

肥料研究報告

第11号

2018年

Research Report of Fertilizer

Vol. 11
2018



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価格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た迅速・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 29 年度に得られた成果を中心に収録した第 11 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。

2018 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 11 号

－ 2018 －

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肥料中のく溶性主成分の抽出方法 杉村 靖	1
2	ICP 発光分光分析 (ICP-OES) 法による固形肥料中のく溶性主成分の測定 松尾信吾	14
3	堆肥及び汚泥肥料等に含まれる苦土全量の測定 ―フレーム原子吸光法の適用― 平田絵理香, 添田英雄, 吉村英美, 八木啓二	29
4	有機物を含まない肥料中のクロムの測定 ―共同試験成績― 平原稔夫, 廣井利明, 石川智美	39
5	液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) 法による肥料中のスルファミン酸の測定 ―共同試験成績― 小塚健志, 伊藤浩平, 中村信仁, 白井裕治	47
6	吸光光度法による肥料中の尿素性窒素の測定 高橋伸英	54
7-1	液体クロマトグラフタンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法による堆肥等中のクロピラリドの測定 ―微量試験法の適用範囲拡大― 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井裕治	63
7-2	液体クロマトグラフタンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法による堆肥等中のクロピラリドの測定 ―微量試験法の共同試験成績― 伊藤浩平, 小塚健志, 秋元里乃, 坂井田里子, 大島舞弓, 中村信仁, 白井裕治	75
8	高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による肥料中の尿酸の測定 船木紀夫	86

<調査・試験業務>

- 9 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) -2016 年冬作・2017 年夏作-

..... 青山恵介, 八木寿治, 齋藤晴文, 佐久間健太, 鈴木時也, 田中雄大,
橋本良美, 阿部文浩 106

<試験成績の信頼性確保関連>

- 10 2017 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

..... 坂井田里子, 顯谷久典, 廣井利明, 山岡孝生, 山西正将, 平田絵理香,
白井裕治, 引地典雄, 今川俊明 129

- 11 2017 年度 肥料認証標準物質の開発 -高度化成肥料 FAMIC-A-17 の調製-

..... 秋元里乃, 小塚健志, 坂井田里子, 伊藤浩平, 中村信仁,
橋本良美, 白井裕治 159

- 12 2017 年度 肥料認証標準物質の開発 -高度化成肥料 FAMIC-A-13, 普通化成肥料 FAMIC-B-14
及び汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2 の長期安定性評価-

..... 稲葉茂幸, 川口伸司, 伊藤 潤, 松尾信吾, 船木紀夫,
山西正将, 白井裕治 173

<ノート>

- 13 試験紙による肥料成分の検出

..... 齋藤晴文, 佐久間健太, 白井裕治, 阿部文浩 190

Research Report of Fertilizer Volume 11

– 2018–

Index

<Development and Validation for Determination Methods>

1	Extraction Method for the Citrate-Soluble Principal Ingredients in the Fertilizer using a General-Purpose Equipment Yasushi SUGIMURA	1
2	Simultaneous Determination of Citrate-Soluble Principal Ingredients (C-P ₂ O ₅ , C-K ₂ O, C-MgO, C-MnO and C-B ₂ O ₃) in Fertilizer using Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) Shingo MATSUO	14
3	Determination of Total Magnesium in Compost and Sludge Fertilizer by Atomic Absorption Spectrometry Erika HIRATA, Hideo SOETA, Hidemi YOSHIMURA, Keiji YAGI	29
4	Evaluation of Digest Method for Determination of Chromium in Inorganic Fertilizer by Atomic Absorption Spectrometry: A Collaborative Study Toshio HIRABARA, Toshiaki HIROI, Tomomi ISIKAWA	39
5	Determination of Sulfamic Acid in Fertilizer by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC-MS): A Collaborative Study Kenji KOZUKA, Kohei ITO, Nobuhito NAKAMURA, Yuji SHIRAI	47
6	Determination of Urea Nitrogen in Fertilizer by Spectrophotometry Shinei TAKAHASHI	54
7-1	Validation of Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Kohei ITO, Kenji KOZUKA, Keisuke AOYAMA, Yuji SHIRAI	63
7-2	Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS): A Collaborative Study ... Kohei ITO, Kenji KOZUKA, Satono AKIMOTO, Satoko SAKAIDA, Mayu OSHIMA, Nobuhito NAKAMURA, Yuji SHIRAI	75

8	Determination of Uric Acid in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography Norio FUNAKI	86
< Investigation and Research >		
9	Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued Report) - Winter 2016 and Summer 2017 - ... Keisuke AOYAMA, Toshiharu YAGI, Haruhumi SAITO, Kenta SAKUMA, Tokiya SUZUKI, Yudai TANAKA, Yoshimi HASHIMOTO, Fumihiro ABE	106
< Assurance Practices for Reliable Analytical Data >		
10	Result of Proficiency Testing for Determination of Major Components and Harmful Elements in Ground Fertilizers Conducted in Fiscal Year 2017 Satoko SAKAIDA, Hisanori ARAYA, Toshiaki HIROI, Takao YAMAOKA, Masayuki YAMANISHI, Erika HIRATA, Yuji SHIRAI, Norio HIKICHI, Toshiaki IMAGAWA	129
11	Preparation of Certified Reference Material (CRM) for Determination of Major Components: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-17) Satono AKIMOTO, Takeshi KOZUKA, Satoko SAKAIDA, Kohei ITO, Nobuhito NAKAMURA, Yoshimi HASHIMOTO, Yuji SHIRAI	159
12	Long-term Stability Evaluation of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-13), Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-14) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-12-2) Shigeyuki INABA, Shinji KAWAGUCHI, Jun ITO, Shingo MATSUO, Norio FUNAKI, Masayuki YAMANISHI, Yuji SHIRAI	173
< Note >		
13	The Qualitative Test by Means of Test Paper Harufumi SAITO, Kenta SAKUMA, Yuji SHIRAI, Fumihiro ABE	190

1 汎用的な機器を用いた肥料中のく溶性主成分の抽出方法

杉村 靖¹

キーワード 振とう恒温水槽, く溶性主成分, 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, く溶性主成分, 可溶性けい酸, 水溶性効果発現促進材等に用いられており, 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, 既に水溶性主成分について簡易的抽出方法³⁾及び垂直往復振とう機を用いた抽出方法⁴⁾を報告した.

今回は, 肥料中のく溶性りん酸(C-P₂O₅), く溶性加里(C-K₂O), く溶性苦土(C-MgO), く溶性マンガン(C-MnO)及びく溶性ほう素(C-B₂O₃)を対象として振とう恒温水槽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加工りん酸肥料, 副産りん酸肥料, 混合りん酸肥料, 化成肥料, 配合肥料, 副産複合肥料, ほう酸塩肥料, 熔成ほう素肥料, 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用いた. また, 同様に熔成りん肥, 鉍さいけい酸質肥料, 水酸化苦土肥料及び鉍さいマンガン肥料を, 目開き 212 µm のふるいを全通するまで粉砕したものを用いた.

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) くえん酸溶液: JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 20 g を水に溶かして 1000 mL とした.
- (5) エチレンジアミン四酢酸塩溶液: JIS K 8107 に規定するエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 37.2 g を水に溶かして 1000 mL とした.
- (6) 酢酸アンモニウム溶液: JIS K 8359 に規定する酢酸アンモニウム 250 g を水に溶かして 500 mL とし, 硫酸(1+4)で pH を 5.2±0.1 に調整した.
- (7) アゾメチン H 溶液: アゾメチン H 0.6 g 及び JIS K 9502 に規定する L(+)-アスコルビン酸 2 g に水を加え, 35 °C~40 °C に加温して溶かし, 冷却後水を加えて 100 mL とした.
- (8) 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

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

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り、少量の水で溶かし、全量フラスコ 1000 mL に移し入れ、硝酸 2 mL～3 mL を加え、標線まで水を加えた。

(9) リン酸標準液(P_2O_5 0.5 mg/mL)：リン酸標準液(P_2O_5 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。

(10) カリウム標準液(K_2O 1 mg/mL)：カリウム標準液(K 1000 mg/L) (関東化学;JCSS)を使用した。

(11) マグネシウム標準液(MgO 1 mg/mL)：マグネシウム標準液(Mg 1000 mg/L) (関東化学;JCSS)を使用した。

(12) 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。

(13) ほう素標準液(B_2O_3 2.5 mg/mL)：JIS K 8863 に規定するほう酸をデシケーター中に約 24 時間放置して乾燥した後、4.441 g をひょう量皿にはかりとり、少量の水で溶かし、全量フラスコ 1000 mL に移し入れ、標線まで水を加えた。

(14) ほう素標準液(B_2O_3 0.05 mg/mL)：ほう素標準液(B_2O_3 2.5 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 500 mL にとり、標線まで水を加えた。

(15) 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 150 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 50 g を水に溶かして加え、更に水を加えて 1000 mL とした。

(16) 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。

(17) 干渉抑制剤溶液(苦土及びマンガン測定用)：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。

3) 器具及び装置

(1) 電子天びん：sartorius CPA423S

(2) 振とう恒温水槽：タイテック MM-10(ツメクランプ CF-0250 を用い全量フラスコ 250 mL を水面に対して垂直に固定した)

(3) 恒温上下転倒式回転振り混ぜ機：三喜製作所 RS-12

(4) ホットプレート：柴田科学 NP-6, ADVANTEC HTP552AA

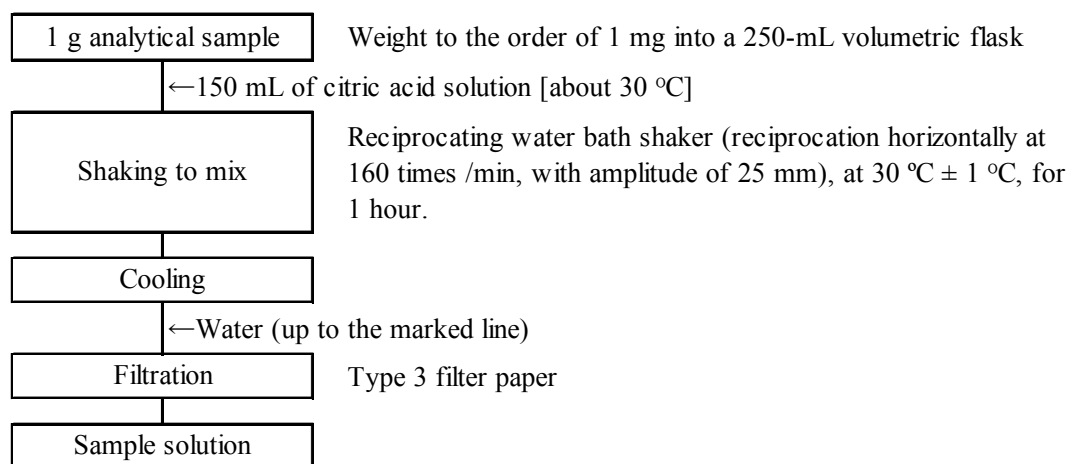
(5) 分光光度計：島津製作所 UVmini-1240

(6) 原子吸光分析装置：日立ハイテクノロジーズ Z-2310

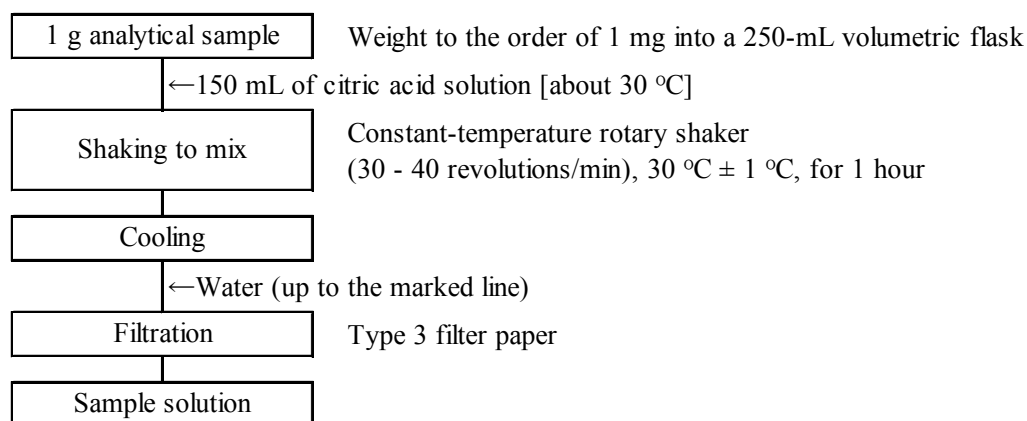
4) 分析方法

試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、全量フラスコ 250 mL に入れ、約 30 °C に加温したくえん酸溶液 150 mL を加え、30 °C の振とう恒温水槽で 1 時間振り混ぜ放冷した後標線まで水を加え、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恒温上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出手順を Scheme 2 に示した。

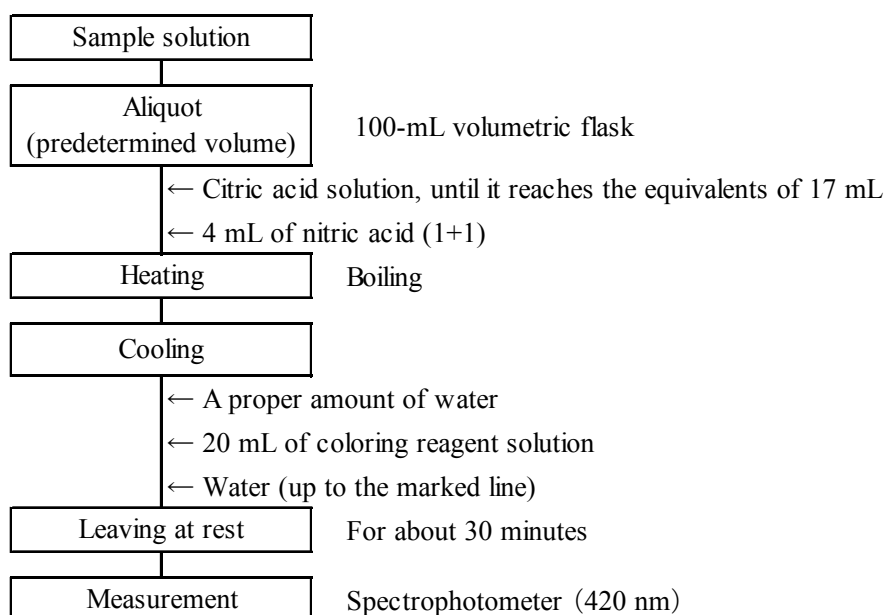
これらの試料溶液について、く溶性りん酸(C- P_2O_5)はバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法(Scheme 3 及び Scheme 4)、く溶性加里(C- K_2O)、く溶性苦土(C-MgO)及びく溶性マンガン(C-MnO)は原子吸光法(Scheme 5)、く溶性ほう素(C- B_2O_3)はアゾメチン H 法(Scheme 6)の手順でそれぞれ測定した。

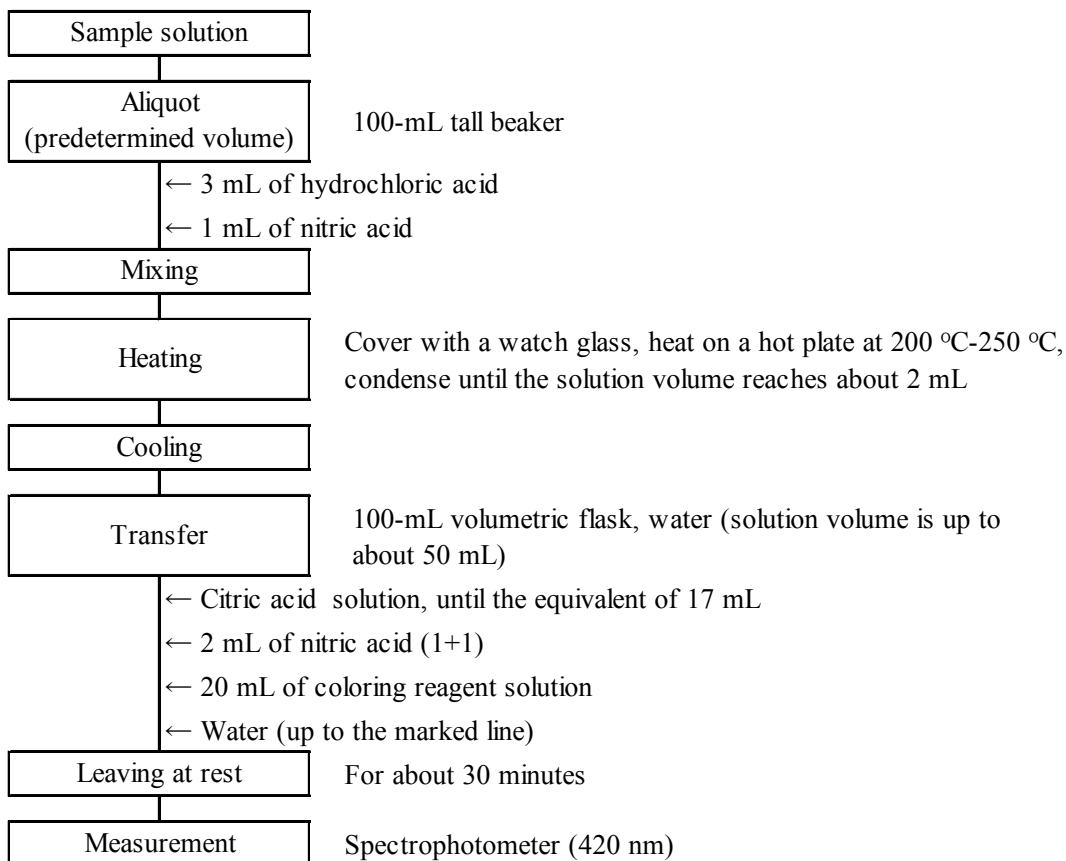


Scheme 1 The flow sheet of extraction procedure using reciprocating water bath shaker

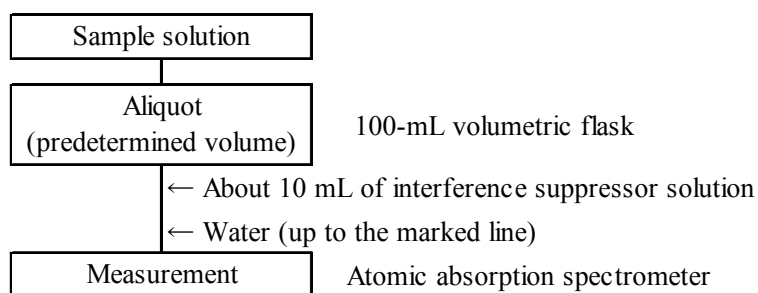


Scheme 2 The flow sheet of extraction procedure using constant-temperature rotary shaker

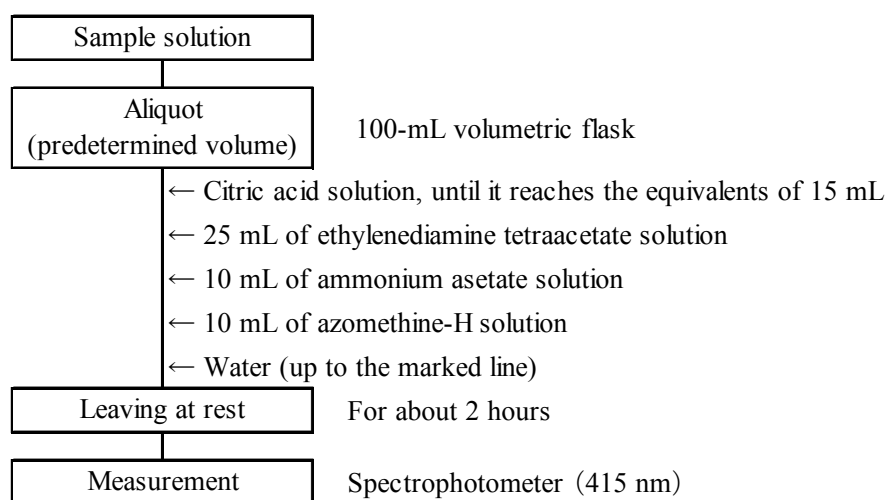
Scheme 3 The flow sheet for citrate soluble phosphoric acid (C-P₂O₅)



Scheme 4 The flow sheet for citrate soluble phosphoric acid (C-P₂O₅)
in fertilizer containing phosphite



Scheme 5 The flow sheet for citrate soluble potassium (C-K₂O) and
citrate soluble magnesium (C-MgO) and citrate soluble manganese (C-MnO)

Scheme 6 The flow sheet for citrate soluble boron ($C-B_2O_3$)

3. 結 果

1) 振とう恒温水槽の機器設定の確認

市販されている振とう恒温水槽は、振とう回数、振幅などが調節できるもの、固定のものなど様々な仕様のものであるため、抽出が可能な設定条件について確認した。

抽出容器へのサンプル固着が発生しやすい熔成りん肥及び鉍さいマンガン肥料を用いて、3 点併行で抽出を行い全量プラスコへのサンプル固着の状況を Table 1 に示した。また、確認のため、く溶性りん酸($C-P_2O_5$)、く溶性苦土($C-MgO$)及びく溶性マンガン($C-MnO$)について定量したところ、固着が有ったことが確認された設定条件下ではいずれも低値となることを確認した。この結果から、振とう恒温水槽の振とう回数条件が 160 往復／分の場合、振幅 20 mm 以上の条件であれば十分な抽出が可能と推測されたが、検討に当たって振とう恒温水槽の設定を振とう回数 160 往復／分、振幅 25 mm とし余裕を持たせた条件に仮設定した。確認のため、当該条件において固着の状況の確認したところ、固着は認められなかった。振とう恒温水槽の振とう回数 160 往復／分の条件における振幅ごとの平均定量値を Fig. 1 に示した。

さらに、当該条件における抽出を確認するため、メディアンが既知の鉍さいけい酸質肥料 3 点を用いて、く溶性苦土($C-MgO$)について定量した結果を Table 2 に示した。いずれも z スコアが 2 以下であり十分満足する結果であった。

この結果から、今回の検討において、振とう恒温水槽の振とう回数及び振幅の機器設定をそれぞれ 160 往復／分、25 mm とすることとした。

Table 1 Solidification situation of sample by visual check

Shaking amplitude (mm)	Shaking frequency (times/min)		
	120	140	160
40	formed	unformed	unformed
30	—	formed	unformed
20	—	formed	unformed
10	—	formed	unformed

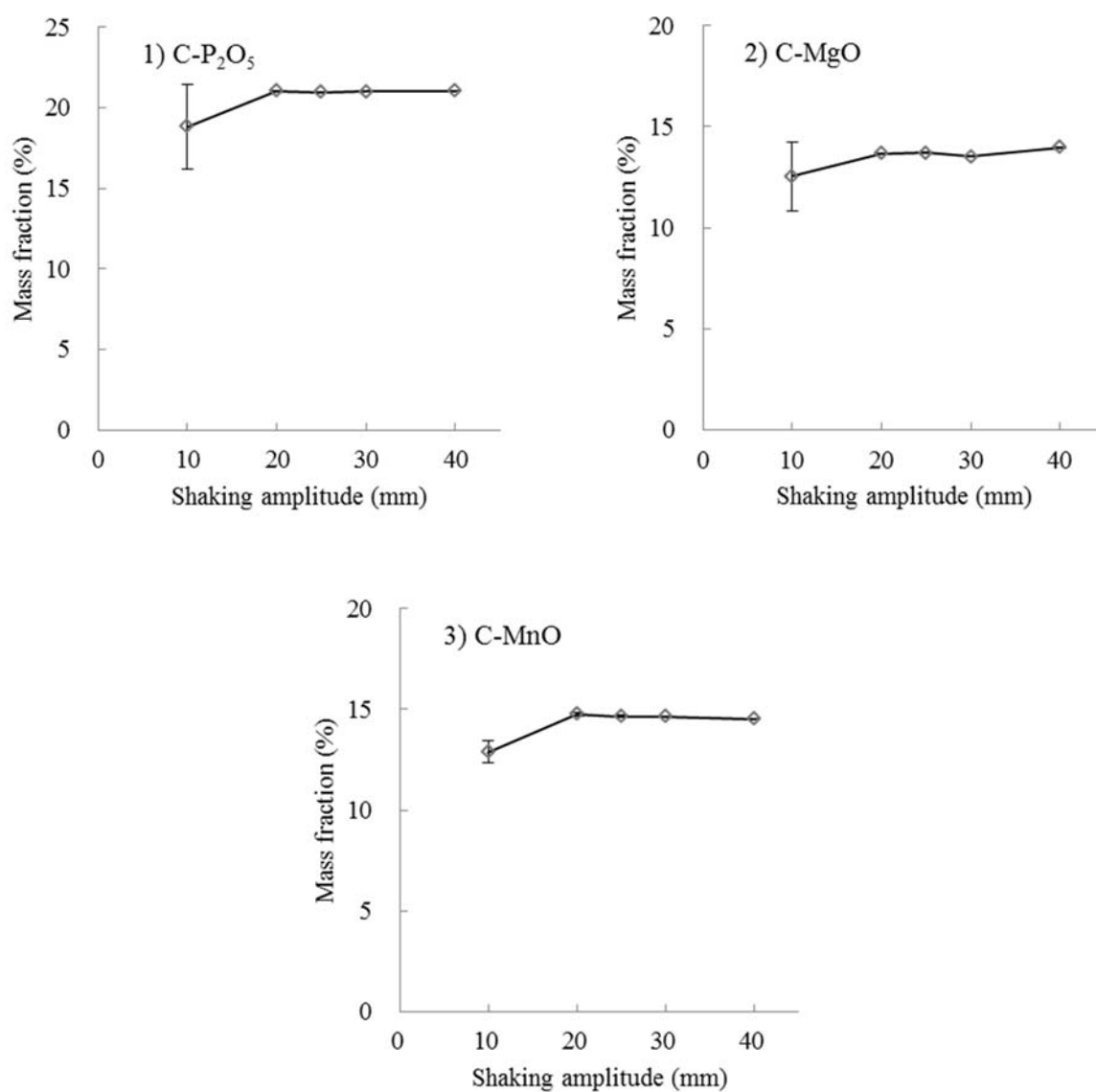


Fig. 1 Mean value of shaking amplitude in shaking frequency 160 times/min
Plot bar: sample standard deviation

Table 2 Aptitude test result for equipment condition

Sample	C-MgO mean ^{a)} (%) ^{b)}	Standard deviation (%) ^{b)}	Median (%) ^{b)}	z-score
1	5.08	0.02	4.87	0.85
2	7.54	0.02	7.36	1.35
3	4.45	0.01	4.36	0.49

a) Mean value of C-MgO in slag silicate fertilizer ($n = 3$)

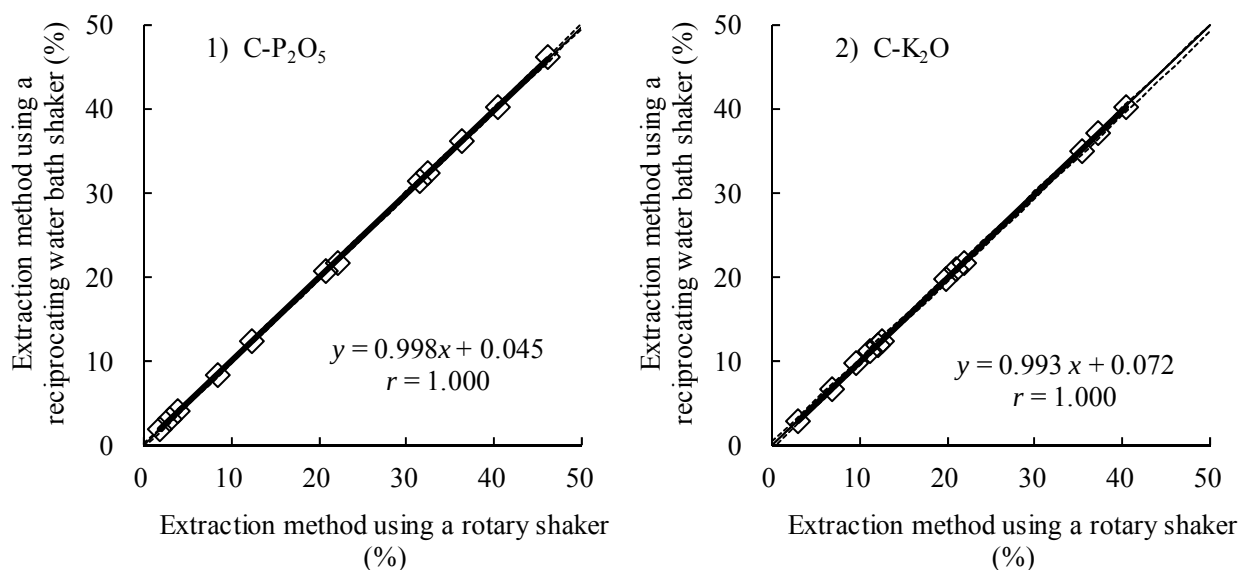
b) Mass fraction

2) 方法間比較による真度の評価

く溶性りん酸(C-P₂O₅), く溶性加里(C-K₂O), く溶性苦土(C-MgO), く溶性マンガン(C-MnO)及びく溶性ほう素(C-B₂O₃)について, 試料 12 点を用いて, 恒温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. 2 に示した.

く溶性りん酸(C-P₂O₅) ($y=0.045+0.998x$, $r=1.000$)の傾きの 95 %信頼区間は 0.993~1.003, 切片の 95 %信頼区間は-0.088~0.178, く溶性加里(C-K₂O) ($y=0.072+0.993x$, $r=1.000$)の傾きの 95 %信頼区間は 0.984~1.002, 切片の 95 %信頼区間は-0.125~0.269, く溶性苦土(C-MgO) ($y=-0.019+1.004x$, $r=1.000$)の傾きの 95 %信頼区間は 0.998~1.011, 切片の 95 %信頼区間は-0.163~0.124, く溶性マンガン(C-MnO) ($y=-0.001+1.010x$, $r=1.000$)の傾きの 95 %信頼区間は 1.007~1.013, 切片の 95 %信頼区間は-0.024~0.022, く溶性ほう素(C-B₂O₃) ($y=-0.0004+1.010x$, $r=0.998$)の傾きの 95 %信頼区間は 0.970~1.049, 切片の 95 %信頼区間は-0.009~0.010 であり, 肥料等試験法に示されている真度評価の推奨範囲と照らし合わせたところ, く溶性マンガンの 95 %信頼区間の傾きにおいて 1 を含まない結果となったが, そのほかの性能パラメータは真度評価の推奨範囲内であった.

また, く溶性ほう素(C-B₂O₃)は分析用試料の濃度に偏りがあったため, 高濃度試料については濃度の異なる試料 3 点を用いて, 恒温上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出法と本法により 4 点併行で試験を実施し, 等分散性及び t 検定の結果を Table 3 に示した. いずれの濃度においても有意な差は認められなかった.



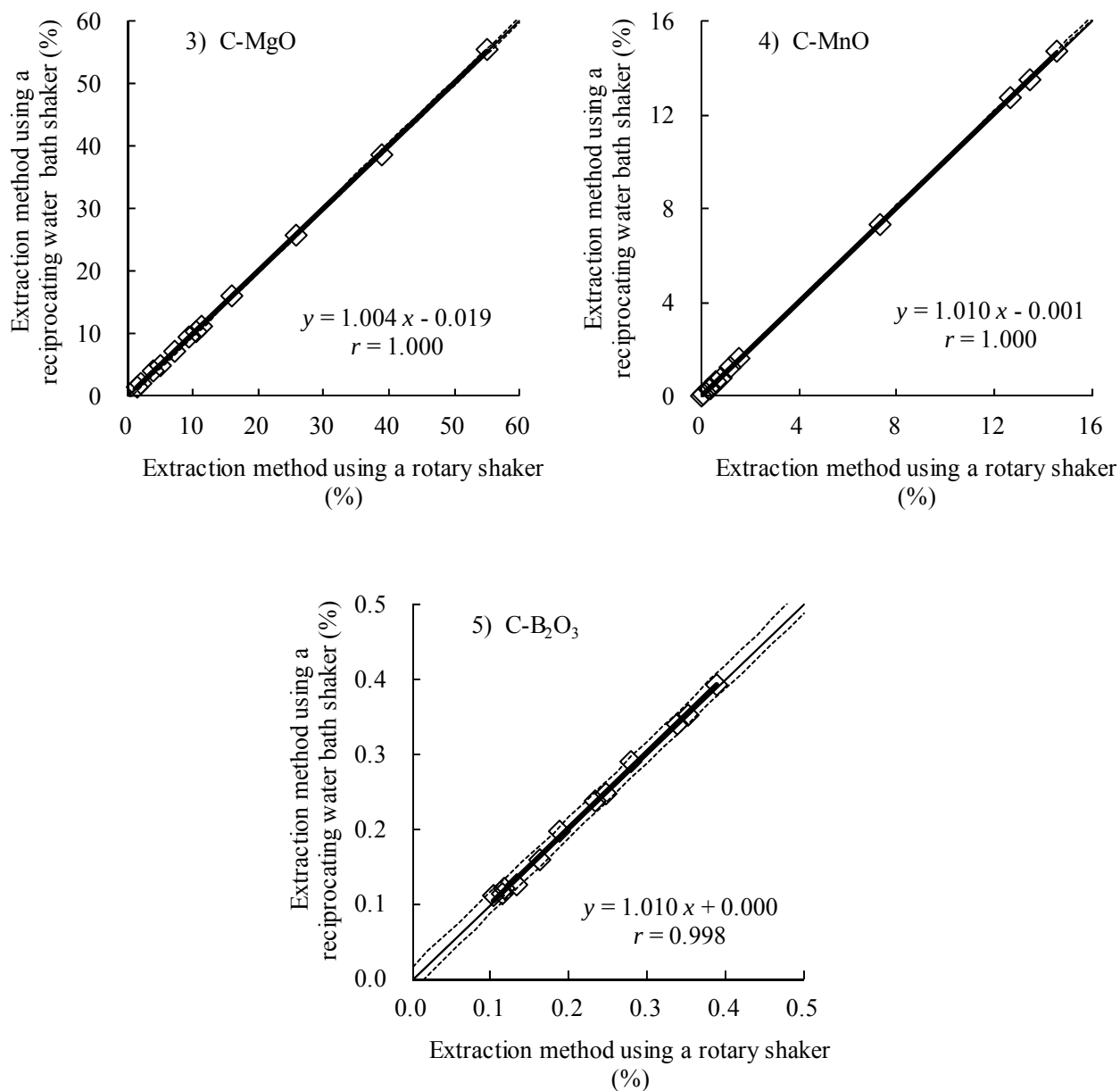


Fig. 2 Comparison of extraction method using a rotary shaker and using a reciprocating water bath shaker

Heavy line: Regression line

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

Thin line: $y = x$

Table 3 Test result using samples of 3 different concentration for evaluating trueness

Sample	Method	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Homoscedasticity		<i>t</i> test	
			Variance ratio	Critical value	<i>t</i> -ratio	Critical value
Mixed microelement fertilizer	New test method	5.84	2.05	9.28	1.79	2.45
	Validated test method	5.80				
Fused boron fertilizer	New test method	17.86	3.50	9.28	2.04	2.45
	Validated test method	17.71				
Borax fertilizer	New test method	43.23	1.32	9.28	0.05	2.45
	Validated test method	43.21				

a) Mean value ($n = 4$)

b) Mass fraction

3) 肥料認証標準物質を利用した真度の評価

く溶性りん酸 (C-P₂O₅), く溶性苦土 (C-MgO), く溶性マンガン (C-MnO) 及びく溶性ほう素 (C-B₂O₃) について, 肥料認証標準物質 A-13 を用いて, 3 点併行で試験を実施して得られた結果から平均値, 平均値と認証値との差を求め Table 4 に示した. それぞれの平均値は認証値に対する警戒線以内であり, また, 平均値と認証値との差の絶対値は認証値から求めた拡張不確かさを超えるものではなく, いずれも肥料等試験法に示されている真度評価の推奨範囲内であった.

Table 4 Test result using a certified reference material (FAMIC-A-13) for evaluating trueness

Component	Certified value (%) ^{b)}	Warning limit for the certified value (%) ^{b)}	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Absolute value of the difference between the observed value and the certified value (%) ^{b)}	Expanded uncertainty calculating from the certified value (%) ^{b)}
C-P ₂ O ₅	10.79	10.67~10.91	10.81	0.02	0.03
C-MgO	3.18	2.95~3.41	3.22	0.04	0.08
C-MnO	0.356	0.327~0.385	0.360	0.004	0.012
C-B ₂ O ₃	0.203	0.185~0.220	0.198	0.005	0.005

a) Mean value ($n = 3$)

b) Mass fraction

4) 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, 加工りん酸肥料, 化成肥料, 配合肥料, 副産複合肥料, 水酸化苦土肥料, 鉍さいマンガン肥料及びほう酸塩肥料を用いて, 2 濃度のく溶性りん酸 (C-P₂O₅), く溶性加里 (C-K₂O), く溶性苦土 (C-MgO), く溶性マンガン (C-MnO) 及びく溶性ほう素 (C-B₂O₃) を 2 点併行で日を変えて 5 回試験を実施して得られた結果を Table 5 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 6 に示した. 加工りん酸肥料のく溶性りん酸 (C-P₂O₅) の平均値は質量分率 46.45 %で, 併行相対標準偏差は 0.2 %, 中間相対標準偏差は 0.9 %であった. また, 化成肥料のく溶性りん酸 (C-P₂O₅) の平均値は質量分率 2.18 %で, 併行相対標準偏差は 0.7 %, 中間相対標準偏差は 1.8 %であった. 副産複合肥料のく溶性加里 (C-K₂O) の平均値は質量分率 41.01 %で, 併行相対標準偏差は 0.4 %, 中間相対標準偏差は 0.7 %であった. また, 化成肥料のく溶性加里 (C-K₂O) の平均値は質量分率 3.01 %で, 併行相対標準偏差は 0.4 %, 中間相対標準偏差は 1.3 %であった. 水酸化苦土肥料のく溶性苦土 (C-MgO) の平均値は質量分率 55.18 %で, 併行相対標準偏差は 0.2 %, 中間相対標準偏差は 0.8 %であった. また, 化成肥料のく溶性苦土 (C-MgO) の平均値は質量分率 1.49 %で, 併行相対標準偏差は 2.7 %, 中間相対標準偏差は 2.2 %であった. 鉱さいマンガン肥料のく溶性マンガン (C-MnO) の平均値は質量分率 14.45 %で, 併行相対標準偏差は 0.4 %, 中間相対標準偏差は 0.5 %であった. また, 配合肥料のく溶性マンガン (C-MnO) の平均値は質量分率 0.046 %で, 併行相対標準偏差は 0.5 %, 中間相対標準偏差は 1.0 %であった. ほう酸塩肥料のく溶性ほう素 (C-B₂O₃) の平均値は質量分率 41.90 %で, 併行相対標準偏差は 0.4 %, 中間相対標準偏差は 0.9 %であった. また, 化成肥料のく溶性ほう素 (C-B₂O₃) の平均値は質量分率 0.112 %で, 併行相対標準偏差は 2.3 %, 中間相対標準偏差は 3.9 %であった.

相対標準偏差のうち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) の目安と照らし合わせたところ, く溶性苦土 (C-MgO) の併行精度は目安を超えていたが許容される範囲内での精度であった. そのほかの相対標準偏差は目安以内であった. このことから, く溶性りん酸 (C-P₂O₅), く溶性加里 (C-K₂O), く溶性苦土 (C-MgO), く溶性マンガン (C-MnO) 及びく溶性ほう素 (C-B₂O₃) の抽出については, 恒温上下転倒式回転振り混ぜ機を用いない振とう恒温水槽による抽出でも十分な方法であることが確認された.

Table 5 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation (% (Mass fraction))

Test day	C-P ₂ O ₅				C-K ₂ O				C-MgO			
	Processed phosphate fertilizer		Compound fertilizer		Byproduct Compound fertilizer		Compound fertilizer		Magnesium hydroxide fertilizer		Compound fertilizer	
1	46.23	46.26	2.14	2.15	41.33	41.04	3.03	3.01	54.80	54.59	1.47	1.47
2	46.28	46.36	2.16	2.15	41.18	41.09	3.01	3.05	54.71	54.75	1.54	1.46
3	46.35	46.24	2.24	2.22	40.36	40.67	2.94	2.95	55.43	55.29	1.54	1.48
4	46.12	46.32	2.20	2.24	41.23	41.05	3.04	3.04	55.55	55.80	1.55	1.47
5	47.12	47.20	2.17	2.18	41.07	41.08	3.00	3.01	55.53	55.40	1.48	1.49

Table 5 Continue

Test day	C-MnO				C-B ₂ O ₃			
	Slag manganese fertilizer		Mixed fertilizer		Borax fertilizer		Compound fertilizer	
1	14.38	14.46	0.046	0.046	41.60	41.90	0.105	0.111
2	14.57	14.43	0.046	0.047	42.43	42.18	0.109	0.110
3	14.37	14.41	0.046	0.046	41.53	41.45	0.119	0.117
4	14.45	14.39	0.046	0.046	42.45	42.03	0.116	0.111
5	14.51	14.53	0.047	0.047	41.70	41.70	0.110	0.112

Table 6 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)} (%)
C-P ₂ O ₅	Processed phosphate fertilizer	46.45	0.08	0.2	1.0	0.40	0.9	2.0
	Compound fertilizer	2.18	0.02	0.7	2.0	0.04	1.8	3.5
C-K ₂ O	Byproduct Compound fertilizer	41.01	0.15	0.4	1.0	0.30	0.7	2.0
	Compound fertilizer	3.01	0.01	0.4	2.0	0.04	1.3	3.5
C-MgO	Magnesium hydroxide fertilizer	55.18	0.12	0.2	1.0	0.45	0.8	2.0
	Compound fertilizer	1.49	0.04	2.7	2.0	0.03	2.2	3.5
C-MnO	Slag manganese fertilizer	14.45	0.06	0.4	1.5	0.07	0.5	2.5
	Mixed fertilizer	0.046	0.000	0.5	4.0	0.000	1.0	6.5
C-B ₂ O ₃	Borax fertilizer	41.90	0.18	0.4	1.0	0.38	0.9	2.0
	Compound fertilizer	0.112	0.003	2.3	3.0	0.004	3.9	4.5

a) Mean value (n = sample number of parallel test (2) $\times$ number of test days (5))

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

肥料中のく溶性りん酸、く溶性加里、く溶性苦土、く溶性マンガン及びく溶性ほう素について、振とう恒温水槽を用いた抽出方法について検討したところ、次の結果が得られた。

(1) 恒温上下転倒式回転振り混ぜ機を用いない抽出方法として、振とう恒温水槽を用いて抽出可能な機器条件を確認したところ、サンプルの固着が発生しない振とう回数 160 往復／分及び振幅 25 mm 以上の機器条件の場合、既存の抽出方法と同程度の性能であることを確認した。

(2) く溶性りん酸 (C-P₂O₅)、く溶性加里 (C-K₂O)、く溶性苦土 (C-MgO)、く溶性マンガン (C-MnO) 及びく溶性ほう素 (C-B₂O₃) について分析用試料 12 点を用いて、恒温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、両法の相関係数は $r=0.998\sim 1.000$ を示し、強い相関が認められた。また、く溶性ほう素 (C-B₂O₃) について異なる濃度の分析用試料 3 点を用いて、恒温上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出法と本法との結果から、等分散性が確認されるとともに濃度毎の t 検定を実施したところ両側有意水準 5 % で有意な差は認められなかった。さらに、肥料認証標準物質 A-13 において認証されているく溶性りん酸 (C-P₂O₅)、

く溶性苦土 (C-MgO), く溶性マンガン (C-MnO) 及びく溶性ほう素 (C-B₂O₃) について, 本法により試験した結果, いずれの測定値の平均値も認証値に対する警戒線以内であり, 測定値の平均値と認証値との差の絶対値が認証値から算出した拡張不確かさを超えていなかった.

