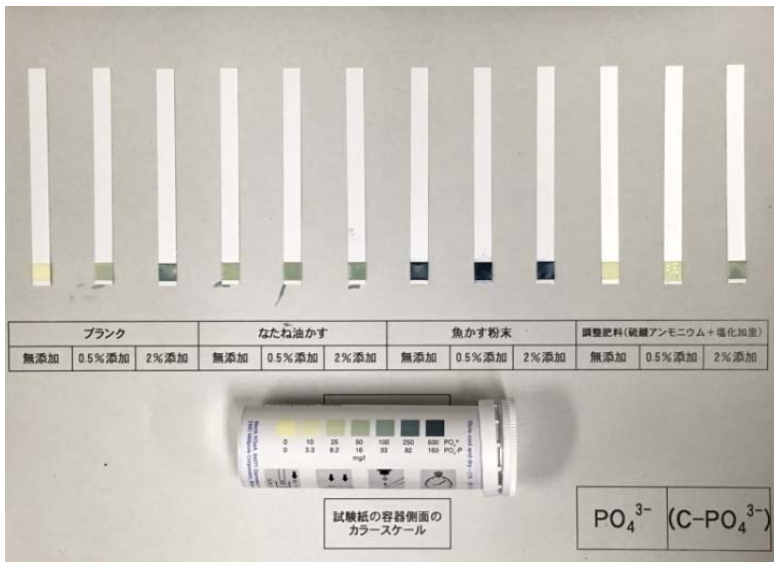


写真 8 熔成りん肥の添加試験結果

抽出方法

くえん酸溶液 1 時間適宜振とう

試験紙

MQuant™ Phosphate Test

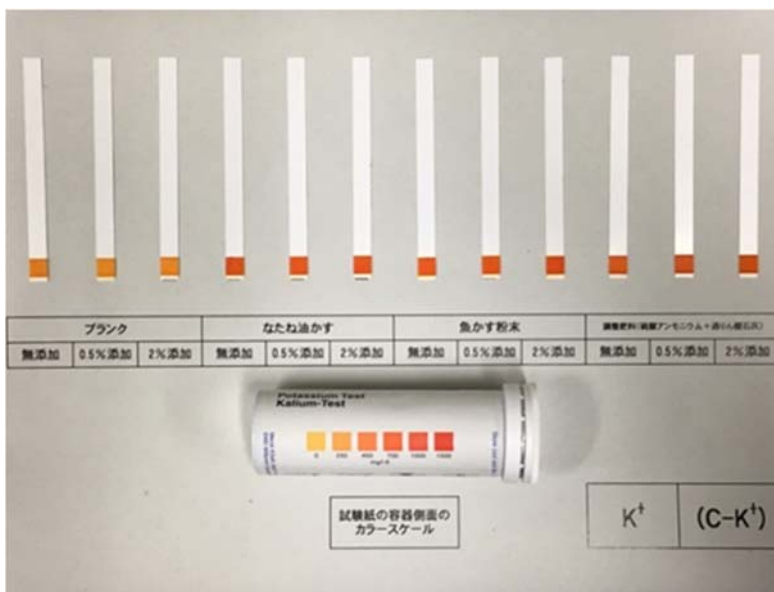


写真 9 けい酸加里肥料の添加試験
結果

抽出方法

くえん酸溶液 30 秒間振とう

試験紙

試験紙:MQuant™ Potassium Test

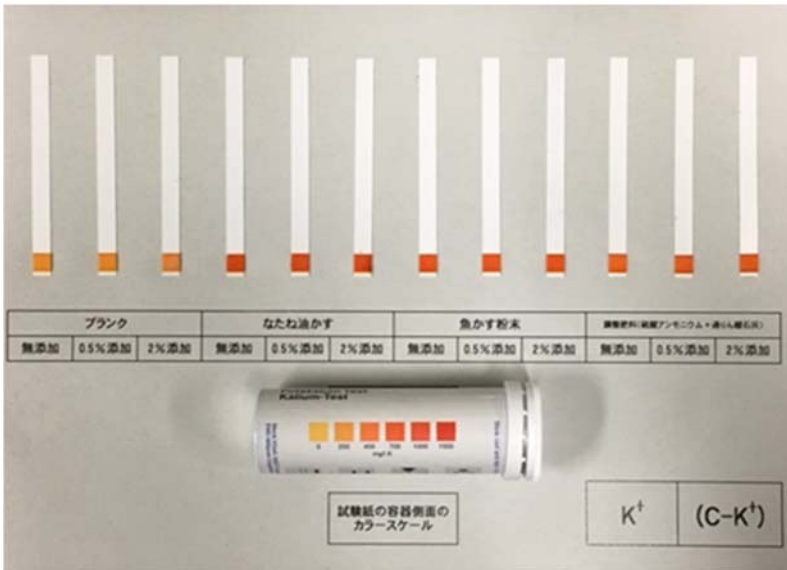


写真 10 けい酸加里肥料の添加試験結果

抽出方法

くえん酸溶液 1 時間適宜振とう

試験紙

MQuant™ Potassium Test

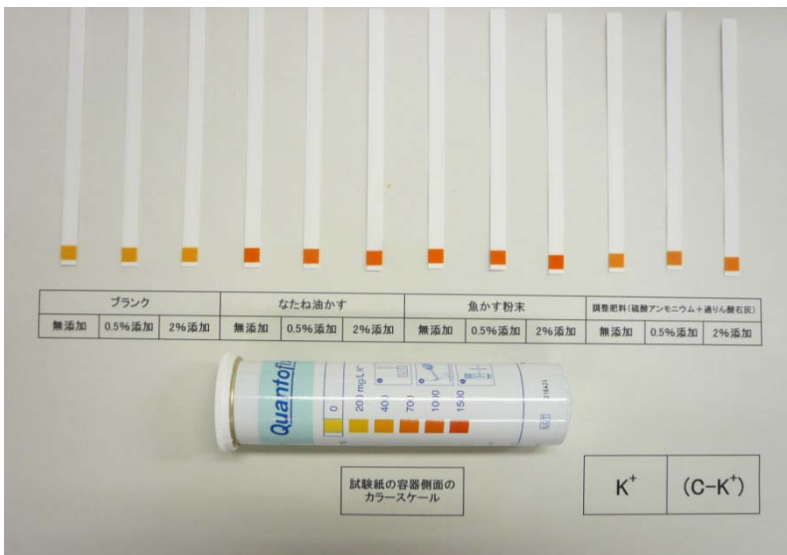


写真 11 けい酸加里肥料の添加試験結果

抽出方法

くえん酸溶液 30 秒間振とう

試験紙

QUANTOFIX® Potassium

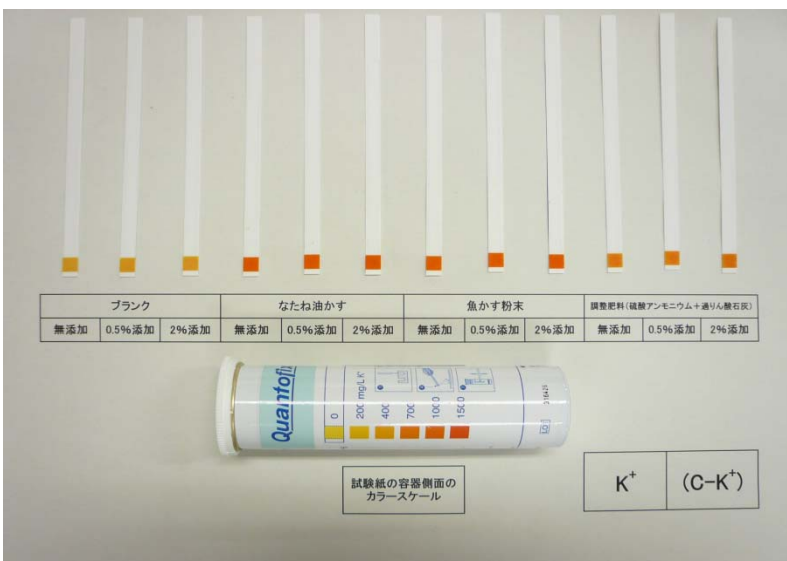


写真 12 塩化加里の添加試験結果

抽出方法

くえん酸溶液 1 時間適宜振とう

試験紙

QUANTOFIX® Potassium

3) カリウムイオン用試験紙における偽陽性の原因の確認

塩化加里の添加試験及びけい酸加里の添加試験において、水溶性及びく溶性加里を含まない調製肥料においてもカリウムイオンの定性反応を示したことから、調製肥料の原料として用いた過りん酸石灰及び硫酸アンモニウム由来のイオンが偽陽性の原因として疑われた。

それぞれのイオンを含む水溶液を調製し、2の4)(2)(iv)アの操作を実施した結果、試験紙は、25 g/Lの過りん酸石灰溶液はカリウムイオンの定性反応を示さず、25 g/Lの硫酸アンモニウム溶液はカリウムイオンの定性反応を示した。さらに硫酸ナトリウム溶液と、アンモニア水を用いて2の4)(2)(iv)アの操作を実施したところ、硫酸ナトリウム溶液は25 g/Lの濃度までカリウムイオンの定性反応を示さず、アンモニア水は0.60%の濃度でカリウムイオンの定性反応を示した。(写真13及び14)

以上の結果から、偽陽性の原因はアンモニウムイオンであると考えられたため、アンモニアを含有する4種の肥料(塩化アンモニア、硫酸アンモニア、りん酸一アンモニア及びりん酸二アンモニア)を1 g/L～4 g/L含む溶液をそれぞれ調製し、2の4)(2)(iv)ア及びイの操作を実施したところ、すべて4 g/L以下の濃度でもカリウムイオンの定性反応を示した。(写真15～18)