(3) 加工りん酸肥料, 化成肥料, 配合肥料, 副産複合肥料, 水酸化苦土肥料, 鉱さいマンガン肥料及びほう酸塩肥料を用いて, 高含有量及び低含有量のく溶性りん酸 (C-P₂O₅), く溶性加里 (C-K₂O), く溶性苦土 (C-MgO), く溶性マンガン (C-MnO) 及びく溶性ほう素 (C-B₂O₃) を 2 点併行で日を変えて 5 回試験を実施した. 高含有量の試料のく溶性主成分の平均値は質量分率 14.45 %~55.18 %で, 併行相対標準偏差は 0.2 %~0.4 %, 中間相対標準偏差は 0.5 %~0.9 %であった. また, 低含有量の試料のく溶性主成分の平均値は質量分率 0.046 %~3.01 %で, 併行相対標準偏差は 0.4 %~2.7 %, 中間相対標準偏差は 1.0 %~3.9 %であった. いずれの併行精度及び中間精度も許容される範囲内 (肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける精度の目安の 2 倍) 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 (2017)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2017.pdf>
- 2) 農林水産省農業環境技術研究所: 肥料分析法 (1992 版), 公益財団法人日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
- 3) 川口伸司: 液状肥料中の水溶性成分の簡易抽出方法, 肥料研究報告, **9**, 10~20 (2016)
- 4) 川口伸司: 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, 肥料研究報告, **10**, 1~8 (2017)

Extraction Method for the Citrate-Soluble Principal Ingredients in the Fertilizer using a General-Purpose Equipment

Yasushi SUGIMURA¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

The Japanese Official Methods of Analysis of Fertilizer provides several determination methods using the upside down constant-temperature rotary shaker (rotary shaker) as the extractor. However, the rotary shaker is a custom order apparatus. This study describes development and validation of extraction method for the citrate soluble principal ingredients in the fertilizer using commercially reciprocating water bath shaker. The values of C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃ measured in 12 analytical samples by extraction method using a reciprocating water bath shaker were compared with ones using a rotary shaker. The former values were achieved and correlated highly with the latter values (Line of regression and correlation coefficient; C-P₂O₅ ($r=1.000$, $y=0.045+0.998x$), C-K₂O ($r=1.000$, $y=0.072+0.993x$), C-MgO ($r=1.000$, $y=-0.019+1.004x$), C-MnO ($r=1.000$, $y=-0.001+1.010x$), C-B₂O₃ ($r=0.998$, $y=0.000+1.010x$). The values of C-B₂O₃ measured a quadruple test using 3 different concentrative analytical samples by extraction method using a reciprocating water bath shaker were compared with ones using an rotary shaker. As the result, significant difference was not confirmed in homoscedasticity of the results of 2 groups and t-test for each concentration under the two-sided significant level of 5 %. The values of C-P₂O₅, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃ measured a triplicate test using a certified reference material fertilizer (FAMIC- A-13). As the result, the mean values of those components were within the warning level to the certified value. And, the absolute value of the difference between the mean values and the certified values were not exceed 2 times of the standard uncertainty composed of respective uncertainties of the mean values and the certified values. C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃ were conducted a duplicate test per 5 test days using two analytical samples of solid fertilizers respectively. As the result, total mean values (mass fraction) of C-P₂O₅ were 46.45 % and 2.18 %, repeatability relative standard deviation (RSD_r) were 0.2 % and 0.7 %, and intermediate relative standard deviation (RSD_I) 0.9 % and 1.8 %, respectively. Total mean values (mass fraction) of C-K₂O were 41.01 % and 3.01 %, RSD_r were 0.4 % and 0.4 %, RSD_I were 0.7 % and 1.3 %, respectively. Total mean values (mass fraction) of C-MgO were 55.18 % and 1.49 %, RSD_r were 0.2 % and 2.7 %, RSD_I were 0.8 % and 2.2 %, respectively. Total mean values (mass fraction) of C-MnO were 14.45 % and 0.046 %, RSD_r were 0.4 % and 0.5 %, RSD_I were 0.5 % and 1.0 %, respectively. Total mean values (mass fraction) of C-B₂O₃ were 41.90 % and 0.112 %, RSD_r were 0.4 % and 2.3 %, RSD_I were 0.9 % and 3.9 %. This extraction method is valid for the determination of the citrate soluble principal ingredients in the fertilizer.

Key words reciprocating water bath shaker, citrate-soluble principal ingredients, fertilizer, single-laboratory method validation

(Research Report of Fertilizer, **11**, 1~13, 2018)

2 ICP 発光分光分析(ICP-OES)法による固形肥料中のく溶性主成分の測定

松尾信吾¹

キーワード ICP 発光分光分析法, く溶性主成分, 肥料

1. はじめに

従来, 肥料の主成分の分析法には, 成分別にフレイム原子吸光法, 吸光光度法, 容量法等(以下, 「従来法^{1, 2)}」という。)の異なる測定方法が肥料分析法¹⁾及び肥料等試験法²⁾に用いられてきた。近年, 分析の簡便化及び迅速化など観点から誘導プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES)を用いた一斉分析法の開発及び妥当性の確認が望まれてきた。肥料の品質を保証する主成分は政令³⁾で成分全量, 有効成分, アルカリ分等が規定されており, そのうち有効成分は農林水産省告示⁴⁾で可溶性成分, く溶性成分及び水溶性成分で示されている。可溶性主成分及びく溶性主成分はその溶解性が同告示で規定されていることから, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(以下, 「FAMIC」という。)では肥料性状(固形, 液状)及び抽出方法別に ICP-OES を用いた同時分析法の順次検討することとした。既に, ICP-OES 法による液状肥料中の水溶性主成分及び効果発現促進材を測定について青山が検討し単一試験室の妥当性確認を報告^{5, 6)}しており, 肥料等試験法に収載されている。

今回は, く溶性主成分(以下, く溶性りん酸は「C-P₂O₅」, く溶性加里は「C-K₂O」, く溶性苦土は「C-MgO」, く溶性マンガンは「C-MnO」, く溶性ほう素は「C-B₂O₃」という。)を従来法と同様にくえん酸溶液で抽出し, その抽出液について(ICP-OES)を用いた一斉分析法を検討したのでその結果を報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

(1) 流通肥料

流通している固形肥料について, く溶性成分の含まれるもの 13 種類合計 40 点(加工りん酸肥料, 化成肥料, 家庭園芸用複合肥料, 鉍さいけい酸質肥料, 混合堆肥複合肥料, 混合りん酸肥料, 成形複合肥料, 配合肥料, 副産複合肥料, 副産りん酸肥料, 有機化成肥料, 熔成りん肥及び指定配合肥料)を用いた。試料については, 目開き 500 µm のスクリーンを通過するまで粉砕した(鉍さいけい酸質肥料及び熔成りん肥については, 振動ミルで粉砕した後, 212 µm のふるいを通過した)ものを試験に用いた。

(2) 調製試料

添加回収試験用の試料の調製にあたっては Table 1 に示した試薬を原料として用いた。各成分を含有する原料として, C-P₂O₅ はリン酸水素二ナトリウム, C-K₂O は塩化カリウム, C-MgO は酢酸マグネシウム四水和物, MnO は酢酸マンガン(II)四水和物, B₂O₃ は四ほう酸ナトリウム十水和物を混合した。さらに各成分が任意の濃度になるように, 硫酸アンモニウム及びスクロースを配合することで調製を行った。これら原料のうち, 酢酸マグネ

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

シウム四水和物及び酢酸マンガン(Ⅱ)四水和物は JIS 規格に規定されている試薬がないことから, 試薬純度 99.0 %以上で製造業者が特級グレードの規格を保証するものを用い, その他の原料は JIS 規格に規定されている試薬特級を使用した. これらの原料は振動ミルにて粉碎し, 目開き 500 μm のふるいを全通したものを用い, 任意の濃度になるようポリエチレン袋に入れてよく混合した. また, 調製した試料についてはポリエチレン袋内に密封し, 分析に供するまでデシケーター内で保管した.

なお, 各材料の配合割合及び C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO 及び C-B₂O₃ の各成分の質量分率は Table 2 に示した配合設計のとおりである.

Table 1 Properties of material (% (mass fraction))

	C-P ₂ O ₅ ^{a)}	C-K ₂ O ^{a)}	C-MgO ^{a)}	C-MnO ^{a)}	C-B ₂ O ₃ ^{a)}
A Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	49.99				
B Potassium chloride (KCl)		63.18			
C Magnesium acetate tetrahydrate ((CH ₃ COO) ₂ Mg·4H ₂ O)			18.81		
D Manganese(II) acetate tetrahydrate ((CH ₃ COO) ₂ Mn·4H ₂ O)				28.94	
E Sodium tetraborate decahydrate (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O)					36.51
F Ammonium sulfate	-	-	-	-	-
G Sucrose	-	-	-	-	-

a) Theoretical value

Table 2 The preparation of analytical samples (% (mass fraction))

No. of samples ^{a)}	The mixing ratio of the materials ^{b)}							Citrate soluble component ^{c)}				
	A	B	C	D	E	F	G	C-P ₂ O ₅	C-K ₂ O	C-MgO	C-MnO	C-B ₂ O ₃
1	100.00							49.99				
2		100.00							63.18			
3			100.0							18.81		
4				100.0							28.94	
5					100.00							36.51
6	29.03	22.58	48.39					14.51	14.27	9.10		
7	15.28	11.88	25.47			23.68	23.68	7.64	7.51	4.79		
8	3.42	2.66	5.69			44.12	44.12	1.71	1.68	1.07		
9				55.56	44.44						16.08	16.23
10				18.52	14.81	33.33	33.33				5.36	5.41
11				6.17	4.94	44.44	44.44				1.79	1.80
12				2.06	1.65	48.15	48.15				0.595	0.601
13	0.521					49.74	49.74	0.260				
14		0.521				49.74	49.74		0.329			
15			1.23			49.38	49.38			0.232		

a) Number of analytical samples

b) These are materials which are shown in table 1

c) Citrate soluble component (P₂O₅, K₂O, MgO, MnO, B₂O₃)

2) 試薬等の調製

- (1) りん標準液(P 10 mg/mL): りん標準液(P: 10 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH; TraceCERT)
- (2) カリウム標準液(K 1 mg/mL): カリウム標準液(K: 1000 µg/mL) (和光純薬工業; JCSS)
- (3) マグネシウム標準液(Mg 1 mg/mL): マグネシウム標準液(Mg: 1000 µg/mL) (和光純薬工業; JCSS)
- (4) マンガン標準液(Mn 1 mg/mL): マンガン標準液(Mn: 1000 µg/mL) (和光純薬工業; JCSS)
- (5) ほう素標準液(B 1 mg/mL): ほう素標準液(B: 1000 µg/mL) (和光純薬工業; JCSS)
- (6) 混合標準液: (1)～(5)の標準液を標準原液とし、各標準原液を混合・希釈して混合標準液(P 200 µg/mL, K 200 µg/mL, Mg 20 µg/mL, Mn 10 µg/mL 及び B 10 µg/mL)を調製した。また、この混合標準液を希釈し、塩酸濃度が(1+23)となるよう適宜塩酸(1+5)を加えて検量線用混合標準液を調製した。
- (7) 水: 超純水製造装置(MILLIPORE 製 Milli-Q Element A-10)を用いて精製した超純水(比抵抗値 18 MΩcm 以上)を使用した。
- (8) 塩酸: JIS K 8180 に規定する試薬(和光純薬工業; 精密分析用)を使用した。
- (9) くえん酸溶液: JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 20 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (10) りん酸水素二ナトリウム: JIS K 9020 に規定する試薬(和光純薬工業製; 試薬特級)を使用した。
- (11) 塩化カリウム: JIS K 8121 に規定する試薬(和光純薬工業製; 試薬特級)を使用した。
- (12) 酢酸マグネシウム四水和物: 和光純薬工業製, 試薬純度 99.0 %以上の試薬を使用した。
- (13) 酢酸マンガン(II)四水和物: 和光純薬工業製, 試薬純度 99.0 %以上の試薬を使用した。
- (14) 四ほう酸ナトリウム十水和物: JIS K 8866 に規定する試薬(和光純薬工業製; 試薬特級)を使用した。
- (15) 硫酸アンモニウム: JIS K 8960 に規定する試薬(和光純薬工業製; 試薬特級)を使用した。
- (16) スクロース: JIS K 8383 に規定する同等の品質の試薬(和光純薬工業; 試薬特級)を使用した。

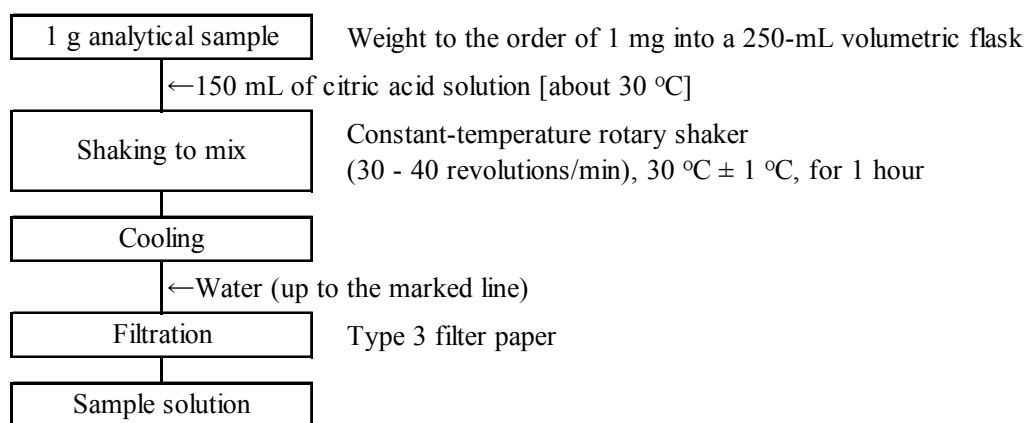
3) 装置及び器具

- (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) 恒温上下転倒式回転振り混ぜ機
- (3) 超純水製造装置: Milli-Q Element A-10 Elix UV5
- (4) 全量フラスコ
- (5) 全量ビペット
- (6) ろ紙 3 種

4) 分析方法

分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、全量フラスコ 250 mL に入れ、約 30 °C に加温したくえん酸溶液 150 mL を加え、30～40 回転/分(30 °C±1 °C)で 1 時間振り混ぜた。速やかに冷却後、標線まで水を加え、ろ紙 3 種でろ過した。ろ液の一定量を別の全量フラスコ 100 mL にとり、塩酸(1+5) 25 mL を加えて水で定容したものを試料溶液とした。試料溶液を ICP-OES に導入し、Table 3 の測定波長^{5, 6)}で発光強度を測定した。また、混合標準液を同様に測定して得られた検量線より、試料中のく溶性主成分の含有量を算出した。なお、ICP-OES の分析フローシートを Scheme 1 及び Scheme 2 に示した。

また、方法間比較による真度の評価には、同一のろ液(Scheme 1)から一定量を採取し、それぞれ Scheme 3.1 ～ Scheme 3.4 に示した従来法により分析を行った。



Scheme 1 The flow sheet of extraction procedure using constant-temperature rotary shaker

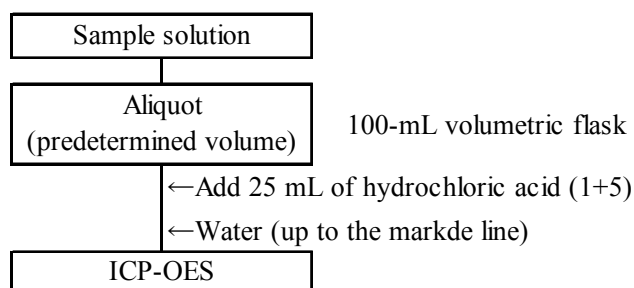
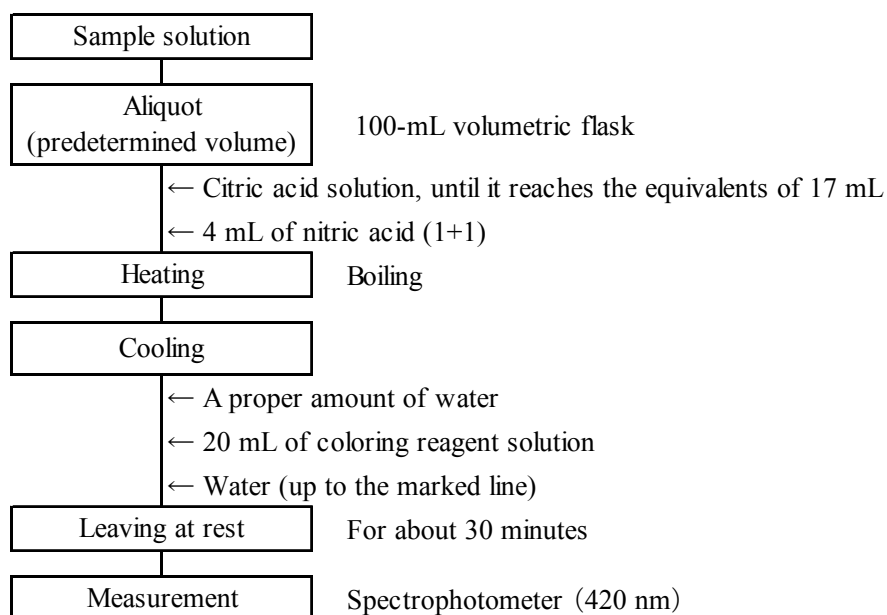
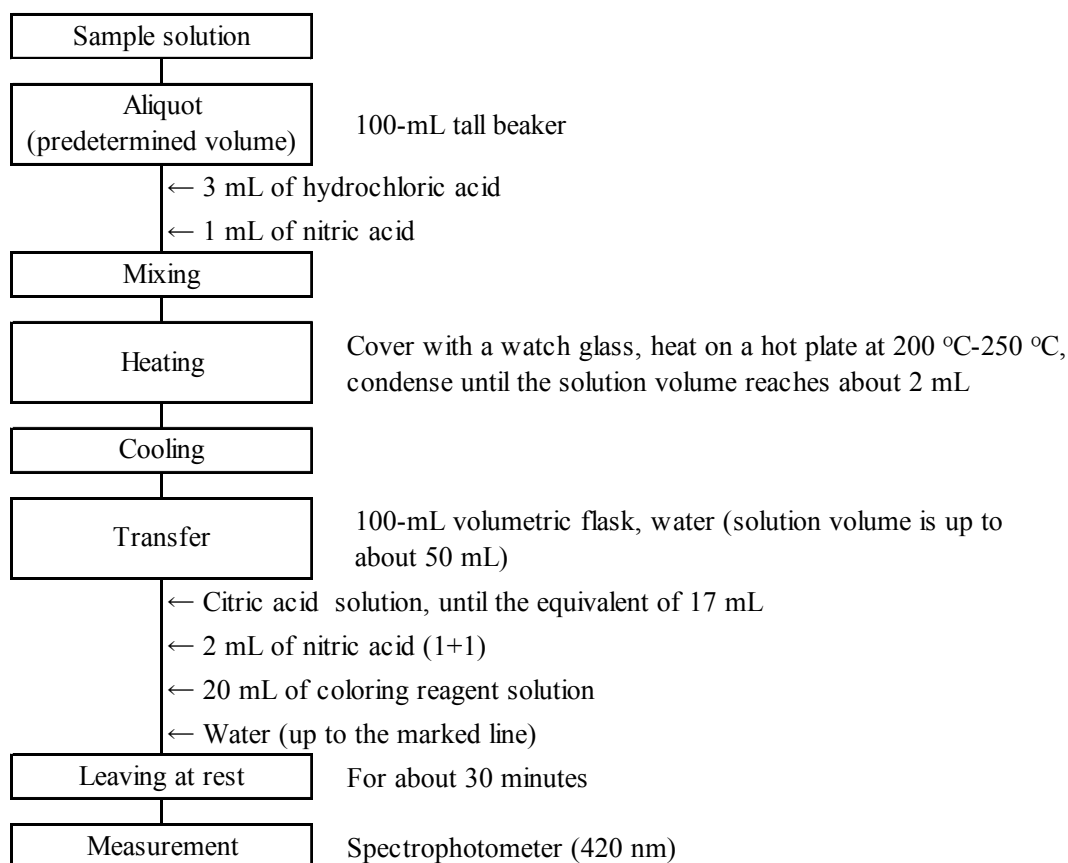
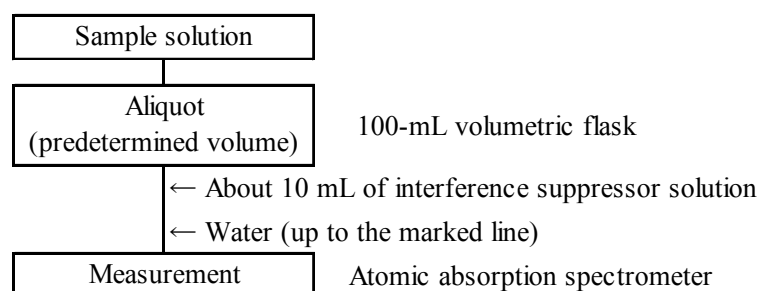
Scheme 2 Flow sheet of measurement procedure using ICP-OES for C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₅ in solid fertilizer

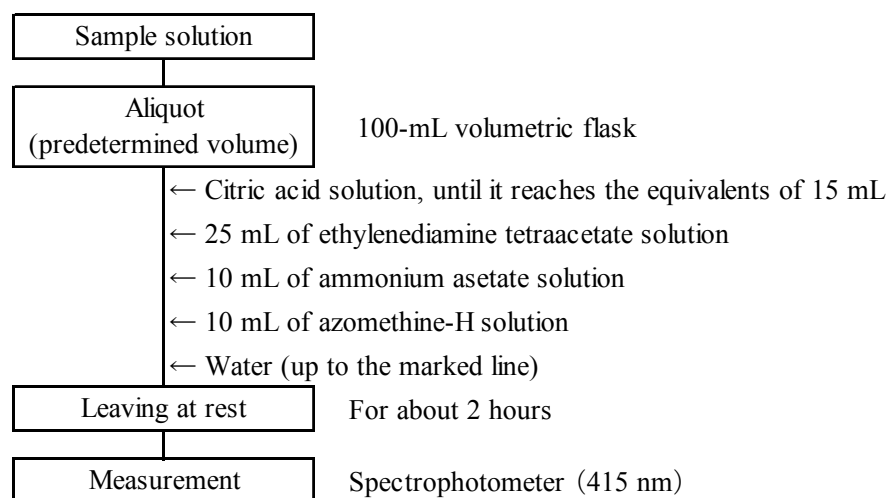
Table 3 Analysis wavelength

Element	Wavelength (nm)
P	178.287
K	766.491
Mg	279.553
Mn	257.610
B	249.773

Scheme 3-1 The flow sheet of measurement procedure using spectrophotometer for C-P₂O₅Scheme 3-2 The flow sheet of measurement procedure using spectrophotometer for C-P₂O₅ in fertilizer containing phosphite



Scheme 3-3 The flow sheet of measurement procedure using atomic absorption spectrometer for C-K₂O, C-MgO and C-MnO



Scheme 3-4 The flow sheet of measurement procedure using spectrophotometer for C-B₂O₃

3. 結果及び考察

1) 方法間比較による真度の評価

(1) 従来法と本法の比較

従来法と本法の分析値の比較を行った。従来法の分析法として、C-P₂O₅ はバナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法で 33 点、C-K₂O はフレイム原子吸光法で 17 点、C-MgO はフレイム原子吸光法で 26 点、C-MnO はフレイム原子吸光法で 16 点、C-B₂O₃ はアゾメチン H 法で 14 点の分析を行った。

各成分の従来法及び本法の分析値における回帰直線及び 95 % 予測区間の相関図を 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 4 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*) は同区間に原点 (0) が含まれ、かつ相関係数 (*r*) は 0.99 以上を推奨しており、C-P₂O₅、C-K₂O、C-MgO 及び C-MnO は、これらすべての基準を満たしていた。一方、C-B₂O₃ は傾き (*b*) 及び相関係数 (*r*) は基準を満たしていたが、切片 (*a*) に原点 (0) が含まれておらず推奨基準を満たさない結果となった。

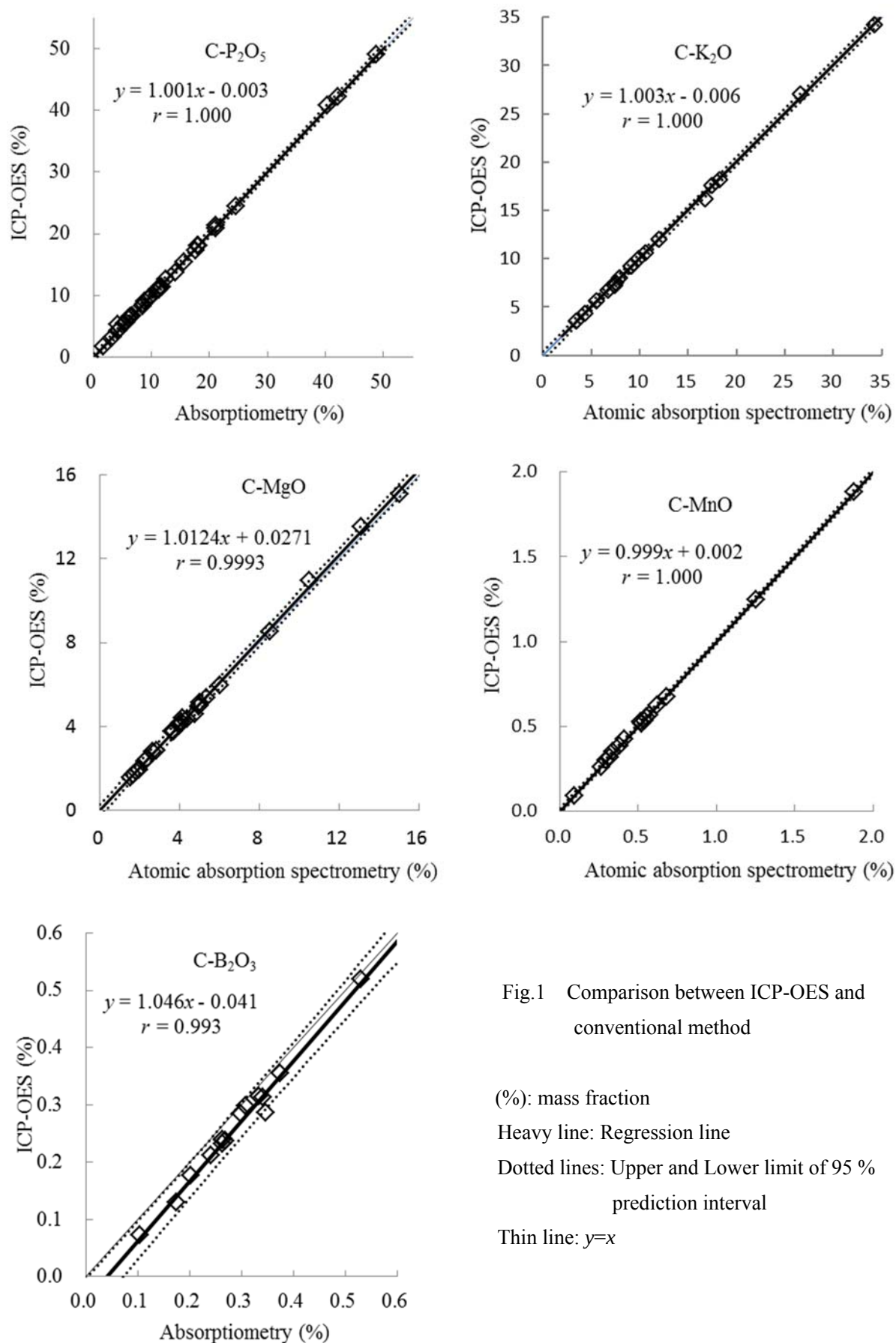


Fig.1 Comparison between ICP-OES and conventional method

Table 4 The 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line
in between ICP-OES and conventional method

	95 % confidence interval						correlation coefficient (r)
	inclination (b)			intercept (a)			
C-P ₂ O ₅	0.992	~	1.01	-0.155	~	0.150	1.000
C-K ₂ O	0.990	~	1.02	-0.192	~	0.181	0.999
C-MgO	0.997	~	1.03	-0.064	~	0.119	0.999
C-MnO	0.990	~	1.01	-0.005	~	0.008	0.999
C-B ₂ O ₃	0.967	~	1.12	-0.064	~	-0.016	0.992

(2) C-B₂O₃ の分析値の比較について

前項に示したとおり、アゾメチンH法と本法の比較では、肥料等試験法の推奨している相関の基準を満たさない結果となった。しかし、現在、肥料等試験法に収載されているC-B₂O₃のアゾメチンH法は、ろ過後のくえん酸抽出液が着色していた場合、C-P₂O₅のバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法のように活性炭による脱色で分光光度計の吸光度を補正する方法等が規定されておらず、C-B₂O₃の分析値が高値となることも考えられる(参考として化成肥料3点の抽出液をFig.2に示した。).

そこで、Table 5に示した方法を行った。すなわち、従来のアゾメチンH法で得られた吸光度を、発色試薬のアゾメチンHを加えないで測定した際の吸光度で補正し、そこから得られた分析値と本法の分析値の比較を行った(補正した吸光度=アゾメチンH法の吸光度-(アゾメチンHを添加しなかった場合の吸光度-(エチレンジアミン四酢酸及び酢酸アンモニウムの混合液の吸光度))). その結果、傾き(b)0.956~1.04, 切片(a)-0.019~0.005, 回帰直線の相関係数(r)は0.997となり、肥料等試験法の妥当性確認の推奨基準を満たす結果となった。なお、回帰直線と95%予測区間による相関図をFig.3に、95%信頼区間における傾き(b), 切片(a)及び回帰直線の相関係数(r)をTable 6に示した。

今回、着色の原因を確認するため、実際の検討に用いた流通肥料5種14点についてその原料を確認したところ、有機物が含まれていると、ろ過後のくえん酸抽出液が着色している傾向が見られた。また、前項と本項の結果から、従来のアゾメチンH法は、くえん酸抽出液が着色していた場合、何らかの方法で分析値の補正を行うか、アゾメチンH法の前処理について新たな方法を開発する必要があると示唆された。



Fig.2 Citrate solution extract of chemical fertilizer

Table 5 Correction of absorptiometry (conventional method) for C-B₂O₃^{a)}

Element	Method for finding absorbance			
	Conventional method ^{b)}	Correction value ^{c)}	Reagent mixture ^{d)}	Standard solution ^{e)}
Sample solution	○	○	-	-
Standard solution of B ₂ O ₃	-	-	-	○
Citrate solution (Equivalent to 15 mL)	○	○	○	○
EDTA	○	○	○	○
Ammonium acetate Solution	○	○	○	○
Azomethin H	○	-	-	○
Distilled water (filled up)	○	○	○	○

a) Correction absorbance of conventional method = b - (c - d). Obtain the result from the corrected absorbance.

b) Azomethin-H method

c) Measurement value without addition of azomethine H

d) Measurement value without addition of sample solution and azomethine H

e) Including B₂O₃ equivalent to 0-1 mg. Zero point correction is Including B₂O₃ equivalent to 0 mg.

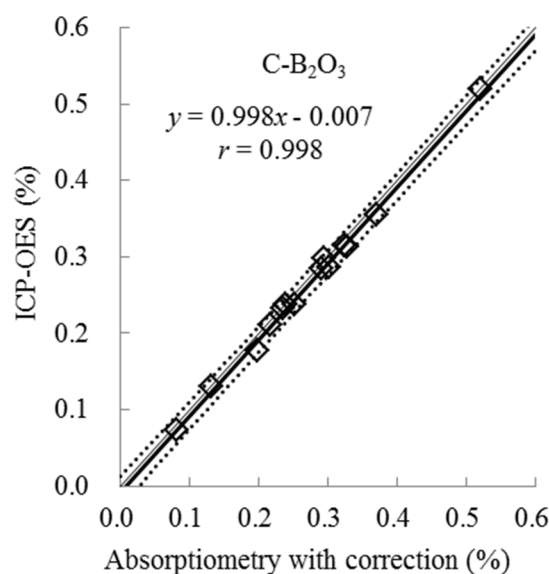


Fig.3 Comparison between ICP-OES and Correction methods
of conventional method with correction
%: mass fraction

Table 6 The 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line between
ICP-OES and conventional method or correction method of conventional method

C-B ₂ O ₃	The 95 % confidence interval						Correlation coefficient (<i>r</i>)
	Inclination (<i>b</i>)			Intercept (<i>a</i>)			
Conventional method	0.967	~	1.12	-0.064	~	-0.016	0.992
Correction method of conventional method	0.956	~	1.04	-0.019		0.005	0.997

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、Table 2 の試験品 1～試験品 15 について 3 点併行で分析を行った。C-P₂O₅ は 0.260 %～49.99 % の設計で回収率は 96.3 %～101 %，C-K₂O は 0.329 %～63.18 % の設計で回収率は 98.0 %～100 %，C-MgO は 0.232 %～18.81 % の設計で回収率は 94.9 %～103 %，C-MnO は 0.595 %～28.94 % の設計で回収率 98.5 %～106 %，C-B₂O₃ は 0.601 %～36.51 % の設計で回収率 97.0 %～102 % であった。結果として全ての成分、全ての設計濃度において、肥料等試験法が示している真度(回収率)の目標を満たしていた。

なお、各成分の設計値、測定の平均値、回収率及び相対標準偏差は Table 7 に示した。

1) (2) で吸光度を補正したアゾメチン H 法と本法の比較では相関の改善が確認された。また、本項の調製試料を用いた添加回収試験の結果では、平均値、回収率及び相対標準偏差に問題がなかったことから、本法は C-B₂O₃ の分析にも適用が可能であると判断した。

Table 7 Result of recovery test

Element	No. of sample ^{a)}	Citrate soluble component ^{b)c)}	Mean value ^{b)d)}	Mean recovery	RSD _r ^{e)}	Criteria of the trueness ^{f)}
C-P ₂ O ₅	1	49.99	50.40	101	1.35	98~102
	6	14.51	14.36	98.9	0.97	97~103
	7	7.64	7.42	97.2	1.49	96~104
	8	1.71	1.69	98.7	1.13	96~104
	13	0.260	0.251	96.3	0.51	94~106
C-K ₂ O	2	63.18	63.02	99.8	1.22	98~102
	6	14.27	14.09	98.7	1.49	97~103
	7	7.51	7.42	98.8	0.94	96~104
	8	1.68	1.65	98.0	0.90	96~104
	14	0.329	0.330	100	2.81	94~106
C-MgO	3	18.81	18.80	99.9	2.50	97~103
	6	9.10	8.93	98.2	1.02	97~103
	7	4.79	4.60	96.1	1.03	96~104
	8	1.07	1.10	103	5.14	96~104
	15	0.232	0.220	94.9	1.17	94~106
C-MnO	4	28.94	28.49	98.5	0.28	98~102
	9	16.08	16.26	101	2.22	97~103
	10	5.36	5.57	104	0.23	96~104
	11	1.79	1.78	99.5	2.15	96~104
	12	0.595	0.628	106	2.27	94~106
C-B ₂ O ₃	5	36.51	37.52	102	0.85	98~102
	9	16.23	16.27	100	1.34	97~103
	10	5.41	5.50	102	3.35	96~104
	11	1.80	1.81	101	3.02	96~104
	12	0.601	0.583	97.0	2.82	94~106

a) Number of analytical samples

b) Mass fraction

c) Citrate soluble component

d) Mean Value ($n=3$)

e) Repeatability relative standard deviation

f) Criteria of trueness (recovery) shown in Testing Methods of Fertilizers

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、化成肥料及び配合肥料について、各成分 2 点併行で日にちを変えて 7 日間本法による試験を実施した。得られた結果は Table 8 に示した。さらに、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 9 に示した。

化成肥料の C-P₂O₅、C-K₂O、C-MgO、C-MnO 及び C-B₂O₃ の平均値は質量分率 20.90 %, 16.17 %, 1.66 %, 0.54 % 及び 0.38 %, 併行相対標準偏差は 0.6 %, 0.8 %, 1.6 %, 2.3 % 及び 1.9 %, 中間相対標準偏差は 0.9 %, 1.0 %, 1.8 %, 3.1 % 及び 3.1 % であった。また、配合肥料の C-P₂O₅、C-K₂O、C-MgO、C-MnO 及び C-B₂O₃ の平均値は質量分率 6.44 %, 4.42 %, 8.41 %, 0.09 % 及び 0.08 %, 併行相対標準偏差は 0.9 %, 1.0 %, 1.1 %, 1.9 % 及び 4.2 %, 中間相対標準偏差は 1.0 %, 1.6 %, 1.1 %, 2.4 % 及び 7.5% であった。いずれの結果も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又は許容値の範囲以内であった。

Table 8 Repeatability test results on different (%(mass fraction))

Sample	Element	Test days						
		1	2	3	4	5	6	7
Chemical fertilizer	C-P ₂ O ₅	20.76	20.80	21.08	20.95	20.84	20.81	21.18
		20.88	20.79	21.18	20.52	20.88	20.93	21.04
	C-K ₂ O	16.13	16.27	16.28	16.03	16.09	16.08	16.21
		16.38	16.04	16.32	15.83	16.35	16.08	16.25
	C-MgO	1.66	1.67	1.65	1.69	1.66	1.69	1.68
		1.68	1.64	1.68	1.67	1.57	1.66	1.68
	C-MnO	0.550	0.523	0.576	0.556	0.536	0.561	0.535
		0.535	0.538	0.555	0.556	0.513	0.535	0.539
	C-B ₂ O ₃	0.373	0.382	0.370	0.384	0.377	0.384	0.358
		0.374	0.402	0.380	0.383	0.363	0.378	0.361
Compound fertilizer	C-P ₂ O ₅	6.51	6.51	6.41	6.39	6.37	6.41	6.44
		6.36	6.54	6.44	6.51	6.35	6.46	6.47
	C-K ₂ O	4.37	4.49	4.34	4.41	4.37	4.37	4.47
		4.32	4.50	4.44	4.43	4.45	4.42	4.49
	C-MgO	8.48	8.65	8.36	8.52	8.42	8.37	8.32
		8.35	8.36	8.34	8.51	8.34	8.31	8.39
	C-MnO	0.0883	0.0884	0.0907	0.0932	0.0895	0.0883	0.0884
		0.0849	0.0916	0.0921	0.0897	0.0881	0.0883	0.0878
	C-B ₂ O ₃	0.0808	0.0800	0.0665	0.0737	0.0734	0.0745	0.0802
		0.0719	0.0827	0.0696	0.0733	0.0712	0.0757	0.0863

Table 9 Repeatability and intermediate precision

Sample	Element	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)} (%)
Chemical fertilizer	C-P ₂ O ₅	20.90	0.13	0.6	1.5	0.18	0.9	2.5
	C-K ₂ O	16.17	0.13	0.8	1.5	0.15	1.0	2.5
	C-MgO	1.66	0.03	1.6	2	0.03	1.8	3.5
	C-MnO	0.54	0.01	2.3	3	0.02	3.1	4.5
	C-B ₂ O ₃	0.38	0.007	1.9	3	0.01	3.1	4.5
Compound fertilizer	C-P ₂ O ₅	6.44	0.06	0.9	2	0.06	1.0	3.5
	C-K ₂ O	4.42	0.04	1.0	2	0.04	1.6	3.5
	C-MgO	8.41	0.09	1.1	2	0.10	1.1	3.5
	C-MnO	0.09	0.002	1.9	4	0.002	2.4	6.5
	C-B ₂ O ₃	0.08	0.003	4.2	4	0.006	7.5	6.5

a) $n=14$ (2 repetition $\times$ 7 days)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability relative standard deviation

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate relative standard deviation

4) 定量下限等の確認

肥料の公定規格において、配合肥料中の含有すべき主成分の最小量は、く溶性りん酸、く溶性加里及びく溶性苦土は 1.0 %, く溶性マンガン及びく溶性ほう素は 0.005 %と定められてる。また、肥料等試験法において、定量下限は流通肥料中の含有最小量の 1/5 以下であることが推奨されている。これらを踏まえたうえで定量下限の推定を行った。

Table 2 に示した調製試料のうち、C-P₂O₅ は試験品 13 (設計値 質量分率 0.260 %), C-K₂O は試験品 14 (設計値 質量分率 0.329 %), C-MgO は試験品 15 (設計値 質量分率 0.232 %) を用いて 7 点併行で試験を実施し定量下限の推定を行った。一方、C-MnO 及び C-B₂O₃ は目標とする定量下限が 0.001 % となり、自家配合で肥料を調製することが困難なことから、方法間比較の検討に用いた流通肥料のうち、最も分析値の低かった配合肥料を用いて 7 点併行試験による定量下限の推定を行った。

各成分とも、併行試験により求められた標準偏差から、定量下限は(標準偏差)×10、また、検出下限は(標準偏差)×2× $t(n-1, 0.05)$ を用いて算出した。その結果、C-P₂O₅ の定量下限は 0.01 % 程度、検出下限は 0.005 % 程度、C-K₂O の定量下限は 0.09 % 程度、検出下限は 0.04 % 程度、C-MgO の定量下限は 0.03 % 程度、検出下限は 0.01 % 程度、C-MnO の定量下限は 0.01 %, 検出下限は 0.004 %, C-B₂O₃ の定量下限は 0.01 % 程度、検出下限は 0.005 % 程度と推定された。

現在市場に流通している配合肥料の最小保証成分量と、今回推定された定量下限及び検出下限の比較を行ったところ、C-P₂O₅、C-K₂O 及び C-MgO については最小保証成分量の 1/5 以下であり、本法の適用が十分可能であることが確認できた。一方、C-MnO 及び C-B₂O₃ については最小保証成分量を定量できるほどの定量下限は確保できなかったが、質量分率での保証成分量が、C-MnO 及び C-B₂O₃ ともに 0.01 % 以上であれば本法による定量が可能で、かつ、最小保証成分量の 0.005 % であった場合には、本法により検出が可能であると判断した。なお、結果については Table 10 に示した。

Table 10 Estimation of the lower limit of quantitation (LOQ)

Elemnt	Sample	Content (%)	Mean ^{a)} (%)	s_r ^{b)} (%)	LOQ ^{c)} (%)	LOD ^{d)} (%)
C-P ₂ O ₅	Analytical sample No.13	0.260	0.251	0.001	0.01	0.005
C-K ₂ O	Analytical sample No.14	0.329	0.330	0.009	0.09	0.04
C-MgO	Analytical sample No.15	0.232	0.220	0.003	0.03	0.01
C-MnO	Compound fertilizer	–	0.0868	0.001	0.01	0.004
C-B ₂ O ₃	Compound fertilizer	–	0.0802	0.001	0.01	0.005

a) Mean value of the parallel test ($n=7$)

b) Repeatability standard deviation

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

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

4. まとめ

ICP-OES による固形肥料中のく溶性成分の分析法を検討したところ、次の結果が得られた。

(1) 市場に流通している固形肥料のうち、C-P₂O₅ を保証する肥料は 33 点、同様に C-K₂O は 17 点、C-MgO は 26 点、C-MnO は 16 点、C-B₂O₃ は 14 点の試料を用い、従来法と本法の比較を行った。得られた分析値の真度を確認するため、95 %信頼区間の傾き(b)、切片(a)及び回帰直線の相関係数(r)を求めたところ、C-P₂O₅,

C-K₂O, C-MgO 及び C-MnO は、肥料等試験法に定める推奨基準を満たし、従来法と本法の間に強い相関が認められた。一方、C-B₂O₃ は 95 %信頼区間に原点 (0) が含まれず推奨基準を満たさない結果となった。

(2) C-B₂O₃ の分析について、肥料等試験法に収載のアゾメチン H 法で得られた吸光度を、発色試薬のアゾメチン H を加えないで測定した際の吸光度で補正し、その補正值から計算で得られた分析値と本法の分析値との比較を行った。その結果、傾き (b) 0.956~1.04, 切片 (a) -0.019~0.005, 回帰直線の相関係数 (r) は 0.997 となり、肥料等試験法に定める妥当性確認の推奨基準を満たす結果となった。

(3) 添加回収試験による真度確認のため、5 種類のく溶性成分のいずれかが含まれる試料を合計で 15 点調製し分析を行ったところ、それぞれの成分の回収率は C-P₂O₅ が 96.3 %~101 %, C-K₂O が 98.0 %~100 %, C-MgO が 94.9 %~103 %, C-MnO が 98.5 %~106 %, C-B₂O₃ が 97.0 %~102 %となり、全ての成分及び設計濃度で肥料等試験法の基準を満たす結果となった。

(4) (2)及び(3)の結果により、本法による C-B₂O₃ の分析の真度が確認された。

(5) 併行精度及び中間精度を確認するため、化成肥料及び配合肥料について 2 点併行で日を変えて 7 回試験を実施したところ、C-P₂O₅ の平均値は質量分率 20.90 %及び 6.44 %で、併行相対標準偏差は 0.6 %及び 0.9 %, 中間相対標準偏差は 0.9 %及び 1.0 %, C-K₂O の平均値は質量分率 16.17 %及び 4.42 %, 併行相対標準偏差 0.8 %及び 1.0 %, 中間相対標準偏差は 1.0 %及び 1.6 %, C-MgO の平均値は質量分率 1.66 %及び 8.41 %, 併行相対標準偏差は 1.6 %及び 1.1 %, 中間相対標準偏差は 1.8 %及び 1.1 %, C-MnO の平均値は質量分率 0.54 %及び 0.09 %, 併行相対標準偏差は 2.3 %及び 1.9 %, 中間相対標準偏差は 3.1 %及び 2.4 %, C-B₂O₃ の平均値は質量分率 0.38 %及び 0.08 %, 併行相対標準偏差は 1.9 %及び 4.2 %, 中間相対標準偏差は 3.1 %及び 7.5 %となり、いずれ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) の目安以内であった。

(6) 本法における定量下限及び検出下限は、C-P₂O₅ は 0.01 %及び 0.005 %程度、C-K₂O は 0.09 %及び 0.04 %程度、C-MgO は 0.03 %及び 0.01 %程度、C-MnO は 0.01 %及び 0.004 %, C-B₂O₃ は 0.01 %及び 0.005 %程度と推定された。

文 献

- 1) 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)
- 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(2017)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2017.pdf>
- 3) 肥料取締法施行令:昭和 25 年 6 月 20 日, 政令第 198 号, 最終改正平成 28 年 3 月 24 日, 政令第 73 号 (2016)
- 4) 農林水産省告示:肥料取締法施行令第一条の二の規定に基づき農林水産大臣の指定する有効石灰等を指定する件, 昭和 59 年 3 月 16 日, 農林水産省告示第 695 号, 最終改正平成 11 年 5 月 13 日, 農林水産省告示第 704 号 (2009)
- 5) 青山恵介:ICP 発光分光分析(ICP-OES)法による液状肥料中の水溶性主成分の測定, 肥料研究報告, **8**, 1~8(2015)
- 6) 青山恵介:ICP 発光分光分析(ICP-OES)法による液状肥料中の効果発現促進材の測定, 肥料研究報告, **9**, 1~9(2016)

Simultaneous Determination of Citrate-soluble Principal Ingredients (C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃) in Fertilizer using Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)

Shingo MATSUO¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

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

A single-laboratory validation study was conducted for the simultaneous determination of citrate-soluble principal ingredients (C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃) in fertilizer products by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). The fertilizer was extracted with citrate solution. Hydrochloric acid was added to the extract, diluted with water, and analyzed with ICP - OES. As a result of 3 replicate analysis in 5 fertilizer samples prepared to contain with C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃ at 0.232 % ~ 63.18 % (mass fraction), 0.260 % ~ 49.99 %, 0.329 % ~ 63.18 %, 0.232 % ~ 18.81 %, 0.595 % ~ 28.94 % and 0.601 % ~ 36.51 %, the mean recoveries were 96.3 % ~ 101 %, 98.0 % ~ 100 %, 94.9 % ~ 103 %, 98.5 % ~ 106 % and 97.0 % ~ 102 %, respectively. Repeatability relative standard deviation of C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃ (*RSD_r*) were 0.6 % ~ 0.9 %, 0.8 % ~ 1.0 %, 1.1 % ~ 1.6 %, 1.9 % ~ 2.3 % and 1.9 % ~ 4.2 %, respectively. Intermediate relative standard deviation of C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃ (*RSD_{I(T)}*) were 0.9 % ~ 1.0 %, 1.0 % ~ 1.6 %, 1.1 % ~ 1.8 %, 2.4 % ~ 3.1 % and 3.1 % ~ 7.5 %, respectively. The limit of quantitative value (*LOQ*) of were C-P₂O₅, C-K₂O, C-MgO, C-MnO and C-B₂O₃ were 0.01 %, 0.09 %, 0.03 %, 0.01 % and 0.01 %, respectively. Those results indicated that the developed method was valid for the analysis of citrate-soluble principal ingredients in a fertilizer.

Key words ICP-OES, citrate-soluble principal ingredients, fertilizer

(Research Report of Fertilizer, **11**, 14~28, 2018)

3 堆肥及び汚泥肥料等に含まれる苦土全量の測定

―フレイム原子吸光法の適用―

平田絵理香¹, 添田英雄¹, 吉村英美¹, 八木啓二¹

キーワード 苦土全量, 堆肥, 汚泥肥料, フレイム原子吸光法, 肥料等試験法

1. はじめに

農林水産消費安全技術センター(FAMIC)では, 肥料分析法(1992 年版)¹⁾に掲載されている各成分の試験法の性能を順次評価しつつ, 肥料等試験法²⁾に記載しホームページで公表している. 近年, 肥料成分として有機質肥料中に含まれる苦土が注目されてきているが, 堆肥, 汚泥肥料等を対象とした苦土全量(T-MgO)測定法については, 肥料等試験法で記載されていない.

このことから, 既に肥料等試験法²⁾に石灰全量等の試験法として記載されている試料溶液の調製方法を堆肥, 汚泥肥料等を対象とした苦土全量に適用し, フレイム原子吸光分析装置を用いて系統的に分析できる方法を検討したうえで, 単一試験室での妥当性確認を実施したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 調査対象肥料

流通している堆肥及び汚泥肥料等(計 7 種類 15 点)を収集して分析に供した. 内訳は堆肥(6 点), 汚泥発酵肥料(2 点), し尿汚泥肥料(2 点), 鶏ふん燃焼灰(2 点), 下水汚泥肥料(以下 1 点), 工業汚泥肥料, 動物の排泄物である. 堆肥(6 点)の内訳は鶏ふん堆肥(2 点), 家きんふん堆肥(以下 1 点), 豚ふん堆肥, 牛ふん堆肥, バーク堆肥である. 鶏ふん燃焼灰は有機質を含む堆肥及び汚泥肥料等に該当しないが, 苦土全量を測定している分析機関に対して苦土全量の依頼が多い試料を調査したところ鶏ふん燃焼灰が挙げられたため, 調査対象肥料として分析に供した. これらの調査対象肥料は, 必要に応じて 65 °C で 5 時間あるいは 40 °C で 70 時間程度の予備乾燥を行い, 遠心粉碎機で目開き 500 µm のふるいを通すように粉碎し混合した. 乾燥及び粉碎後の調査対象肥料は, ポリ袋に入れて密封し, 分析時まで常温で保存した.

2) 装置及び器具

- (1) 原子吸光分析装置: 日本ジャーレル・アッシュ SOLAAR M5
- (2) 電気炉: KOYO KBF828N1
- (3) ホットプレート: 柴田科学 NP-6

3) 試薬の調製

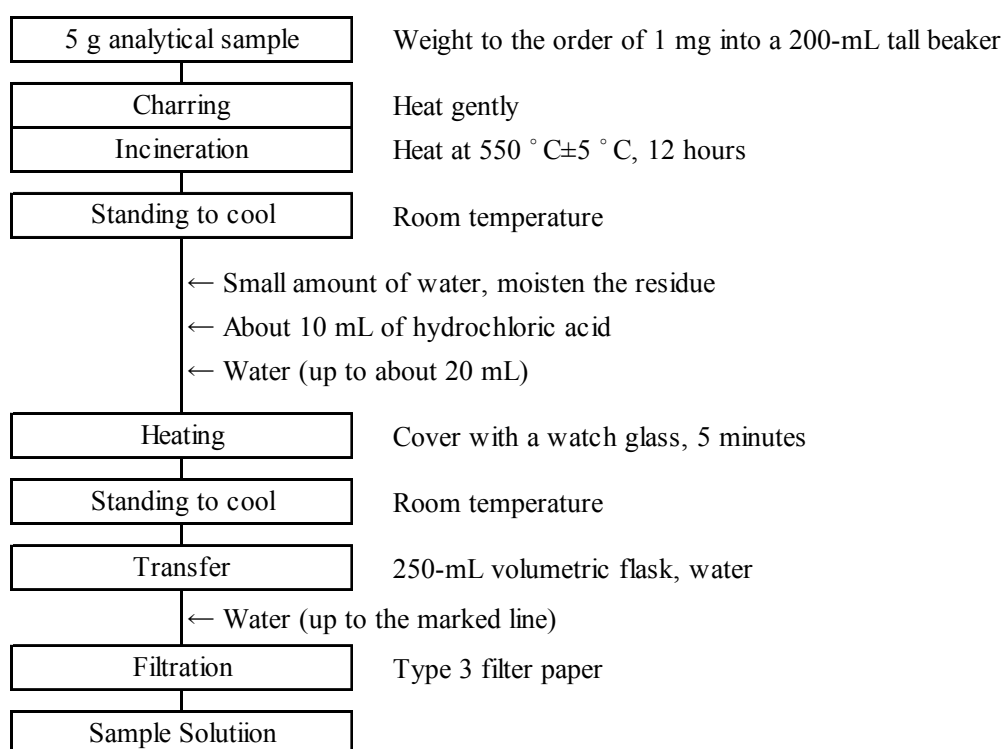
- (1) 水: 水精製装置(日本ミリポア Elix Advantage 5)を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 の水を使用した.

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

- (2) 硝酸: JIS K 8541 に規定する同等の品質の試薬(関東化学;有害金属測定用)を使用した.
- (3) 塩酸: JIS K 8180 に規定する同等の品質の試薬(関東化学;有害金属測定用)を使用した.
- (4) 硫酸マグネシウム七水和物: JIS K 8995 に規定する同等の品質で純度 99.5 %以上の試薬(和光純薬工業)を使用した.
- (5) スクロース: JIS K 8383 に規定する同等の品質の試薬(和光純薬工業)を使用した.
- (6) 干渉抑制剤溶液: JIS K 8132 に規定する塩化ストロンチウム六水和物 60.9 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.
- (7) マグネシウム標準液(Mg 1 mg/mL): マグネシウム標準液(Mg 1000 mg/L) (和光純薬工業;JCSS)を使用した.
- (8) マグネシウム標準液(Mg 0.1 mg/mL): マグネシウム標準液(Mg 1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり, 標線まで水を加えた.
- (9) 検量線用マグネシウム標準液(Mg 1 µg/mL~10 µg/mL): マグネシウム標準液(Mg 0.1 mg/mL) の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 250 mL に段階的にとり, 干渉抑制剤溶液約 25 mL を加え, 標線まで水を加えた.
- (10) 検量線用空試験液: 干渉抑制剤溶液約 25 mL を全量フラスコ 250 mL にとり, 標線まで水を加えた.

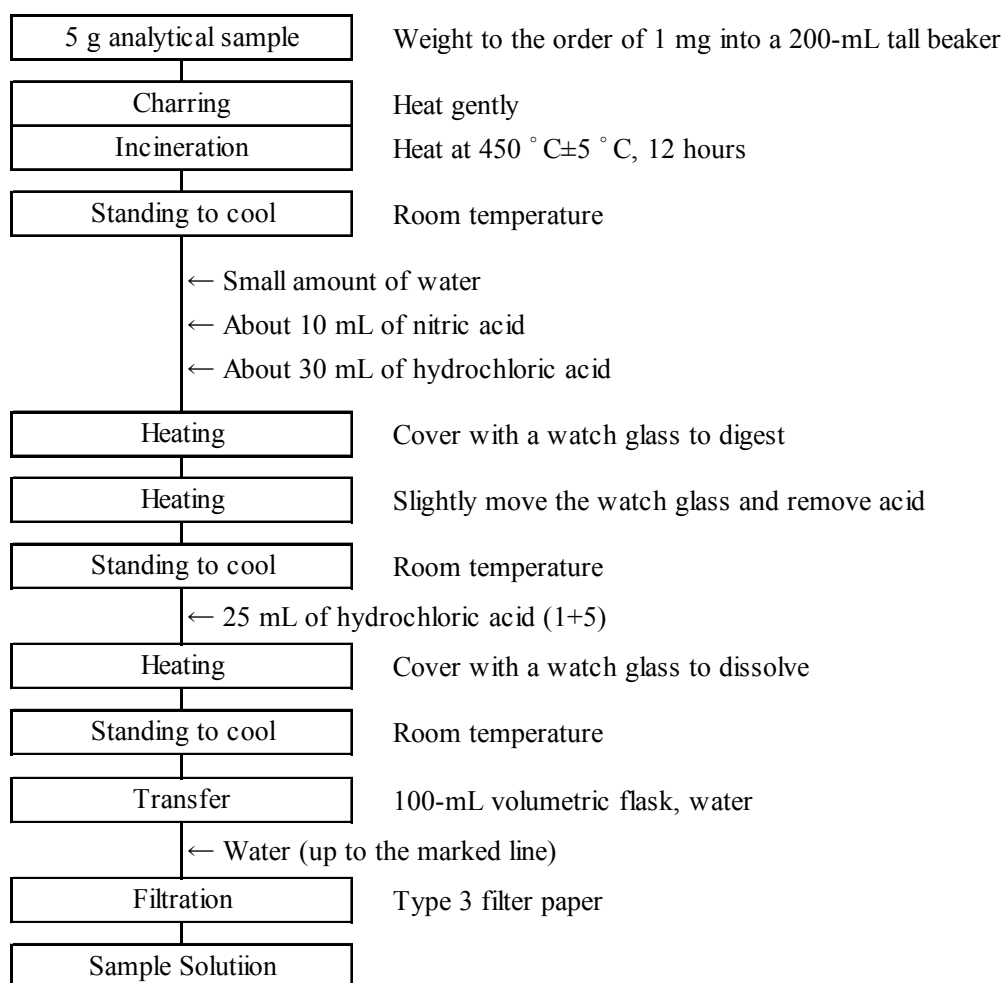
4) 試験方法

苦土全量(T-MgO)の抽出及び測定は, 肥料等試験法²⁾に記載されている石灰全量の試験法(Table 1)を用いて検討した. 参考のために, 各試験法のフローシート(Scheme 1~3)を示した.

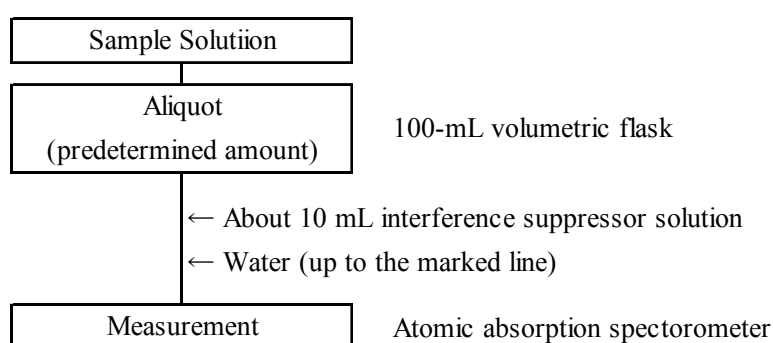


Scheme 1 The flow sheet for total magnesium in fertilizers

(Preparation of sample solution by incineration-hydrochloric acid boiling)



Scheme 2 The flow sheet for total magnesium in fertilizers
(Preparation of sample solution by incineration-aqua regia digestion)



Scheme 3 The flow sheet for total magnesium in fertilizers
(Measurement)

Table 1 Method of total magnesium

Testing Methods for Fertilizers	Preparation of sample solution
4.5.1.a Flame atomic absorption spectrometry	(4.1.1) Incineration-hydrochloric acid boiling
4.5.1.a Flame atomic absorption spectrometry	(4.1.2) Incineration-aqua regia digestion

3. 結果及び考察

1) 試料溶液の調製方法の検討

肥料等試験法²⁾によると、石灰全量のフレイム原子吸光法には試料溶液の調製方法が2通り収載されている。試料を550℃で灰化した後に塩酸10 mLと水約10 mLを加える灰化－塩酸煮沸操作(以下、塩酸煮沸法とする。)と、試料を450℃で灰化した後に硝酸10 mLと塩酸30 mLを加える灰化－王水分解操作(以下、王水分解法とする。)である。それぞれの調製方法で苦土全量(T-MgO)を測定し、得られた測定値で回帰分析を行い試料溶液調製方法の比較を行った。結果はTable 2に示すとおりである。

塩酸煮沸法による分析試料中の苦土全量(T-MgO)の測定値の範囲は0.225%～6.921%(質量分率)であり、王水分解法による分析試料中の苦土全量(T-MgO)の測定値の範囲は0.237%～6.814%(質量分率)であった。塩酸煮沸法において、王水分解法による測定値との差及び測定値に対する割合は-0.049%～0.107%(質量分率)及び93.6%～104.7%であった。

塩酸煮沸法と王水分解法について測定値の相関並びに95%予測区間を回帰直線の周囲に描き、Figure 1で示した。また、Figure 1の回帰直線について傾き(b)と切片(a)の95%信頼区間及び相関係数(r)をTable 3で示した。

調製方法間の測定値を比較するために、肥料等試験法²⁾に記載されている妥当性確認の真度評価を用いた。肥料等試験法²⁾で定める推奨基準では、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(r)が0.99以上であることとしている。Table 3によると、相関係数(r)の基準を満たしていたものの、傾き(b)と切片(a)については推奨基準を満たすことができなかった。この理由として、Table 2で示した2方法間による測定値の差が低濃度ではプラス側にあり、高濃度ではマイナス側にある傾向が認められたことが考えられる。この傾向から、回帰直線上において塩酸煮沸法の測定値が王水分解法よりもわずかに高くなり、回帰直線の傾き(a)や切片(b)に影響を与えたことが原因だと考えられる。

そこで、分析試料15点の測定値を用いて対応のあるt検定を実施したところ、2方法間で有意な差は認められなかった。このことから、回帰直線上において塩酸煮沸法の測定値がわずかに高くなる傾向があるが、2方法間の測定値に有意差は認められず、どちらの調製方法を選択してもほぼ同等の測定値を得ることができると考えられる。以上の結果から、2-2)真度評価結果以降の試料溶液の調製方法は、王水分解法を用いて検討した。

Table 2 Analysis results by Incineration-hydrochloric acid boiling or Incineration-aqua regia digestion

Sample	Incineration- hydrochloric acid boiling	Incineration-aqua regia digestion	The difference in the measure	The comparison of the measure
	A (%) ^{a)}	B (%) ^{a)}	A-B (%) ^{a)}	(A/B)×100 (%)
Cattle manure compost	0.719	0.768	-0.049	93.6
Pig manure compost	3.117	3.101	0.016	100.5
Poultry manure compost	1.228	1.207	0.021	101.7
Compost of chicken droppings 1	1.173	1.182	-0.009	99.3
Compost of chicken droppings 2	1.542	1.473	0.069	104.7
Bark compost	0.225	0.237	-0.012	94.7
Excrement of livestock	1.239	1.226	0.012	101.0
Incineration ash of chicken droppings 1	6.921	6.814	0.107	101.6
Incineration ash of chicken droppings 2	4.137	4.048	0.089	102.2

a) Mass fraction

Table 2 Continue

Sample	Incineration- hydrochloric acid boiling	Incineration-aqua regia digestion	The difference in the measure	The comparison of the measure
	A (%) ^{a)}	B (%) ^{a)}	A-B (%) ^{a)}	(A/B)×100 (%)
Composted sludge fertilizer 1	1.345	1.365	-0.019	98.6
Composted sludge fertilizer 2	0.831	0.847	-0.016	98.1
Human waste sludge fertilizer 1	0.486	0.503	-0.017	96.7
Human waste sludge fertilizer 2	1.470	1.456	0.014	101.0
Sewage sludge fertilizer	1.206	1.234	-0.028	97.7
Industrial sludge fertilizer	0.407	0.429	-0.022	94.9

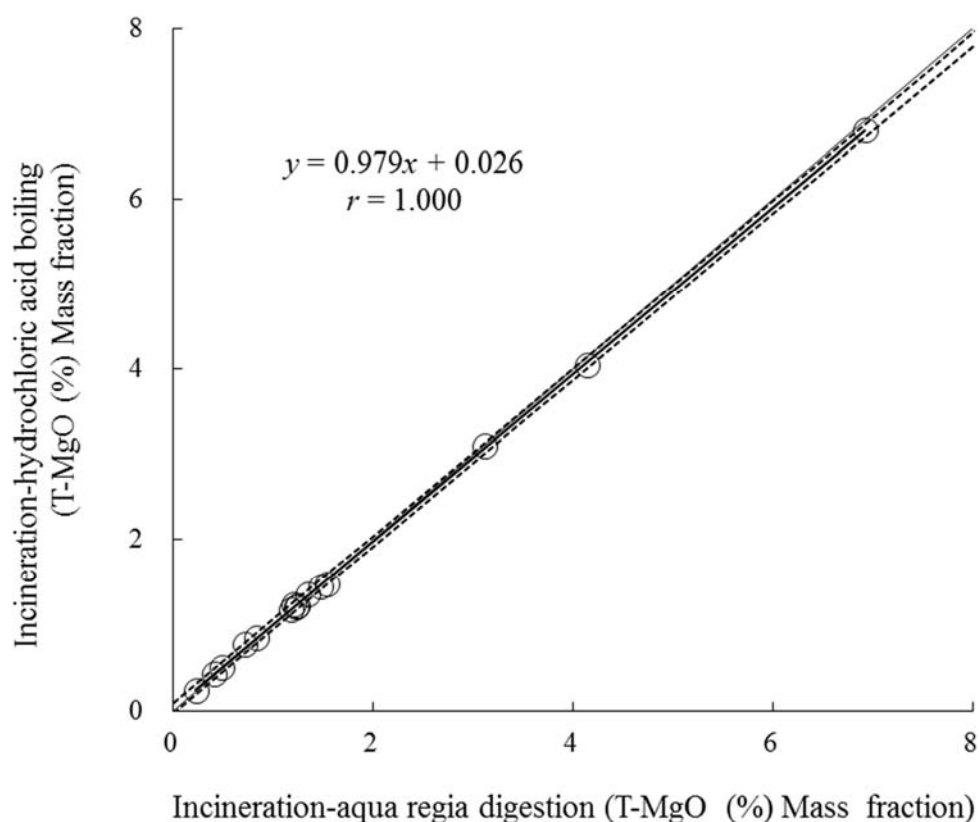


Figure 1 Comparison between Incineration-hydrochloric acid boiling and Incineration-aqua regia digestion
 Heavy line: Regression line,
 Dotted lines: Upper and Lower limit of 95 % prediction intervals,
 Thin line: $y=x$

Table 3 The 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line

Method of benchmark	Method of object	95 % confidence interval		Correlation coefficient (r)
		Inclination (b)	Intercept (a)	
Incineration-hydrochloric acid boiling	Incineration-aqua regia digestion	0.970 ~ 0.988	0.0053 ~ 0.0471	1.000

2-1) 真度評価用試料の調製に用いた硫酸マグネシウム七水和物中の苦土の含有量

真度評価用試料の調製に用いた硫酸マグネシウム七水和物中の苦土 (MgO) の含有量を肥料等試験法²⁾に収載されている水溶性苦土 (W-MgO) の試験法により, 3 点併行で測定した結果を Table 4 に示した. 理論値に対する平均値の割合は 99.8 % であり, 試薬純度の表示値を満たしていた. また, 相対標準偏差は 0.59 % と小さかった. このことから, 真度評価用試料の調製では理論値を用いて配合設計を行った. 真度評価用試料の配合設計は Table 5 のとおりである.

Table 4 Content of W-MgO for the reagent

Reagent	Theoretical value	Mean ^{a)}	s_r	The comparison of the theoretical value	Purity	RSD_r ^{b)}
	A (%) ^{c)}	B (%) ^{c)}	(%) ^{c)}	C ^{d)} (%)	(%)	(%)
Magnesium sulfate-7 hydrate (W-MgO)	16.35	16.32	0.10	99.8	min 99.5	0.59

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

b) Repeatability relative standard deviation

c) Mass fraction

d) $C = (B/A) \times 100$

Table 5 The combination percentages of the sample used for the test

Reagents	Sample		
	MgO-5	MgO-1	MgO-0.2
Magnesium sulfate-7 hydrate (MgO:16.35%)	30.58	6.12	1.22
Sucrose	69.42	93.88	98.78
Percentage of total magnesium (%) ^{a)}	5.00	1.00	0.20

a) Mass fraction

2-2) 真度評価結果

真度評価用試料 (Table 5) を用いて 3 点併行で苦土全量 (T-MgO) の試験を実施した成績を Table 6 に示した. 苦土 (MgO) として 0.2 % ~ 5.0 % (質量分率) を含有する調製試料を用いて, 苦土全量 (T-MgO) を測定したところ, 設計値と測定値との差は 0.01 % ~ 0.12 % (質量分率) であり, 設計値に対する回収率は, 102 % ~ 103 % であった.

なお, 肥料等試験法²⁾で示されている濃度レベルにおける回収率の目安は濃度 5.0 % (質量分率) 及び 1.0 % (質量分率) で 96 % ~ 104 %, 0.2 % (質量分率) で 94 % ~ 106 % であり, 3 濃度全ての回収率がこれらの目安を満たしていた. このことから, 石灰全量のフレイム原子吸光法は, 堆肥及び汚泥肥料等の苦土全量 (T-MgO) の評価を得るのに十分な正確さを有していることが確認された.

Table 6 Result of recovery test

Sample	Content of T-MgO ^{a)}	Mean ^{b)}	The difference between spike level and mean	The comparison of the mean	recovery rate	s_r ^{c)}	RSD_r	Criteria of the trueness
	A (%) ^{d)}	B (%) ^{d)}	C ^{e)} (%) ^{d)}	D ^{f)} (%)	E ^{g)} (%)	F (%) ^{d)}	G ^{h)} (%)	(%)
MgO-5	5.00	5.12	0.12	2.4	102	0.04	0.8	96~104
MgO-1	1.00	1.02	0.02	1.7	102	0.01	0.8	96~104
MgO-0.2	0.20	0.21	0.01	3.0	103	0.00	1.7	94~106

a) Content of W-MgO for the sample (design value)

b) Mean value of parallel test ($n = 3$)c) Standard deviation of parallel test ($n = 3$)

d) Mass fraction

e) $C = B - A$ f) $D = (C / A) \times 100$ g) $E = (B / A) \times 100$ h) $G = (F / B) \times 100$

3) 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、Table 2 で示した豚ふん堆肥、汚泥発酵肥料 2 及び鶏ふん燃焼灰 2 を用いて、灰化－王水分解操作による苦土全量(T-MgO)の測定を 2 点併行で日を変えて 5 回実施し得られた結果を Table 7 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 8 に示した。

Table 8 より、豚ふん堆肥の総平均値は 3.14 % (質量分率) で、併行相対標準偏差は 1.06 %、中間相対標準偏差は 1.49 % であった。汚泥発酵肥料 2 の総平均値は 0.84 % (質量分率)、併行相対標準偏差が 1.25 % で中間相対標準偏差は 1.34 % であった。そして、鶏ふん燃焼灰 2 の総平均値は 3.99 % (質量分率) で、併行相対標準偏差は 0.77 %、中間相対標準偏差は 0.77 % 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ことから、石灰全量のフレーム原子吸光法は堆肥、汚泥肥料及び鶏ふん燃焼灰の苦土全量測定法として十分な精度を有していることが確認された。

Table 7 Repeatability test results on different days (Mass fraction (%))

Sample	Test day					Total mean
	1	2	3	4	5	
Pig manure compost	3.21	3.17	3.14	3.16	3.10	3.14
	3.18	3.17	3.12	3.06	3.11	
Composted sludge fertilizer 2	0.84	0.84	0.84	0.84	0.83	0.84
	0.85	0.85	0.82	0.82	0.84	
Incineration ash of chicken droppings 2	3.98	3.93	4.00	4.00	3.98	3.99
	3.99	4.01	4.00	4.02	4.03	

Table 8 Repeatability and intermediate precision

Sample	Mean ^{a)} (%) ^{h)}	Repeatability			Intermediate precision		
		s_r ^{b)} (%) ^{h)}	RSD_r ^{c)} (%)	$CRSD_r$ ^{d)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)} (%) ^{h)}	$RSD_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)
Pig manure compost	3.14	0.03	1.06	2	0.05	1.49	3.5
Composted sludge fertilizer 2	0.84	0.01	1.25	3	0.01	1.34	4.5
Incineration ash of chicken droppings 2	3.99	0.03	0.77	2	0.03	0.77	3.5

a) $n = 10$ (2 repetition $\times$ 5 days)

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of repeatability relative standard deviation

e) Intermediate standard deviation

f) Intermediate relative standard deviation

g) Criteria of intermediate relative standard deviation

h) Mass fraction

4) 定量下限及び検出下限

苦土全量(T-MgO)として約 0.2 % (質量分率) 程度を含有したバーク堆肥を定量下限確認用試料として用いて 10 点併行で苦土全量(T-MgO) 試験を実施した結果を Table 9 に示した. バーク堆肥の平均値は 0.24 % (質量分率) であり, その併行標準偏差は 0.02 % (質量分率) であった.

なお, 定量下限は (併行標準偏差) $\times 10$, 検出下限は (併行標準偏差) $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$ を用いて算出した. その結果, 本試験法における定量下限は 0.2 % (質量分率), 検出下限は 0.06 % (質量分率) 程度と推定された.

Table 9 Estimation of the lower limit of quantitation and lower limit of detection of total magnesium

Sample	Mean ^{a)}	s_r ^{b)}	(Mass fraction (%))	
			LOQ ^{c)}	LOD ^{d)}
Bark compost	0.24	0.02	0.2	0.06

a) Mean value of parallel test ($n = 10$)

b) Repeatability standard deviation

c) Lower limit of quantitation ($LOQ = s_r \times 10$)d) Lower limit of detection ($LOD = s_r \times 2 \times t(n-1, 0.05)$)

4. まとめ

苦土全量(T-MgO)の試験法として石灰全量のフレーム原子吸光法が適用可能かどうかを確認するために, 測定溶液の調製方法を検討し, 単一試験室における真度, 併行精度, 中間精度, 定量下限及び検出下限を調査したところ, 次の結果を得た.

(1) 苦土全量(T-MgO)の試料溶液調製法として, 石灰全量の溶液調製法である灰化－塩酸煮沸操作と灰化－王水分解操作について検討した. 堆肥及び汚泥肥料等 15 点について各調製法により得られた測定値を用いて対応のある t 検定を行った結果, 2 方法間の測定値に有意な差は認められなかった. また, 苦土全量の測定対象として要望が多かった鶏ふん燃焼灰を追加し検討を行った結果, 鶏ふん燃焼灰も当該方法により測定が可能であると考えられた.

(2) 真度確認のため, 苦土(MgO)として 0.2 %～5.0 % (質量分率) を含有する試料を調製し添加回収試験

を行った結果、設計値と測定値との差は 0.01 %～0.12 % (質量分率) であり、設計値に対する回収率は 102 %～103 % であった。この結果は、肥料等試験法²⁾に示されている回収率の目安を満たしていた。

(3) 苦土全量(T-MgO)を含有する3種類の試料(豚ふん堆肥、汚泥発酵肥料及び鶏ふん燃焼灰)を用いて併行精度及び中間精度を確認したところ、平均値が 3.14 % (質量分率)、0.84 % (質量分率) 及び 3.99 % (質量分率) で併行相対標準偏差は 0.77 %～1.25 %、中間相対標準偏差は 0.77 %～1.49 % であった。この結果は、肥料等試験法²⁾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。

(4) 苦土全量(T-MgO)として約 0.2 % (質量分率) 程度を含有したバーク堆肥を用いて定量下限及び検出下限を確認したところ、定量下限は 0.2 % (質量分率)、検出下限は 0.06 % (質量分率) 程度と推定された。

(1)～(4)の成績により、単一試験室において肥料等試験法²⁾に記載されている石灰全量のフレーム原子吸光法が堆肥、汚泥肥料及び鶏ふん燃焼灰を対象とした苦土全量(T-MgO)の試験法として適用できることが確認された。

文 献

- 1) 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)
- 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 (2017)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2017.pdf>

Determination of Total Magnesium in Compost and Sludge Fertilizer by Atomic Absorption Spectrometry

Erika HIRATA¹, Hideo SOETA¹, Hidemi YOSHIMURA¹, Keiji YAGI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

A single-laboratory validation study was conducted for the determination for total magnesium (T-MgO) in compost, sludge fertilizer and incineration ash of chicken droppings by flame atomic absorption spectrometry described in Testing Method for Fertilizers as testing method for total calcium. Fifteen fertilizer samples were compared in measurement values with incineration-hydrochloric acid boiling procedure and incineration-aqua regia digestion procedure. The *t*-test for each concentration indicated that significant difference was not observed under two-tailed significant level of 5 %. In addition, the result suggested both procedures were applicable to incineration ash of chicken droppings. The accuracy of testing methods for the total magnesium by incineration-aqua regia digestion procedure was assumed from 3 replicate determinations of 3 fertilizer samples containing 0.2 % ~ 5.0 % magnesium (as MgO) which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 102 % ~ 103 %. In the train of duplicate test per 5 tests on different days using three fertilizer samples, repeatability relative standard deviations (RSD_r) were 0.77 % ~ 1.25 % and intermediate relative standard deviations ($RSD_{I(T)}$) were 0.77 % ~ 1.49 %, respectively. As a result, they were within the criteria of repeatability and intermediate precision of the Testing Methods for Fertilizers. On the basis of 10 replicate measurements of naturally contained sample the limit of quantitative value (*LOQ*) was estimated at 0.2 %. Those results demonstrated that this method in a single-laboratory was validated for the determination of total magnesium in compost, sludge fertilizer and incineration ash of chicken droppings by atomic absorption spectrometry.

Key words total magnesium, compost, sludge fertilizer, atomic absorption spectrometry,
Testing Methods for Fertilizers

(Research Report of Fertilizer, **11**, 29~38, 2018)

4 有機物を含まない肥料中のクロムの測定

－共同試験成績－

平原稔夫¹, 廣井利明², 石川智美¹

キーワード クロム, 原子吸光法, 湿式分解, 硫酸アンモニウム, 無機質肥料, 共同試験

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, クロムについても含有許容量が定められている. 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.

有機物を含まない肥料中のクロム測定に関しては, 肥料分析法(1992 年版)に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³⁾が掲載されているが, 本法により肥料認証標準物質の値付けのための共同試験⁵⁾を実施したところ, 室間再現精度が肥料等試験法において試験法の妥当性確認の手順に示されている目安を超える結果となった. これは, 測定溶液中のりん酸の影響と考えられた. 廣井ら⁶⁾は, 有機物を含まない肥料中のクロム測定法の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に採用されている硝酸－硫酸－過塩素酸分解法⁷⁾を基に突沸する肥料に対応するための改良法を検討し, 有機物を含まない肥料全般を対象として, 単一試験室における妥当性を確認した.

今回, 有機物を含まない肥料中のクロムの測定法(改良法)について, 共通試料を用いて共同試験を実施し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) 共同試験用試料の調製

クロムを含む混合りん酸肥料及び化成肥料の各 1 点は目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉碎し, 熔成けい酸りん肥, 鉍さいけい酸質肥料及び鉍さいマンガン肥料の各 1 点は目開き 212 μm の網ふるいを通過するまで粉碎し, 混合した. 共同試験用試料として上記 5 種類の試料各約 1.9 g をチャック付きポリ袋に採取後密封し, それぞれ 40 袋を調製した. ブラインド試料を提供するため, 共同試験用試料の袋に乱数を付し, 各試料 2 袋計 10 袋を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ホットプレート(又は砂浴)及び原子吸光分析装置を使用した.

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)札幌センター

3) 試験方法

(1) 試料溶液の調製

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、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 1)。

なお、空試験は 300 °C 以上加熱時の突沸を防止するため、硫酸アンモニウム及び酸添加後、時計皿で覆い 170 °C のホットプレート又は砂浴上で少時加熱後、時計皿をずらし穏やかに 1 時間以上加熱し液量を約 15 mL 以下に濃縮した後、再度時計皿で覆い 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、以下試料と同様に処理し空試験溶液とした。

(2) クロムの定量

試料溶液の一定量(25 mL 以下)を全量フラスコ 100 mL にとり、干渉抑制剤溶液約 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となるように試料溶液が 25 mL の場合は塩酸(1+17)を標線まで加え、試料溶液が 5 mL の場合は塩酸(1+17)約 67 mL 及び水を標線まで加え、原子吸光分析装置に導入し、波長 357.9 nm 又は 359.3 nm の吸光度を測定した。同時に標準液を測定して得られた検量線を用いて分析試料中のクロム濃度を求めた。

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⁸⁾の均質性試験に従い、各種類の共同試験用試料からそれぞれ 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行でランダムな順序で 3) に従って分析した。

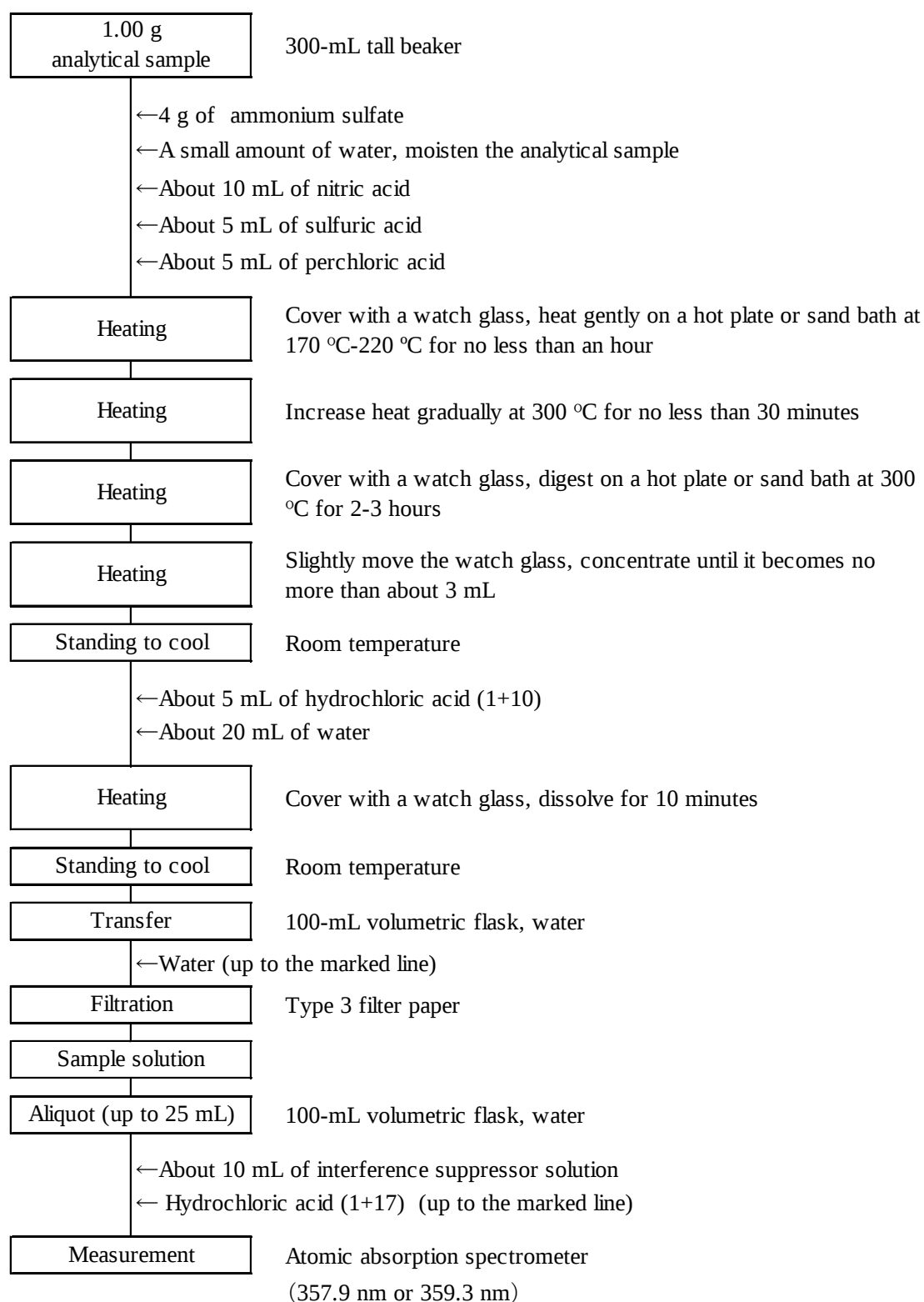
5) 共同試験

試験に参加した 12 試験室と使用した原子吸光分析装置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 10 試料について 3) に従ってクロムを分析した。

- ・ 株式会社那須環境技術センター(日立 ZA3300)
- ・ 一般社団法人新潟県環境衛生中央研究所(日立 Z-2000)
- ・ 一般財団法人日本食品分析センター 彩都研究所(日立 ZA3000)
- ・ 公益財団法人日本肥糧検定協会 本部(日立 ZA3300)
- ・ 公益財団法人日本肥糧検定協会 関西支部(島津製作所 AA-7000)
- ・ 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(日立 Z-2310)
- ・ 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(日立 Z-2000)
- ・ 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(日立 Z-2310)
- ・ 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(日立 Z-2310)
- ・ 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(日立 Z-2310)

- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部(日立 Z-2310)
- ・ 平成理研株式会社 環境科学センター(日立 ZA3300)

(50 音順)



Scheme 1 Method flow sheet of chromium in inorganic fertilizers

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性確認試験の成績及びその成績の一元配置による分散分析等から得られた統計量を Table 1 に示した. 併行精度について Cochran 検定による外れ値はすべての試料において認められなかった. 次に, 併行相対標準偏差は 1.0 %~1.8 %であり, 肥料等試験法⁴⁾の濃度別精度の目安(室間再現再現相対標準偏差)の 1/2 以下であった. このことから, 一元配置による分散分析の F 検定(片側有意水準 5 %)を実施した結果, すべての成分について試料間に有意な差は認められなかった⁸⁾. また, 併行精度を含む試料間相対標準偏差は 1.1 %~1.8 %であった. このことから, すべての共同試験用試料が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 1 Homogeneity test results of chromium in inorganic fertilizers

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (mg/kg)	s_r ^{c)} (mg/kg)	RSD_r ^{d)} (%)	s_{bb} ^{e)} (mg/kg)	s_{b+r} ^{f)} (mg/kg)	RSD_{b+r} ^{g)} (%)	F Value ^{h)i)}
Silicate slag fertilizer	10 (0)	69.75	0.71	1.0	0.38	0.81	1.2	1.57
Phosphate fertilizer mixture	10 (0)	949.3	9.9	1.0	2.4	10.2	1.1	1.12
Processed ferromanganese slag	10 (0)	3056	45	1.5	0	45	1.5	0.87
Fused silicate phosphate	10 (0)	4707	85	1.8	0	85	1.8	0.88
Compound fertilizer	10 (0)	561.6	6.3	1.1	0	6.3	1.1	0.50

a) The number of samples after exclusion ; (): The number of outliers from Cochran test

b) Total mean(Number of samples after excluding outliers $\times n=2$)

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Standard deviation between samples

f) Standard deviation between samples including repeatability $s_{b+r} = \sqrt{s_{bb}^2 + s_r^2}$

g) Relative standard deviation between samples 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 2 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^{9, 10)}に従って統計処理した. 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, 2 種類(熔成けい酸りん肥及び化成肥料)の試料で各 2 試験室の試験成績が外れ値として判定された.