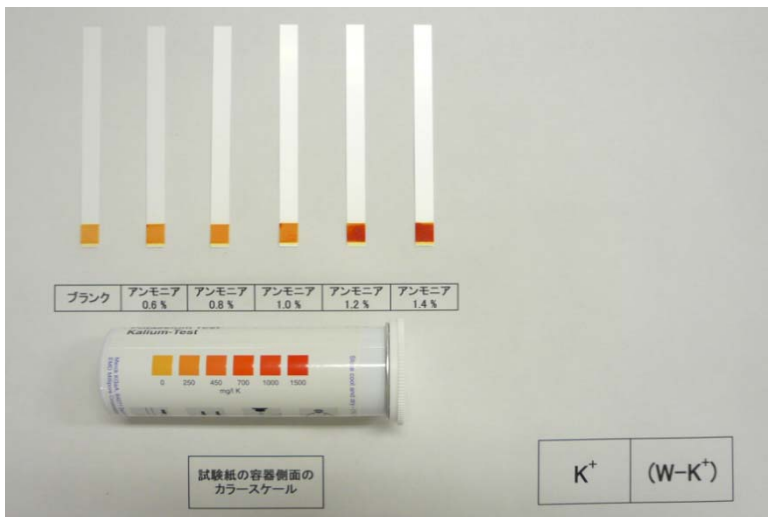


写真13 アンモニア水の偽陽性試験結果

試験紙
MQuant™ Potassium Test



写真14 アンモニア水の偽陽性試験結果

試験紙
QUANTOFIX® Potassium

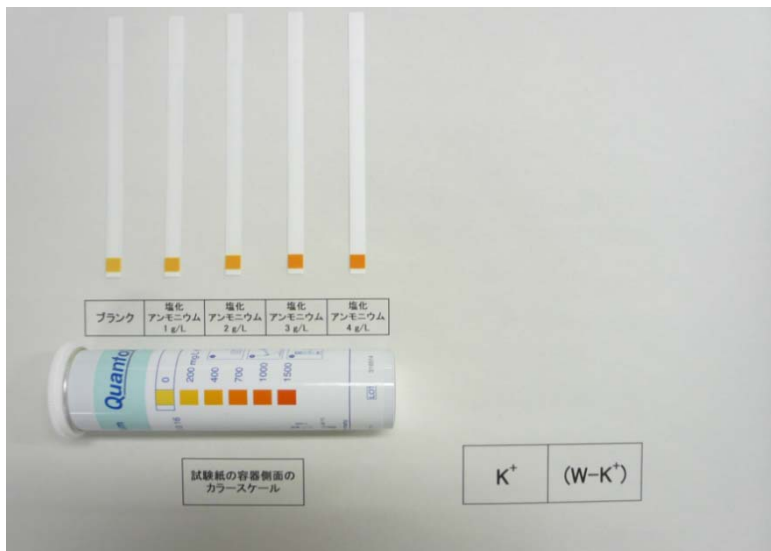


写真 15 塩化アンモニアの偽陽性
試験結果

試験紙

QUANTOFIX[®] Potassium

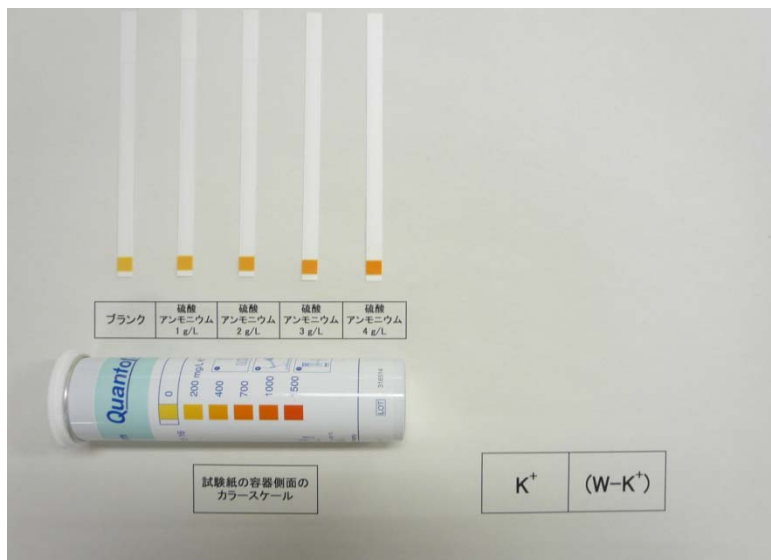


写真 16 硫酸アンモニアの偽陽性
試験結果

試験紙

QUANTOFIX[®] Potassium

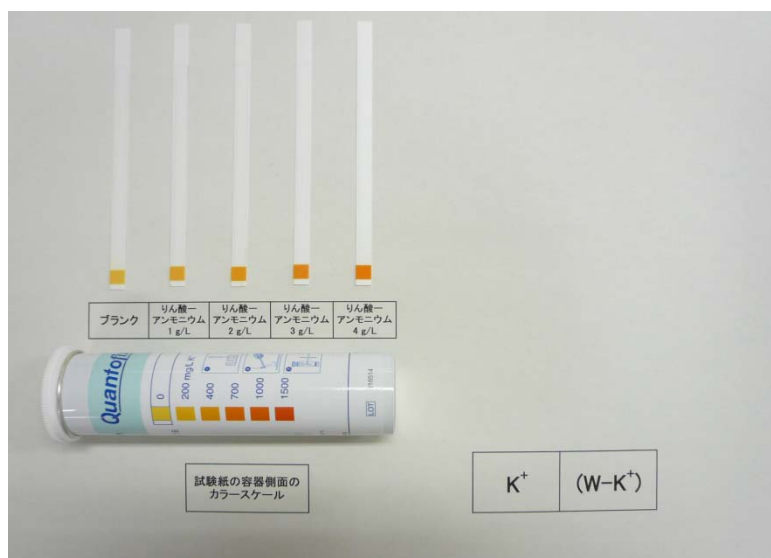


写真 17 りん酸一アンモニアの偽陽性
試験結果

試験紙

QUANTOFIX[®] Potassium

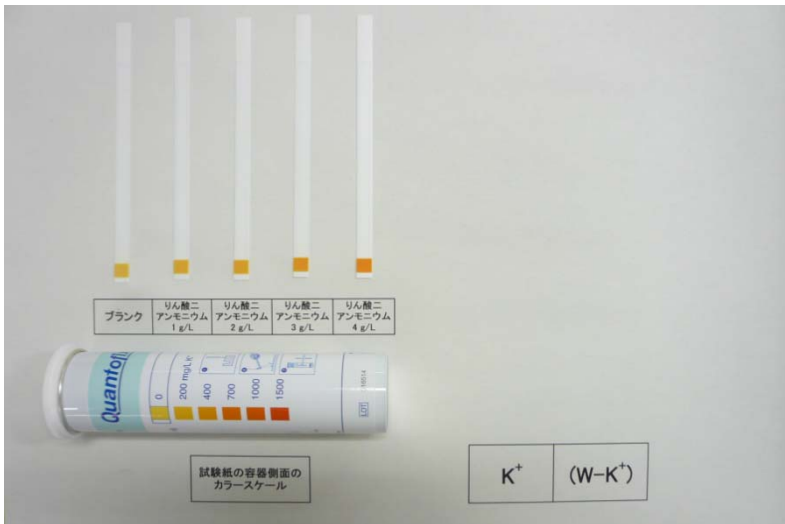


写真 18 リン酸二アンモニアの偽陽性試験結果

試験紙

QUANTOFIX[®] Potassium

4) 流通肥料(普通肥料)の結果(水による抽出)

指定配合肥料 2 銘柄, 化成肥料 1 銘柄, 硫酸苦土肥料 1 銘柄及び鉍さいけい酸質肥料 1 銘柄を用いて, 2 の 4) (1) (i) 水による抽出を行った溶液について 2 の 4) (2) の各操作を実施した結果を表 5 及び写真 19 ~24 に示した.

流通肥料の試験では MQuantTMと QUANTOFIX[®]の定性結果は一致した.

指定配合肥料及び化成肥料がカリウムイオンの定性反応を示したことについては, 3) で示したアンモニウムイオンによる偽陽性の可能性も考えられた.

表5 流通肥料(普通肥料)の確認(水による抽出)

検出対象イオン	指定配合肥料①	指定配合肥料②	化成肥料	硫酸苦土肥料	鉍さいけい酸質肥料
アンモニウムイオン	+a)	+	+	-	-
硝酸イオン	-	+ -	+	-	-
りん酸イオン	+	+	+	-	-
カリウムイオン	+	+	+	-	-