Table 2 Individual result of chromium in inorganic fertilizers (mg/kg)

Lab ID ^{a)}	Silicate slag fertilizer		Phosphate fertilizer mixture		Processed ferromanganese slag	
A	62.12	55.42	905.9	906.9	2999	3100
B	62.78	65.68	888.2	921.6	2881	2770
C	62.50	62.28	925.3	920.6	3131	3122
D	62.64	62.85	915.7	924.3	3116	3172
E	58.81	62.90	882.6	841.4	3200	3145
F	64.07	60.28	912.0	910.3	2706	2600
G	68.69	66.86	912.4	912.0	2975	3023
H	69.36	69.60	943.0	934.9	3006	2992
I	60.12	60.12	827.7	847.7	2625	2896
J	65.32	64.28	957.8	962.8	2794	2767
K	60.68	63.00	969.6	965.0	2961	3051
L	70.80	68.80	923.3	898.1	2991	3075

Lab ID ^{a)}	Fused silicate phosphate		Compound fertilizer	
A	4462	4496	516.4	543.8
B	4142 ^{b)}	3320 ^{b)}	541.9	519.8
C	4843	4743	536.5	553.4
D	4353	4881	542.9	545.2
E	4581	4400	554.2	568.3
F	4738	4776	550.2	544.2
G	4902	4868	547.7	543.2
H	4798	4726	561.8	569.1
I	4659	4529	529.1	513.0
J	4737	4617	336.0 ^{c)}	304.8 ^{c)}
K	3381 ^{b)}	4760 ^{b)}	510.0 ^{c)}	480.6 ^{c)}
L	4581	4550	546.0	544.7

a) Laboratory identification (random order)

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Grubbs test

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した試験成績により算出^{9, 10)}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), 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 3 に示した.

クロムの平均値は 63.75 mg/kg～4662 mg/kg であり, その併行標準偏差(s_r)は 2.02 mg/kg～135 mg/kg, 併行相対標準偏差(RSD_r)は 1.4 %～3.2 %, 室間再現標準偏差(s_R)は 3.87 mg/kg～176 mg/kg, 室間再現相対標準偏差(RSD_R)は 2.8 %～6.1 %であった.

いずれの併行相対標準偏差(RSD_r)及び室間再現相対標準偏差(RSD_R)も肥料等試験法⁴⁾の妥当性確認の手順に示されている各濃度レベルにおける精度の目安の範囲内であることから, 本法の精度は同試験法の性能規準に適合していることを確認した.

Table 3 Statistical analysis of Collaborative study results

Sample	Labs $p(q)^a$	Mean ^{b)} (mg/kg)	s_r^c (mg/kg)	RSD_r^d (%)	$CRSD_r^e$ (%)	s_R^f (mg/kg)	RSD_R^g (%)	$CRSD_R^h$ (%)
Silicate slag fertilizer	12	63.75	2.02	3.2	6	3.87	6.1	11
Phosphate fertilizer mixture	12	912.9	13.0	1.4	4	37.3	4.1	8
Processed ferromanganese slag	12	2962	74	2.5	3	176	5.9	6
Fused silicate phosphate	10(2)	4662	135	2.9	3	166	3.6	6
Compound fertilizer	10(2)	543.6	10.2	1.9	4	15.4	2.8	8

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

b) Average value after excluding outliers(n =The number of laboratories(p)×The number of samples(2))

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of precision for Repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2017

f) Reproducibility standard deviation

g) Reproducibility relative standard deviation

h) Criteria of precision for Reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2017

4. まとめ

12 試験室において各 5 種類(10 点)の試料を用いて共同試験を実施し、有機物を含まない肥料中のクロム測定における試験室間の再現精度を調査した。

その結果、クロムの平均値 63.75 mg/kg～4662 mg/kg の範囲において、室間再現相対標準偏差(RSD_R)は 2.8 %～6.1 %であり、肥料等試験法⁴⁾の妥当性確認の手順に示されている各濃度レベルにおける精度の目安の範囲内であることから、本法の精度は同試験法の性能規準に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力頂きました、株式会社那須環境技術センター、一般社団法人新潟県環境衛生中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、公益財団法人日本肥糧検定協会本部、同関西支部及び平成理研株式会社環境科学センターの各位に謝意を表します。

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 30 年 1 月 22 日, 農林水産省告示第 134 号
- 3) 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)
- 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 (2017)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenhoh_2017.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－普通化成肥料 FAMIC-B-14 の調製－, 肥料研究報告, **8**, 140～152 (2015)
- 6) 廣井利明, 高津文香: 有機物を含まない肥料中のクロムの測定, 肥料研究報告, **10**, 9～28 (2017)
- 7) 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－無機質肥料の分解法の適用－, 肥料研究報告, **3**, 30～42 (2010)
- 8) 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)
- 9) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331～343 (1995)
- 10) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

Evaluation of Digest Method for Determination of Chromium in Inorganic Fertilizer by Atomic Absorption Spectrometry: A Collaborative Study

Toshio HIRABARA¹, Toshiaki HIROI², Tomomi ISIKAWA¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

A collaborative study was conducted to atomic absorption spectrometry for determination of Chromium in inorganic fertilizers. 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). We sent 5 materials to 12 collaborators with a blind duplicate design and these samples were analyzed as blind duplicates. After identification of outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of Chromium were reported 63.75 mg/kg ~4662 mg/kg and 1.4 %~3.2 % (mass fraction), respectively. These results indicated that this method has acceptable precision for determination of Chromium in these concentration ranges.

Key words chromium, atomic absorption spectrometry, wet digestion, ammonium sulfate, inorganic fertilizer, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **11**, 39~46, 2018)

5 液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)法による肥料中の スルファミン酸の測定

－共同試験成績－

小塚健志¹, 伊藤浩平², 中村信仁¹, 白井裕治¹

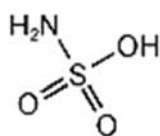
キーワード スルファミン酸, 肥料, 液体クロマトグラフ質量分析計, 共同試験

1. はじめに

スルファミン酸は、普通肥料の公定規格¹⁾で有害成分として含有許容量が規定されている。肥料中のスルファミン酸の定量については、肥料分析法²⁾において亜硝酸ナトリウム法が定められているが、滴定操作において外部指示薬による終点の判定に高度な修練が必要である。また、肥料の種類によっては共存物質の影響により終点の判定が困難となり精確な測定が行えないという問題がある。このことから、肥料中のスルファミン酸の分析法として、平成 26 年度に伊藤ら³⁾が液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)法について真度、併行精度、定量下限等を検討したところ、単一試験室内における試験方法の妥当性が確認された。そこで、平成 27 年度に野崎⁴⁾がこの方法の性能評価のため、共通試料を用いて試験室間の再現精度を調査したところ、室間再現精度における試験方法の妥当性が確認できなかった。

今回、この LC-MS 法による肥料中のスルファミン酸の測定について、機器測定でのマトリックスの影響を低減させるために試験溶液の希釈倍率を見直し、性能評価のため、再度、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、スルファミン酸の構造式を Fig.1 に示した。



Sulfamic acid [HOSO₂NH₂]CAS No: 5329-14-6

Fig.1 Chemical structural formula of sulfamic acid

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料

市販されている硫酸アンモニア、副産窒素肥料、化成肥料及び副産複合肥料を目開き 500 μm のふるいを通

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)農薬検査部

過するまで粉碎し、よく混合した 4 種類の粉状及び市販されている 2 種類の液状複合肥料を共同試験用試料とした。これらの試料は対象成分の含有が認められない試料であったため、共同試験参加試験室においてスルファミン酸を添加して共同試験を実施することとした。

粉状の共同試験用試料は約 1.5 g をポリエチレン袋に入れ密封して、液状の共同試験用試料は約 1.5 mL をガラスバイアルに入れ栓をして調製した。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に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

市販されているスルファミン酸を水に溶解した標準液の一定量を水で希釈して 6 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 6 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 又は LC-MS/MS、マグネチックスターラー、遠心分離機及び高速遠心分離機を使用した。

4) スルファミン酸の測定

(1) 抽出

(1.1) 粉状分析用試料

分析試料 1.00 g をはかって共栓三角フラスコ 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 10 分間かき混ぜた。静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL に移し、 $1700\times g$ (3000 rpm) で 5 分間遠心分離して上澄み液を抽出液とした。

(1.2) 液状分析用試料

分析用試料 1.00 g をはかって全量フラスコ 100 mL に入れ、水約 50 mL を加え、振り混ぜた。その後、標線まで水を加え、抽出液とした。

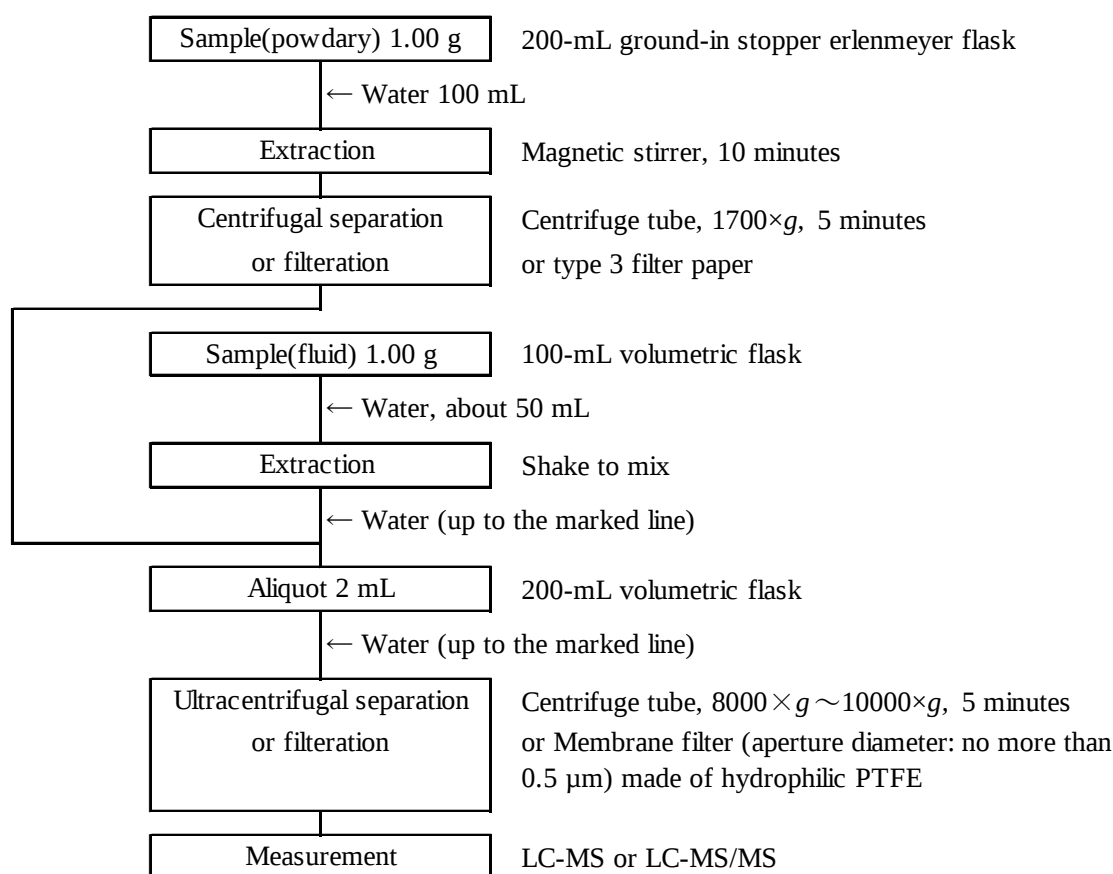
(2) 希 釈

抽出液 2 mL を全量フラスコ 200 mL にとり、標線まで水を加える。その後、共栓遠心沈殿管 1.5 mL に移し、 $8000\times g$ (10000 rpm) で 5 分間遠心分離して上澄み液を試料溶液とした。

(3) 測 定

試料溶液及び検量線作成用標準液を LC-MS 又は 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、試料溶液中の成分量を求め、分析試料中のスルファミン酸量を算出した。なお、測定にあたっては、LC-MS/MS では MS 分析モードを用い、肥料等試験法 (2018) 5.7.b 項⁵⁾を参照して各試験室の LC-MS 又は 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 sulfamic acid in fertilizer

5) 共同試験

試験に参加した9試験室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12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又は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微量試験課
- ・ 株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター
- ・ 埼玉県環境科学国際センター
- ・ 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
- ・ 昭和電工株式会社 Shodex サービスセンター
- ・ 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仙台センター
- ・ 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: 1100 Series, Agilent Technologies MS: 1956B, Agilent Technologies	Inertsil HILIC, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 µm)
LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 µm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: TQD, Waters	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 µm)
LC: LC800 System, GL Sciences MS/MS: API 4000 Q TRAP, AB SCIEX	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 µm)
LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: LCMS-8030 Plus, Shimadzu	Shodex ODP2 HP-2D, Showa Denko (2 mm×150 mm, 5 µm)
LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 µm)
LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 µm)
LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 µm)
LC: Prominence, Shimadzu MS: LCMS-2010EV, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 µm)

3. 結果及び考察

1) 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 2-1 及び Table 2-2 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⁶⁾に従って統計処理した。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, 9 試験室の試験成績のうち 1 種類の試料で 2 試験室が外れ値として判定された。

Table 2-1 Individual result of sulfamic acid

Lab ID ^{a)}	Ammonium sulphate		By-product nitrogen fertilizer		% (Mass fraction)	
					Compound fertilizer	
A	0.239	0.224	0.457	0.443	0.118 ^{b)}	0.117 ^{b)}
B	0.193	0.189	0.387	0.370	0.0962	0.0980
C	0.195	0.193	0.399	0.389	0.102	0.0890
D	0.202	0.191	0.391	0.350	0.0954	0.0954
E	0.187	0.198	0.421	0.400	0.0961	0.102
F	0.241	0.188	0.468	0.396	0.115 ^{b)}	0.113 ^{b)}
G	0.204	0.140	0.363	0.370	0.0953	0.0923
H	0.240	0.215	0.461	0.369	0.0940	0.0996
I	0.211	0.207	0.395	0.390	0.0899	0.0939

a) Laboratory identification

b) Outlier of Grubbs test

Table 2-2 Individual result of sulfamic acid

%(Mass fraction)

Lab ID ^{a)}	By-product compound fertilizer		Liquid compound fertilizer 1		Liquid compound fertilizer 2	
A	0.0173	0.00879	0.0320	0.0356	0.283	0.263
B	0.0170	0.0150	0.0368	0.0335	0.230	0.238
C	0.0251	0.0224	0.0404	0.0418	0.264	0.255
D	0.0175	0.0120	0.0354	0.0319	0.214	0.229
E	0.0185	0.0202	0.0385	0.0378	0.240	0.237
F	0.0201	0.0170	0.0316	0.0358	0.250	0.214
G	0.0193	0.0228	0.0466	0.0453	0.225	0.232
H	0.0116	0.0124	0.0416	0.0460	0.252	0.255
I	0.0107	0.0107	0.0397	0.0362	0.253	0.247

Table 3 Statistical analysis of collaborative study results for sulfamic acid

Table 3. Statistical analysis of collaborative study results for sulfuric acid								
Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	s_R ^{f)}	RSD_R ^{g)}	$CRSD_R$ ^{h)}
	$p(q)$ ^{a)}	%(Mass fraction)	%(Mass fraction)	%	%	%(Mass fraction)	%	%
Ammonium sulphate	9(0)	0.203	0.021	10.4	4	0.024	11.9	8
By-product nitrogen fertilizer	9(0)	0.401	0.030	7.5	4	0.035	8.8	8
Compound fertilizer	7(2)	0.0957	0.0043	4.5	4	0.0043	4.5	8
By-product compound fertilizer	9(0)	0.0166	0.0028	16.8	4	0.0048	29.1	8
Liquid compound fertilizer 1	9(0)	0.0381	0.0022	5.8	4	0.0049	12.8	8
Liquid compound fertilizer 2	9(0)	0.243	0.011	4.5	4	0.018	7.6	8

a) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier removed and (q) =number of outlierb) 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 2018

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 2018

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)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 3 に示した。

スルファミン酸の平均値は 0.0166 %(質量分率)～0.401 %(質量分率)であり, その併行標準偏差は 0.0022 %(質量分率)～0.030 %(質量分率), 併行相対標準偏差は 4.5 %～16.8 %, 室間再現標準偏差は 0.0043 %(質量分率)～0.035 %(質量分率)及び室間再現相対標準偏差は 4.5 %～29.1 %であった。

今回配付した共同試験用試料(濃度範囲)において, 最も低い濃度の結果では, 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⁵⁾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 2 倍を超えていた。その他の結果では, 室間再現相対標準偏差はこの精度の目安の 2 倍以

内に収まっていた。なお、この内の 1 種類の肥料で併行相対標準偏差がこの精度の目安の 2 倍以上にあった。

4. まとめ

9 試験室において 6 種類(12 点)の肥料を用いて共同試験を実施し、LC-MS 法による肥料中のスルファミン酸の測定の評価を行った。その結果、スルファミン酸の平均値 0.0166 % (質量分率) ~ 0.401 % (質量分率) において室間再現精度(相対標準偏差)は 4.5 % ~ 29.1 % 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、最も低い濃度のスルファミン酸の平均値 0.0166 % (質量分率) では肥料等試験法に示している精度の目安の 2 倍を上回っており目標とする精度を満たさなかったが、0.0381 % (質量分率) ~ 0.401 % (質量分率) の濃度範囲では肥料等試験法に示している精度の目安の 2 倍以内で満足な精度にあった。

謝辞

共同試験にご協力頂きま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微量試験課、株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター、埼玉県環境科学国際センター、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、昭和電工株式会社 Shodex サービスセンターの各位に謝意を表します。

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 30 年 1 月 22 日, 農林水産省告示第 134 号 (2018)
- 2) 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)
- 3) 伊藤浩平, 藤田真理子, 橋本良美, 白井裕治: 液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)法による肥料中のスルファミン酸の測定, 肥料研究報告, **8**, 38~49 (2015)
- 4) 野崎友春: 液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)法による肥料中のスルファミン酸の測定, 肥料研究報告, **9**, 69~76 (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(2018)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2018.pdf >
- 6) Horwitz W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)

Determination of Sulfamic acid in Fertilizer by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (LC-MS): A Collaborative Study

Kenji KOZUKA¹, Kohei ITOU², Nobuhito NAKAMURA¹, and Yuji SHIRAI¹

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) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station

A collaborative study was conducted to evaluate liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) for determination of sulfamic acid in fertilizer. Sulfamic acid in fertilizer was extracted and diluted with water. The sulfamic acid was analyzed by LC-MS. Six samples, respectively, were sent to 9 collaborators. These samples were analyzed as blind duplicates. The mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) were 0.0166 % (mass fraction) ~ 0.401 % (mass fraction) and 4.5 % ~ 29.1 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision in 0.0381 % (mass fraction) ~ 0.401 % (mass fraction), but an unacceptable precision in 0.0166 % (mass fraction) for determination of sulfamic acid.

Key words sulfamic acid, fertilizer, LC-MS, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **11**, 47~53 2018)

6 吸光光度法による肥料中の尿素性窒素の測定

高橋伸英¹

キーワード 尿素性窒素, 吸光光度法

1. はじめに

尿素は、植物の窒素源としての速効性を有することから、複合肥料の原料として広く使用されており、堆肥等においては発酵促進材として利用されている。また、肥料取締法の公定規格¹⁾においてはアセトアルデヒド縮合尿素等の制限事項として、尿素性窒素の残存量が公示されており、その分析法として、ウレアーゼ法及び高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法が肥料等試験法 (2017)²⁾に収載されている。これら分析法については、ウレアーゼ法はその操作に熟練を要し、HPLC 法は測定機器の保有が必要とされている。そこで、分析操作が簡便な第二改訂詳解肥料分析法³⁾に参考法として掲載されているジメチルアミノベンズアルデヒドによる吸光光度法について、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) 供試試料

供試試料は、流通している尿素が含まれている普通肥料 18 点、尿素が含まれていない普通肥料 3 点及び特殊肥料 (堆肥) 4 点を用いた (Table 1)。また、JIS 規格に規定されている試薬特級を混合した配合試料を尿素が含まれないものとして用いた。供試試料のうち、固形のものは粉砕機で目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉砕し、水分の多いものは十分に乾燥させたのち、目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉砕した。

Table 1 Fertilizers used in this study

• Fertilizers containing urea			
Urea	3	Coated urea	3
CDU (Cyclo-Di-Urea)	1	Compound fertilizer	4
IB (Isobutylidene diurea)	1	Mixed fertilizer	3
UF (Ureaform)	1	Designated mixed fertilizer	2
• Non-urea fertilizers			
Compound fertilizer	1	Ground crustacean fertilizer	1
Composted sludge fertilizer	1	Compost	4

2) 装置及び器具

- (1) マグネチックスターラー: AS ONE HS-6AN
- (2) 分光光度計: SHIMADZU UV-1800

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 (現)消費安全情報部

- (3) 高速液体クロマトグラフ (HPLC): SHIMADZU Prominence シリーズ
 (4) カラム: Asahipak ES-502C 7C: 長さ 100 mm L×内径 7.5 mm I.D., 粒径 9 μm
 Hamilton PRP-X200: 長さ 150 mm×内径 4.1 mm, 粒径 10 μm

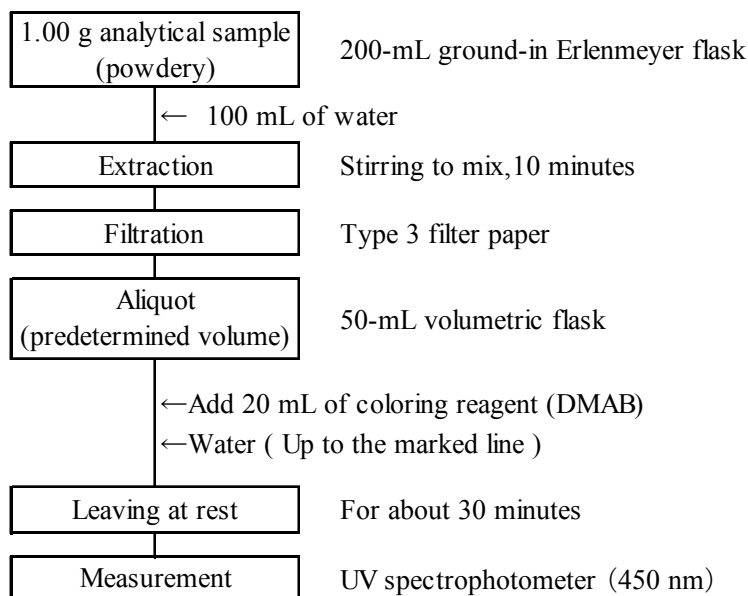
3) 試薬等の調製

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水
 (2) 発色試薬溶液: JIS K 8496 に規定する *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 20 g を JIS K 8101 に規定するエタノール (99.5) 1000 mL 及び JIS K 8180 に規定する塩酸 100 mL に溶かした.
 (3) 尿素性窒素標準液 (200 μg/mL): JIS K 8731 に規定する尿素 0.2145 g を水に溶かして 500 mL とした.
 (4) 検量線用尿素性窒素標準液 (10 μg/mL ~ 100 μg/mL): 尿素性窒素標準液の一定量を水で希釈して 10 μg/mL, 20 μg/mL, 30 μg/mL, 40 μg/mL, 60 μg/mL, 80 μg/mL 及び 100 μg/mL の検量線用尿素性窒素標準液を調製した.
 (5) リン酸塩緩衝液: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム (KH₂PO₄) 3.92 g 及び JIS K 9005 に規定するりん酸 (H₃PO₄) 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とした.

4) 試験操作

(1) 吸光光度法

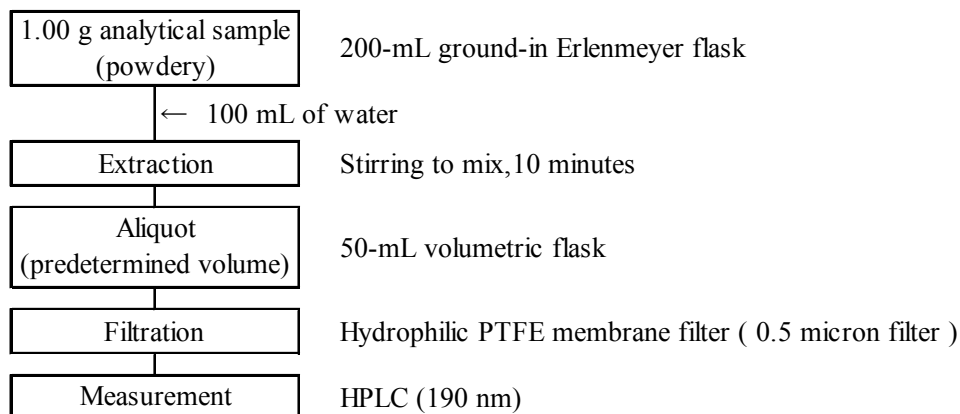
分析試料 1.00 g をはかり取り, 三角フラスコ 200 mL に入れ, 水 100 mL を加え, マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜた後, ろ紙 3 種でろ過したものを抽出液とした. 抽出液の一定量を全量フラスコ 50 mL に入れ, 発色試薬溶液を加え, 標線まで水を加えた後, 約 30 分間放置し測定用試料溶液とした (Scheme 1-1). なお, 試料溶液が着色して定量に影響を及ぼすおそれのある場合は, ろ紙 3 種の上に活性炭約 0.5 g を加えろ過した.



Scheme 1-1 The method flow sheet for Urea Nitrogen (U-N) in fertilizer by UV spectrophotometry

(2) HPLC 法

肥料等試験法に従った。なお、遠心分離はせずに親水性 PTFE メンブレンフィルター (孔径 0.5 μm) でろ過した (Scheme 1-2)。



Scheme 1-2 The method flow sheet for Urea Nitrogen (U-N) in fertilizer by HPLC

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

(1) 発色試薬溶液の添加量

尿素性窒素 50 $\mu\text{g/mL}$ に発色試薬溶液 5 mL, 10 mL 及び 20 mL を加え吸光度を測定した (Fig. 1)。添加量は吸光度が十分に得られる 20 mL とした。

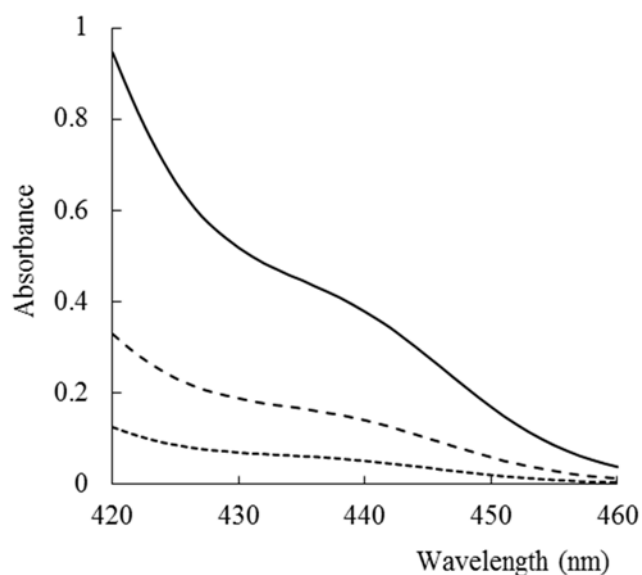


Fig. 1 Effect of coloring reagent addition amount on U-N absorbance curve

U-N concentration: 50 $\mu\text{g/mL}$

Coloring reagent solution addition amount:

— 20 mL - - - 10 mL ····· 5 mL

(2) 測定波長

尿素性窒素 0 $\mu\text{g/mL}$ 及び 10 $\mu\text{g/mL}$ の吸光度を測定した (Fig. 2). 第二改訂詳解肥料分析法では, 425 nm ~ 430 nm 範囲での測定を推奨しているが, その範囲の尿素性窒素 10 $\mu\text{g/mL}$ 吸光度が 0.2~0.4 程度であるのに対し尿素性窒素 0 $\mu\text{g/mL}$ の吸光度は 0.1~0.3 程度と高い. そこで, 尿素性窒素 0 $\mu\text{g/mL}$ の吸光度が低く, 示差率*が 7 倍程度ある 450 nm を測定波長とした.

*示差率 = (10 $\mu\text{g/mL}$ 吸光度 - 0 $\mu\text{g/mL}$ 吸光度) / 0 $\mu\text{g/mL}$ 吸光度

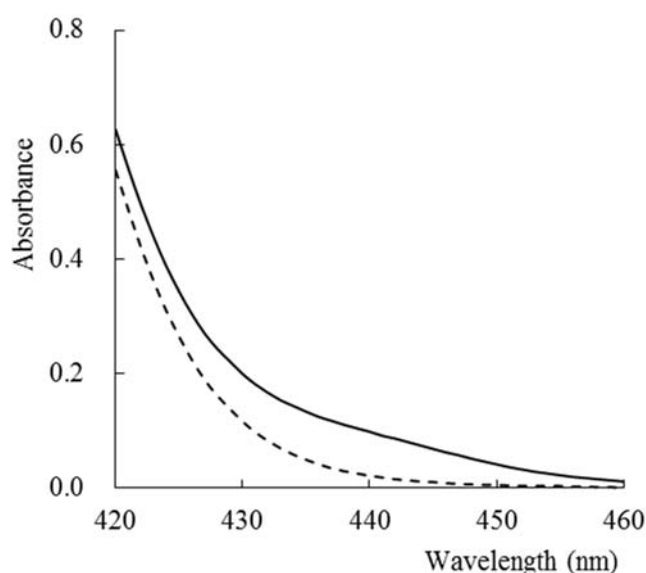


Fig. 2 Effect of coloring reagent addition amount on U-N absorbance curve

U-N concentration: — 10 $\mu\text{g/mL}$ - - - 0 $\mu\text{g/mL}$

2) 検量線の直線性確認

検量線用尿素性窒素標準液 (0 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 $\mu\text{g/mL}$) の吸光度から検量線を作成した (Fig. 3). 検量線は 0 $\mu\text{g/mL}$ ~ 50 $\mu\text{g/mL}$, 0 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ のいずれにおいても直線性を示し, その決定係数 (r^2) は 0.999 以上で肥料等試験法に示されている推奨規準を満たした.

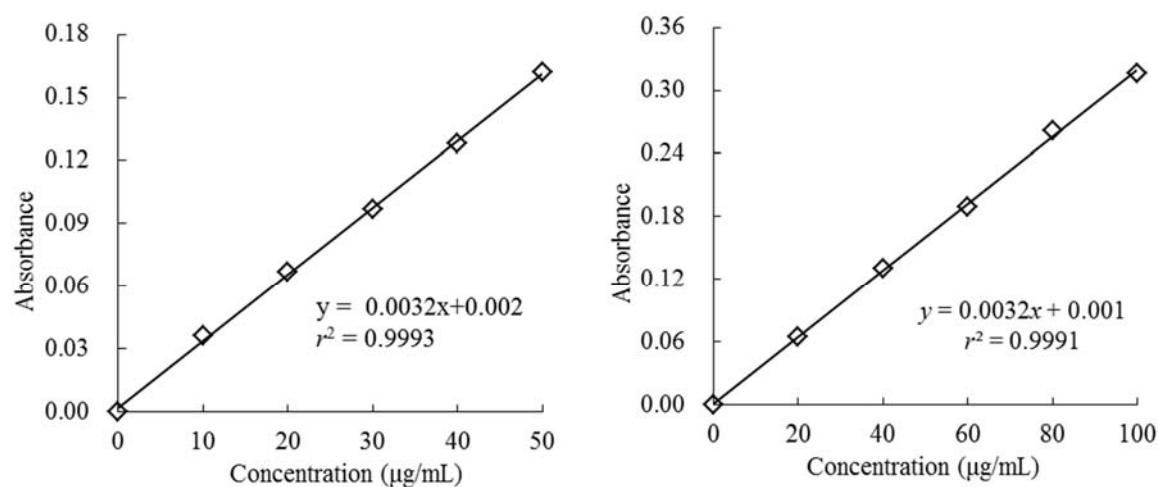


Fig.3 Calibration curves for U-N

3) 着色の影響確認

試料溶液の着色による影響を確認するため、堆肥及び汚泥発酵肥料の吸光度を測定した (Table 2). なお、供試肥料に使用されている原料は Table 3 のとおりである. いずれも活性炭を加えろ過した溶液を測定したが、堆肥 A, B 及び汚泥発酵肥料で測定に妨害を及ぼす吸光度が確認された. このことから、堆肥及び汚泥肥料は本検討の対象外とした.

Table 2 Filtration test results		Table 3 Materials used in sample	
Sample	Absorbance	Sample	Materials
Compost A	0.032	Compost A	cattle dung
Compost B	0.013	Compost B	cattle dung, poultry dung
Compost C	0.003	Compost C	cattle dung
Compost D	0.002	Compost D	straw, wood
Composted sludge fertilizer	0.079	Composted sludge fertilizer	sludge, food waste, bark

4) 添加回収試験による真度確認

尿素が含まれていない化成肥料、甲殻類質肥料粉末及び調合した配合試料に尿素性窒素として質量分率 3 %, 10 % 及び 20 % となるように尿素を加え、3 点併行で添加回収試験を行った (Table 4). 回収率は 98.9 % ~ 103.3 % であり、肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける真度の目標を満たした.

Table 4 Spiking and recovery tests				
Sample	Spike level ^{a)} (%) ^{b)}	recovery ^{c)} (%)	RSD ^{d)} (%)	Criteria of the trueness ^{e)} (%)
Compound fertilizer	3	98.9	4.0	96~104
	10	102.0	3.6	97~103
	20	101.3	1.4	97~103
Ground crustacean fertilizer	3	98.0	0.8	96~104
	10	100.8	0.6	97~103
	20	100.0	2.4	97~103
Mixtures (reagent grade materials)	3	103.3	2.3	96~104
	10	100.5	2.6	97~103
	20	102.4	1.2	97~103

a) Spike as U-N

b) Mass fraction

c) Mean recovery ($n=3$)

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of trueness (recovery) show in Testing Methods for Fertilizers (2017)

5) 方法間比較による真度確認

流通している普通肥料 18 点を本法及び肥料等試験法に掲載されている HPLC 法で測定した (Table 5). 発色試薬溶液の *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドはウレイド基に反応して発色するため、イソブチルアルデヒド縮

合尿素及びホルムアルデヒド加工尿素も反応し、両肥料中の尿素性窒素は測定できなかったが、アセトアルデヒド縮合尿素肥料中の尿素性窒素は測定可能であった。また、本法及びHPLC法の分析値の相関図(Fig. 4)を作成したところ、回帰直線の相関係数(r)は 0.999、傾き(b)及び切片(a)の 95 %信頼区間は 0.96~0.99, -0.22~0.46 であり、肥料等試験法の推奨規準をほぼ満たした。

Table 5 U-N measurements in fertilizers

Sample	UV (%) ^{a)}	HPLC (%) ^{a)}
Urea A	46.71	45.20
Urea B	47.54	45.65
Urea C	46.18	45.38
CDU	2.23	× ^{b)}
IB	× ^{b)}	- ^{c)}
UF	× ^{b)}	- ^{c)}
Coated urea A	40.40	40.67
Coated urea B	42.31	41.15
Coated urea C	38.33	37.44
Compound fertilizer A	1.14	1.10
Compound fertilizer B	2.50	2.48
Compound fertilizer C	6.18	6.19
Compound fertilizer D	3.87	3.89
Mixed fertilizer A	2.50	2.39
Mixed fertilizer B	2.04	2.06
Mixed fertilizer C	2.22	2.20
Designated mixed fertilizer A	7.45	7.54
Designated mixed fertilizer B	5.65	5.78

a) Mass fraction

b) Interference of coexisting elements

c) No analysis

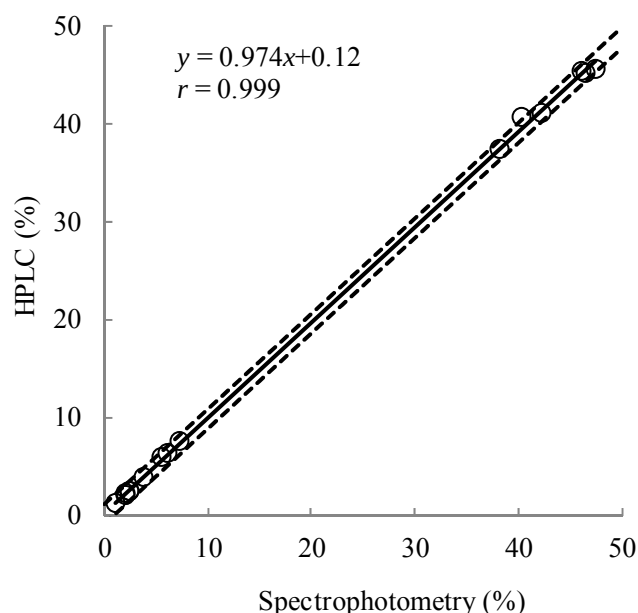


Fig.4 Comparison of HPLC and spectrophotometry for U-N in fertilizers

— Regression line

- - - Upper and Lower limit of 95 % prediction interval

6) 精度確認

尿素、指定配合肥料及び化成肥料について、2点併行で7日間行った反復試験の分析結果を Table 6-1 に示した。この結果について一元配置分散分析を行い単一試験室における併行精度及び中間精度を求めた (Table 6-2)。各肥料の総平均値は質量分率 1.12 %~45.9 %, その併行精度の併行相対標準偏差は 1.9 %~2.2 %であり、肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける精度の目安の許容値(目安の 2.0 倍)を満たした。また、中間精度の中間相対標準偏差は 2.0 %~2.9 %であり、各濃度レベルにおける精度の目安を満たした。

Table 6-1 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation
(% (Mass fraction))

Test day	Urea		Designated mixed fertilizer		Compound fertilizer	
1	44.60	45.79	7.11	7.14	1.15	1.09
2	46.15	47.07	7.73	7.61	1.18	1.17
3	45.65	45.83	7.53	7.30	1.11	1.08
4	45.71	47.62	7.81	7.29	1.16	1.11
5	46.69	44.57	7.52	7.54	1.08	1.10
6	46.55	46.03	7.50	7.39	1.14	1.11
7	44.72	45.31	7.40	7.39	1.11	1.14

Table 6-2 Statistical analysis of repetition test result for evaluating precision

Sample	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
		s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	$s_{I(T)}$ ^{f)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)}	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)}
		(%) ^{b)}	(%)	(%)	(%) ^{b)}	(%)	(%)
Urea	45.9	0.889	1.9	1	0.912	2.0	2
Designated mixed fertilizer	7.45	0.157	2.1	2	0.204	2.7	3.5
Compound fertilizer	1.12	0.024	2.2	2	0.032	2.9	3.5

a) $n=14$ (7 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

7) 定量下限及び検出下限の確認

定量下限について、肥料等試験法に示されている検量線を用いて推定する方法により算出したところ、質量分率 0.2 % と推定された。そこで、尿素が含まれていない化成肥料に尿素性窒素として質量分率 0.2 % になるように尿素を加え、7 点併行で添加回収試験を行った (Table 7)。回収率は 101.0 % であり、真度の目標を満たした。また、標準偏差より算出した推定検出下限は質量分率 0.07 % と推定された。

Table 7 Spike and recovery test (limit of quantification)

Sample	Spike level ^{a)} (%) ^{b)}	Mean ^{c)} (%) ^{b)}	recovery (%)	s_r (%) ^{b)}	LOD ^{d)} (%) ^{b)}
Compound fertilizer	0.2	0.2	101.0	0.02	0.07

a) Spike as U-N

b) Mass fraction

c) Mean recovery ($n=7$)

d) $s_r \times 2 \times t(n-1, 0.05)$

4. まとめ

第二改訂詳解肥料分析法に掲載されている吸光光度法による尿素性窒素の測定について、その妥当性を確認したところ、次の結果を得た。

(1) 測定波長は、第二改訂詳解肥料分析法では、425 nm～430 nm 範囲での測定を推奨しているが、示差率等から、450 nm が適していた。

(2) 堆肥及び汚泥発酵肥料は、試料溶液の着色による影響を受け、活性炭で除去できないものがあった。また、アルデヒド縮合又は加工尿素を含む肥料のうち、アセトアルデヒド縮合尿素肥料中の尿素性窒素は測定可能であることを確認した。

(3) 検量線は、0 µg/mL～100 µg/mL の範囲において直線性を示し、決定係数(r^2)は 0.999 以上で肥料等試験法の推奨規準を満たした。

(4) 真度は、質量分率 3 %～20 %の範囲における添加回収試験の結果、平均回収率が 98.9 %～103.3 % であり、各濃度レベルにおける真度目標を満たした。また流通している肥料の本法及び HPLC 法による測定値の回帰直線は、相関係数が 0.999, 95 %信頼区間の傾き(b)は 0.96～0.99, 切片(a)は-0.22～0.46 であり、肥料等試験法の推奨規準をほぼ満たした。

(5) 精度は、日を変えての反復試験の結果、尿素性窒素の総平均値が質量分率 1.12 %～45.9 %, その併行相対標準偏差は 1.9 %～2.2 %, 中間相対標準偏差は 2.0 %～2.9 %であり、各濃度レベルにおける精度の目安の許容範囲を満たした。

(6) 定量下限は、定量下限付近の添加回収試験から、質量分率 0.2 % であり、推定検出下限は質量分率 0.07 % と推定された。

以上のことから、本法は肥料中の尿素性窒素の分析法として単一試験室による妥当性が確認された。

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) 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 (2017)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2017.pdf>
- 3) 越野正義編:第二改訂詳解肥料分析法, p.60～62 (1988)

Determination of Urea Nitrogen in Fertilizer by Spectrophotometry

Shinei TAKAHASHI¹,

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Food Safety and Consumer Affairs Information Department

Determination of urea nitrogen (U-N) in fertilizer by spectrophotometry was developed and validated as a single-laboratory validation. Samples were extracted by stirring to mix and diluted with water. After adding *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) as coloring reagent, sample solution was analyzed using UV-VIS spectrophotometer (450 nm). As a result of 3 replicate analysis of 3 fertilizer samples spiked with U-N, the mean recoveries were 98.9 % ~ 103.3 %, respectively. In the repetition test of changing the date (7 days), the repeatability relative standard deviation were 1.9 % ~ 2.2 % and relative standard deviation were 0.8 % ~ 1.8 %. The limits of quantification were 0.2% (mass fraction). In the filtration test for compost and composted sludge fertilizer, the interference of colored compounds could not be eliminated. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of U-N in fertilizer (except compost and composted sludge fertilizer).

Key words urea nitrogen, Spectrophotometry

(Research Report of Fertilizer, **11**, 54~62, 2018)

7-1 液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による

堆肥等中のクロピラリドの測定

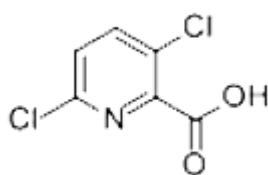
―微量試験法の適用範囲拡大―

伊藤浩平¹, 小塚健志², 青山恵介², 白井裕治²

キーワード クロピラリド, 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, 微量試験法

1. はじめに

クロピラリドはカルボキシ基を有するピリジン系の農薬であり(Fig.1), クロピラリド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⁾. クロピラリドは国内では使用されていないが, 除草剤として使用されている米国, カナダ, 豪州からの輸入飼料に含まれていることがあり, 平成 28 年度に行われた調査によると, 国内の飼料中及び牛ふん堆肥中にもクロピラリドが含まれることが確認されている²⁾. また, 牛ふん堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの分析法としては, 平成 21 年度から平成 28 年度において八木, 顯谷, 小塚らにより液体クロマトグラフタンデム型質量分析(LC-MS/MS)法が開発及び妥当性の確認がなされ^{3~5)}, 定量下限が 10 µg/kg の試験方法として肥料等試験法に記載されている⁶⁾. しかしながら, 土壌中のクロピラリド濃度が 1 µg/kg 程度の低濃度においても作物によっては生育障害を引き起こす場合があることから⁷⁾より高感度な分析法が必要とされ, 平成 29 年度に農業・食品産業技術総合研究機構により定量下限 2 µg/kg 以下の「牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法」(参考法)が開発された⁸⁾.