a) +: 定性試験陽性, +-: 定性試験陽性(微弱), -: 定性試験陰性

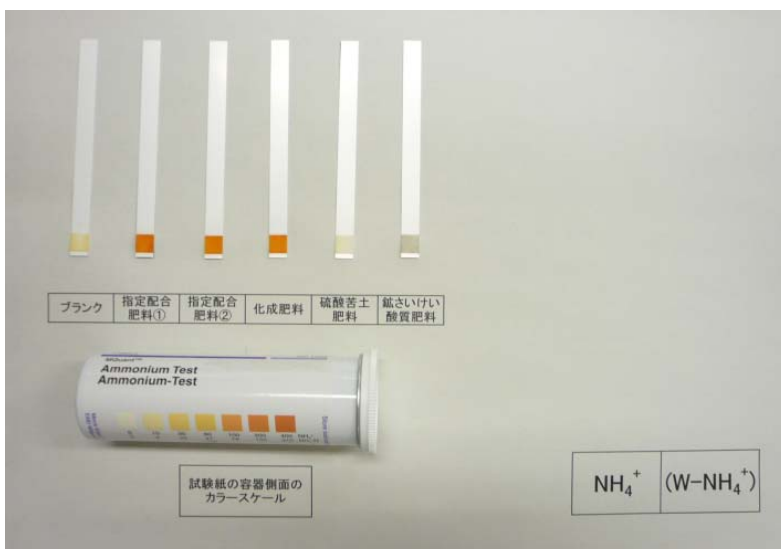


写真 19 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

MQuantTM Ammonium Test



写真 20 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Nitrate Test

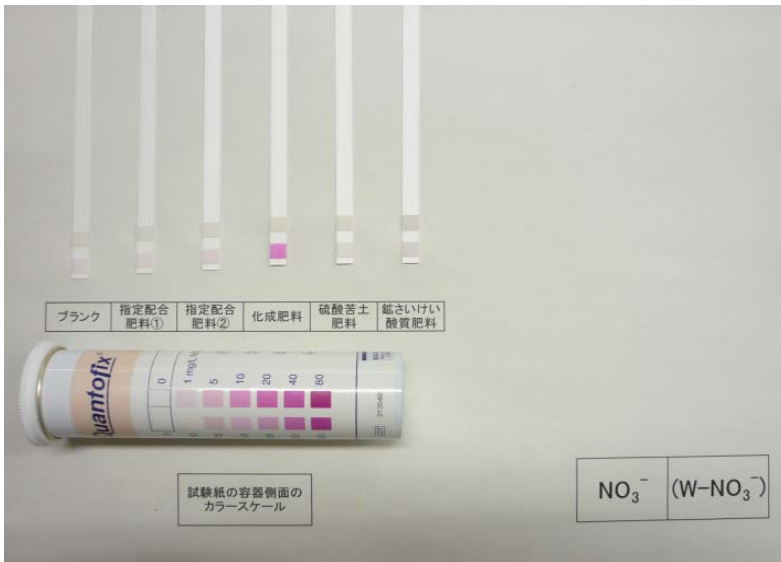


写真 21 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

QUANTOFIX® Nitrate/Nitrite

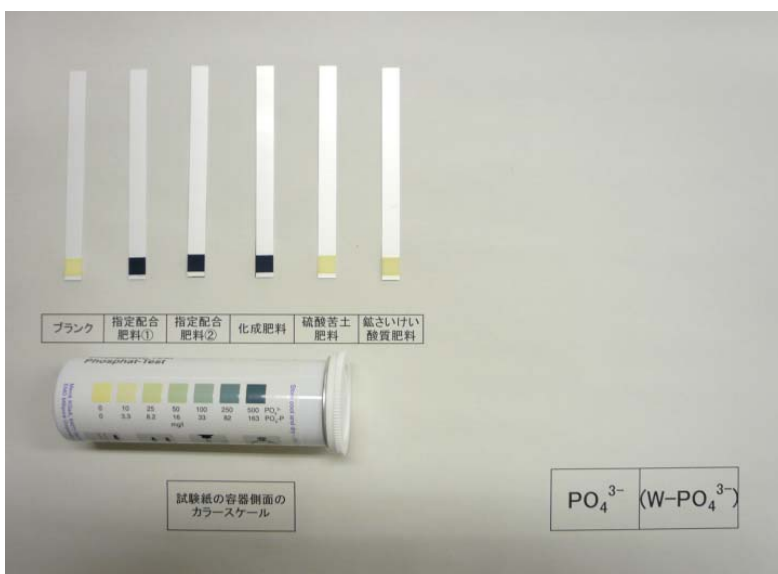


写真 22 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Phosphate Test

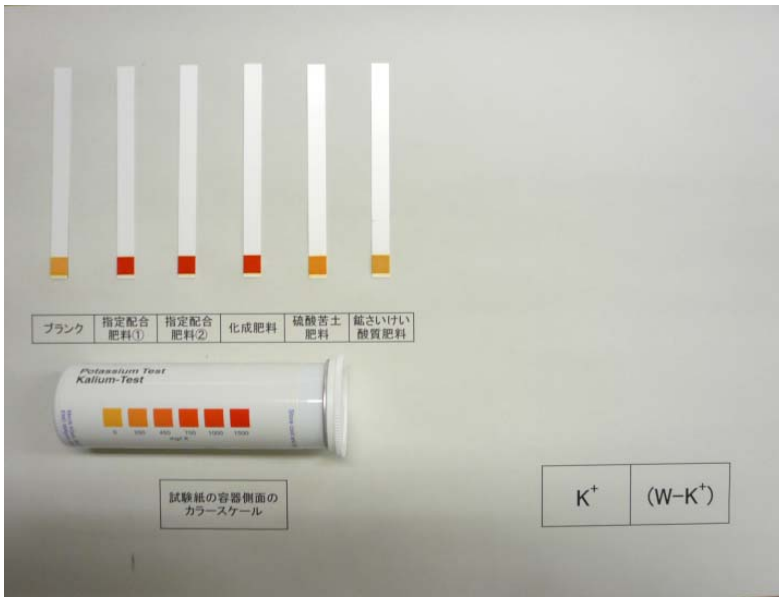


写真 23 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Potassium Test

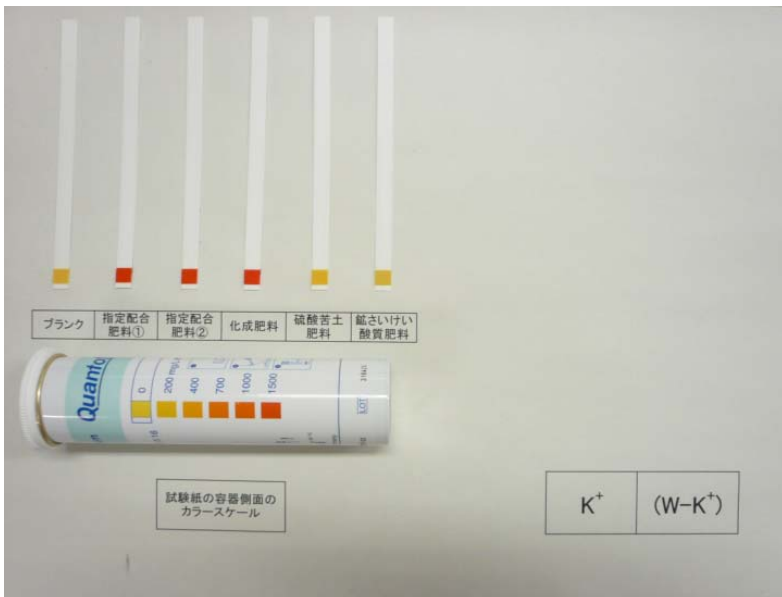


写真 24 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

QUANTOFIX® Potassium

5) 流通肥料(普通肥料)の結果(くえん酸溶液による抽出)

指定配合肥料, 混合りん酸肥料, 鉍さいけい酸質肥料, 熔成りん肥料及び成形複合肥料をそれぞれ1 銘柄ずつを用いて, 2 の 4) (1) (ii)くえん酸溶液による抽出を行った溶液について 2 の 4) (2)の各操作を実施した結果を表 6 及び写真 25~27 に示した.

カリウムイオン用試験紙について, 一部が MQuant™と QUANTOFIX®の試験紙で異なる定性反応を示したが, これはそれぞれの測定対象濃度範囲が異なるためと考えられた.

混合りん酸肥料, 鉍さいけい酸質肥料及び成形複合肥料がカリウムイオンの定性反応を示したことについては, 3)で示した偽陽性である可能性も考えられた. く溶性りん酸を含む 1 銘柄がりん酸イオンの定性反応を示さなかったが, 当該銘柄のく溶性りん酸は 0.1 % 以下と微量であった. 試験紙の測定対象濃度範囲を下回る量のく溶性りん酸を含む 2 銘柄がりん酸イオンの定性反応を示した.

表6 流通肥料(普通肥料)の確認(くえん酸溶液による抽出)

検出対象イオン	試験紙	混合りん酸 肥料	鉍さい けい酸質肥料	熔成りん肥	成形複合肥料
りん酸イオン	MQuant™ Phosphate Test	+ ^{a)}	-	+	+
カリウムイオン	MQuant™ Potassium Test	+	-	-	+
	QUANTOFIX® Potassium	+ -	+	-	+