Clopyralid

CAS No: 1702-17-6

Fig. 1 Chemical structure of clopyralid

クロピラリドは牛ふん以外の畜ふんを利用した堆肥にも含有している可能性があることから, この試験法についての適用範囲拡大が必要とされており, 当センターでは平成 29 年 11 月に農林水産省から試験法開発の依頼を受けた. そこで今回, この LC-MS/MS 法で牛ふん以外の畜ふん由来堆肥(鶏ふん堆肥, 豚ふん堆

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(現)農薬検査部

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

肥等)及び汚泥発酵肥料への適用範囲拡大を目的として、単一試験室の妥当性確認として、真度及び精度の評価、定量下限の確認を実施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

市販の堆肥 7 種類(鶏ふん堆肥 3 点, 豚ふん堆肥 4 点)及び汚泥発酵肥料 8 種類の計 15 種類を試験品として収集し, それぞれ 40 °C で約 60 時間乾燥した後, それぞれ粉砕機で目開き 500 µm の網ふるいを通すまで粉砕して分析用試料を調製した。

2) 装置及び器具

- (1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) : Waters Quattro Premier XE
カラム: Waters ACQUITY UPLC HSS C18 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm)
- (2) 振とう機: TAITEC SR-2DW
- (3) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (4) ロータリーエバポレーター: BÜCHI R-200
- (5) カートリッジカラム: Waters Oasis PRiME HLB Plus Short Cartridge (225 mg)
- (6) 超遠心分離機: AS ONE MCD-2000
- (7) マニホールド: Waters 及び GLSciences
- (8) 試験管ミキサー: AS ONE 試験管ミキサー TRIO TM-2N

3) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 相当の水。ただし, LC-MS/MS に導入する溶離液については A4 の水を使用した。
- (2) アセトニトリル: LC-MS 用
- (3) メタノール(抽出・クリーンアップ用): 残留農薬・PCB 試験用(5000 倍濃縮)または LC-MS 用
- (4) メタノール(溶離液用): LC-MS 用
- (5) 水酸化ナトリウム: 特級
- (6) 塩酸: 有害金属測定用
- (7) アンモニア水: 特級
- (8) ジクロロメタン: 特級
- (9) 硫酸: 有害金属測定用
- (10) ぎ酸: LC-MS 用
- (11) アンモニア溶液(0.0028 % (質量分率)): アンモニア水 0.1 mL を水 1000 mL に加えた。
- (12) クロピラリド標準液(0.1 mg/mL): クロピラリド[C₆H₃C₁₂NO₂]約 0.01 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg の桁まで測定した後, 少量のアセトニトリルで溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた。
- (13) クロピラリド標準液(1 µg/mL): クロピラリド標準液(0.1 mg/mL)の 2 mL を全量フラスコ 200 mL にとり, 標線までアセトニトリルを加えた。
- (14) 検量線用クロピラリド標準液(100 ng/mL): 使用時にクロピラリド標準液(1 µg/mL)の 5 mL を全量

フラスコ 50 mL にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

(15) 検量線用クロピラリド標準液(5～50 ng/mL)： 検量線用クロピラリド標準液(100 ng/mL)の 2.5 mL ～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

(16) 検量線用クロピラリド標準液(0.5 ng/mL～2 ng/mL)： 検量線用クロピラリド標準液(10 ng/mL)の 2.5 mL～10mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 5.00 g を量ってねじ口遠心沈殿管 100 mL に入れ、水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]を 50 mL 加え、振とう機で 30 分間振り混ぜた。その後、遠心力約 $1700 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を三角フラスコ 100 mL に移した。残留物に水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]を 40 mL 加え、振とう機で 30 分間振り混ぜた後、遠心力約 $1700 \times g$ で 5 分間遠心分離した。太首全量フラスコ 100 mL を受器として上記上澄み液をガラス繊維ろ紙をのせた桐山ロートで吸引ろ過し、続いて容器及び残留物を少量の水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]で数回洗浄した洗液を同様に吸引ろ過した。標線まで水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]を加えて抽出液とした。

(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。なす形フラスコ 100 mL をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 10 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 °C 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。なす形フラスコ 100 mL 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。ねじ口円錐型遠心沈殿管 10 mL をカートリッジカラムの下に置き、アンモニア溶液(0.0028 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、クロピラリドを速やかに溶出させた。

(4) 精製 3

溶出液に水酸化ナトリウム(40 g/L)0.1 mL を加え、試験管ミキサーで混合した。その後、ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間混合し、遠心力 $740 \times g$ で約 3 分間遠心分離し、下層(ジクロロメタン層)をパスツールピペットで除去する操作を 2 回繰り返した。残った水層に硫酸(1+2)0.15 mL を加え、試験管ミキサーで混合した。その後、ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間混合し、遠心力 $740 \times g$ で 3 分間遠心分離し、下層(ジクロロメタン層)をパスツールピペットでなす形フラスコ 50 mL に入れる操作を 3 回繰り返した。繰り返しの操作において、下層は同じなす形フラスコ 50 mL に加えた。これにアセトン 5 mL を加え、40 °C 以下の水浴上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させた。これにぎ酸(1+1000)を 1 mL 加え、超音波洗浄機を用いて超音波処理により溶解した後、共栓遠心沈殿管 1.5 mL に移して遠心力 $8100 \times g$

で 5 分間遠心分離した. 上澄み溶液を LC-MS/MS の測定バイアルに移し試料溶液とした.

(5) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

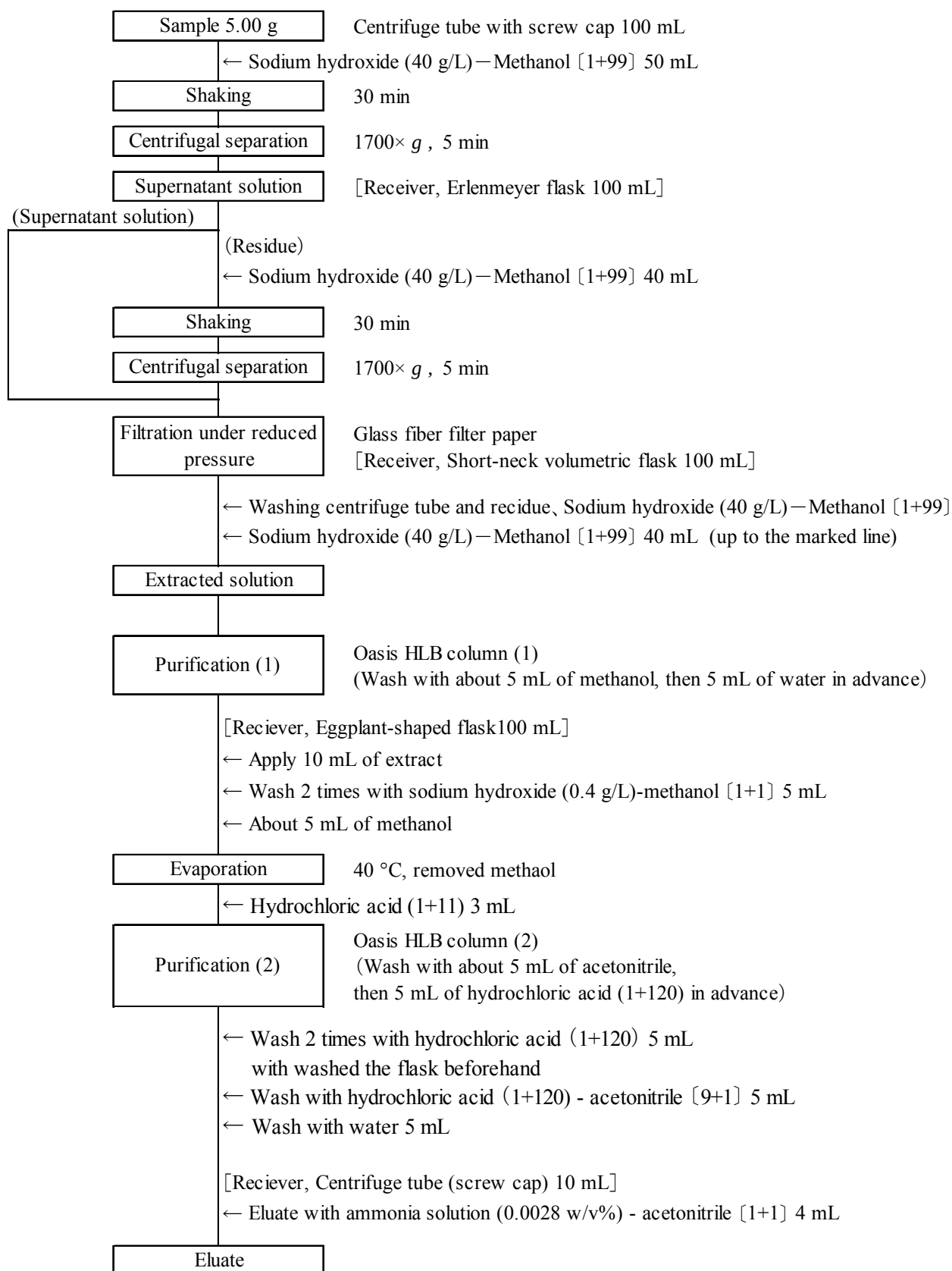
試料溶液及び検量線作成用混合標準液を LC-MS/MS に注入し, Table 1 及び表 Table 2 の測定条件に従って選択反応検出 (SRM) クロマトグラムを得た. 得られた SRM クロマトグラムから各成分のピーク面積を求めて検量線を作成し, 試料溶液中の各成分量を求め, 分析試料中のクロピラリドの量を算出した. なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

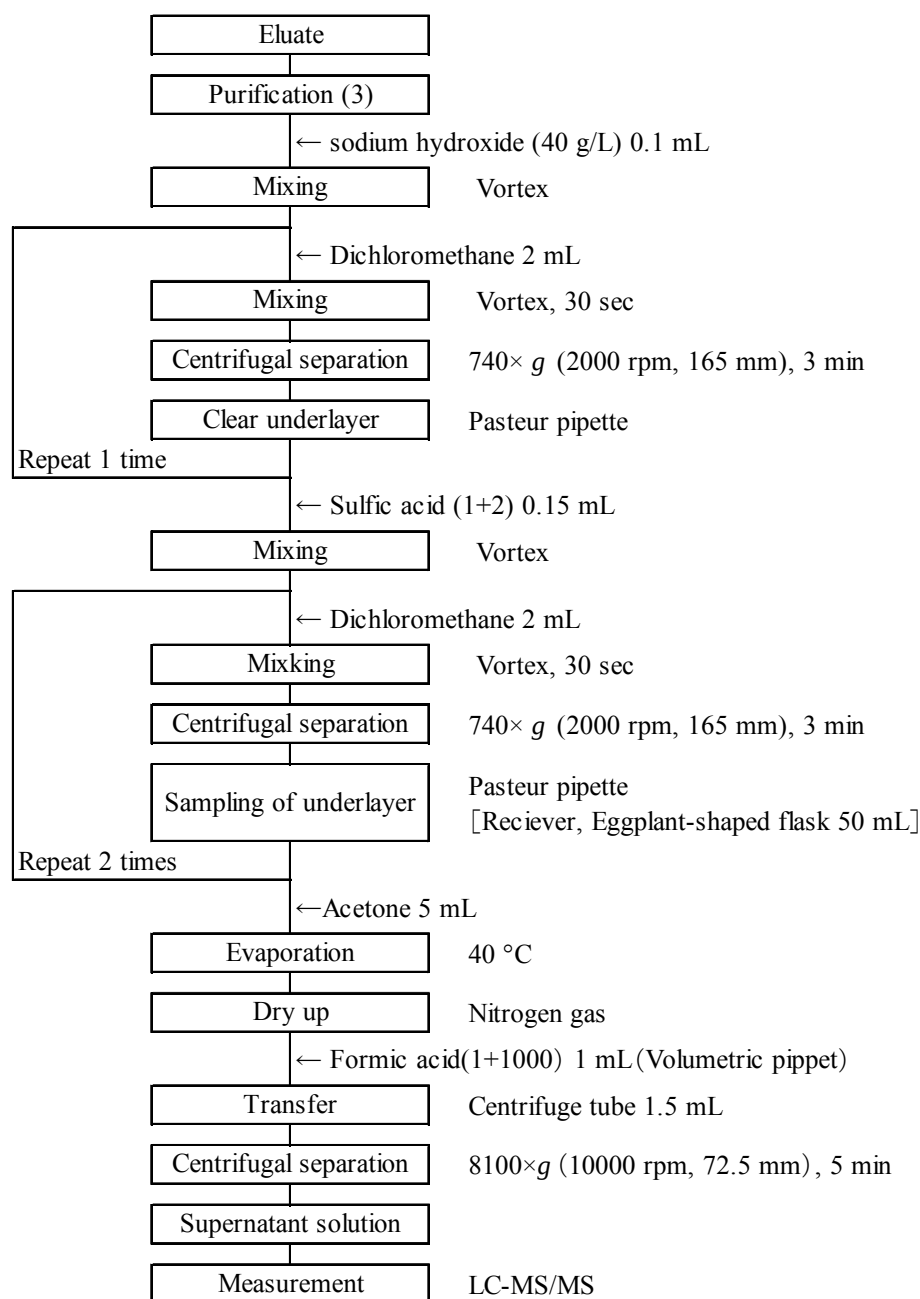
Column	Waters, ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm i.d.×100 mm, 1.8 µm)
Mobile phase	A:Formic Acid (1+1,000) B:Methanol 0 min (5 %B)→5 min (60 %B)→6 min (95 %B)→7 min (5 %B)
Flow rate	0.4 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Desolvation gas	N ₂ , 400 °C, 800 L/hour
Cone gas	Ar (50 L/hour)
Capillary voltage	1.0 kV
Ion source	120 °C

Table 2 MS/MS Parameters

Agricultural chemical	Precursor ion (m/z)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy	
		for quantification (m/z)	for identification (m/z)		for quantification (eV)	for identification (eV)
Clopyralid	192	146	110	20	20	30



Scheme 1-1 Analytical procedure for clopyralid in fertilizer



Scheme 1-2 Analytical procedure for clopyralid in fertilizer

3. 結果及び考察

1) 添加回収試験による真度の評価

豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料の3種類の肥料に、クロピラリドとしてそれぞれ 200 µg/kg, 2 µg/kg 及び 80 µg/kg 相当量添加し、十分に溶媒を揮散させた試料を調製し、本法に従って3点併行で添加回収試験を行った。各試料の結果を Table 3 に、また、添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig.2 に示した。回収率は81.2 %～94.2 %であり、いずれも肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける真度の目標を満たしていたことから、これらの試料の分析において十分な真度を有していることが確認された。

Table 3 Result of recovery test

Sample	Content of clopyralid ($\mu\text{g/kg}$)	Mean recovery ^{a)} (%)	<i>RSD</i> ^{b)} (%)	Criteria of the trueness ^{c)} (%)
Pig manure compost	200	88.6	8.1	70~120
Poultry manure compost	2	81.2	13.0	60~125
Composted sludge fertilizer	80	94.2	3.2	70~120

a) $n = 3$

b) Relative standard deviation

c) Criteria of trueness (recovery) shown in Testing Methods for Fertilizer

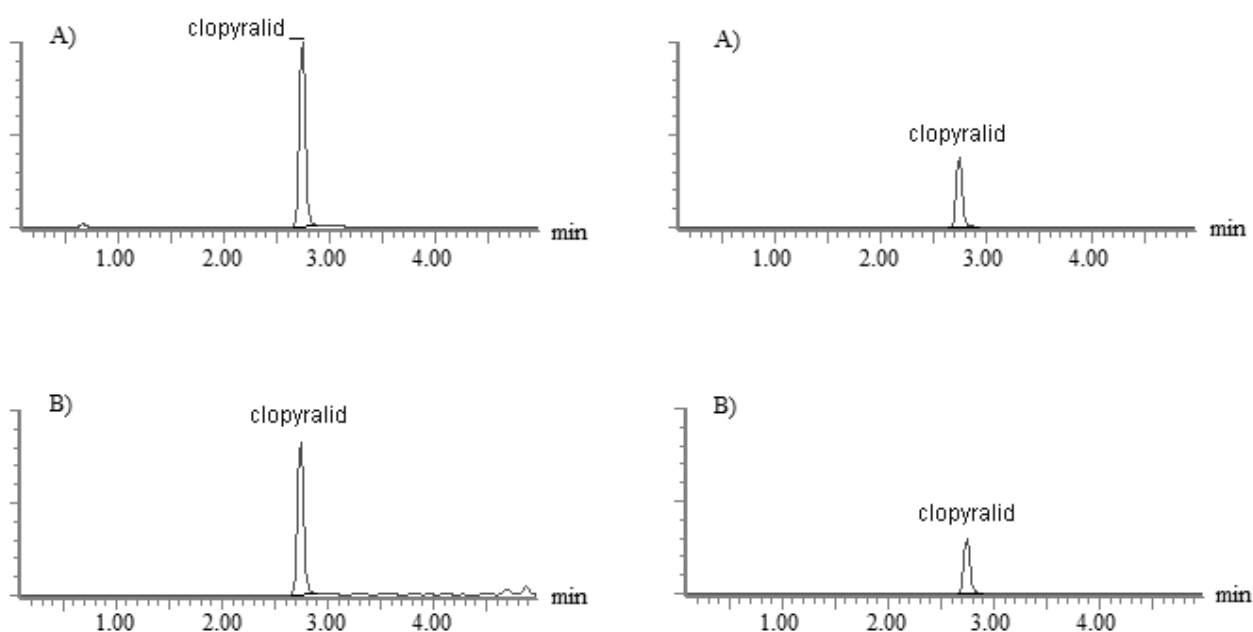


Fig.2 Chromatogram of recovery test

A) Standard solution (Clopyralid content : 0.5 ng)

B) Sample solution (Pig manure compost, clopyralid content : 200 $\mu\text{g/kg}$)

Left figure : Product ion for quantification (192>146)

Right figure : Product ion for identification (192>110)

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に豚ふん堆肥及び鶏ふん堆肥について、クロピラリドとして 200 $\mu\text{g/kg}$ 及び 2 $\mu\text{g/kg}$ 相当量添加し、2 点併行で日を変えて 5 回試験を実施して得られた結果を Table 4 に示した。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 5 に示した。豚ふん堆肥及び鶏ふん堆肥の平均値は 141 $\mu\text{g/kg}$ 及び 1.59 $\mu\text{g/kg}$ 、併行相対標準偏差は 13 %及び 10 %、中間相対標準偏差は 16 %及び 21 %であった。いずれの相対標準偏差も肥料等試験法⁶⁾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)の目安の 2 倍以内であったことから、本法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 4 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation($\mu\text{g/kg}$)

Test days	Pig manure compost		Poultry manure compost	
1	129	160	1.71	1.85
2	122	146	1.84	1.42
3	132	120	1.12	1.13
4	161	184	2.02	1.84
5	112	143	1.40	1.52

Table 5 Statistical analysis of repetition test result for evaluation precision

Sample	Mean value ^{a)} ($\mu\text{g/kg}$)	Repeatability precision			Intermediate precision		
		s_r ^{b)} ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_r ^{c)} (%)	$CRSD_r$ ^{d)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)} ($\mu\text{g/kg}$)	$RSD_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)
Pig manure compost	141	18	13	11	23	16	18
Poultry manure compost	1.59	0.16	10	11	0.33	21	18

a) Total mean (Number of test days (5) $\times$ Number of replicates (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

クロピラリドとしてそれぞれ 1 $\mu\text{g/kg}$ 相当量を含有する鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を調製し、本法に従って 8 点併行で分析した。得られた分析値の標準偏差を 10 倍して定量下限を推定し、また、標準偏差を $2 \times t(n-1, 0.05)$ 倍として検出下限を推定した結果を Table 6 に示した⁹⁾。定量下限及び検出下限は、堆肥が 1 $\mu\text{g/kg}$ 及び 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 、汚泥発酵肥料が 1 $\mu\text{g/kg}$ 及び 0.4 $\mu\text{g/kg}$ と推定された。

Table 6 Calculated LOQ and LOD values of cropyralid ($\mu\text{g/kg}$)

Sample	Content of cropyralid	Mean value ^{a)}	s_r ^{b)}	LOQ ^{c)}	LOD ^{d)}
Poultry manure compost	1.00	0.67	0.09	1	0.3
Composted sludge fertilize	1.00	0.69	0.11	1	0.4

a) $n=8$

b) Standard deviation

c) Standard deviation $\times 10$; 1-digit accuracyd) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$; 1-digit accuracy

4) 流通肥料の分析による適用範囲の確認

15 点の流通肥料 (鶏ふん堆肥 3 点, 豚ふん堆肥 4 点, 汚泥発酵肥料 8 点) について, 本法に従ってクロピラリドを測定したところ, 8 点の試料でクロピラリドが検出された. 得られた結果のうち, 現物あたり試料中クロピラリド濃度を Table 7 に, また, 各試料のクロマトグラムの一例を Fig.3 に示した. 鶏ふん堆肥は検出下限未満 ~ 6 $\mu\text{g/kg}$. 豚ふん堆肥は 4 $\mu\text{g/kg}$ ~ 19 $\mu\text{g/kg}$ 及び汚泥発酵肥料は検出下限未満 ~ 11 $\mu\text{g/kg}$ であった. 本法による低濃度の測定は可能であったが, 一部堆肥によってはカートリッジカラムによる精製ができないものが存在した. これは, 精製 2 の操作において, 試料溶液に塩酸を添加して酸性条件にしたところで, 試料溶液中に固形物が多量に発生し, この溶液をカートリッジカラムに注入することでカラムに詰まりが生じたため, その後の操作ができなくなってしまったことによる. 堆肥や汚泥発酵肥料は, 使用される原料や材料の違い等において多種多様な製品が存在しているが, 今回のように測定できない試料も存在していることから, 前処理方法については今後更なる検討が必要と考える.

Table 7 Analysis of commercial fertilizers (actual article)

Sample No.	Sample	Content of clopyralid ($\mu\text{g/kg}$)
1	Poultry manure compost 1	N.D ^{a)}
2	Poultry manure compost 2	6
3	Poultry manure compost 3	3
4	Pig manure compost 1	4
5	Pig manure compost 2	6
6	Pig manure compost 3	19
7	Pig manure compost 4	- ^{b)}
8	Composted sludge fertilizer 1	N.D ^{a)}
9	Composted sludge fertilizer 2	N.D ^{a)}
10	Composted sludge fertilizer 3	1
11	Composted sludge fertilizer 4	8
12	Composted sludge fertilizer 5	(0.6) ^{c)}
13	Composted sludge fertilizer 6	11
14	Composted sludge fertilizer 7	N.D ^{a)}
15	Composted sludge fertilizer 8	N.D ^{a)}

a) Not detectable

b) Unmeasurable

c) Analytical value of higher than or equal to *LOD* and lower than *LOQ*

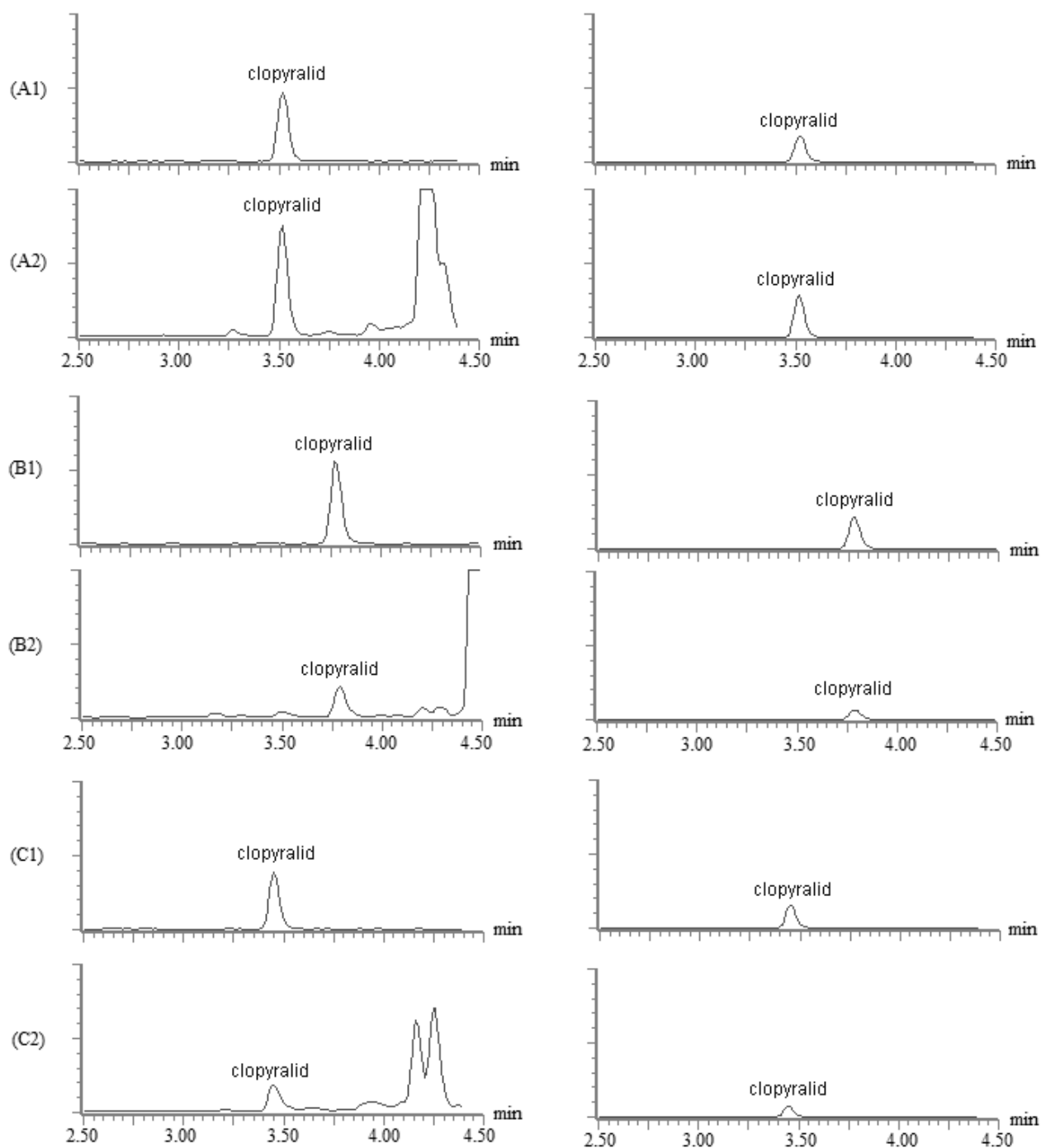


Fig.3 Chromatogram of analysis of commercial fertilizers.

(A1, B1, C1) Standard solution : 10 ng/mL

(A2) Poultry manure compost 2

(B2) Pig manure compost 3

(C2) Composted sludge fertilizer 4

Left figure : Product ion for quantification (192>146)

Right figure : Product ion for identification (192>110)

4. まとめ

LC-MS/MS を用いた高感度分析法の適用範囲拡大のために、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料について、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。

(1) 豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を用い、3 点併行の添加回収試験により真度の確認を行った結果、回収率は 81.2 %～94.2 %であった。この結果は肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける真度の目標を満たしていた。

(2) 併行精度及び中間精度を確認するため、豚ふん堆肥及び鶏ふん堆肥を用い、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 13 %及び 10 %、中間相対標準偏差は 16 %及び 21 %であった。この結果は、肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける併行精度及び中間精度の目安の 2 倍以内であり、許容範囲を満たしていた。

(3) 鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を用いて定量下限等の確認を行った結果、定量下限は 1 µg/kg 程度、検出下限は 0.4 µg/kg 程度であることを確認した。

(4) 流通試料を用いて豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料について分析を行ったところ、一部の豚ふん堆肥を除き定量は可能であった。定量のできなかった豚ふん堆肥は前処理操作の途中で問題が生じ、測定溶液の調製ができなかったためであったことから、今後更なる前処理操作の改良が必要と考える。

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) 農林水産省：輸入飼料中及び堆肥中に含まれるクロピラリドの調査結果について
<<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyoclopyralid/attach/pdf/clopyralid-18.pdf>>
- 3) 八木寿治，関根優子，白井裕治：液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) によるたい肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド測定，肥料研究報告，**3**，51～59 (2010)
- 4) 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)
- 5) 小塚健志，大島舞弓，橋本良美，田丸直子，白井裕治：液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) 法による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド及び関連物質の測定－共同試験成績－，平成 28 年度肥料等技術検討会資料
- 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/sub9.html>>
- 7) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター：土壤中クロピラリドのトマト，サヤエンドウ，スイートピーの初期成育に及ぼす影響・データ集
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078226.html>
- 8) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター：牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法 (参考法)
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078229.html>
- 9) Codex：“Guideline on Analytical Terminology”，CAC/GL 72-2009 (2009)

Validation of Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Kohei ITO¹, Kenji KOZUKA², Keisuke AOYAMA², and Yuji SHIRAI²

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

(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

A single-laboratory validation study was conducted for the microanalysis determination of clopyralid in compost and composted sludge fertilizer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. The extract was purified by retention and elution with a cleanup cartridge and by extraction with dichloromethane. These purification took advantage of characteristics that the behavior of elution varies between acidity and alkaline. The clopyralid was analyzed by LC-MS/MS. As a result of 3 replicate analysis of 3 fertilizer (pig manure compost, poultry manure compost and composted sludge fertilizer) samples spiked with clopyralid at 2 µg/kg ~ 200µg/kg, the mean recoveries were 81.2 % ~ 94.2 %. Repeatability of clopyralid in 2 fertilizers (poultry manure compost and composted sludge fertilizer) were 13 % and 10 %, intermediate precision of there were 16 % and 21 %. Minimum limit of quantification of there were estimated 1 µg/kg. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of clopyralid in compost and composted sludge fertilizer. However, preparation process of sample solution has a need for improvement, because the existence of pig manure compost which was difficult to prepare sample solution was confirmed in analysis of commercial fertilizers.

Key words clopyralid, compost, composted sludge fertilizer, LC-MS/MS, sensitive determination method

(Research Report of Fertilizer, **11**, 63~74, 2018)

7-2 液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による

堆肥等中のクロピラリドの測定

―微量試験法の共同試験成績―

伊藤浩平¹, 小塚健志², 秋元里乃³, 坂井田里子², 大島舞弓², 中村信仁², 白井裕治²

キーワード クロピラリド, 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, 微量試験法, 共同試験

1. はじめに

クロピラリドはカルボキシル基を有するピリジン系の農薬であり(Fig. 1), クロピラリド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⁾. 平成 28 年度に行われた調査によると, 国内で生産されている牛ふん堆肥中にもクロピラリドが含まれることが確認されている²⁾. また, 牛ふん堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの分析法としては, 平成 21 年度から平成 28 年度において八木, 顯谷, 小塚らにより液体クロマトグラフタンデム型質量分析(LC-MS/MS)法が開発および妥当性の確認がなされ^{3~5)}, 定量下限が 10 µg/kg の試験方法として肥料等試験法に収載されている⁶⁾. しかしながら, 土壌中のクロピラリド濃度が 1 µg/kg 程度の低濃度においても作物によっては生育障害を引き起こす場合があることから⁷⁾より低含有量のクロピラリドを測定可能な分析法が必要とされ, 平成 29 年度に国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構において定量下限 2 µg/kg 以下の「牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法」(参考法)が開発された⁸⁾. また, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)では, この試験法について, 牛ふん以外の畜ふん由来堆肥等への適用範囲拡大を検討し, 単一試験室の妥当性確認のための試験を実施した⁹⁾.

更に, この方法の性能評価(試験室間の再現精度)のため, 共通試料を用いて複数試験室による妥当性確認を実施したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料

流通されている堆肥を 4 種類(牛ふん堆肥 2 種類, 豚ふん堆肥及び鶏ふん堆肥各 1 種類)及び汚泥発酵肥料 1 種類を 40 °C で一昼夜風乾した後, 目開き 500 µm のスクリーンを通過するまで粉碎し, よく混合して共同試験用試料とした. このうち豚ふん堆肥と 2 種類の牛ふん堆肥はクロピラリドの含有が認められ, その他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.

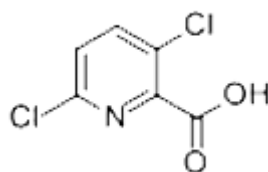
共同試験用試料は約 9 g をポリエチレン袋に入れ密封して, それぞれ 40 袋を調製した. 一対のブラインド試

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(現)農薬検査部

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

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)農林水産省 関東農政局

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。



Clopyralid

CAS No: 1702-17-6

Fig. 1 Chemical structure of clopyralid

2. 材料及び方法

2) 添加用標準液

市販されているクロピラリド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2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2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、マニホールド、試験管ミキサーを使用した。

4) クロピラリドの測定

(1) 抽出

分析試料5.00 gを量ってねじ口遠心沈殿管100 mLに入れ、水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]を50 mL加え、振とう機で30分間振り混ぜた。その後、遠心力約 $1700 \times g$ で5分間遠心分離し、上澄み液を三角フラスコ100 mLに移した。残留物に水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]を40 mL加え、振とう機で30分間振り混ぜた後、遠心力約 $1700 \times g$ で5分間遠心分離した。太首全量フラスコ100 mLを受器として上記上澄み液をガラス繊維ろ紙をのせた桐山ロートで吸引ろ過し、続いて容器及び残留物を少量の水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]で数回洗浄した洗液を同様に吸引ろ過した。標線まで水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]を加えて抽出液とした。

(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。なす形フラスコ100 mLをカートリッジカラムの下に置き、抽出液10 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 °C 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。なす形フラスコ 100 mL 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。ねじ口円錐型遠心沈殿管 10 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、クロピラリドを速やかに溶出させた。

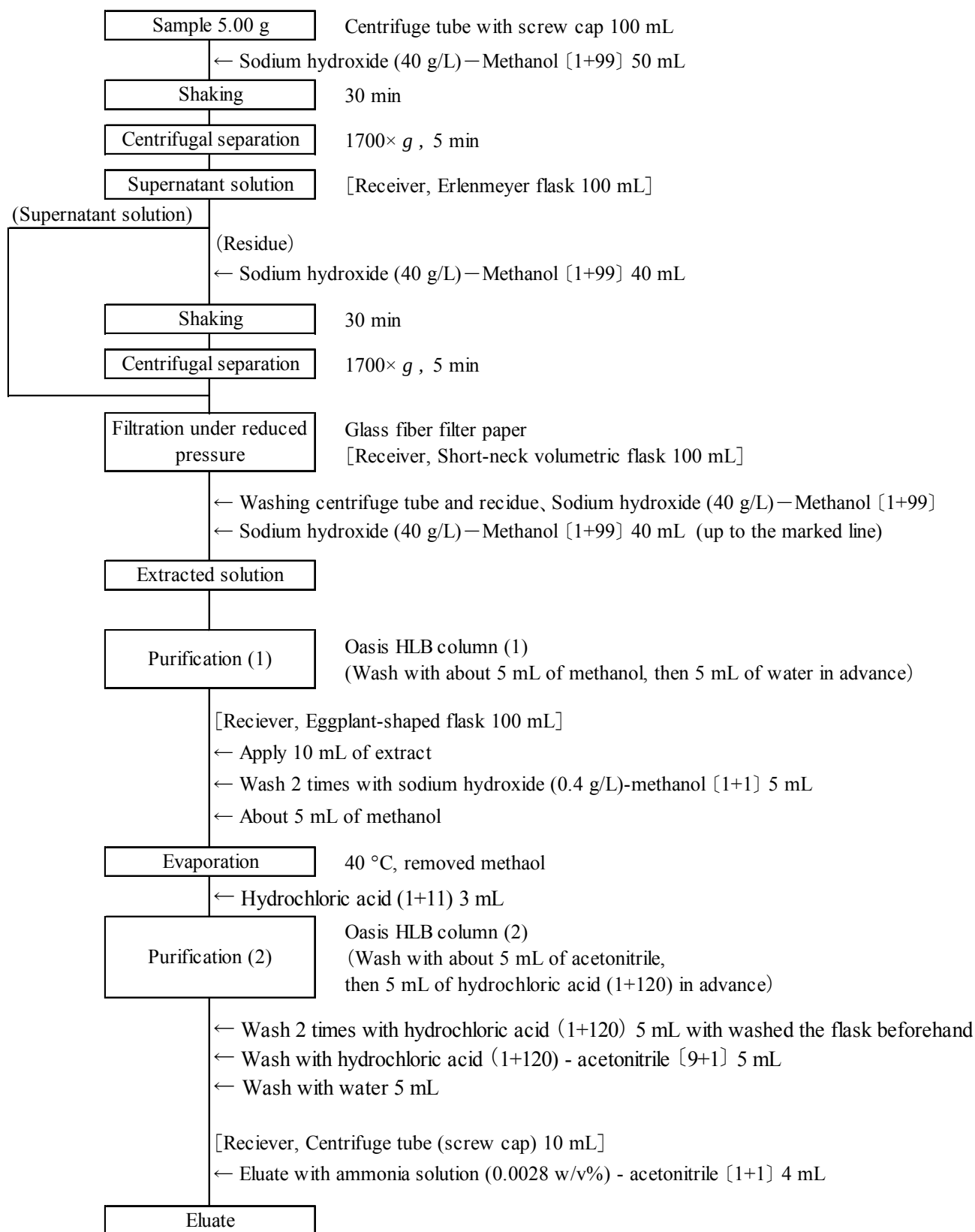
(4) 精製3

溶出液に水酸化ナトリウム(40 g/L) 0.1 mL を加え、試験管ミキサーで混合した。その後、ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間混合し、遠心力 $740 \times g$ で約 3 分間遠心分離し、下層(ジクロロメタン層)をパスツールピペットで除去する操作を 2 回繰り返した。残った水層に硫酸(1+2) 0.15 mL を加え、試験管ミキサーで混合した。その後、ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間混合し、遠心力 $740 \times g$ で 3 分間遠心分離し、下層(ジクロロメタン層)をパスツールピペットでなす形フラスコ 50 mL に入れる操作を 3 回繰り返した。繰り返しの操作において、下層は同じなす形フラスコ 50 mL に加えた。これにアセトン 5 mL を加え、40 °C 以下の水浴上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させた。これにぎ酸(1+1000)を 1 mL 加え、超音波洗浄機を用いて超音波処理により溶解した後、共栓遠心沈殿管 1.5 mL に移して遠心力 $8100 \times g$ で 5 分間遠心分離した。上澄み溶液を LC-MS/MS の測定バイアルに移し試料溶液とした。

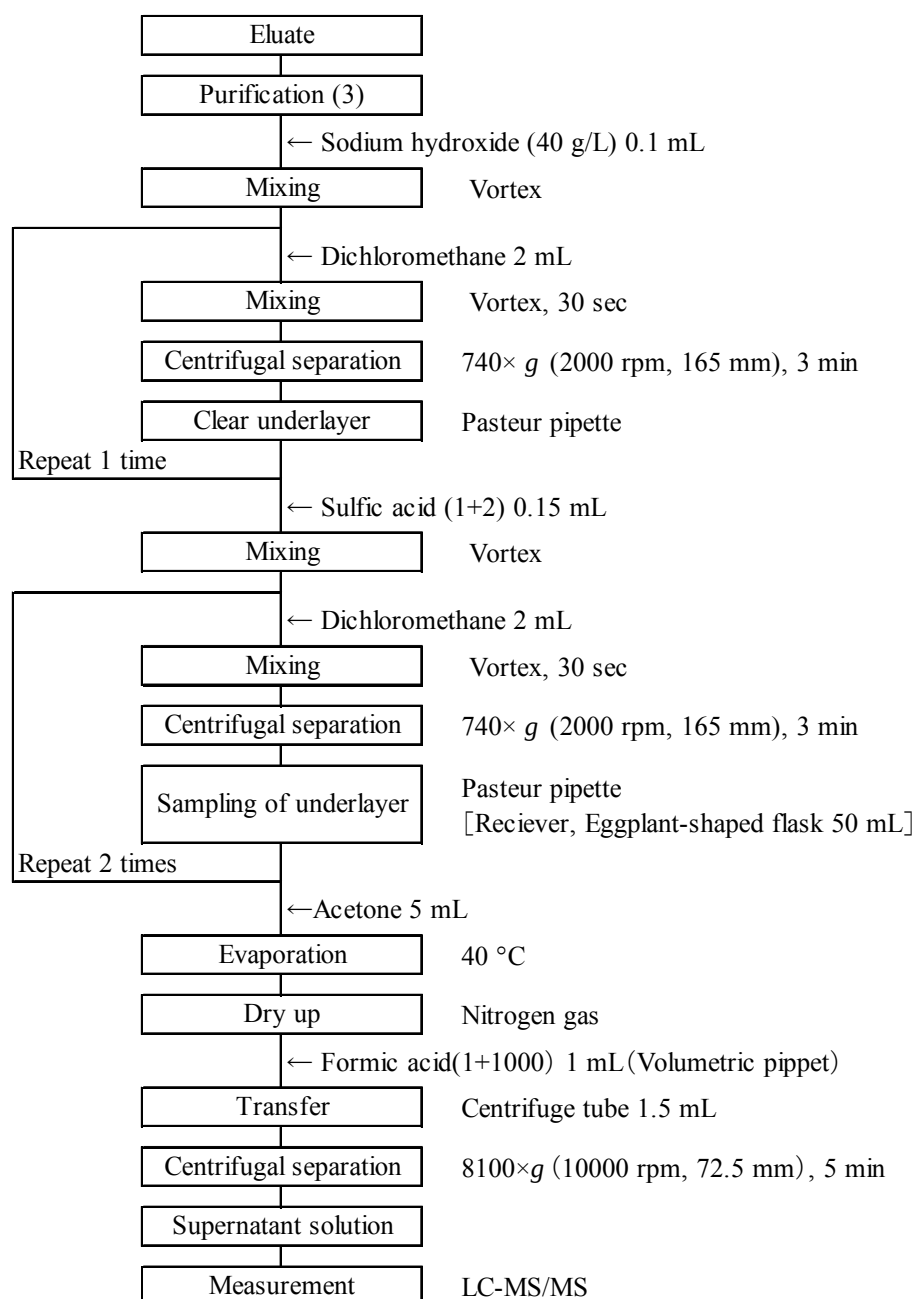
(5) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

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の量を算出した。なお、測定にあたっては、肥料等試験法(2017) 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 1-1 及び Scheme 1-2 に示した。



Scheme 1-1 Analytical procedure for clopyralid in fertilizer



Scheme 1-2 Analytical procedure for clopyralid in 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¹⁰⁾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(牛ふん堆肥 1, 牛ふん堆肥 2 及び豚ふん堆肥)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、ねじ口遠心沈殿管に計り入れる分析試料は牛ふん堆肥 1 は 4.00 g, その他は 4.50 g とした。

6) 共同試験

試験に参加した 10 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.

- ・ 一般財団法人材料科学技術振興財団分析評価部 KB
- ・ 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター
- ・ 一般財団法人日本食品検査関西事業所
- ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所
- ・ 株式会社食環境衛生研究所
- ・ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター
有害化学物質研究領域
- ・ 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
- ・ 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
- ・ 日本環境科学株式会社事業部分析グループ
- ・ 三浦工業株式会社環境事業本部科学分析センター

(50 音順)

Table 1 Instruments used in the collaborative study

LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
LC: 1200series, Agilent Technologies MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	L-column2 ODS, CERI (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)
LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: MICROMASS Quattro micro API, Waters	ACQUITY UPLC HSS T3, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)
LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: Agilent 1200 Infinity Series MS/MS: Agilent 6460 Triple Quad LC/MS	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: Prominence UFLC, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	L-column2 ODS, CERI (2.1 mm×150 mm, 5.0 μm)
LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: API 4000 QTRAP, AB SCIEX	InertSustain AQ-C18, GL Science (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: Nexera XR, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (3.0 mm×50 mm, 2.0 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQ, Waters	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 2.0 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 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) 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併行精度の目安 ($CRSD_r$) 以内であり, F 値が F 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なかった. 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 Homogeneity test result of clopyralid

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} ($\mu\text{g/kg}$)	s_r ^{c)} ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} ($\mu\text{g/kg}$)	s_{b+r} ^{g)} ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	F value ^{i,j)}
Cattle manure compost 1	10(0)	180.31	11.88	6.6	11	2.02	12.05	6.7	1.06
Cattle manure compost 2	10(0)	2.70	0.28	10.4	11	0	0.28	10.4	0.43
Pig manure compost	9(1)	31.92	1.50	4.7	11	1.58	2.18	6.8	3.23

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

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

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

f) Standard deviation of sample-to-sample

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

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

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

j) 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 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¹¹⁾に従って統計処理した. 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, 10 試験室の試験成績のうち, 3 種類の試料で各 1 試験室が外れ値として判定された.

3) 併行精度及び室間再現精度

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_r), 併行相対標準偏差 (RSD_r) 値及び肥料等試験法⁶⁾における併行相対標準偏差 ($CRSD_r$) の目安並びに室間再現標準偏差 (s_R), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) 及び肥料等試験法¹¹⁾における室間再現相対標準偏差 ($CRSD_R$) の目安を Table 4 に示した.

クロピラリドの平均値は $1.20 \mu\text{g/kg} \sim 128 \mu\text{g/kg}$ であり, その併行標準偏差は $0.06 \mu\text{g/kg} \sim 10.1 \mu\text{g/kg}$, 併行相対標準偏差は 2.5 % $\sim$ 15.3 %, 室間再現標準偏差は $0.14 \mu\text{g/kg} \sim 14.6 \mu\text{g/kg}$, 室間再現相対標準偏差は 11.4 % $\sim$ 17.6 %であった.

いずれの併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) も肥料等試験法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 2 倍以内であったことから, 本法の精度は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 3 Individual result of clopyralid ($\mu\text{g/kg}$)

Lab ID ^{a)}	Cattle manure compost 1		Cattle manure compost 2		Pig manure compost	
A	91.6	91.2	1.34	1.14	16.6	14.4
B	129	128	2.52	2.50	26.6	27.8
C	113	146	2.45	1.88	10.1 ^{c)}	26.5 ^{c)}
D	166	157	2.18	2.45	26.0	33.2
E	115	121	3.38	2.14	22.3	19.5
F	138 ^{b)}	161 ^{b)}	2.63 ^{b)}	2.89 ^{b)}	30.0 ^{b)}	28.9 ^{b)}
G	100	85.0	1.48	2.00	15.6	12.0
H	129	134	2.45	2.69	23.1	22.8
I	153	155	2.16	2.17	20.5	23.8
J	127	121	2.72	2.44	21.7	19.5

Lab ID ^{a)}	Poultry manure compost		Composted sludge fertilizer	
A	0.896	0.856	35.9	34.2
B	1.07	0.971	53.5	54.8
C	1.05	1.00	35.4 ^{c)}	53.0 ^{c)}
D	0.992	0.967	56.7	55.0
E	1.29	1.36	33	35.0
F	1.49 ^{b)}	1.52 ^{b)}	62.7 ^{b)}	61.1 ^{b)}
G	0.413 ^{c)}	0.765 ^{c)}	35.2	33.4
H	1.12	1.13	42.0	42.5
I	1.23	1.14	54.3	56.8
J	1.65	1.84	60.9	59.3

a) Laboratory identification

b) Calculated value using m/z 110 for quantification

c) Outlier of Cochran test

Table 4 Statistical analysis of collaborative study results for clopyralid

Sample	Labs ^{a)} <i>p</i> (<i>q</i>)	Mean ^{b)} ($\mu\text{g/kg}$)	s_r ^{c)} ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	s_R ^{f)} ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_R ^{g)} (%)	$CRSD_R$ ^{h)} (%)
Cattle manure compost 1	10(0)	128	10.1	7.9	11	14.6	11.4	22
Cattle manure compost 2	10(0)	2.28	0.35	15.3	11	0.40	17.6	22
Pig manure compost	9(1)	22.5	2.31	10.3	11	3.43	15.3	22
Poultry manure compost	9(1)	1.20	0.06	5.0	11	0.14	12.0	22
Composted sludge fertilizer	9(1)	48.1	1.21	2.5	11	5.60	11.6	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 ($n=p \times \text{number of samples (2)}$)
- 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
- 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

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の測定について室間再現性の評価を行った. その結果, クロピラリドの平均値 $1.20 \mu\text{g/kg} \sim 128 \mu\text{g/kg}$ において, 室間再現相対標準偏差は 11.4 %~17.6 %であった. いずれの室間再現相対標準偏差(RSD_R)も肥料等試験法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範囲内であることから, 本法の精度は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が確認された.

謝 辞

共同試験にご協力頂きました一般財団法人材料科学技術振興財団分析評価部 KB, 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター, 一般財団法人日本食品検査関西事業所, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 株式会社食環境衛生研究所, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター有害化学物質研究領域, 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, 日本環境科学株式会社事業部分分析グループ及び三浦工業株式会社環境事業本部科学分析センターの各位に謝意を表します.

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) 農林水産省: 輸入飼料中及び堆肥中に含まれるクロピラリドの調査結果について
<<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-18.pdf>>
- 3) 八木寿治, 関根優子, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)によるたい肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド測定, 肥料研究報告, 3, 51~59(2010)
- 4) 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)
- 5) 小塚健志, 大島舞弓, 橋本良美, 田丸直子, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)法による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド及び関連物質の測定ー共同試験成績ー, 平成28年度肥料等技術検討会資料
- 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/sub9.html>>
- 7) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター: 土壌中クロピラリドのトマト, サヤエンドウ, スイートピーの初期成育に及ぼす影響・データ集
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078226.html>
- 8) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター: 牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法(参考法)
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078229.html>
- 9) 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井裕治: 12 LC-MS/MS 法による堆肥等中のクロピラリドの測定ー適用範囲拡大ー, 平成29年度肥料等技術検討会資料
- 10) 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)
- 12) Horwitz W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)

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

Kohei ITO¹, Kenji KOZUKA², Satono AKIMOTO³, Satoko SAKAIDA¹, Mayu OSHIMA¹,
Nobuhito NAKAMURA¹ and Yuji SHIRAI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kanto Regional Agricultural Administration Office

A collaborative study was conducted to evaluate LC-MS/MS for determination of clopyralid, in compost and composted sludge fertilizer. Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. The extract was purified by retention and elution with a cleanup cartridge and by extraction with dichloromethane. These purification took advantage of characteristics that the behavior of elution varies between acidity and alkaline. The clopyralid, was 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 1.20 $\mu\text{g/kg}$ ~ 128 $\mu\text{g/kg}$ and 11.4 % ~ 17.6 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of clopyralid,

Key words clopyralid, compost, composted sludge fertilizer, LC-MS/MS, microanalysis method, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **11**, 75~85, 2018)

8 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿酸の測定

船木紀夫¹

キーワード 尿酸, 高速液体クロマトグラフィー, リン酸緩衝液, 家きん由来原料

1. はじめに

尿酸は、家きん由来の肥料中に含まれる窒素の主要形態であり、ウリカーゼ等の作用により土壤中でアラントイン、アラントイン酸及び尿素を経由して速やかに分解する(Fig. 1)ことから、有効態の窒素として評価されている。このことから、肥料中の尿酸を定量することは、肥料の特性や肥効発現の様相を知る上で重要であるだけでなく、肥料中の家きん由来原料の含有量を判断する指標になると考えられる。

従来、肥料及び堆肥中の尿酸の分析法としては、吸光光度法により測定する方法が、詳解肥料分析法¹⁾に記載がある他、多く報告されている^{2~10)}が、どの分析法も、前処理工程が長く分析操作に習熟を要する、妥当性が確認されていない、等の問題がある。そこで、肥料中の尿酸の含有量を簡便に確認することを目的に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による肥料中の尿酸分析時における選択性、真度、精度、定量下限、添加回収率、中間精度及び併行精度等の検討を行ったので、それらの概要を報告する。

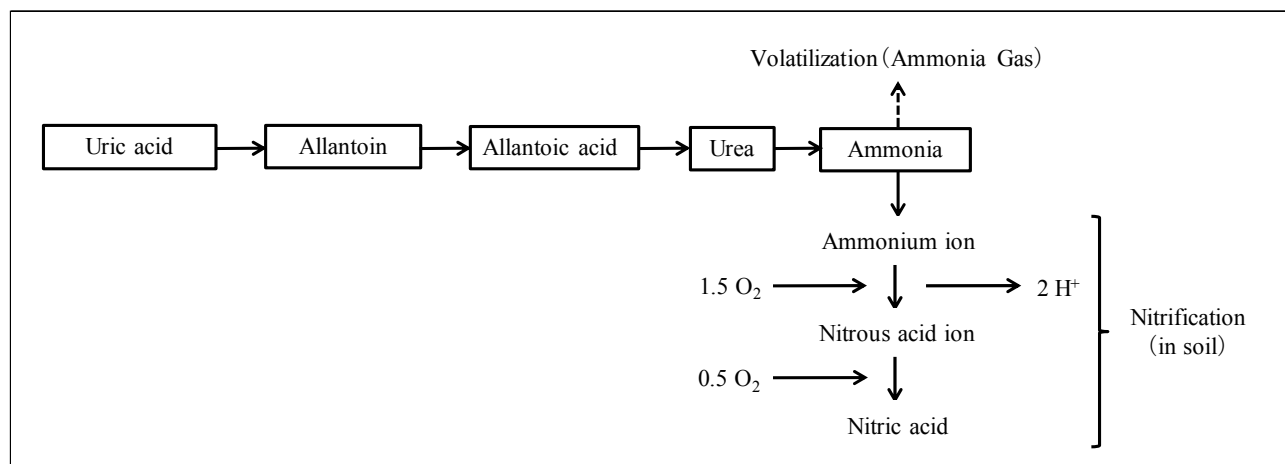


Fig. 1 The pathway of uric acid metabolism

2. 材料及び方法

1) 供試試料

供試試料として市販の流通肥料 24 点(化成肥料, 汚泥発酵肥料, 混合堆肥複合肥料, 堆肥及び動物の排せつ物(うずらふん))を供試した。汚泥発酵肥料, 堆肥及び動物の排せつ物は 65 °C の恒温乾燥器にて 10 時間乾燥した後に、他の種類の肥料は乾燥せずに、それぞれ超遠心粉砕機を用いて 500 μm 以下に粉砕した。

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

2) 試薬等の調製

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- (2) pH 7, pH 8 及び pH 9 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 9.073 g を水に溶かして 1000 mL としたもの, 及び JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) 9.464 g を水に溶かして 1000 mL としたものを, pH がそれぞれ 7.0 ± 0.1 , 8.0 ± 0.1 及び 9.0 ± 0.1 になるよう混合して使用した。
- (3) 0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液: ピロリン酸ナトリウム ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 26.6 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (4) 0.4 % 炭酸リチウム溶液: 純度 99 % (質量分率) 以上の炭酸リチウム (Li_2CO_3) 4 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (5) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム (NaOH) 4 g を水に溶かして 1000 mL としたもの。
- (6) 0.01 mol/L 炭酸リチウム溶液: 純度 99 % (質量分率) 以上の炭酸リチウム (Li_2CO_3) 0.74 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (7) 尿酸標準液 (1000 $\mu\text{g/L}$): 尿酸 [$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$] (和光純薬工業, 特級) を 0.100 g はかりとり, 0.01 mol/L 炭酸リチウム溶液に溶かして 100 mL とした。
- (8) アラントイン標準液 (1000 $\mu\text{g/L}$): アラントイン [$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3$] (関東化学, 特級) を 0.100 g はかりとり, 水に溶かして 100 mL とした。
- (9) アラントイン酸標準液 (1000 $\mu\text{g/L}$): アラントイン酸 [$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_5$] (和光純薬工業) を 0.100 g はかりとり, 0.01 mol/L 炭酸リチウム溶液に溶かして 100 mL とした。
- (10) 検量線用混合標準液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 $\mu\text{g/mL}$): 尿酸標準液, アラントイン標準液及びアラントイン酸標準液の一定量を混合し, 抽出液で順次希釈して 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 及び 100 $\mu\text{g/mL}$ の検量線用混合標準液をそれぞれ調製した。
- (11) 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液: JIS K 8359 に規定する酢酸アンモニウム ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) を 1.54 g はかりとり, 水に溶かして 1000 mL とした。
- (12) メタノール: HPLC 用

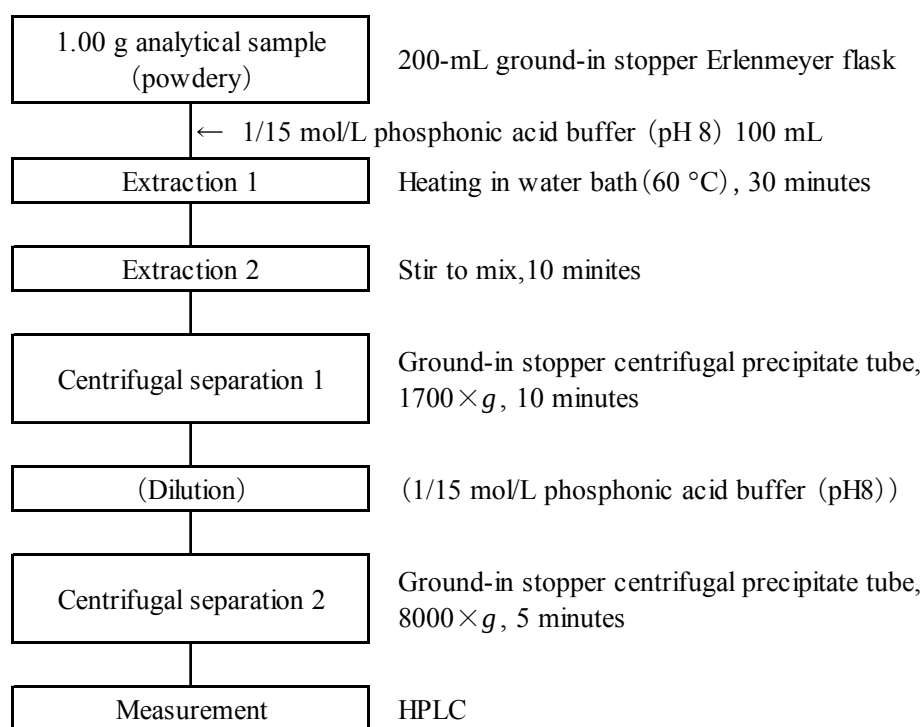
3) 器具及び装置

- (1) 高速液体クロマトグラフ: Waters 2695 Separation module, 2996 photo diode Array Detector
- (2) カラム: Scherzo SS-C18: 長さ 250 mm L × 内径 4.6 mm I.D., 粒径 3 μm
- (3) マグネチックスターラー: 東京硝子器械 F-626N
- (4) 遠心分離機: 日立工機 himac SCT 5BA
- (5) 超遠心分離機: KUBOTA 6800
- (6) 超遠心粉碎機: ZM-200 Retsch

4) 試験操作

(1) 抽出

粉状にした分析用試料 1.00 g を共栓三角フラスコ 200 mL にはかり取り, 1/15 mol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0 ± 0.1, 以下 pH 8) を 100 mL 加え, 軽くシリコン栓をし, 60 ± 2 °C になるよう設定したウォーターバスで約 30 分間加熱 (10 分ごとに軽く振とう) 後, 直ちにマグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜた. 抽出液を 15 mL または 50 mL の遠心沈殿管にとり, 1700 × *g* で 10 分間遠心分離した後, さらに 8000 × *g* で 5 分間遠心分離したものを, HPLC 測定用試料溶液とした (Scheme 1).



Scheme 1 Method flow sheet of uric acid in fertilizers

(2) HPLC による測定

各検量線用混合標準液 10 μL を HPLC に注入し, Table 1 の測定条件で測定して得られたピーク高さから検量線を作成した. 試料溶液 10 μL を HPLC に注入し, ピーク高さから検量線により試料液中の尿酸の量を求め, 分析試料中の濃度を算出した. なお, 測定時間については, 妨害ピークが 25~28 分頃に出る試料があったため, 30 分とした.

Table 1 HPLC Conditions

HPLC	Waters 2695 separation module
Detector system	2996 photo diode array detector
Wavelength	290 nm (uric acid) 210 nm (allantoin and allantoic acid)
Column	Scherzo SS-C18 (250 mm L×4.6 mm I.D., 3 μm particle size)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	20 mmol/L ammonium acetate - metanol (9+1)
Flow rate	0.4 mL/min
Injection volume	10 μL
Measurement time	30 min

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

(1) HPLCの分離モード及び検出方法の選択

尿酸と、その代謝物質であるアラントイン及びアラントイン酸の HPLC または LC-MS による測定法として、血清の報告法、ジューエルサイエンス社のカラムアプリケーション、及びインタクト社のカラムアプリケーション等の報告がある^{11~15)} (Table 2). これらのうち、インタクト社の方法¹⁵⁾は、測定波長を 210 nm とすることで、尿酸、アラントイン及びアラントイン酸を同時に分析することができるが、他の方法ではアラントインとアラントイン酸を分離できず、また、HILIC カラムでは尿酸とアラントインをも分離できないことを確認した。

肥料の種類によっては、家畜由来原料から生じる尿酸が、代謝物質であるアラントインまたはアラントイン酸の形で検出する可能性もあると考え、今後 3 成分の同時分析が必要となったときにも対応できるよう、本検討ではインタクト社の条件を改良して採用することとした。なお、改良した点は、測定波長、カラム内径及びカラム温度である。改良法によるクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示す。

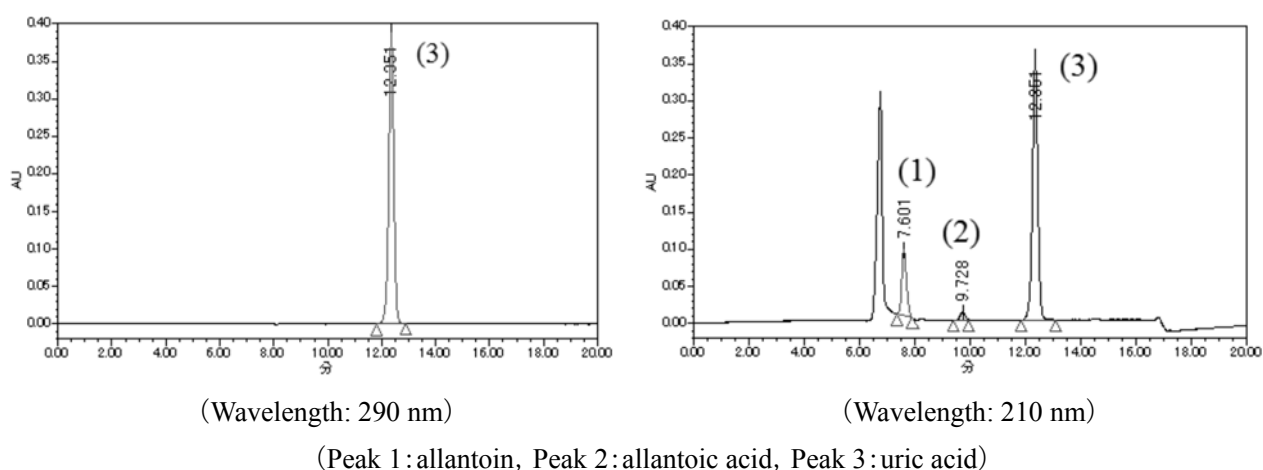


Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed standard solution (50 μg/mL) using Scherzo SS-C18
(The solution is diluted with 1/15 mol/L phosphate buffer (pH 8).)

Table 2 The measuring method for uric acid and its metabolite, using HPLC or LC-MS

The name of analytical method or testing organization	Substance	The name of column	Column size ^{a)}	Mobile phase	Flow rate (mL/min)	Wavelength (nm)	m/z
Japanese recommendation method for serum	Uric acid	Inertsil ODS-4	4.6 mm φ 250 mm L 5 μm (P)	74 mmol/L phosphate buffer (pH 2.2) ^{b)}	1.0	284	-
				74 mmol/L phosphate buffer (pH 2.2) ^{b)} - Methanol (98+2)			
Niigata Univ., Japan	Allantoin Allantoic Acid	Symmetry C8	4.6 mm φ 150 mm L 5 μm (P)	Methanol-Water (9+1), added monoethanolamine (0.01 %)	0.8	210 ^{c)}	157 ^{c)} 175
GL Science Corp.	Uric acid Allantoin	Inertsil HILIC	2.1 mm φ 150 mm L 5 μm (P)	Acetonitrile - 2 mmol/L ammonium acetate (9+1)	0.3		169.9 157.9
Ehime Pref., Japan	Allantoin	HILIC Silica	4.6 mm φ 150 mm L Unknown (P)	Acetonitrile - water (95+5)	1.0	195	-
Intakt Corp.	Uric acid Allantoin Allantoic acid	Scherzo SS-C18	3.0 mm φ 250 mm L 3 μm (P)	20 mmol/L ammonium acetate - methanol (9+1)	0.4	210	-

a) φ: Inner diameter, L: Length, (P): Particle size

b) 0.2 mol/L disodium hydrogen phosphate 12-water and 0.5 mol/L phosphoric acid are mixed

c) Measured by LC-MS (Ionization mode: APCI) because of no dividing peaks with allantoin and allantoic acid

(2) 測定波長

溶液中の尿酸等の吸光度曲線を Fig. 3 に示す. インタクト社の方法¹⁵⁾では, 測定波長を 210 nm としているが, 尿酸は 290 nm 及び 235 nm 付近に特異的な吸収をもち, 特に 290 nm では 210 nm よりも高いピーク高さを得られること, また 290 nm においては尿酸の保持時間付近に肥料中の妨害ピークが少なかったことから, 尿酸については測定波長を 290 nm とした.

(3) カラム内径

インタクト社の方法¹⁵⁾では 3.0 mm とされていたが, 流速 0.4 mL/min の条件では HPLC システムで使用する検出器について, 流路内圧力がメーカー推奨範囲を大幅に超えたため, それを超えないようカラム内径をより大きな 4.6 mm のものに変更した.

(4) カラム温度

インタクト社の方法¹⁵⁾では 50 °C とされていたが, 溶離液中メタノールのカラム内での膨張に由来すると考えられる, 流路内圧力の急激な増加がみられたことから, カラム温度は 40 °C とした.

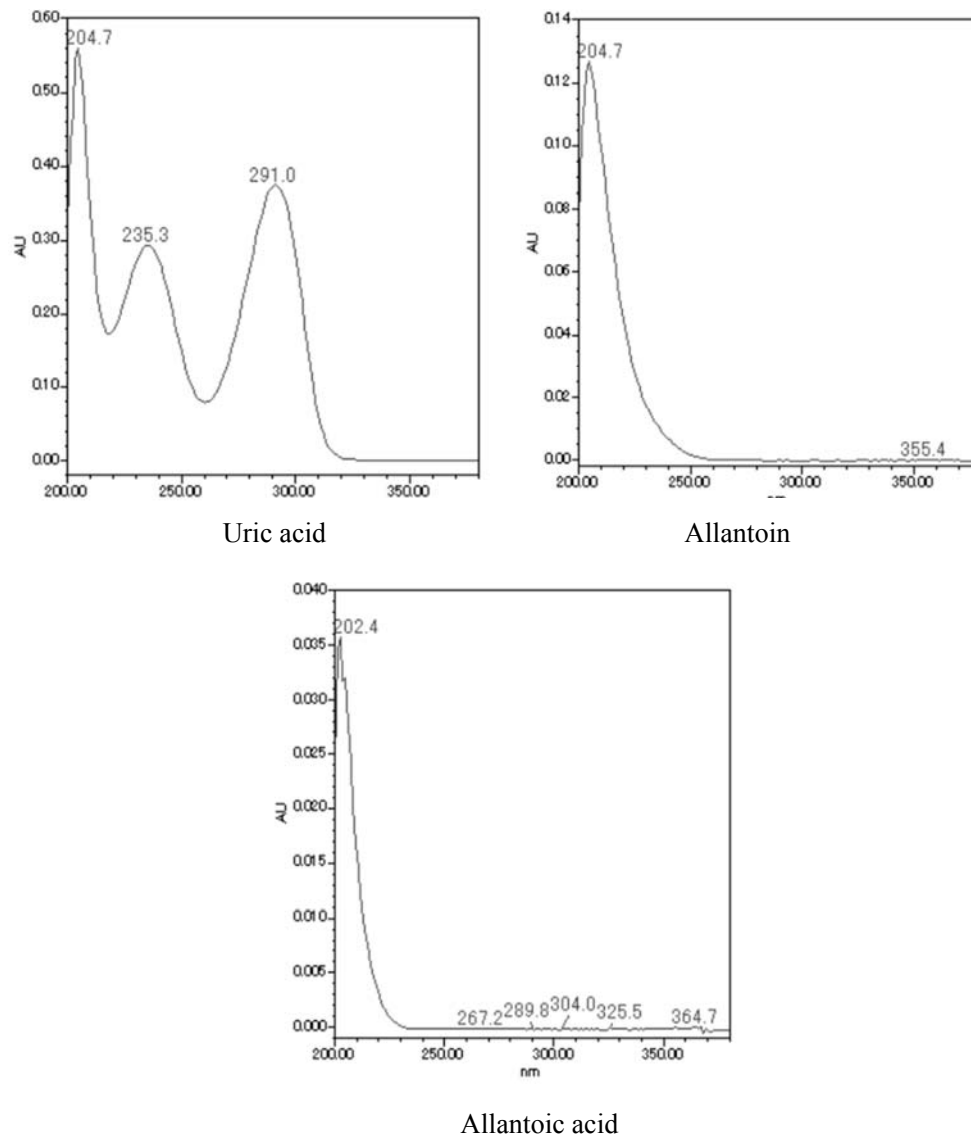


Fig. 3 Absorbance curves of uric acid, allantoin and allantoic acid (50 µg/mL)

2) 検量線の直線性の検討

各検量線用混合標準液 (0.1 µg/mL ~ 100 µg/mL) を本法に従って HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク高さから検量線を作成した (Fig. 4). 尿酸は 0.1 µg/mL ~ 100 µg/mL 相当量の範囲で高い直線性が得られた. なお, アラントインは 2.5 µg/mL ~ 100 µg/mL 相当量の範囲, アラントイン酸は 5 µg/mL ~ 100 µg/mL 相当量の範囲で高い直線性が得られた.

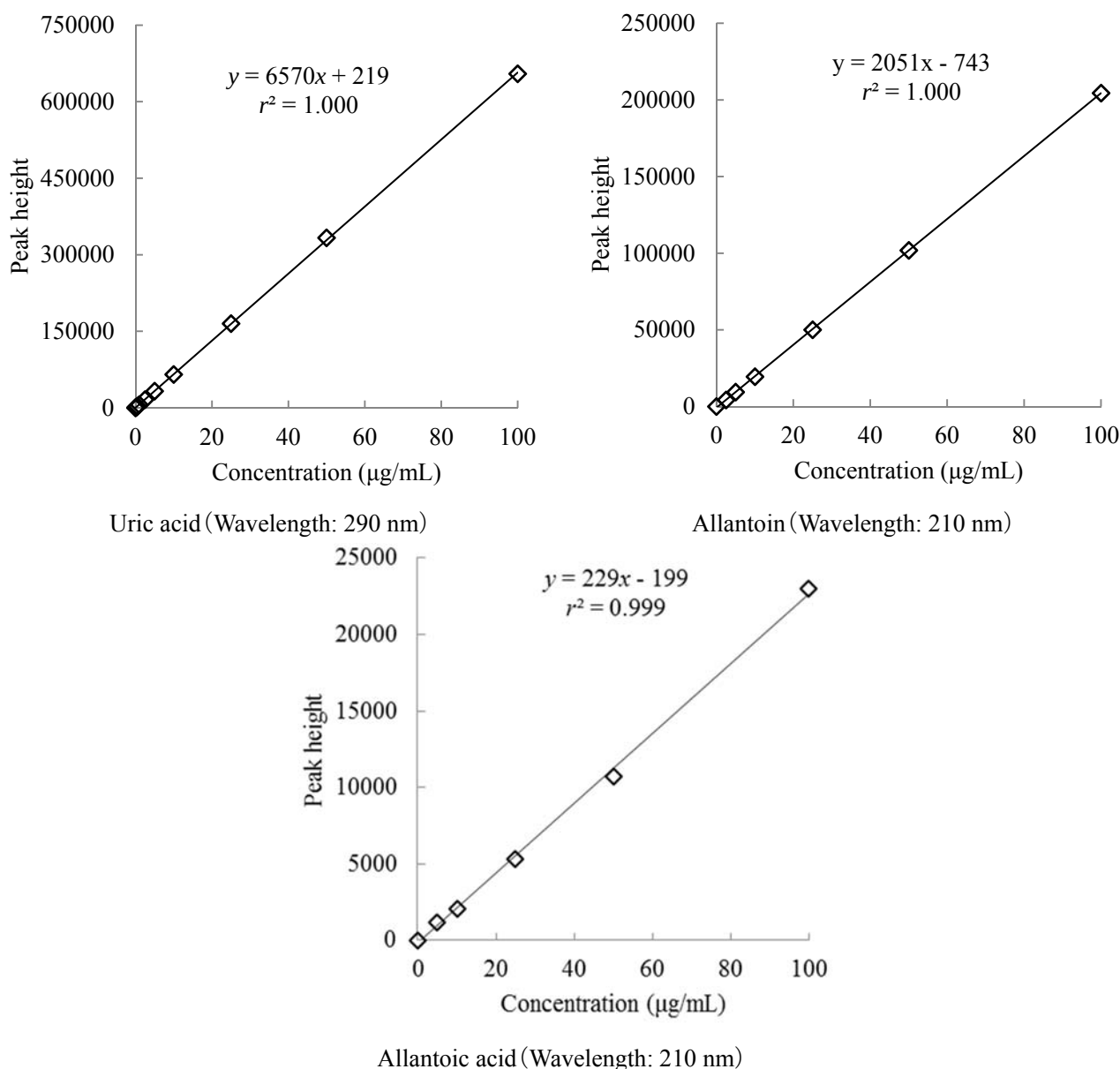


Fig. 4 Calibration curves of uric acid, allantoin, allantoic acid using Scherzo SS-C18

3) 抽出条件の最適化 1: pHに着目した、抽出液の種類を検討

これまでに報告されている、肥料及び堆肥中の尿酸分析法においては、抽出液としてりん酸二水素カリウム溶液及びりん酸水素二ナトリウム溶液を混合して調製した 1/15 mol/L りん酸緩衝液 (pH7.0 ± 0.1, 以下 pH 7)^{9, 10)}, 0.1 mol/L ピロりん酸ナトリウム溶液^{6~8)}, 及び 0.4 % (または 0.6 %) 炭酸リチウム溶液^{2~5)} が用いられている。これらの溶液の pH はそれぞれ概ね 7, 10 及び 11 であることと、尿酸は冷水には難溶だがアルカリに可溶である⁹⁾ こと等を踏まえ、これらの溶液に加えて、1/15 mol/L りん酸緩衝液 (pH 8) 及び 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH は約 12.5) について、次の方法で尿酸の抽出力を比較検討することとした。なお、0.6 % 炭酸リチウム溶液については検討しなかった。

尿酸を検出することを確認した市販の化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 点を供試

し、200 mL 三角フラスコに各試料 1.00 g を採取し、各抽出液 100 mL を加え、マグネチックスターラーで 10 分間攪拌し、遠心分離した試料溶液を HPLC にて分析した。

結果を Table 3 に、また一例として、汚泥発酵肥料試料における HPLC 測定のクロマトグラムを Fig. 5 に、それぞれ示す。混合堆肥複合肥料を除く 3 肥料について、0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液、0.4 %炭酸リチウム溶液及び 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液で抽出した各試料溶液は、尿酸濃度が pH 7 及び pH 8 のりん酸緩衝液に比べて低かった。この理由として、溶液中の pH が高くなりすぎると肥料中の尿酸の溶解度が小さくなった、または尿酸の分解に伴うアンモニアの生成・揮発が促進された、等が考えられる。

クロマトグラムを比較すると、0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液抽出の方が、1/15 mol/L りん酸緩衝液 (pH 8) 抽出よりも濃度が低いにもかかわらず、ピーク高さは上回り、高感度検出が期待できることが示唆されたが、一方で、0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液抽出では他の 4 溶液に比べて、尿酸の保持時間が極端に早まる傾向があった。

各抽出液の pH を比較すると (Fig. 6), pH 7 及び pH 8 の 1/15 mol/L りん酸緩衝液は、緩衝能により試料の種類が変わっても抽出液の pH 変動は小さいが、0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウムの場合は変動が大きかったことから、試料の種類による抽出力の変動も大きくなることが考えられた。

以上のことから、この後の抽出条件の検討については、緩衝能により試料の種類にかかわらず尿酸の抽出力が安定し易いと考えられる、1/15 mol/L りん酸緩衝液に絞って行うこととした。

なお、この検討の段階では、HPLC 測定時に内径が 3.0 mm のカラムを使用していたので、Fig 5 のクロマトグラムにおける尿酸の保持時間 (4.0 分～5.4 分) は、Fig. 3 のクロマトグラムにおけるそれよりも早くなっている。

Table 3 Contents^{a)} of uric acid by extractive solution (mass fraction (%))

	1/15 mol/L phosphate buffer (pH 7)	1/15 mol/L phosphate buffer (pH 8)	0.1 mol/L sodium diphosphate	0.4 % ^{b)} lithium carbonate	0.1 mol/L sodium hydroxide
Compound fertilizer	0.315	0.423	0.00298	0.227	0.0427
Composted sludge fertilizer	0.822 ^{c)}	0.975 ^{c)}	0.924 ^{c)}	0.536 ^{c)}	0.0390 ^{c)}
Compost mixed fertilizer	0.203	0.207	0.290	0.298	0.243
Compost	0.896 ^{c)}	1.15 ^{c)}	0.967 ^{c)}	0.774 ^{c)}	0.309 ^{c)}

a) Sampling amount: 1.00 g, extractive solution volume: 100 mL and stirring time: 10 minutes

b) Mass fraction

c) Dry wt. : The same applies to the following, for composted sludge fertilizer and Compost.

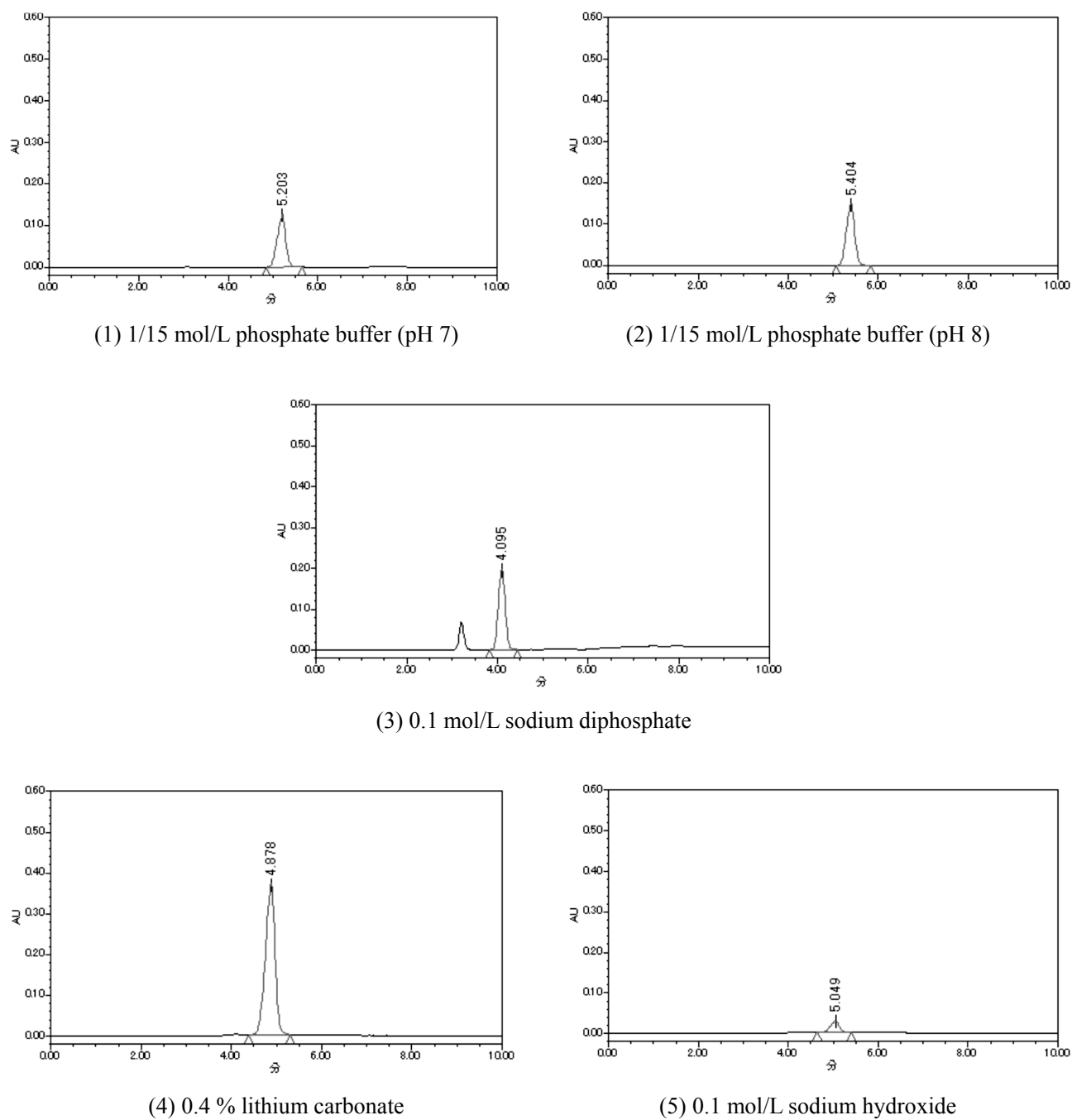


Fig. 5 HPLC chromatogram of composted sludge fertilizer sample solution by extractive solution

Injected sample solution: (1)~(3) Diluted in 5 times the volume by extractive solution

(4)~(5) No dilution

Wavelength: 290 nm

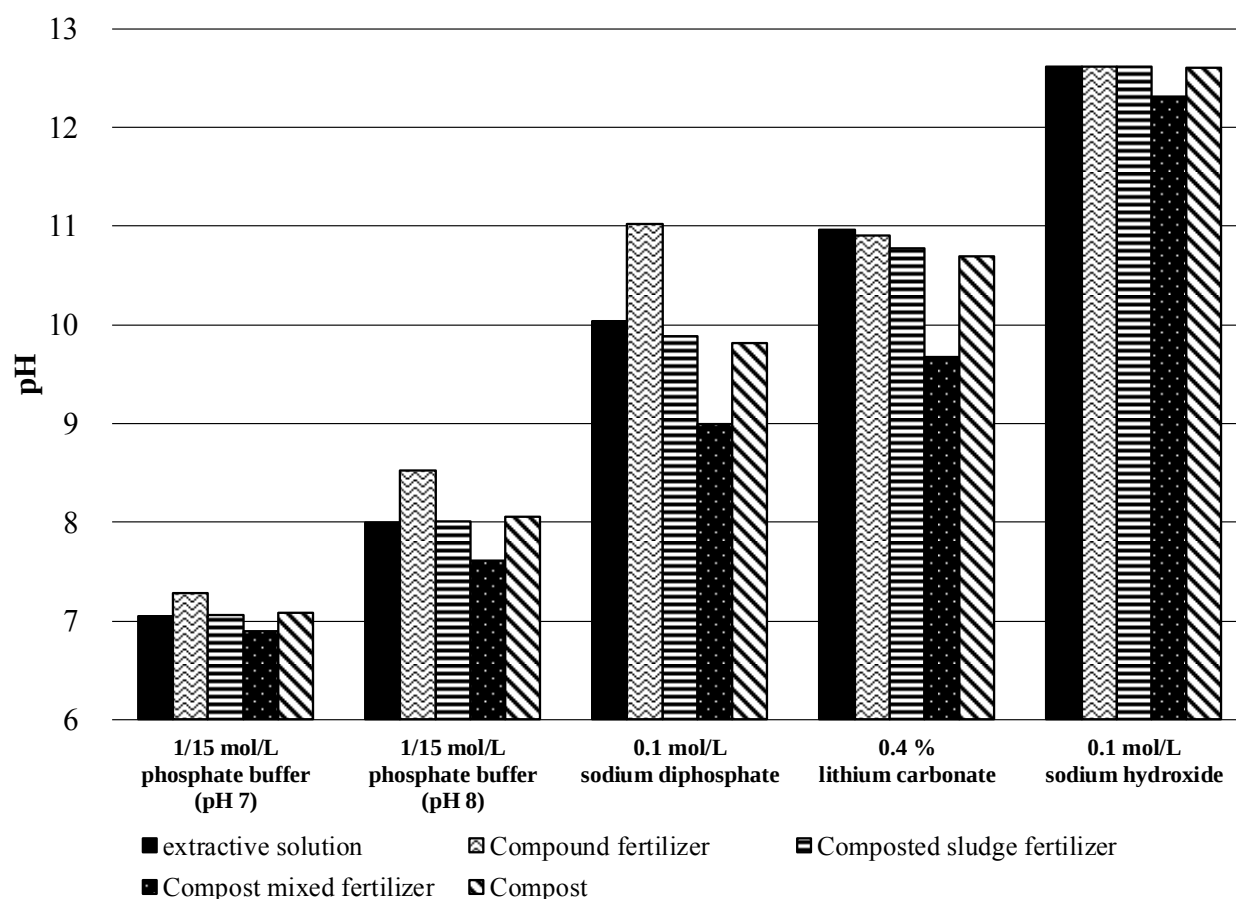


Fig. 6 Change of pH values of all sample solution by extractive solution

4) 抽出条件の最適化 2: 抽出に用いるりん酸緩衝液の pH 及び抽出時間の検討

りん酸緩衝液について、中性～弱アルカリ性領域での pH の最適化を検討することとした。同時に、抽出時間についても検討した。pH については前項で検討した pH 7 及び pH 8 の他に pH 9.0 ± 0.1 (以下 pH 9) を、また、攪拌時間については 10 分間、30 分間、60 分間及び 120 分間の 4 段階を、それぞれ検討した。結果を Fig. 7 に示す。

同じ攪拌時間で比較すると、各試料溶液中の尿酸濃度は、化成肥料の 10 分攪拌を除いて、概ね $\text{pH} 7 < \text{pH} 8 \leq \text{pH} 9$ であった。この結果から、3 種類のりん酸緩衝液のうち pH 9 のものが最も、尿酸の抽出力が優れていることが示唆された。しかしながら、高 pH の溶液を注入することによる HPLC 測定カラムへの負荷も考慮し、この後の検討で使用する 1/15 mol/L りん酸緩衝溶液の pH は 8 とし、次の抽出温度検討により、pH 8 の緩衝液でも pH 9 の緩衝液に匹敵する抽出力を得ることを目指した。また、どの緩衝液についても、攪拌時間が 10 分及び 30 分では抽出が不十分で、60 分または 120 分は必要であることが示唆された。

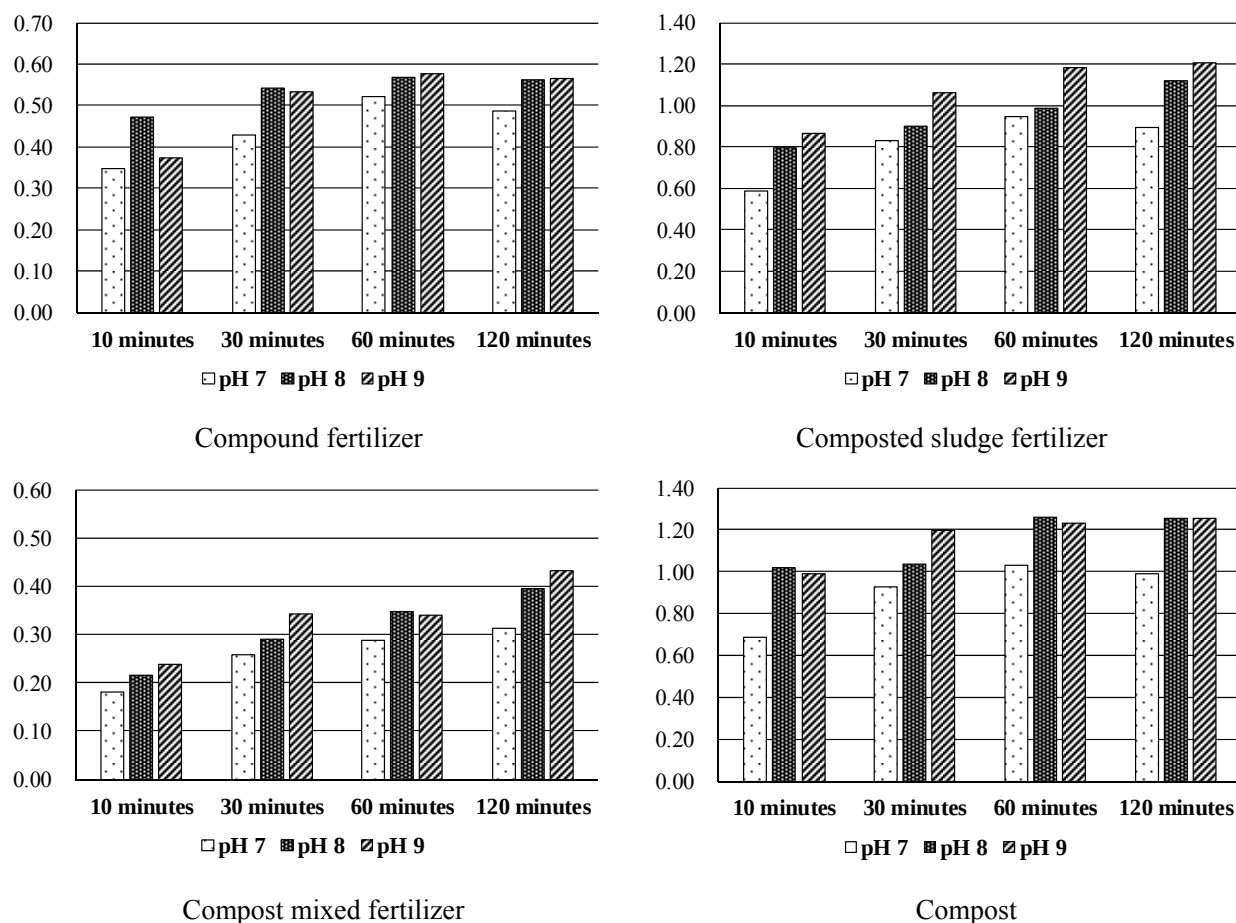


Fig. 7 The variation of content of uric acid by changing pH values of 1/15 mol/L phosphate buffer and stirring time (mass fraction (%))