a) +: 定性試験陽性, +-: 定性試験陽性(微弱), -: 定性試験陰性

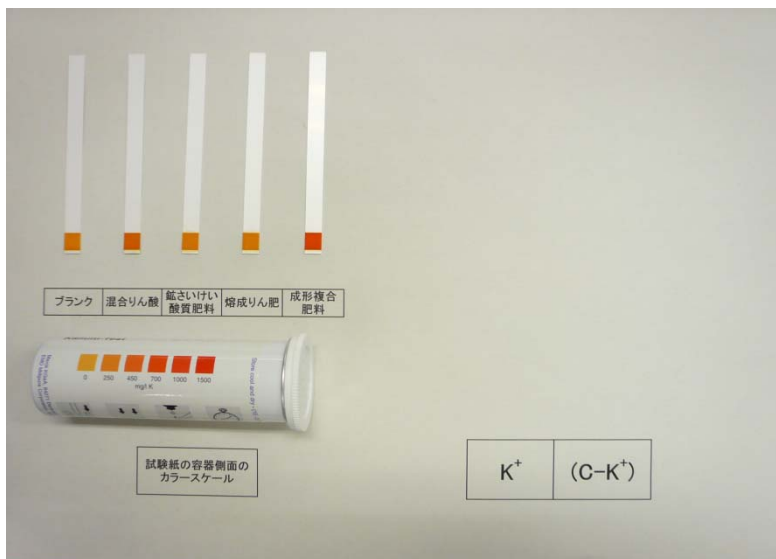


写真 25 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Potassium Test

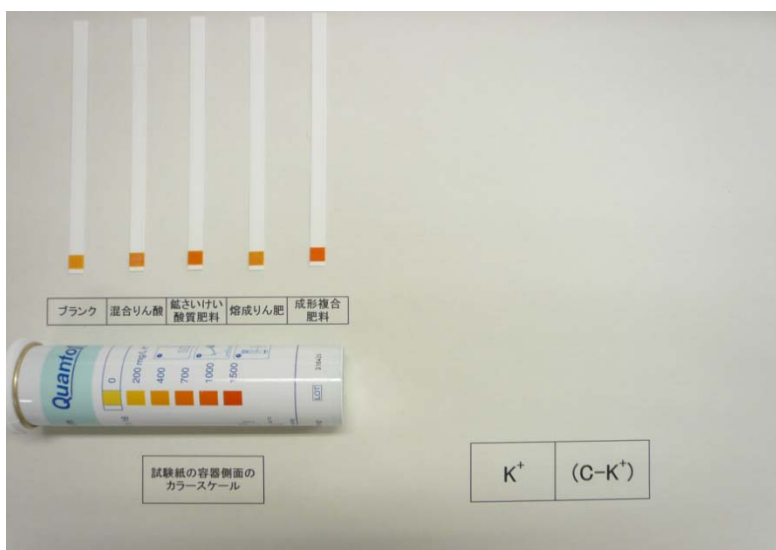


写真 26 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

QUANTOFIX® Potassium



写真 27 流通肥料(普通肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Phosphate Test

6) 流通肥料(汚泥肥料)の結果(水、くえん酸溶液及び塩酸による抽出)

汚泥発酵肥料 3 銘柄, 工業汚泥肥料 2 銘柄及び下水汚泥肥料 1 銘柄を用いて, 2 の 4) (1) (i) 水による抽出並びに 2 の 4) (1) (ii) くえん酸溶液及び塩酸(1+23)による抽出を行った溶液について 2 の 4) (2) の各操作を実施した結果を表 7 及び写真 28~39 に示した. なお, 水による抽出はアンモニウムイオン, 硝酸イオン, りん酸イオン及びカリウムイオンを対象とし, くえん酸溶液及び塩酸(1+23)による抽出はりん酸イオン及びカリウムイオンを対象とした.

流通肥料の試験では MQuant™ と QUANTOFIX® の定性結果は一致した.

試験紙の測定対象濃度範囲に入る量の水溶性りん酸を含む 1 銘柄がりん酸イオンの定性反応を示さなかったが, 当該銘柄の水溶性りん酸は 0.1 % 以下と微量であった. また, 塩酸可溶性の加里を 0.5 % ~ 2.6 % 含有する 3 銘柄が, カリウムイオンの定性反応を示さなかった.

また, 参考として, ろ過していない溶液を用いた定性反応の例を写真 40 に示した. ろ過していない溶液を用いると汚泥の着色により判定が困難となることから, 汚泥肥料の定性においては, ろ過が必要と考えられた.

表7 流通肥料(汚泥肥料)の確認(水、くえん酸溶液又は塩酸による抽出)

検出対象イオン	溶媒	汚泥発酵肥料①	汚泥発酵肥料②	汚泥発酵肥料③	工業汚泥肥料①	工業汚泥肥料②	下水汚泥肥料
アンモニウムイオン	水	- ^{a)}	+	-	+	+	+
硝酸イオン	水	-	-	+	-	-	-
りん酸イオン	水	-	+	+	+	+	+
	くえん酸溶液	+ -	+	+	+	+	+
カリウムイオン	塩酸	+	+	+	+	+	+
	水	-	+	+	-	+ -	-
	くえん酸溶液	+ -	+	+	+ -	+ -	+ -
	塩酸	-	-	-	-	-	-

a) +: 定性試験陽性, +-: 定性試験陽性(微弱), -: 定性試験陰性

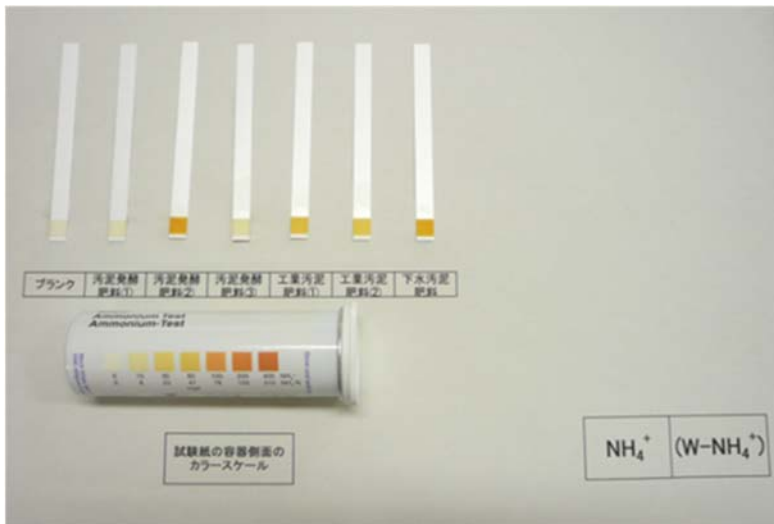


写真 28 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Ammonium Test

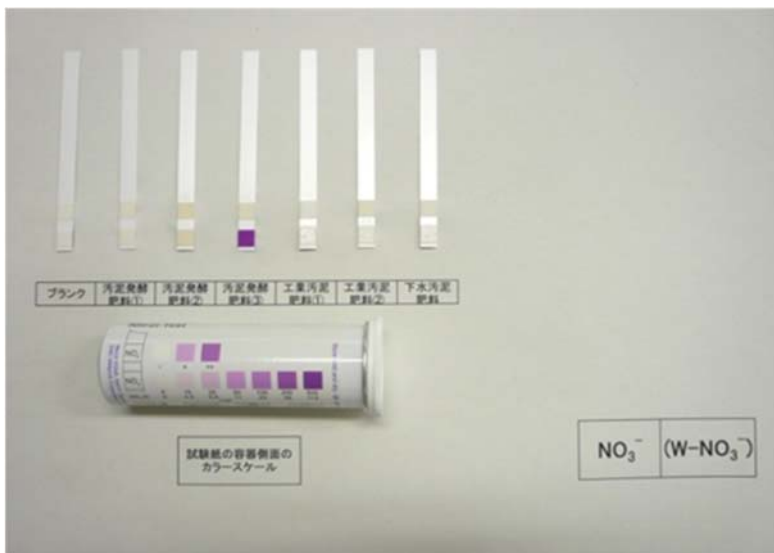


写真 29 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Nitrate Test



写真 30 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

QUANTOFIX® Nitrate/Nitrite

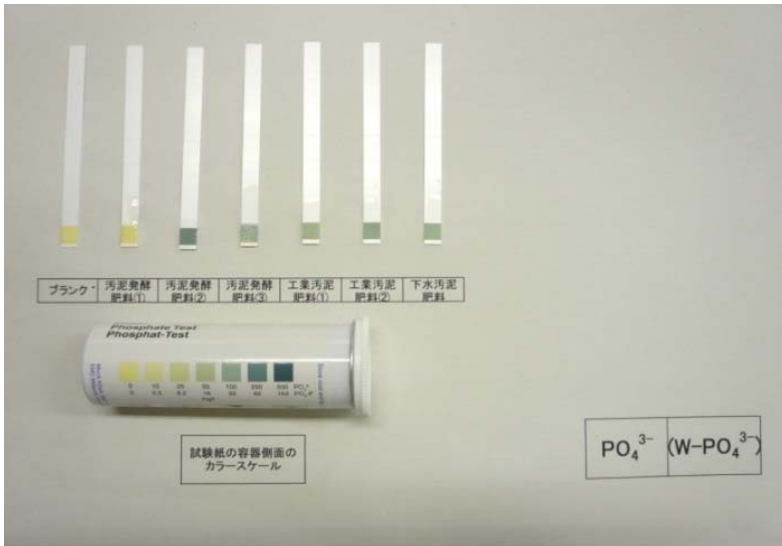


写真 31 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Phosphate Test

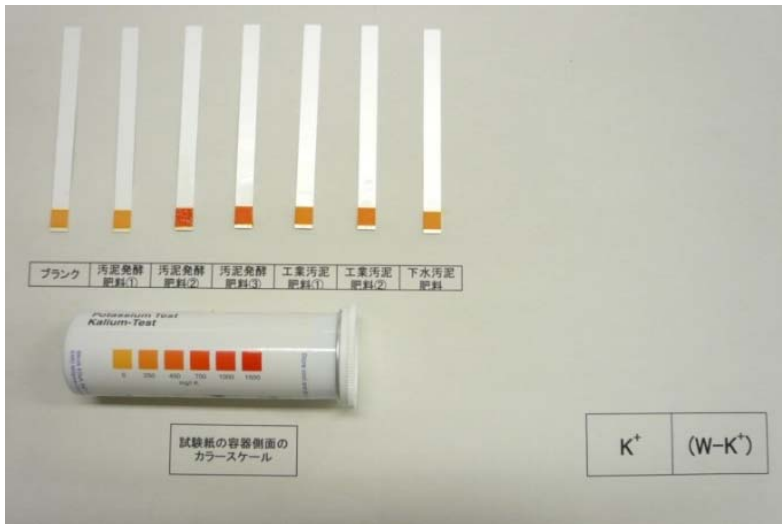


写真 32 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Potassium Test



写真 33 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

QUANTOFIX® Potassium

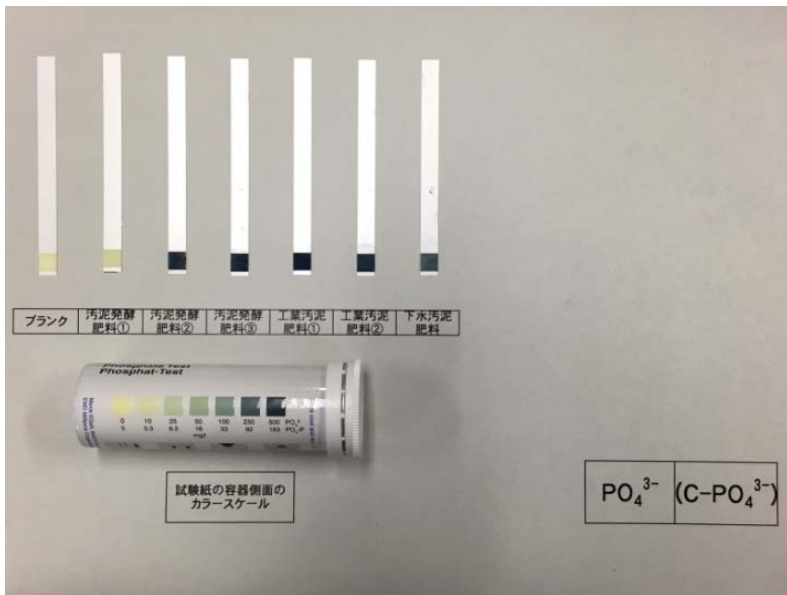


写真 34 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Phosphate Test

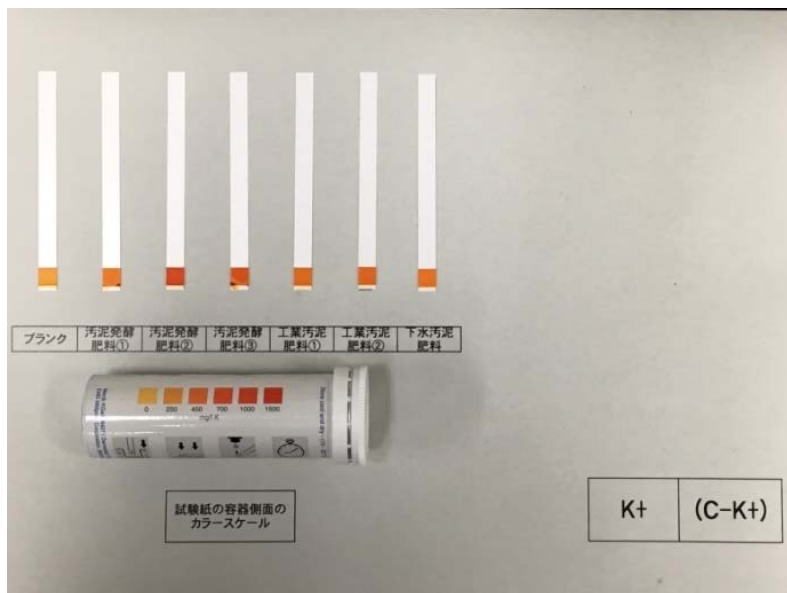


写真 35 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