5) 抽出条件の最適化 3: 抽出温度及び抽出時間の検討

1/15 mol/L リン酸緩衝液(pH 8)抽出での抽出時間の検討においては、どの試料についても攪拌時間を 60 分または 120 分とした際に、最も尿酸濃度が高くなっていたが(Fig. 7), より短時間での抽出が可能になるよう、加温工程を検討することとした。リン酸緩衝液(pH 8)抽出について、常温で 60 分または 120 分攪拌するのみの方法と、40 °C または 60 °C で 30 分加温後に 10 分または 30 分攪拌する方法とで、尿酸濃度を比較した。さらにそれらの結果と、リン酸緩衝液(pH 9)抽出について常温で 60 分または 120 分攪拌するのみの方法による結果を比較した。それらの結果を Fig. 8 に示す。

どの試料についても、加温条件については加温工程なし < 40 °C 加温工程あり < 60 °C 加温工程ありの順に尿酸濃度が高くなる傾向が見られ、特に 60 °C 加温では、リン酸緩衝液(pH 9)で常温抽出した際と同等またはそれを上回る結果となった。一方で、全ての加温条件において、攪拌時間を 10 分から 30 分に延ばしても尿酸濃度に大きな変動は認められなかった。

以上のことから、今後の検討での抽出温度及び抽出時間は、60 °C で 30 分加温後 10 分攪拌とした。

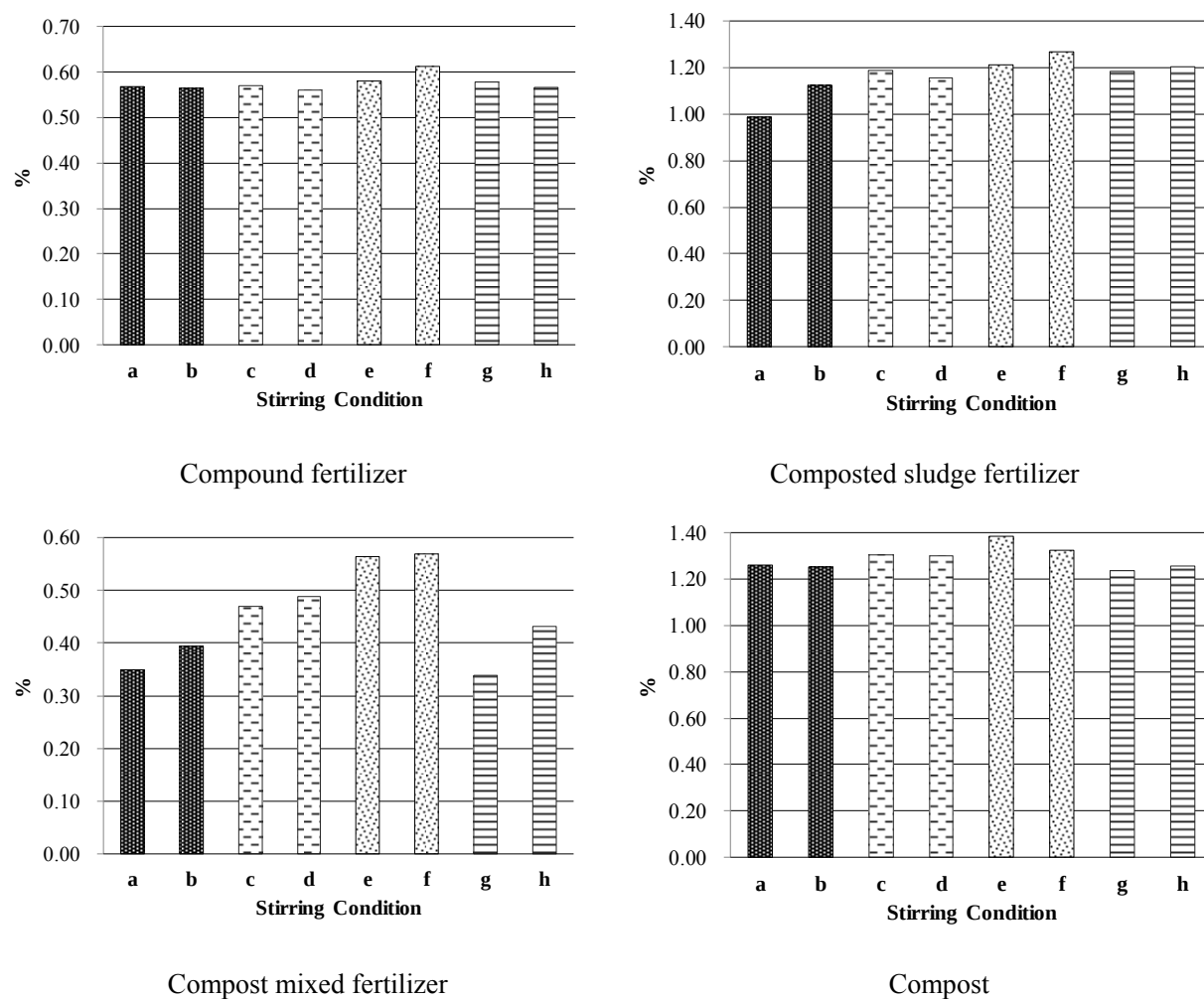


Fig. 8 The variation of content of uric acid by changing heating temperature, stirring time and pH values of 1/15 mol/L phosphate buffer (mass fraction (%))

- a: No heating, 60 minutes (pH 8)
- b: No heating, 120 minutes (pH 8)
- c: Heating in water bath (40 °C), 10 minutes (pH 8)
- d: Heating in water bath (40 °C), 30 minutes (pH 8)
- e: Heating in water bath (60 °C), 10 minutes (pH 8)
- f: Heating in water bath (60 °C), 30 minutes (pH 8)
- g: No heating, 60 minutes (pH 9)
- h: No heating, 120 minutes (pH 9)

6) 流通肥料の測定

流通肥料 24 点 (家きん由来原料が使用されているもの 22 点, 及び使用されていないもの 2 点) について, 本法に従って尿酸の含有量を測定した結果を Fig. 9 及び Table 4 に示す.

家きん由来原料として加工家きんふん肥料, 発酵鶏ふん, 鶏ふん, うずらふんまたは家きん加工くず肥料を

含む肥料については、一部のものを除いて尿酸が検出されたが、家きん由来原料として鶏ふん燃焼灰のみを含む肥料については、尿酸が検出されたものはなかった。また、各抽出液の pH を測定したところ、りん酸緩衝液 (pH 8) の緩衝作用が弱いいためか抽出液の pH の範囲は 7.3~10.1 と試料によって大きな変動が見られたものの、尿酸が検出されたものについては全て 7.5~8.5 の範囲にあった (Fig. 9)。このことから、本法では抽出液の pH が 8 前後になることが、尿酸が安定して抽出されるための条件の一つであると考えられる。

なお、原料の種類がほぼ共通の肥料 (化成肥料 9 及び化成肥料 10) について、抽出液の pH には差が見られなかったが、尿酸の定量値には差が見られ、値が小さかった方 (Compound fertilizer 10) については、アラントインも検出された、という事例があった (Fig. 10)。このことから、尿酸の含有量を元に肥料中の家きん由来原料の含有の有無を確認する際、肥料の種類によってはアラントインの含有量についても確認する必要があると考えられる。

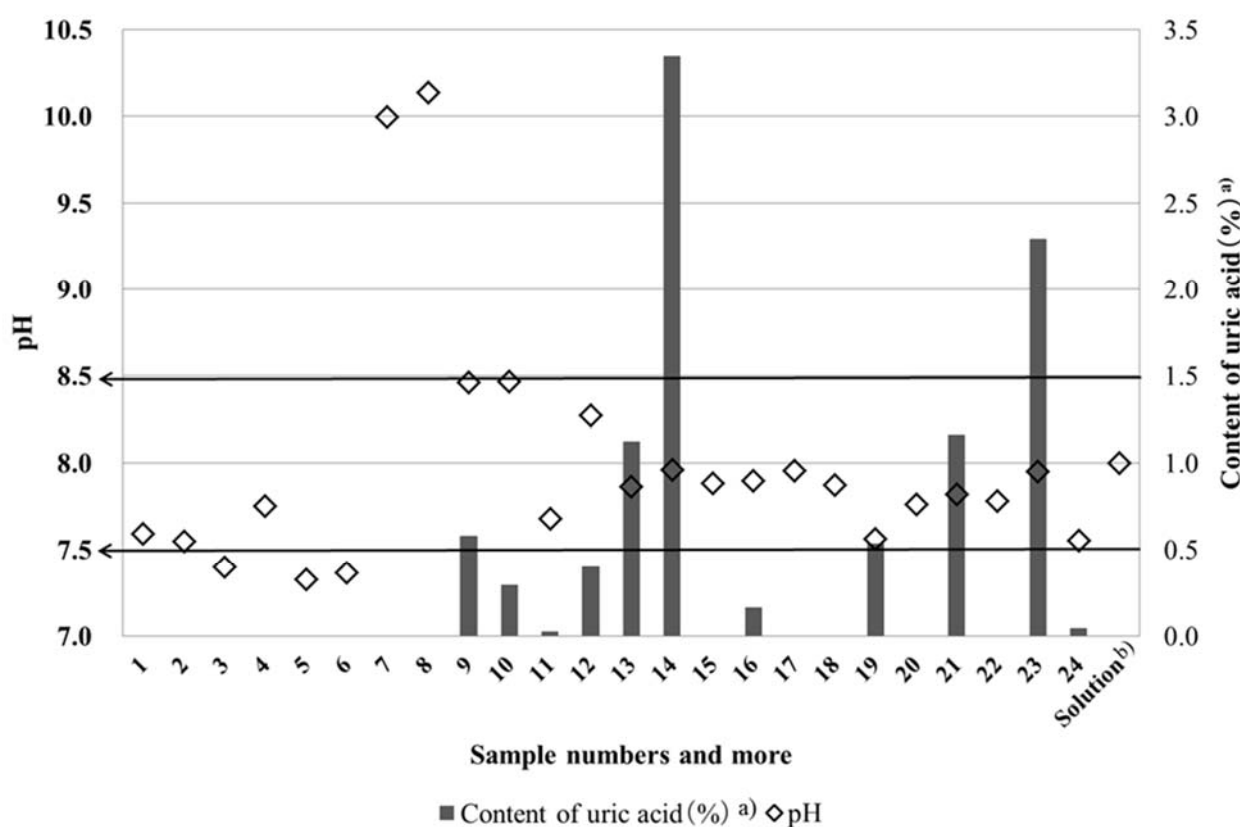


Fig. 9 pH values and content of uric acid of sample solutions

a) Mass fraction

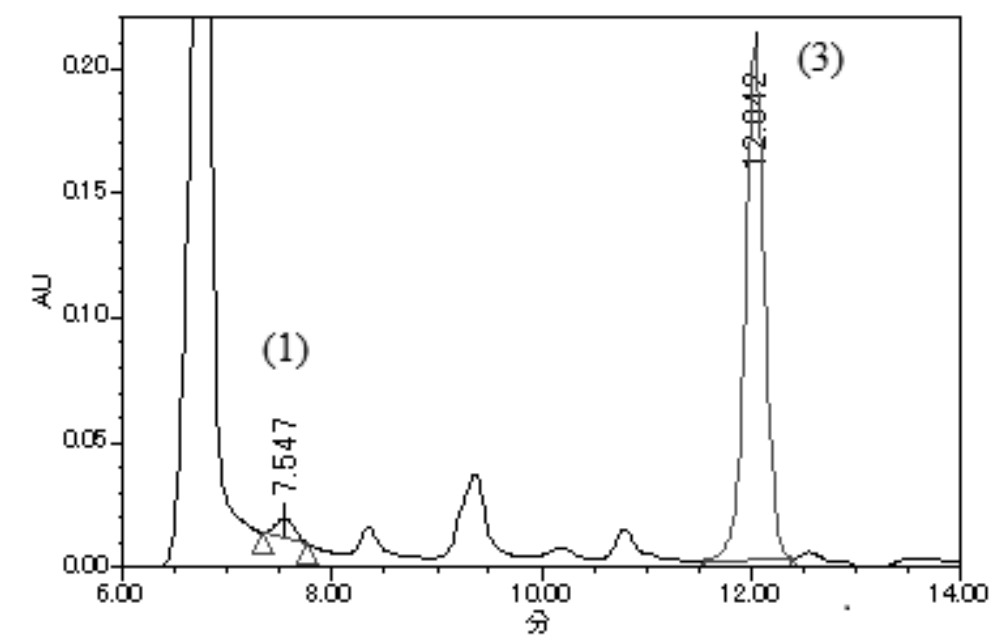
b) Extractive solution (1/15 mol/L phosphate buffer (pH 8))

Table 4 Poultry origin materials used and content of uric acid in samples

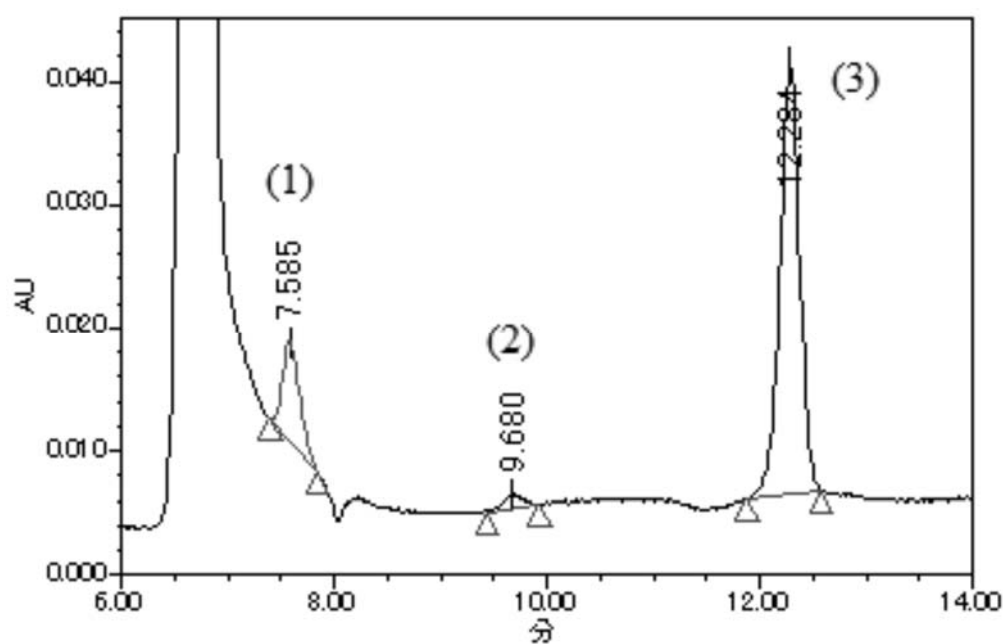
Fertilizer	Sample Number	Content of uric acid(%) ^{a)}	Poultry origin materials
Compound fertilizer	1	N.D.	Calcined manure
	2	N.D.	Calcined manure
	3	N.D.	Calcined manure
	4	N.D.	Calcined manure
	5	N.D.	Calcined manure
	6	N.D.	Calcined manure
	7	N.D.	Calcined manure
	8	N.D.	Calcined manure
	9	0.572	Calcined manure, Processed manure fertilizer, Composted manure
	10	0.293	Calcined manure, Processed manure fertilizer, Composted manure
	11	0.0249	Processed manure fertilizer
	12	0.398	Calcined manure, Composted manure
Composted sludge fertilizer	13	1.12 ^{b)}	Manure
	14	3.35 ^{b)}	Manure
	15	N.D. ^{b)}	Manure
	16	0.157 ^{b)}	Manure, Processed waste fertilizer
	17	N.D. ^{b)}	Manure, Feather meal
Compost mixed fertilizer	18	N.D.	-
	19	0.533	Manure
	20	N.D.	Calcined manure
Compost	21	1.16 ^{b)}	Manure
	22	N.D. ^{b)}	-
	23	2.29 ^{b)}	Composted quail manure
Animal manure	24	0.0249 ^{b)}	Quail manure

a) Mass fraction

b) Dry wt.



Compound fertilizer 10: detected to uric acid and allantoin



Standard solution (50 µg/mL): equal to 0.05 % (mass fraction) in fertilizer

(1) Allantoin (2) Allantoic Acid (3) Uric Acid

Fig. 10 HPLC Chromatogram of solution of compound fertilizer detected on uric acid and allantoin
(Wavelength: 210 nm)

7) 添加回収試験による真度の評価

添加回収試験は、本法で尿酸が検出されなかった化成肥料, 汚泥発酵肥料, 混合堆肥複合肥料及び堆肥各

1 点を供試した。添加用溶液は、血清の勧告法¹¹⁾における HPLC 測定用標準液と同様に、尿酸を 0.01 mol/L 炭酸リチウム溶液に溶解して調製したものをを用いた。添加濃度は、尿酸の 0.01 mol/L 炭酸リチウム溶液に対する溶解度が概ね 1000 µg/mL であったことから、この濃度(質量分率で 0.1 %)を最大とし、3 段階の濃度を添加して計 12 通りを 3 点併行分析した。平均回収率は 85.5 %～114.1 %, 併行相対標準偏差(RSD_r)は 0.3 %～2.1 %であり、すべて肥料等試験法¹⁶⁾における各濃度レベルの回収率の許容範囲を満たした (Table 5)。

Table 5 Results of recovery test

Samples	Sample Content (%) ^{a)}	Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)	Criteria of the trueness ^{d)} (%)
Compound fertilizer	0.005	114.1	2.1	70 ~120
	0.01	105.0	0.6	80 ~115
	0.10	100.2	1.0	85 ~110
Composted sludge fertilizer	0.005	104.4	1.0	70 ~120
	0.01	90.1	1.3	80 ~115
	0.10	93.3	0.2	85 ~110
Compost mixed fertilizer	0.005	97.4	1.5	70 ~120
	0.01	85.5	1.7	80 ~115
	0.10	92.4	0.4	85 ~110
Compost	0.005	92.5	1.0	70 ~120
	0.01	85.3	1.1	80 ~115
	0.10	101.8	0.3	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 (2018)

8) 併行精度及び中間精度

本法で尿酸が検出されなかった化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 点に 2 濃度(質量分率で 0.1 %及び 0.01 %)の尿酸溶液を添加して、本法の併行精度及び中間精度を確認した。2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った結果を Table 6 に、それを基に一元配置分散分析を行って得られた統計解析結果を Table 7 に、それぞれ示す。いずれの相対標準偏差も肥料等試験法¹⁶⁾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、本法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 6 Repeatability test results on different days (mass fraction (%))

Test day	Compound fertilizer				Composted sludge fertilizer			
	0.1 %		0.01 %		0.1 %		0.01 %	
1	0.0994	0.0998	0.0105	0.0107	0.0922	0.0920	0.00947	0.00948
2	0.100	0.0996	0.0103	0.0102	0.0946	0.0943	0.00961	0.00953
3	0.0982	0.0972	0.0102	0.0103	0.0918	0.0905	0.00945	0.00934
4	0.100	0.100	0.0102	0.0102	0.0950	0.0946	0.00876	0.00896
5	0.0963	0.0975	0.00943	0.00953	0.0936	0.0934	0.00956	0.00967

Test day	Compost mixed fertilizer				Compost			
	0.1 %		0.01 %		0.1 %		0.01 %	
1	0.0919	0.0926	0.00946	0.00953	0.100	0.0983	0.00976	0.00980
2	0.0935	0.0937	0.00948	0.00945	0.103	0.102	0.0101	0.0100
3	0.0903	0.0900	0.00917	0.00925	0.0984	0.0976	0.00952	0.00941
4	0.0925	0.0917	0.00875	0.00866	0.0957	0.0939	0.00862	0.00860
5	0.0941	0.0940	0.00912	0.00922	0.102	0.102	0.00871	0.00917

Table 7 Repeatability and intermediate precision

Samples	Spiked Level (%) ^{b)}	Total Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
			s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	$s_{I(T)}$ ^{f)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)}	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)}
			(%) ^{b)}	(%)	(%)	(%) ^{b)}	(%)	(%)
Compound fertilizer	0.1	0.0989	0.0006	0.6	4	0.0015	1.6	6.5
	0.01	0.0102	0.0001	0.7	4	0.00042	4.2	6.5
Composted sludge fertilizer	0.1	0.0932	0.0004	0.5	4	0.0016	1.7	6.5
	0.01	0.00938	0.00009	0.9	4	0.00031	3.3	6.5
Compost mixed fertilizer	0.1	0.0924	0.0004	0.4	4	0.0015	1.7	6.5
	0.01	0.00921	0.00005	0.6	4	0.00032	3.5	6.5
Compost	0.1	0.101	0.001	1.3	4	0.0029	2.8	6.5
	0.01	0.00966	0.00018	1.8	4	0.00049	5.0	6.5

a) $n = 14$ (2 repetition $\times$ 7 days)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability relative standard deviation

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate relative standard deviation

9) 検出下限及び定量下限の確認

定量下限を確認するため、対象成分を含まない汚泥発酵肥料を用い、試料中濃度が 0.002 %となるよう尿酸を添加した試料を調製して7回繰り返し分析を行い、求めた回収率を Table 8 に示した。肥料等試験法が示す真度(回収率)を満たしており、本法の定量下限は 0.0008 %程度、検出下限は 0.0003 %程度、とそれぞれ確認された。

Table 8 Spiking and recovery test (minimum limit of quantification and detectification)

Sample	Confirmation by recovery test						Criteria of the trueness ^{f)}
	Spiked Level (%) ^{a)}	Mean Value ^{b)} (%) ^{a)}	Recovery (%)	RSD ^{c)} (%) ^{a)}	LOQ ^{d)} (%) ^{a)}	LOD ^{e)} (%) ^{a)}	
Composted sludge fertilizer	0.002	0.00213	106	0.00008	0.0008	0.0003	70 ~ 120

a) Mass Fraction

b) $n=7$

c) Relative standard deviation

d) Minimum limit of quantification

e) Minimum limit of detectification

f) Criteria of trueness (recovery) show in Testing method of Fertilizers

4. まとめ

HPLC を用いて肥料中の尿酸の分析について検討したところ、次のことを明らかにした。

1) 試料溶液は、試料 1.00 g を採取して 1/15 mol/L りん酸緩衝溶液 (pH 8) 100 mL を加えて 60 °C で 30 分加温してからマグネチックスターラーで 10 分間攪拌後、遠心分離した溶液が最適であった。HPLC の使用カラムを Scherzo SS-C18, 移動相を 20 mmol/L りん酸緩衝液+メタノール (9+1) とすることで、尿酸及びその代謝体である 2 物質 (アラントイン及びアラントイン酸) は完全に分離し、約 13 分までに対象成分はすべて検出された。

2) 検量線の直線性は、尿酸は 0.1 µg/mL ~ 100 µg/mL の範囲で直線性 (決定係数 $r^2=0.999$ 以上) を示した。アラントインは 2.5 µg/mL ~ 100 µg/mL, アラントイン酸は 5 µg/mL ~ 100 µg/mL で、いずれも決定係数 $r^2 = 0.999$ 以上の直線性を示した。

3) 24 点の流通肥料を本法により測定したところ、加工家きんふん肥料、発酵鶏ふん、鶏ふん、うずらふんまたは家きん加工くず肥料を含む肥料について、一部を除いて尿酸またはアラントインが検出された。また、各抽出液の pH を確認したところ、尿酸を検出したものについては全て 7.5 ~ 8.5 の範囲にあった。

4) 添加回収試験は、4 種類の肥料に、3 段階の濃度の尿酸を添加した計 12 通りを 3 点併行分析した。平均回収率は 85.3 % ~ 114.1 %, 併行相対標準偏差 (RSD) は 0.3 % ~ 2.1 % であり、肥料等試験法における各濃度レベルの回収率の許容範囲をすべて満たした。

5) 同一濃度を添加した試料を毎回調製して 5 日間の反復試験を行ったところ、測定値は安定しており良好な成績であった。

6) 本法における尿酸の定量下限は 0.0008 % 程度、検出下限は 0.0003 % 程度、とそれぞれ確認された。

以上の結果より、本試験法は、化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥中の尿酸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。

参考文献

- 1) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, p.93~96, 養賢堂, 東京(1988)
- 2) 三重科技・農業研究部・生物機能開発グループ:鶏ふん堆肥における尿酸分析による可給態窒素量の迅速推定法, 三重県農業研究所平成13年度研究成果情報(2001)
<<http://www.pref.mie.lg.jp/common/content/000396817.pdf>>
- 3) 三重科技・農業研究部・生物機能開発グループ:鶏ふん堆肥における尿酸態窒素の簡易定量法, 三重県農業研究所平成14年度研究成果情報(2002)
<<http://www.pref.mie.lg.jp/common/content/000396799.pdf>>
- 4) 原正之, 村上圭一:高窒素鶏ふんペレット堆肥の生産と還元技術の開発, 畜産環境情報(24), 26-29(2004)
- 5) 中谷洋, 市川明, 伊藤裕和:鶏ふん堆肥の窒素肥効特性に対する処理日数及び季節の影響, 愛知農総試研報, **34**, 239-243(2002)
- 6) 橘田安正, 茂角正延, 水落勁美:採卵鶏由来鶏糞の窒素成分と窒素無機化率との関係, 日本土壤肥科学雑誌, **73**(3), 263-269(2002)
- 7) 藤原俊一郎:おが屑混合鶏ふん堆積物の腐熟度と施用方法について, 神奈川園試研報, **36**, 1-100(1988)
- 8) 大羽裕:弘法・大羽法, ペトロジスト, **8**(2), 108-116(1964)
- 9) 日高秀俊, 新妻成一, 大澤元成, 久保省三:各種鶏ふんの窒素無機化量の簡易評価法, 日本土壤肥科学雑誌, **75**(1), 21-28(2004)
- 10) 樋口太重:土壌中における施用窒素の有機化と再無機化, 農業技術研究所報告B, **34**, 1-81(1983)
- 11) 日本臨床化学会試薬専門委員会:HPLCを用いる血清尿酸測定の勧告法, 臨床化学, **22**(4), 300-307(1993)
- 12) Noriyuki Ohtake et al.:Quantitative and Isotopic Analysis of Amino Acids, Allantoin, and Allantoic Acid in Soybeans by LC-MS Using the Atmospheric Pressure Chemical Ionization Method, Soil Sci. Plant Nutr., **50**, 241-248(2004)
- 13) GL Sciences: Analysis of purine derivatives by LC/MS/MS, InertSearch™ for LC, Inertsil® Applications, LA621-0696(2018)
<<https://www.gls.co.jp/viewfile/?p=LA621>>
- 14) 宮本紫織, 井上智, 小笠原光憲, 金本昭, 大瀬戸光明, 井上博雄:親水性相互クロマトグラフ(HILIC)によるアラントインの分析, 平成16年度愛媛衛環研年報, 7(2004)
- 15) Imtakt: Allantoin, allantoic acid and uric acid, Technical Information, T701E(2018)
<<http://www.imtakt.com/TecInfo/TI701E.pdf>>
- 16) 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(2018)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2018.pdf>

Determination of Uric Acid in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography

Norio FUNAKI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

A High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for simultaneous determination of uric acid in fertilizer was developed and validated as a single-laboratory validation. Samples were extracted by heating in water bath (60 °C), shaking and diluted with 1/15 mol/L phosphate buffer (pH 8). After centrifugation, sample solution was analyzed by HPLC, on multi-mode ODS column with UV detection at 290 nm. As a result of 3 replicate analysis of 4 fertilizer samples spiked with uric acid, the mean recoveries were 85.3 %~114.1 %. Repeatability standard deviation of uric acid were 0.3 % ~ 2.1 %. Intermediate relative standard deviations of there were 1.6 % ~ 5.0 %. The limits of quantification of there were 0.0008 %. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of uric acid in a fertilizer.

Key words uric acid, HPLC, phosphate buffer, poultry origin material

(Research Report of Fertilizer, **11**, 86~105, 2018)

9 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)

—2016 年冬作・2017 年夏作—

青山恵介¹, 八木寿治², 齋藤晴文¹, 佐久間健太²,
鈴木時也³, 田中雄大¹, 橋本良美¹, 阿部文浩¹

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 2016 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 4 号³⁾~10 号⁴⁾で報告した. 引き続き, 2016 年冬作及び 2017 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) 2016 年冬作の連用試験(2016 年 11 月 14 日~2017 年 3 月 17 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(H₂O), 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 に示す.

(2) 供試肥料等

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)名古屋センター

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 (現)農林水産省消費・安全局

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、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)、その乾物濃度は4.9 mg/kgであり、肥料公定規格の含有許容値(5 mg/kg)(乾物値)付近である。窒素全量(現物値)は質量分率3.3 %及び窒素無機化率約30 %(30 °C, 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について、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。

Table 1 Characteristics of soil for using in winter 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	6.5	6.4	6.5
EC ^{d)}	mS/cm	2009	0.10	0.10	0.14	0.12
		2016	0.10	0.11	0.08	0.09
Phosphate absorption coefficient ^{e)}	mg/100g	2009	5.8	6.1	7.7	6.9
		2016	17.9	12.8	13.1	11.4
Total nitrogen ^{e)}	% ^{f)}	2016	0.44	0.41	0.38	0.37
Total carbon ^{e)}	% ^{f)}	2016	5.9	5.8	5.5	5.5
0.1 mol/L HCl-Cd ^{e)}	mg/kg	2009	0.18	0.19	0.18	0.21
		2016	0.20	0.18	0.12	0.13
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			

a) Mass fraction

b) Content as P₂O₅c) 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

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 P₂O₅c) Content as K₂O

(3) 試験区の構成

試験区は Fig.1 のとおり 1 試験区の面積を 4 m² (縦 2 m × 横 2 m) とし、汚泥肥料施用区及び標準区それぞれ 2 反復の計 4 試験区を配置した。施肥量は埼玉県のコウレンソウ施肥基準⁶⁾を基に設計した (Table 4)。

汚泥肥料の施肥量は、1 作当たり 500 kg/10 a 程度が一般的⁷⁾であり、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、施用量の上限の目安を年間 500～1000 kg/10 a としている^{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、土壌の pH が低下する¹¹⁾ことがわかっている。これらのことを考慮し、汚泥肥料の施用量を 500 kg/10 a (現物) とした。

汚泥肥料の窒素肥効率を前作までの汚泥肥料施用区と標準区の生育量の差から 20 % として計算し、窒素の不足分を補正肥料で補った。加里についても不足分は補正肥料で補った。標準区については、補正肥料を汚泥肥料施用区と同じ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 年夏作以降は成りん肥を使用していたが、交換性苦土が大幅に上昇したため、2014 年冬作以降はリン酸一アンモニウムを施用しており、今回も引き続きリン酸一アンモニウムを施用した。なお、施肥前の跡地土壌の有効態リン酸を分析したところ、汚泥肥料施用区は 15.3 mg/100 g 乾土、標準区は 12.2 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/100 g 乾土) を満たしていたことから、りん酸の追肥はしなかった。

なお、これまでの試験における施肥履歴を Table 5 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¹³⁾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 °C 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た。2015 年冬作ホ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。

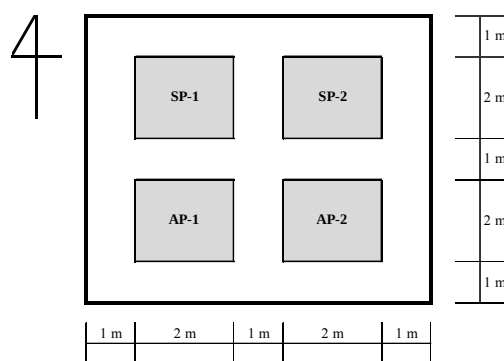


Fig.1 Plots plan of the test field

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

Table 4 The fertilization amount (spinach in winter 2017)

Types of fertilizer	Amounts (g/4 m ²)	Components (g/4 m ²)				Amounts (kg/10 a)	Components (kg/10 a)			
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>										
Sludge fertilizer	2000	66	104	7	7.3	500	16.6	26.1	1.8	1.8
Urea	145	67	—	—	—	36	16.7	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Potassium chloride	103	—	—	65	—	26	—	—	16.2	—
Total		133	104	72	7.3		33.2	26.1	18.0	1.8
<Standard plot (SP)>										
Urea	129	59	—	—	—	32	14.8	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	171	21	104	—	—	43	5.2	26.1	—	—
Potassium chloride	114	—	—	72	—	29	—	—	18.0	—
Total		80	104	72	—		20.0	26.1	18.0	—

Table 5 The fertilizer application log of the test plots

Year	Season	Types of fertilizer	<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>					<Standard plot (SP)>				
			Amounts (kg/10 a)	Components (kg/10 a)				Amounts (kg/10 a)	Components (kg/10 a)			
				N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd
2009	Summer	Sludge fertilizer	332	11	17	1	1.2	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	52	11	—	—	—	104	22	—	—	—
		Potassium dihydrogen phosphate	3	—	2	1	—	36	—	19	12	—
		Potassium chloride	28	—	—	18	—	12	—	—	8	—
		Total	—	22	19	20	1.2	—	22	19	20	—
2009	Winter	Sludge fertilizer	302	10	16	1	1.1	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	47	10	—	—	—	95	20	—	—	—
		Potassium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	30	—	16	10	—
		Potassium chloride	27	—	—	17	—	12	—	—	8	—
		Total	—	20	16	18	1.1	—	20	16	18	—
2010	Summer	Sludge fertilizer	227	8	12	1	0.8	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	36	8	—	—	—	71	15	—	—	—
		Potassium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	23	—	12	8	—
		Potassium chloride	15	—	—	9	—	3	—	—	2	—
		Total	—	15	12	10	0.8	—	15	12	10	—
2010	Winter	Sludge fertilizer	181	6	9	1	0.7	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	28	6	—	—	—	57	12	—	—	—
		Potassium dihydrogen phosphate	5	—	3	2	—	23	—	12	8	—
		Potassium chloride	15	—	—	10	—	6	—	—	4	—
		Total	—	12	12	12	0.7	—	12	12	12	—
2011	Summer	Sludge fertilizer	227	8	12	1	0.8	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	33	7	—	—	—	57	12	—	—	—
		Potassium dihydrogen phosphate	6	1	3	—	—	24	3	15	—	—
		Potassium chloride	22	—	—	14	—	24	—	—	15	—
		Magnesia lime (pH adjustment)	—	—	—	—	—	35	—	—	—	—
		Total	—	15	15	15	0.8	—	15	15	15	—
2011	Winter	Sludge fertilizer	483	16	25	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	22	10	—	—	—	43	20	—	—	—
		Potassium dihydrogen phosphate	1	—	1	1	—	50	—	26	17	—
		Potassium chloride	25	—	—	16	—	1	—	—	1	—
		Slaked lime (pH adjustment)	176	—	—	—	—	216	—	—	—	—
		Total	—	26	26	18	1.8	—	20	26	18	—
2012	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	65	14	—	—	—	80	17	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
		Potassium chloride	29	—	—	18	—	32	—	—	20	—
		Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—	—
		Total	—	30	36	20	1.8	—	22	36	20	—
2012	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	71	15	—	—	—	71	15	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18	—
		Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—	—
		Total	—	32	36	18	1.8	—	20	36	18	—
2013	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	81	17	—	—	—	80	17	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
		Potassium chloride	29	—	—	18	—	32	—	—	20	—
		Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—	—
		Total	—	34	36	20	1.8	—	22	36	20	—
2013	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Ammonium sulfate	87	18	—	—	—	71	15	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18	—
		Fused magnesium phosphate	250	—	25	—	—	250	—	25	—	—
		Slaked lime (pH adjustment)	196	—	—	—	—	218 ^{a)}	—	—	—	—
		Total	—	35	51	18	1.8	—	20	51	18	—
2014	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16	—
		Fused magnesium phosphate	291	—	58	—	—	33	—	7	—	—
		Slaked lime (pH adjustment)	—	—	—	—	—	196	—	—	—	—
		Total	—	27	84	16	1.8	—	19	33	16	—
2014	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	25	11	—	—	—	34	16	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	71	9	43	—	—	36	4	22	—	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18	—
		Total	—	37	70	18	1.8	—	20	22	18	—
2015	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16	—
		Slaked lime (pH adjustment)	196	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Total	—	27	26	16	1.8	—	19	26	16	—
2015	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	21	10	—	—	—	15	7	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	72	9	44	—	—	109	13	67	—	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18	—
		Total	—	35	70	18	1.8	—	20	67	18	—
2016	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—	—
		Urea	—	—	—	—	—	30	14	—	—	—
		Ammonium dihydrogenphosphate	89	11	54	—	—	42	5	26	—	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16	—
		Total	—	27	80	16	1.8	—	19	26	16	—

a) 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)

(4) 栽培方法

2016年11月7日に施肥を行った。各試験区の表層土約12 kgを袋に取り、Table 4の施肥設計にしたがって肥料を加えて混合し、各試験区表層に均等に散布した。さらに、ヨトウムシ等の害虫防除を目的としてダイアジノン粒剤を散布した。その後、耕耘機を用いて深さ約15 cmまで耕耘した。なお、各試験区の周辺1 mの部分(ガードプランツ)には、標準区の施肥設計と同じ割合で施肥した。

2016年11月14日に播種を行った。供試作物はホウレンソウ(品種名:ニューアンナ R4)を用い、試験区内を9条(条間約20 cm)間隔でシーダーテープ種子を用いて播種した。

2016年12月2日及び12月15日に間引きを行った。

2017年3月17日に収穫を行った。地際をハサミで切断して地上部を収穫した。

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。

(5) 作物体のカドミウム分析

収穫した後、直ちにホウレンソウの全株重量を試験区毎に測定した。さらに、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 °C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)で分解¹⁴⁾したものを50 mLに定容し、ICP質量分析装置(UltiMate 3000:Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。

(6) 跡地土壌の分析

収穫後、跡地土壌を対角線採土法¹⁵⁾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。通風乾燥器を用いて35 °C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。

水分は、ハロゲン水分計(HG53:メトラー・トレド)を用いて測定した。

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

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 °Cに保ちながら1時間振とうして抽出した試料液についてICP質量分析装置(UltiMate 3000:Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した¹⁶⁾。

2) 2017年夏作の連用試験(2017年6月20日～2017年10月12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)の試験で使用した汚泥肥料施用区及び標準区の跡地を用いた。

土壌の種類、前作跡地のpH、EC、有効態リン酸、全窒素、全炭素及び0.1 mol/L HCl-CdをTable 6に示す。

Table 6 Characteristics of soil (summer 2016)

	Unit	Year	Ap ^{a)} -1	Ap ^{a)} -2	Sp ^{b)} -1	Sp ^{b)} -2
pH (H ₂ O) ^{c)}		2009 ^{b)}	6.1	6.1	6.2	6.2
		2017 ^{c)}	6.3	6.5	6.4	6.4
EC ^{d)}	mS/cm	2009	0.10	0.10	0.14	0.12
		2017	0.09	0.08	0.06	0.07
Available phosphate ^{e)}	mg/100 g	2009	5.8	6.1	7.7	6.9
		2017	18.7	13.8	16.8	15.2
Total nitrogen ^{e)}	% ^{f)}	2017	0.44	0.42	0.37	0.37
Total carbon ^{e)}	% ^{f)}	2017	5.8	5.7	5.2	5.2
0.1 mol /L HCl-Cd ^{e)}	mg/kg	2009	0.18	0.19	0.18	0.21
		2017	0.17	0.17	0.11	0.12
Kind of soil				Andosol		
Soil texture				Light clay		

a) Sludge-fertilizer-application plot

b) Standard plot

c) Determined on 1:5 (soil : water) suspensions with a glass electrode, average (n=2)

d) Determined on 1:5 (soil : water) suspensions with an electrical conductivity meter, average (n=2)

e) Dry matter, average (n=2)

f) Mass fraction

(2) 供試肥料等

供試肥料及び補正肥料は 2.1) (2) と同じものを用いた。

(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 (Table 7)。汚泥肥料の施用量は 500 kg/10 a (現物) とし、その窒素肥効率を 50 % として計算し、窒素の不足分を補正肥料で補った。加里についても不足分は補正肥料で補った。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じ成分量になるよう施用した。前作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 16.2 mg/100 g 乾土、標準区 16.0 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/100 g 乾土) を満たしていたことから、りん酸は追加しなかった。

Table 7 The fertilization amount (carrot in winter 2017)

Types of fertilizer	Amounts (g/4 m ²)	Components (g/4 m ²)				Amounts (kg/10 a)	Components (kg/10 a)			
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>										
Sludge fertilizer	2000	66	104	7	7.3	500	16.6	26.1	1.8	1.8
Urea	93	43	—	—	—	23	10.7	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Potassium chloride	90	—	—	57	—	23	—	—	14.2	—
Total		109	104	64	7.3		27.3	26.1	16.0	1.8
<Standard plot (SP)>										
Urea	120	55	—	—	—	30	13.8	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	171	21	104	—	—	43	5.2	26.1	—	—
Potassium chloride	101	—	—	64	—	25	—	—	16.0	—
Total		76	104	64	—		19.0	26.1	16.0	—

(4) 栽培方法

2017年6月2日に施肥を行った。各試験区の表層土約12 kgを袋に取り、Table 7の施肥設計にしたがって肥料を加えて混合し、各試験区表層に均等に散布した。さらに、ヨトウムシ等の害虫防除を目的としてダイアジノン粒剤を散布した。その後、耕耘機を用いて深さ約15 cmまで耕耘した。なお、ガードプランツには、標準区の施肥設計と同じ割合で施肥した。

2017年6月20日に播種を行った。供試作物はニンジン(品種名:恋ごころ)を用い、試験区内を9条(条間約20 cm)間隔でシーダーテープ種子を用いて播種した。

2017年8月2日及び8月17日に間引きを行った。

2017年10月12日に収穫を行った。

播種から収穫までの栽培期間は約3ヶ月半であり、その間に異常な症状は確認されなかった。

(5) 作物体のカドミウム分析

収穫したニンジンは水道水で洗浄後、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1 m²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。根部についてはさらにイオン交換水で洗浄して自然乾燥し、薄く切り分けたものをさらに通風乾燥器を用いて65℃で24時間乾燥した後、重量を測定した。葉部については自然乾燥し、さらに通風乾燥器を用いて65℃で24時間乾燥した後、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1 mm及び500 µmのふるいを通過するまで粉碎機(ZM200:Retsch ローター回転数6000 rpm)を用いて粉碎した。

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については、目開き500 µmのふるいを通過するまで粉碎機(ZM200:Retsch ローター回転数6000 rpm)で粉碎し調製をした。

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(UltiMate 3000:Thermo Fisher Scientific)により行った。

3. 結 果

1) 2016年冬作連用試験(冬作ホウレンソウ:2016年11月14日～2017年3月17日)

(1) 作物体の収量及びカドミウム吸収量

ホウレンソウの収量、カドミウム濃度及びカドミウム吸収量(収量(乾物重)×カドミウム濃度(乾物値)により算出)をTable 8に示した。汚泥肥料施用区及び標準区の収量は、生体重でそれぞれ10.90 kgと10.45 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104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0.44 mg/kg、標準区は0.40 mg/kgであり、汚泥肥料施用区が有意に高かった($p=1.4\times 10^{-4}$)。現物濃度については、汚泥肥料施用区は0.055 mg/kg、標準区は0.054 mg/kgであり、いずれの試験区においてもCodex基準値¹⁷⁾(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0.60 mg/試験区、標準区は0.57 mg/試験区であり、汚泥肥料施用区が有意に高かった($p=2.2\times 10^{-3}$)。

Table 8 Yield of spinach (edible portion) and Cadmium uptake (winter 2016)

	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Average	Yield index ^{b)}	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>								
Fresh weight	kg	12.15		9.65		10.90	104	-
Dry weight	kg	1.46		1.24		1.35	95	-
Cadmium concentration (fresh matter)	mg/kg	0.46	0.45	0.43	0.42	0.44	Significance ^{c)}	
Cadmium concentration (dry matter)	mg/kg	0.055	0.054	0.055	0.054	0.055	-	-
Quantity of cadmium uptake ^{a)}	mg/plot	0.67	0.66	0.53	0.52	0.60	-	Pending ^{d)}
<Standard plot (SP)>								
Fresh weight	kg	11.40		9.50		10.45	100	-
Dry weight	kg	1.55		1.30		1.42	100	-
Cadmium concentration (fresh matter)	mg/kg	0.42	0.42	0.37	0.37	0.40	-	-
Cadmium concentration (dry matter)	mg/kg	0.057	0.057	0.051	0.051	0.054	-	-
Quantity of cadmium uptake ^{a)}	mg/plot	0.65	0.64	0.48	0.49	0.57	-	-

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

b) Yield of Standard plot was indexed as 100

c) 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))d) 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))

(2) 跡地土壌の理化学性

跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd, pH (H₂O) 及び EC を分析した結果を Table 9 に示した. 0.1 mol/L HCl-Cd は, 汚泥肥料施用区は 0.17 mg/kg, 標準区は 0.11 mg/kg であり, 汚泥肥料施用区の方が有意に高かった ($p=2.4 \times 10^{-4}$).