MQuant™ Potassium Test

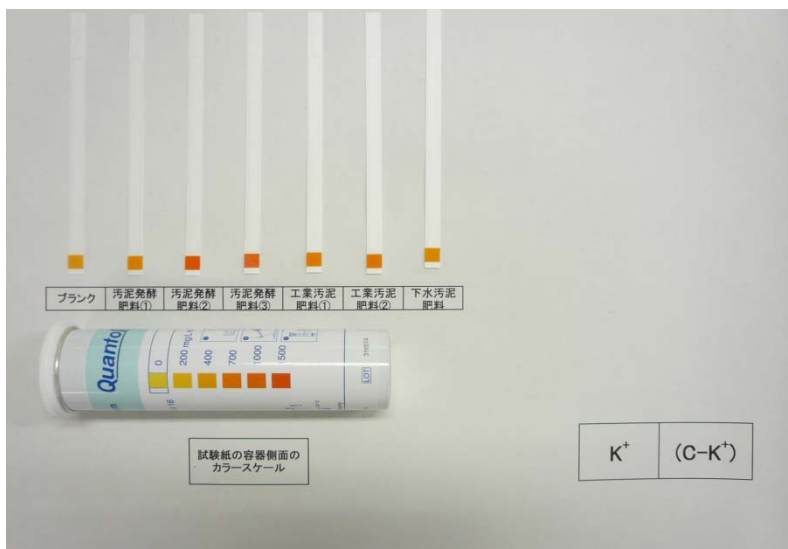


写真 36 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙

QUANTOFIX® Potassium

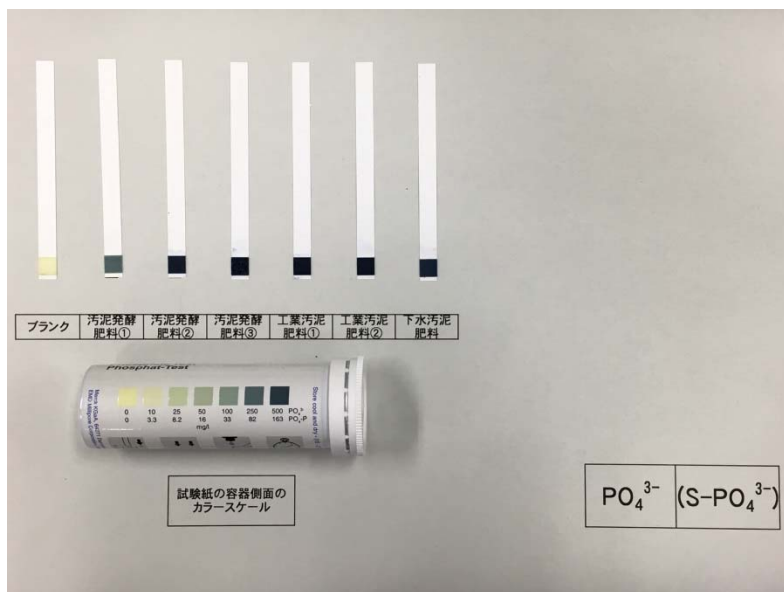


写真 37 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙
MQuant™ Phosphate Test

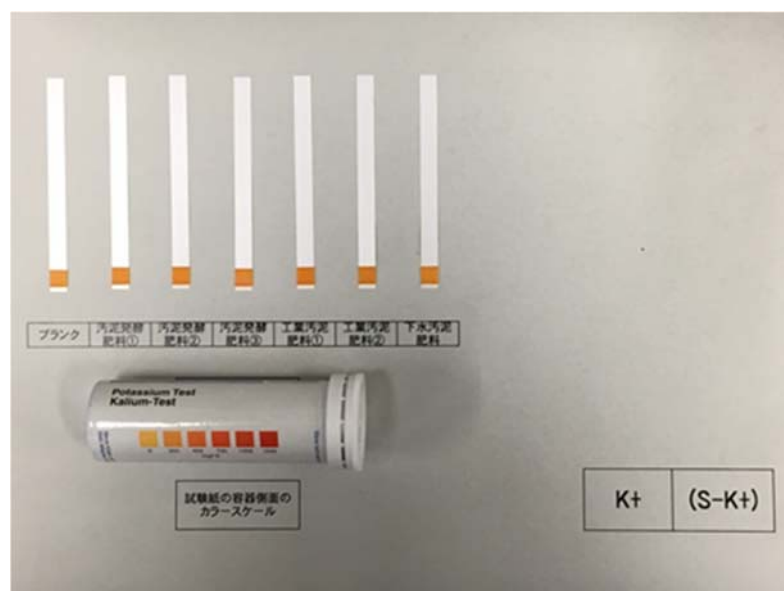


写真 38 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙
MQuant™ Potassium Test

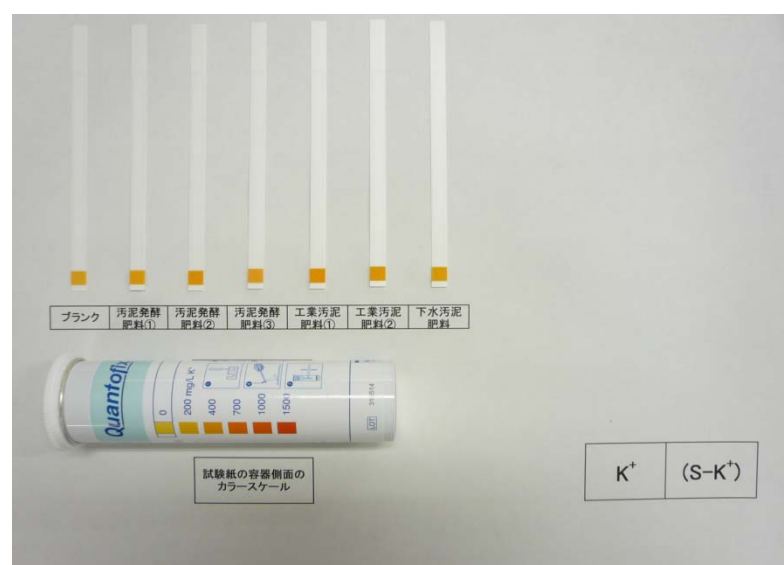


写真 39 流通肥料(汚泥肥料)の試験結果

試験紙
QUANTOFIX® Potassium



写真 40 ろ過していない溶液を用いた定性反応の例

試験紙

MQuant™ Ammonium Test

7) カリウムイオン用試験紙における偽陰性の原因の確認

6)の流通肥料(汚泥肥料)の塩酸(1+23)による抽出において、塩酸可溶性加里を比較的多量に含む試料がカリウムイオンの定性反応を示さなかったことについて、抽出液の pH が試験紙の反応域より低いことが原因として疑われた。

水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 9 付近に調整した溶液と未調整の溶液の反応を比較する追試を実施した結果、pH を 9 付近に調整した溶液はカリウムイオンの定性反応を示した。MQuant™ 及び QUANTOFIX®の両試験紙で結果は一致した(写真 41~42)。

以上の結果から、塩酸を用いた抽出の際は、溶液の pH 調整が必要であると考えられた。

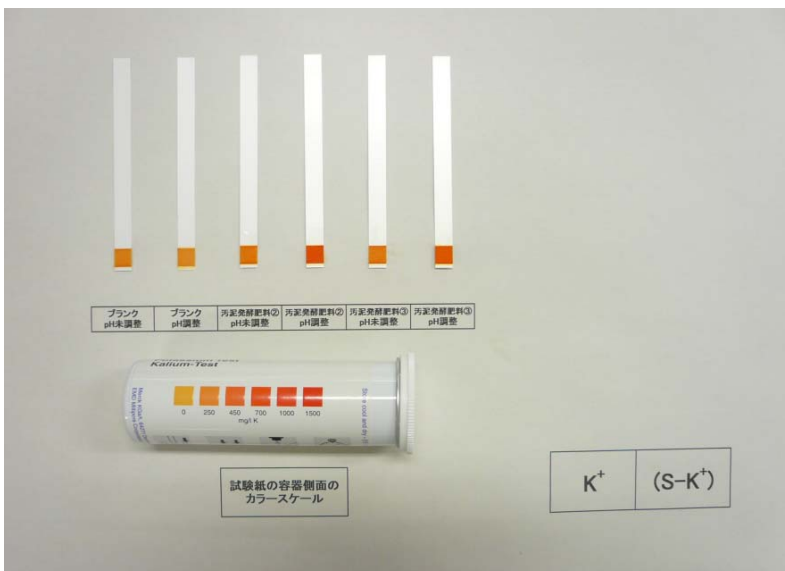


写真 41 pH 調整の有無による比較

試験紙

MQuant™ Potassium Test

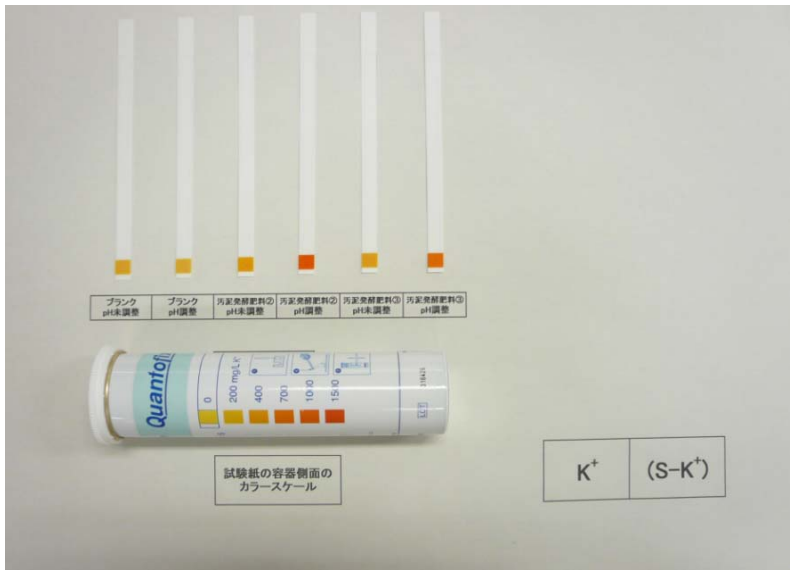


写真 42 pH 調整の有無による比較

試験紙

QUANTOFIX[®] Potassium

8) 選別した原料への適用の検討

未粉碎の硫酸アンモニア及び過りん酸石灰 3 粒(約 0.1 g)をはかりとり、10 mL ポリエチレンテレフタレート製チューブに入れ、10 mL の水を加え 30 秒間振とう抽出を行った溶液について、2 の 4) (2) の各操作を実施した結果を写真 45 及び 46 に示した。

それぞれアンモニウムイオン及びりん酸イオンの定性反応を示したことから、当該試験法は、配合肥料中に含まれる原料を選別して特定する等の使い方への応用が可能であると考えられた。



写真 43 未粉碎の硫酸アンモニア



写真 44 未粉碎の過りん酸石灰



写真 45 未粉碎の硫酸アンモニア
3 粒の試験結果

試験紙

MQuant™ Ammonium Test

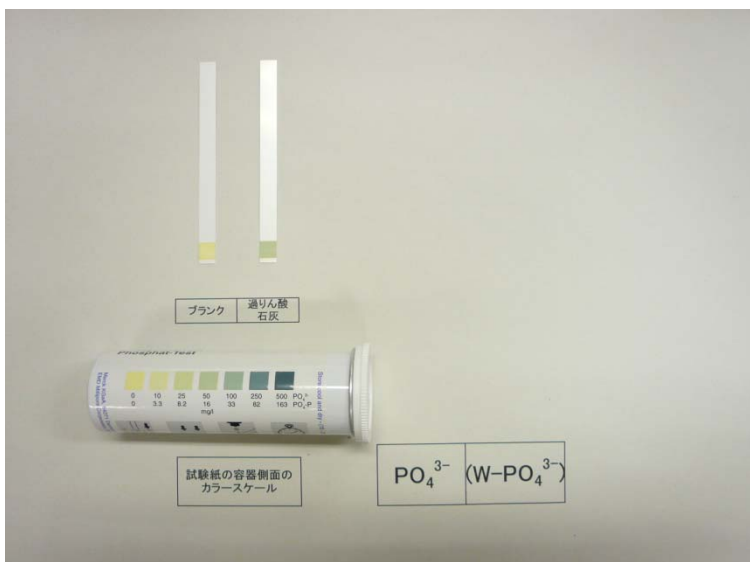


写真 46 未粉碎の過りん酸石灰 3 粒の
試験結果

試験紙

MQuant™ Phosphate Test

4. まとめ

肥料中のアンモニア性窒素, 硝酸性窒素, りん酸, 加里の定性試験法について, 市販試験紙の検討をしたところ, 次のとおりの成績を得た.

(1) なたね油かす, 魚かす及び調製肥料に, 硫酸アンモニア, 硝酸石灰, 過りん酸石灰, 塩化加里, 熔成りん肥及びけい酸加里肥料を 0.5 % 及び 2.0 % になるよう加える添加試験を実施した結果, 多くの組み合わせで, 添加された成分を検出できた. くえん酸溶液による抽出については, 30 秒間振とう抽出より, 一時間適宜振とう抽出で良好な結果が得られた.

(2) 流通肥料の定性試験の結果, 多くの試料及び成分の組み合わせで, 含有する成分を検出できた.

(3) カリウムイオン用試験紙については, アンモニウムイオンにより偽陽性を示したため, アンモニウムイオンを多量に含む肥料への適用は困難であると考えられた. また, 低 pH により偽陰性を示したため, 塩酸による抽出を行う場合には pH 調整が必要であった.

(4) 汚泥肥料では、ろ過していない溶液を用いると、試験紙に着色して判定を困難とするため、ろ過が必要であった。

(5) 試験法は、配合肥料中に含まれる原料を選別して特定する等の使い方への応用が可能であると考えられた。

The Qualitative Test by Means of Test Paper

Harufumi SAITO¹, Souichi IGARASHI², Kenta SAKUMA¹, Yoshimi HASHIMOTO¹,
Naoko TAMARU¹, Erika HIRATA³, Hideo SOETA³, Yuji SHIRAI¹,

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

(Now) Nagasaki Prefecture Kenhoku Development Bureau Agriculture & Forestry Department

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

We investigated the qualitative test by means of test paper about ammonium-nitrogen (A-N), nitrate nitrogen (N-N), phosphorus (as phosphorus oxide; P₂O₅), potassium using fertilizers. It is important to simplify the previous fertilizers appraisal method due to fertilizers appraisal method needs empirical techniques frequently. As results of the tests on rapeseed oil cake, fish cake and blended fertilizer spiked with ammonium sulfate, lime nitrate, superphosphate, potassium chloride, molten phosphorus fertilizer and potassium silicate fertilizer at 0.5 % and 2.0 %, we detected added ingredients in many combinations. As results of the test of fertilizers, which distributed in the market, we could detect the ingredients. In the potassium ion test paper, we observed false positives in the presence of ammonium ion and false negatives at low pH. We considered applicable to usage such as specifying the raw materials contained in blended fertilizer.

Key words qualitative test, test paper, fertilizer, ammonium-nitrogen, nitrate nitrogen, phosphorus oxide, potassium

(Research Report of Fertilizer, **10**, 242~266, 2017)

肥料研究報告編集委員

委員長 山本 実

副委員長 荻野 喜江

會田 紀雄

小塚 健志

青山 恵介

白井 裕治

秋元 里乃

高橋 賢

阿部 文浩

野崎 友春

風間 鈴子

八木 寿治

肥料研究報告 第 10 号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター
埼玉県さいたま市中央区新都心 2 番地 1
さいたま新都心合同庁舎検査棟

TEL 050-3797-1856

FAX 048-601-1179

<http://www.famic.go.jp/>

平成 29 年 12 月

編集 肥料研究報告編集委員会

印刷 名取印刷工業有限公司

東京都新宿区新小川町 7 番 11 号 名取第 2 ビル

TEL 03-3260-4767

リサイクル適性 (A)

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。