Table 9 Characteristics of cultivated soil in winter 2016

	Unit	Test prot-1		Test prot-2		Average	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
0.1 mol /L HCl-Cd ^{a)}	mg/kg	0.17	0.18	0.17	0.17	0.17	Significance ^{d)}
pH (H ₂ O) ^{b)}		6.3		6.5			
EC ^{c)}	mS/m	8.5		7.9			
<Standard plot(SP)>							
0.1 mol /L HCl-Cd	mg/kg	0.12	0.11	0.12	0.11	0.11	
pH (H ₂ O)		6.4		6.4			
EC	mS/m	6.4		7.3			

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

b) Soil pH determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with a glass electrode, $n=2$ c) Soil electrical conductivity determined on 1 : 5 (soil : water) suspensions with an electrical conductivity meter, $n=2$ d) 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) 2017 年夏作連用試験(夏作ニンジン:2017 年 6 月 20 日~2017 年 10 月 12 日)

(1) 作物体の収量及びカドミウム吸収量

ニンジンの収量, カドミウム濃度及びカドミウム吸収量を Table 10 に示した.

ニンジンの収量(生体重)は, 根部については汚泥肥料施用区 10.28 kg, 標準区 10.00 kg, 葉部については汚泥肥料施用区 5.70 kg, 標準区 6.03 kg であり, 根部と葉部の合計は汚泥肥料施用区 15.98 kg, 標準区 16.03 kg であった. 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部が 103, 葉部が 95, 根部と葉部の合計が 100 であった.

カドミウム濃度(乾物値)は, 根部については汚泥肥料施用区 0.12 mg/kg, 標準区 0.10 mg/kg, 葉部については汚泥肥料施用区 0.19 mg/kg, 標準区 0.15 mg/kg であった.

根部のカドミウム濃度(現物値)は, 汚泥肥料施用区 0.013 mg/kg, 標準区 0.017 mg/kg であり, Codex 基準値¹⁾ (0.1 mg/kg) 未満であった.

試験区当たりのカドミウムの吸収量は, 根部については汚泥肥料施用区 0.13 mg/試験区, 標準区 0.12 mg/試験区であり, 葉部については汚泥肥料施用区 0.14 mg/試験区, 標準区 0.12 mg/試験区であり, 根部と葉部の合計は汚泥肥料施用区 0.27 mg/試験区, 標準区 0.24 mg/試験区であった.

Table 10 Cadmium uptake and yield of carrot in the test

	Part	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Average	Yield index ^{b)}	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>									
Fresh weight	Root	kg	10.25		10.30		10.28	103	-
	Leaf	kg	5.80		5.60		5.70	95	-
	Total	kg	16.05		15.90		15.98	100	-
Dry weight	Root	kg	0.96		1.21		1.08	88	-
	Leaf	kg	0.71		0.72		0.72	93	-
	Total	kg	1.67		1.93		1.80	90	-
Cadmium concentration (dry matter)	Root	mg/kg	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12		Pending ^{c)}
	Leaf	mg/kg	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19		Pending ^{c)}
Cadmium concentration (fresh matter)	Root	mg/kg	0.012	0.012	0.014	0.014	0.013		-
	Leaf	mg/kg	0.023	0.024	0.024	0.025	0.024		-
Quantity of cadmium uptake ^{a)}	Root	mg/plot	0.12	0.12	0.15	0.14	0.13		Pending ^{c)}
	Leaf	mg/plot	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14		Pending ^{c)}
	Total	mg/plot	0.26	0.26	0.28	0.28	0.27		Pending ^{c)}
<Standard plot (SP)>									
Fresh weight	Root	kg	9.65		10.35		10.00		
	Leaf	kg	6.20		5.85		6.03		
	Total	kg	15.85		16.20		16.03		
Dry weight	Root	kg	1.19		1.28		1.24		
	Leaf	kg	0.80		0.75		0.77		
	Total	kg	1.99		2.03		2.01		
Cadmium concentration (dry matter)	Root	mg/kg	0.10	0.11	0.08	0.08	0.10		
	Leaf	mg/kg	0.17	0.17	0.13	0.14	0.15		
Cadmium concentration (fresh matter)	Root	mg/kg	0.013	0.013	0.022	0.022	0.017		
	Leaf	mg/kg	0.010	0.010	0.017	0.017	0.014		
Quantity of cadmium uptake ^{a)}	Root	mg/plot	0.12	0.13	0.11	0.11	0.12		
	Leaf	mg/plot	0.14	0.14	0.10	0.10	0.12		
	Total	mg/plot	0.26	0.26	0.21	0.21	0.24		

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

b) Yield of Standard plot was indexed as 100

c) 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))

(2) 跡地土壌の理化学性

跡地土壌の全カドミウム, 0.1 mol/L HCl-Cd, pH(H₂O) 及び EC の分析結果を Table 11 に示した.

全カドミウム濃度は, 汚泥肥料施用区は 0.61 mg/kg, 標準区は 0.46 mg/kg で, 汚泥肥料施用区が有意に高かった ($p=1.4 \times 10^{-5}$).

0.1 mol/L HCl-Cd は, 汚泥肥料施用区は 0.21 mg/kg, 標準区は 0.14 mg/kg であり, 汚泥肥料施用区が有意に高かった ($p=2.1 \times 10^{-6}$).

Table 11 Characteristics of cultivated soil in summer 2017

	Unit	Test prot-1		Test prot-2		Average	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.61	0.60	0.62	0.61	0.61	Significance ^{e)}
0.1 mol/L HCl-Cd ^{b)}	mg/kg	0.22	0.21	0.21	0.21	0.21	Significance
pH (H ₂ O) ^{c)}		6.3		6.4			
EC ^{d)}	mS/m	0.093		0.079			
<Standard plot (SP)>							
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.45	0.46	0.48	0.47	0.46	
0.1 mol/L HCl-Cd ^{b)}	mg/kg	0.15	0.14	0.14	0.14	0.14	
pH (H ₂ O) ^{c)}		6.4		6.5			
EC ^{d)}	mS/m	0.064		0.061			

a) Content in the dry matter

b) Content of cadmium dissolved with 0.1 mol/L hydrochloric acid 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 significantly different for standard plot (two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4$ (2×2) (repetition $\times$ number of samples))

4. 考 察

1) 作物体の収量の推移

2009 年夏作以降の作物体の収量の推移を Fig.2 に示した。

ホウレンソウについては参考にした自治体施肥基準⁶⁾に記載されている目標収量(8 kg/試験区)と同等以上であり、一定の収量が確保されている。

ニンジンについては 2012 年夏作以降、自治体施肥基準⁶⁾に記載されている目標収量(14 kg/試験区)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。

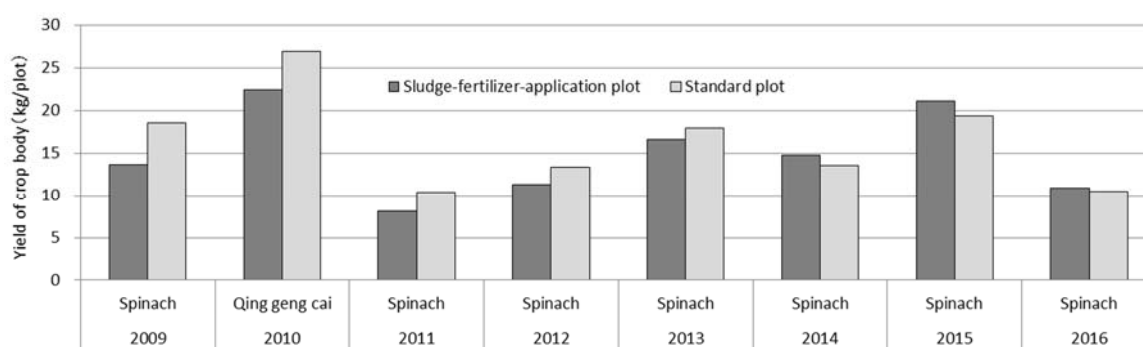


Fig.2-1 The yield of each crop body from 2009 to 2016 (in winter)

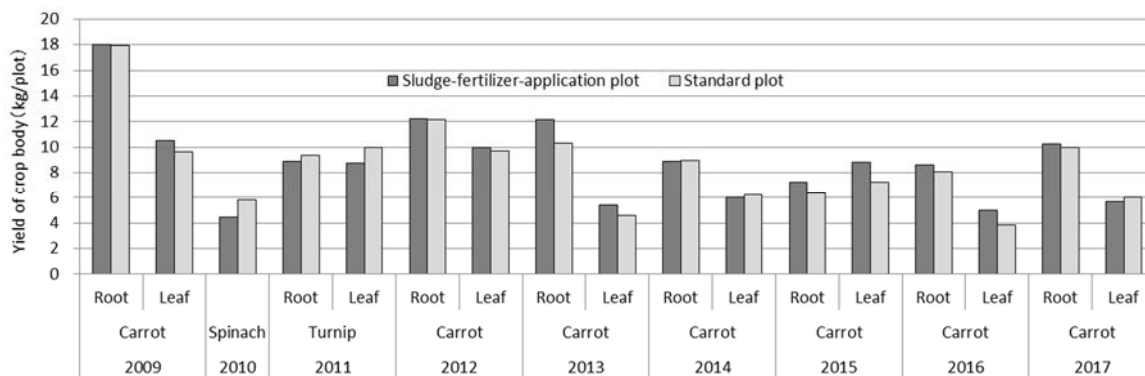


Fig.2-2 The yield of each crop body from 2009 to 2017 (in summer)

2) 作物体のカドミウム濃度及び吸収量の推移

2009 年夏作から 2017 年夏作までの各試験での作物体中のカドミウム濃度及び試験区当たりのカドミウム吸収量の推移を Fig.3 に示した。

2011 年以降、標準区よりも汚泥肥料施用区の方が作物体中のカドミウム濃度及びカドミウム吸収量が高い傾向が続いていることから、汚泥肥料の施肥によって作物体のカドミウム濃度が高くなると考えられる。しかし、これまで汚泥肥料施用区から収穫した作物体のカドミウム濃度が Codex 基準値¹⁷⁾ (葉菜:0.2 mg/kg, 根菜:0.1 mg/kg)を超えることはなかった。

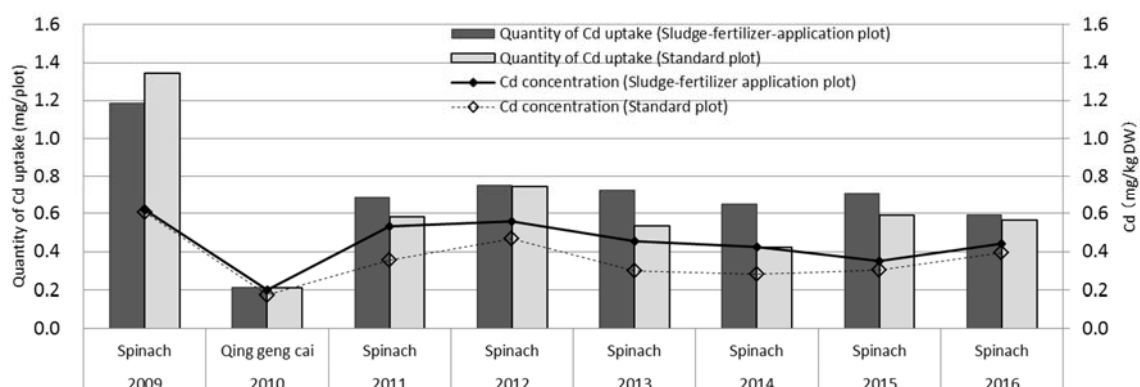


Fig.3-1 Cadmium concentration and absorption amount of each crops from 2009 to 2016 (in winter)

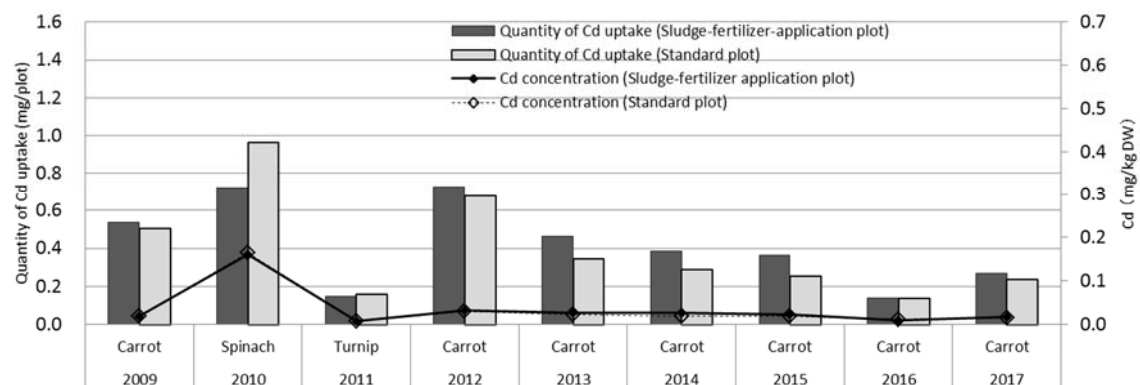


Fig.3-2 Cadmium concentration and absorption amount of each crops from 2009 to 2017 (in summer)

3) 跡地土壌中のカドミウムの推移

(3.1) 跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd の推移

跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd の推移を Table 12 及び Fig.4 に示した.

汚泥肥料施用区及び標準区の 0.1 mol/L HCl-Cd 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 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). 2017 年夏作跡地までの汚泥肥料施用区の回帰は有意でなく($p=0.45$)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($p=3.2 \times 10^{-7}$), 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 が標準区に比べて有意に高くなった. それ以降, 汚泥肥料施用区の方が高い傾向が続いている. これは, 標準区は肥料によるカドミウムの供給がなく, 作物体の持ち出しがあるのに対し, 汚泥肥料施用区は汚泥肥料によって供給されたカドミウムの一部は作物体の吸収によって持ち出されるが, それ以外は土壌に残留していることが要因と考えられる.

Table 12 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		P-value of single regression analysis ^{d)}	
			(mg/kg)		(mg/kg)		(difference between the processing)		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 ^{g)}		—	—
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 ^{g)}		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 ^{h)}		0.41	< 0.01
2012	Winter	Spinach	0.21	(0.01)	0.17	(0.01)	Significance ^{h)}		0.98	< 0.01
2013	Summer	Carrot	0.20	(0.004)	0.16	(0.01)	Significance ^{h)}		0.89	< 0.01
2013	Winter	Spinach	0.22	(0.01)	0.16	(0.004)	Significance ^{h)}		0.34	< 0.01
2014	Summer	Carrot	0.20	(0.01)	0.15	(0.005)	Significance ^{h)}		0.30	< 0.01
2014	Winter	Spinach	0.21	(0.01)	0.15	(0.003)	Pending ^{g)}		0.17	< 0.01
2015	Summer	Carrot	0.15	(0.01)	0.11	(0.005)	Significance ^{h)}		0.80	< 0.01
2015	Winter	Spinach	0.16	(0.01)	0.11	(0.001)	Pending ^{g)}		0.29	< 0.01
2016	Summer	Carrot	0.19	(0.02)	0.12	(0.005)	Pending ^{g)}		0.30	< 0.01
2016	Winter	Spinach	0.17	(0.01)	0.11	(0.002)	Significance ^{h)}		0.16	< 0.01
2017	Summer	Carrot	0.21	(0.002)	0.14	(0.004)	Significance ^{h)}		0.45	< 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))

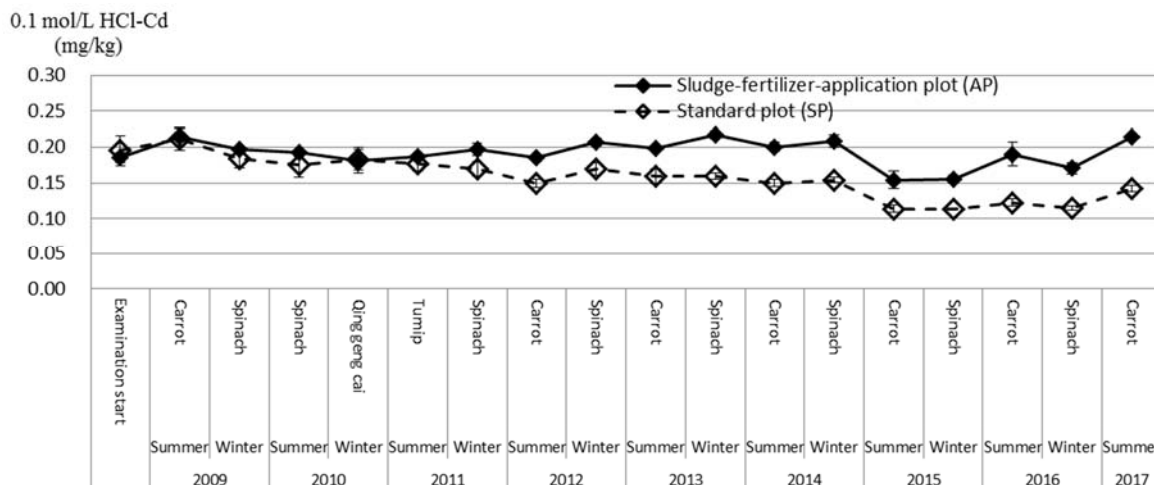


Fig.4 Changes in the 0.1 mol/L HCl-Cd concentration of soil after harvest

(The error bar indicating the standard deviation)

(3.2) 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を Table 13 及び Fig.5 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(夏作から次の夏作までの間隔は 12 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 14). 2017 年夏作跡地までの汚泥肥料施用区は上昇傾向($p=3.4 \times 10^{-3}$)が認められ、標準区は下降傾向($p=2.6 \times 10^{-2}$)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の供給量が、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の供給がないためと考えられる。

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 Fig.5 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 16 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、土壌中のカドミウムの水平方向への移動^{4), 18)~20)}があり、一部のカドミウムが試験区内に留まらないことによるものと考えられた。

Table 13 Changes in the total-Cd concentration^{a)} of soil after harvest

Year	Season	Test Crops	Ap ^{b)} (mg/kg)	SP ^{c)} (mg/kg)	Significance test (difference between the processing)	p-value of single regression analysis ^{d)}	
						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	$p < 0.05^g)$	0.16
2015	Summer	Carrot	0.57 (0.01)	0.46 (0.01)	Significance	$p < 0.01$	0.06
2016	Summer	Carrot	0.54 (0.00)	0.45 (0.02)	Significance	$p < 0.05$	$p < 0.05$
2017	Summer	Carrot	0.61 (0.01)	0.46 (0.01)	Significance	$p < 0.01$	$p < 0.05$

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

f) It was significantly different for processing examination section

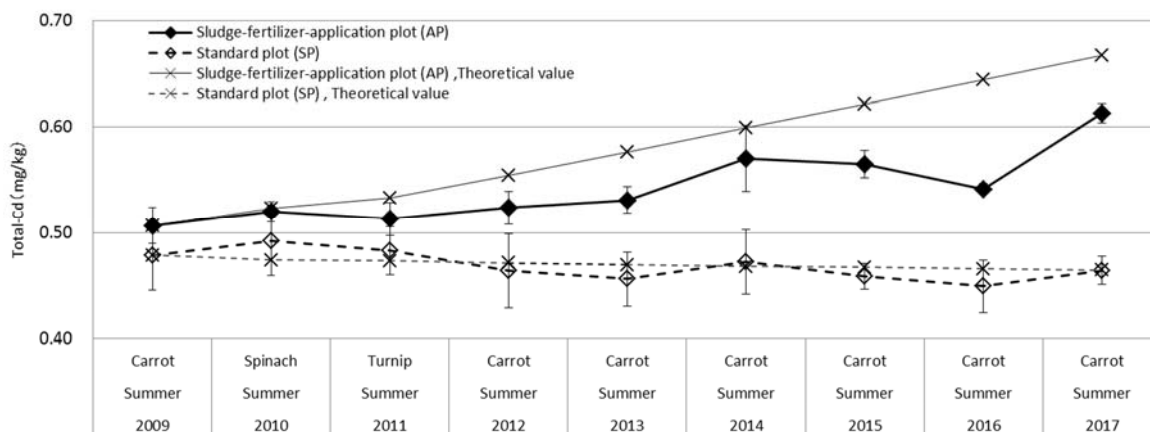
(two-way ANOVA 5 % of both sides levels of significance, $n=4 (2 \times 2)$ (repetition $\times$ number of samples))g) It show that regression is significant in $p < 0.05$ (5 % of both sides levels of significance)

Fig.5 Changes in the actual total-Cd concentration and the theoretical total-Cd concentration of soil after harvest (The error bar indicating the standard deviation)

(3.3) 土壌中の全カドミウムの蓄積量と 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度

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を Table 14 に示した. カドミウムの負荷量は, 施用肥料のカドミウム含有量に施用量を乗じて算出した. 作物体による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. 土壌へのカドミウム蓄積量は, 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により算出した. 土壌へのカドミウム蓄積量は, 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)で除して算出した。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。

Table 14 Changes of the 2009 ～2017 years 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)}	
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	-0.001
2016	Summer	Carrot	7.28	0.23	7.05	0.012	0	0.19	-0.19	-0.0003
2016	Winter	Spinach	7.28	0.60	6.68	0.011	0	0.57	-0.57	-0.0009
2017	Summer	Carrot	7.28	0.28	7.00	0.012	0	0.24	-0.24	-0.0004
Total			105.60	9.36	96.24	0.160	0.00	8.62	-8.62	-0.0144

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 = b) - c)

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

Table 14 の結果から、標準区は作物体によるカドミウムの持ち出し量(累積), 汚泥肥料施用区はカドミウム蓄積量(累積)を算出した結果を土壌中全 Cd 及び 0.1 mol/L HCl-Cd の推移とともに Fig.6 に示した。

標準区については、作物体による Cd の持ち出し量は、全カドミウムの減少幅とほぼ同じだが、0.1 mol/L HCl-Cd の減少幅はそれに対してやや大きい。これは、土壌由来の 0.1 mol/L HCl-Cd の不溶化が徐々に進んでいることによるものと推察される。

汚泥肥料施用区については、肥料由来のカドミウム蓄積量(累積)が試験開始時の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度に近づいているにもかかわらず、0.1 mol/L HCl-Cd 濃度の増加傾向は認められない。これは、作物による持ち出し、土壌中に負荷されたカドミウムの水平移動^{4), 18)~20)}の他に、土壌中の有機物等と結合する²¹⁾ことによって 0.1 mol/L HCl-Cd が不溶化していることが要因と考えられる。作物体のカドミウム濃度が標準区と汚泥肥料区の間で大差がないのは、肥料中の 0.1 mol/L HCl-Cd の多くが作物体に吸収される前に不溶化していることが考えられる。

カドミウムを含有する汚泥肥料の連用により、0.1 mol/L HCl-Cd の不溶化が飽和状態に達した場合、これまで増加傾向が認められなかった土壌中の 0.1 mol/L HCl-Cd が増加傾向に転じることが予想される。その場合は、作物体のカドミウム濃度にも影響することが考えられることから、今後も土壌のカドミウム蓄積量(累積)と 0.1 mol/L HCl-Cd の関係については引き続き調査する必要がある。

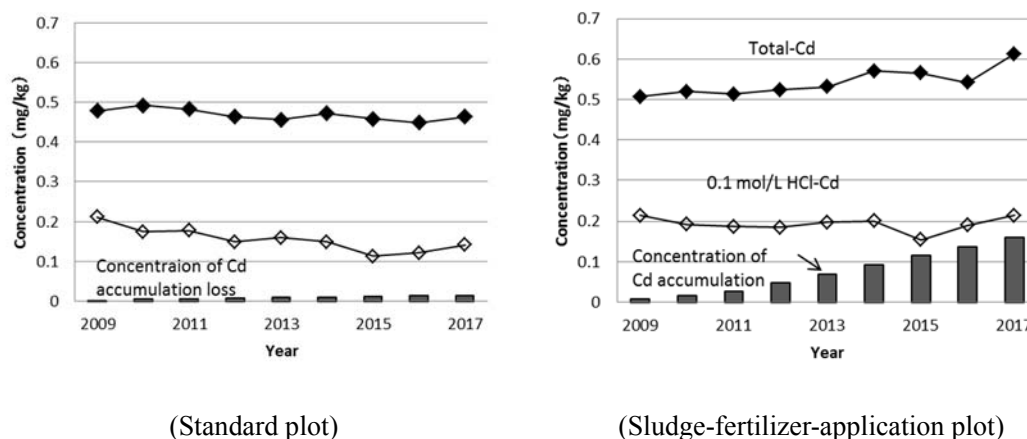


Fig.6 Changes of Cd concentration in the soil

(4) 跡地土壌の理化学性の推移

(4.1) 跡地土壌の pH

跡地土壌の pH の推移は Fig.7 のとおりである. 汚泥肥料施用区及び標準区ともに 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.

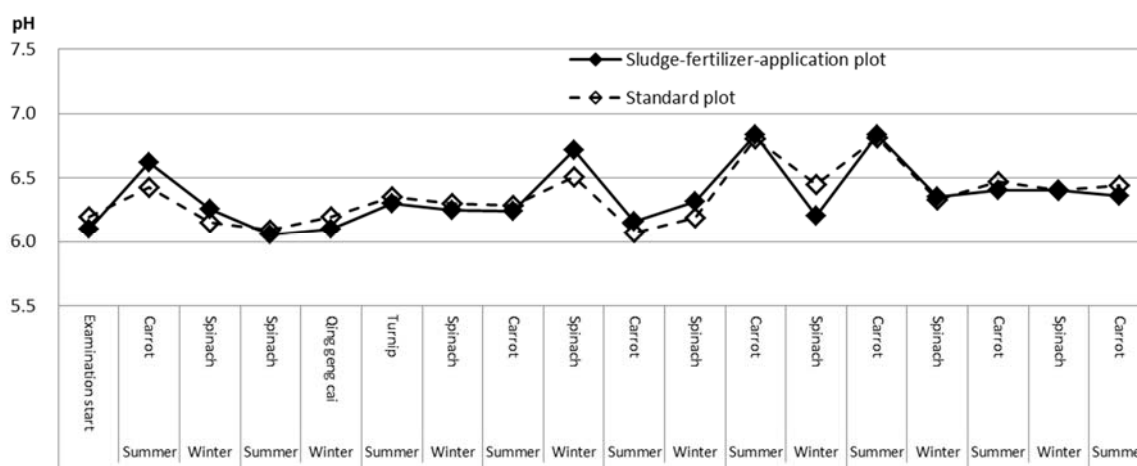


Fig.7 Changes in the pH of soil after harvest

(4.2) 跡地土壌の EC(電気伝導率)

跡地土壌 EC の推移は Fig.8 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.

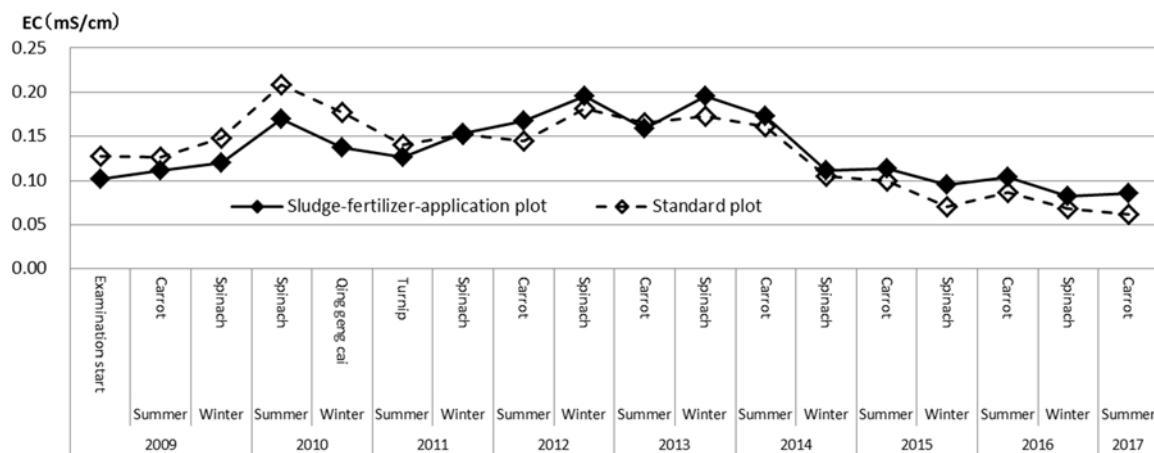


Fig.8 Changes in the EC of soil after harvest

(4.3) 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.9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。

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²¹⁾、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。

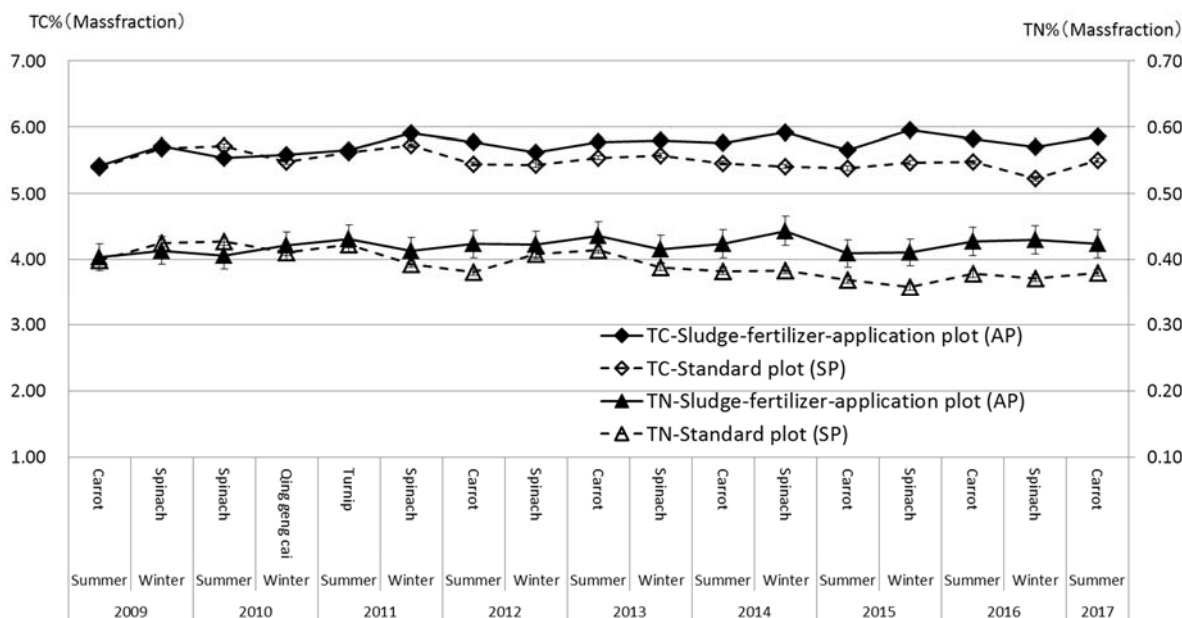


Fig.9 Changes in the total nitrogen (TN) and total carbon (TC) of soil after harvest

(The error bar indicating the standard deviation)

(4.4) 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を Fig.10 に示した. 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施用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熔成りん肥の影響によるものと推察された. 前作に施肥した熔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/100 g 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/100 g 乾土, 標準区は 12 mg/100 g 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, 及び土壌の改善効果を見込んで施肥したりん酸一アンモニウムの施用量の影響が考えられた.

なお, 2016 年冬作及び 2017 年夏作の跡地土壌の有効態リン酸については, 汚泥肥料施用区と標準区は同程度であった.

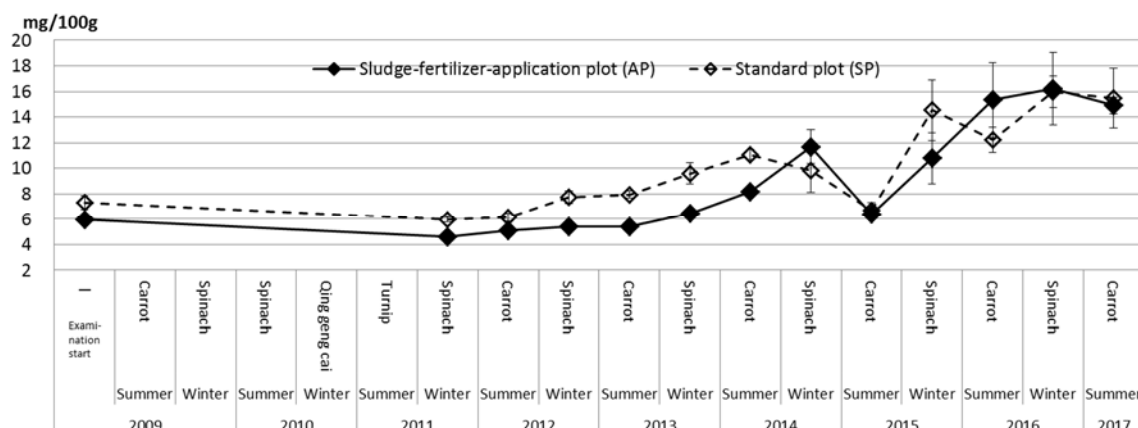


Fig.10 Changes in the available phosphate of soil after harvest

(4.5) 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.11-1, Fig.11-2 及び Fig.11-3 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, 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, それ以降は試験区間で大きな差は見られない.

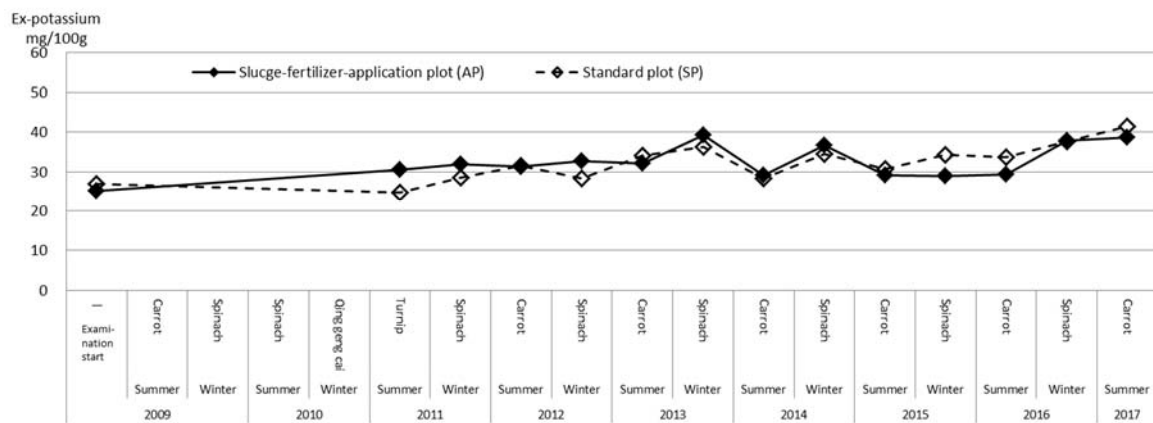


Fig.11-1 Changes in the exchangeable-potassium of soil after harvest

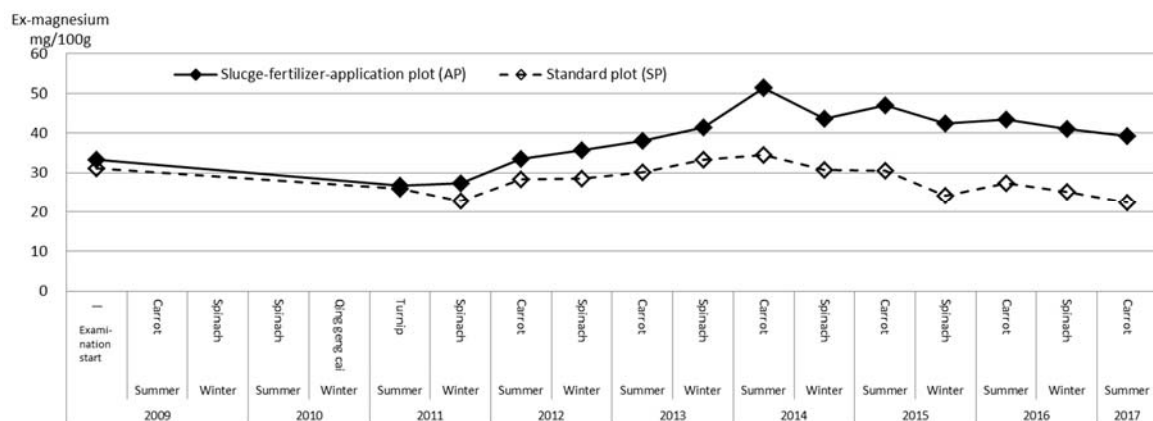


Fig.11-2 Changes in the exchangeable-magnesium of soil after harvest

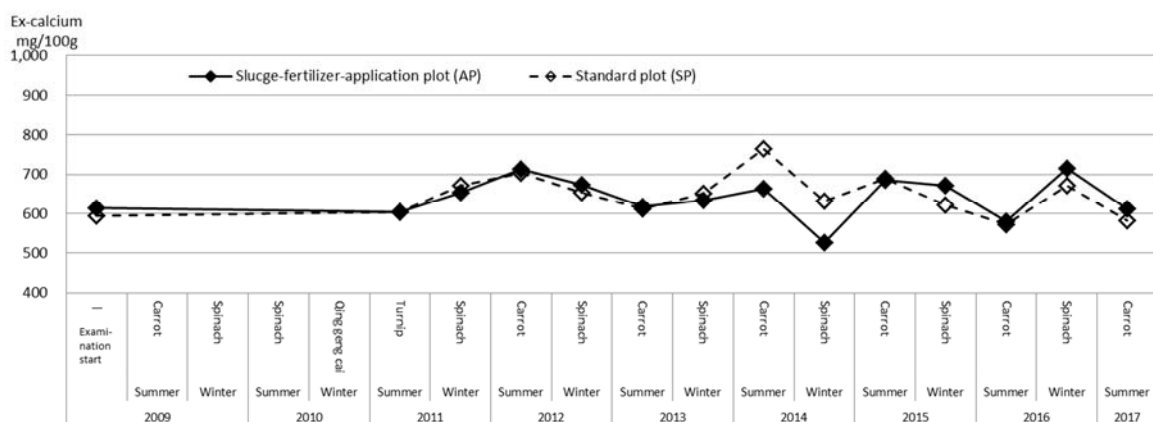


Fig.11-3 Changes in the exchangeable-calcium of soil after harvest

5. まとめ

2016 年冬作のハウレンソウ, 2017 年夏作のニンジン¹⁾の作物体の全カドミウムを分析した結果, ハウレンソウについては汚泥肥料施用区の方が有意に高く($p=1.4 \times 10^{-4}$), ニンジンについても汚泥肥料施用区の方が高い傾向が確認された。

跡地土壌中の全カドミウムを分析した結果, 2009 年夏作から 2017 年夏作まで汚泥肥料施用区は上昇傾向, 標準区は減少傾向が認められた。

跡地土壌中の 0.1 mol/L HCl-Cd を分析した結果, 2009 年夏作から 2017 年夏作まで汚泥肥料施用区は一定で推移する傾向にあり, 標準区は減少傾向が認められた。全カドミウムが上昇傾向にあるのに対し, 0.1 mol/L HCl-Cd が一定で推移する傾向にあるのは, 土壌中のカドミウムが水平方向へ移動することの他に, 土壌中の有機物等により 0.1 mol/L HCl-Cd が一部不溶化していると考えられた。カドミウムの 0.1 mol/L HCl 不溶化が飽和状態になれば, 土壌中の 0.1 mol/L HCl-Cd が上昇傾向に転ずる可能性があり, その場合は作物体中のカドミウム濃度にも影響があると考えられることから, 今後も土壌のカドミウム蓄積量(累積)と 0.1 mol /L HCl-Cd の関係については引き続き調査する必要がある。

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 30 年 9 月 5 日, 農林省告示第 1991 号 (2018)
- 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/honnbun.pdf >
- 3) 舟津正人, 阿部文浩, 添田英雄: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, 肥料研究報告, 4, 74~84, (2011)
- 4) 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: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2015 年冬作・2016 年夏作ー, 肥料研究報告, 10, (2017)
- 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/shikenho_2018.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) 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)
- 14) 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
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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/ >
- 18) 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, 日本土壌肥科学雑誌, 73(4), 391~396, (2002)
- 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, 124~127, 博友社, 東京(1991)
- 20) 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)
- 21) 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)

Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued Report)
- Winter 2016 and Summer 2017 -

Keisuke AOYAMA¹, Toshiharu YAGI², Harufumi SAITO¹, Kenta SAKUMA²,
Tokiya SUZUKI³, Yudai TANAKA¹, Yoshimi HASHIMOTO¹, Fumihiro ABE¹

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) Nagoya Regional Center

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Food Safety and Consumer Affairs Bureau

We have been researching Cd absorption of the crop and accumulation in the soil used sludge fertilizer since 2009. The soil is composed of the Andosol. We cultivated spinach in winter 2016 and carrot in summer 2017. 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 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 total-Cd compared with the soil in the SP since winter 2011. The concentration of total-Cd in the soil (from summer 2009 to summer 2017) showed significant increasing trend in the AP. The concentrations of cadmium in each crop harvested (from summer 2009 to summer 2017) 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, **11**, 106~128, 2018)

10 2017 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

坂井田里子¹, 顯谷久典², 廣井利明³, 山岡孝生⁴,
山西正将⁵, 平田絵理香⁶, 白井裕治¹, 引地典雄⁷, 今川俊明⁷

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, 2017 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 4 ヶ月間常温で保管した. その後, 試料をよく混合し, のし餅状に抔けて短冊状に 9 等分し, 1~9 の区分番号を付して容器に移した.

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 (現) 札幌センター

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 公益財団法人日本肥糧検定協会

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 250 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 μm 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 170 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
区分番号	1	8	2	4	9	1	5
	3	7	9	7	4	2	8
	4	3	1	5	6	7	6
	6	5	8	2	3	9	1

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) 及びく溶性マンガン (C-Mn)、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。2017 年度、化成肥料は 140 試験室、鉍さいけい酸質肥料は 73 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 (Moist), 窒素全量 (T-N), アンモニア性窒素 (A-N), りん酸全量 (T-P), く溶性りん酸 (C-P₂O₅), 水溶性りん酸 (W-P₂O₅), 加里全量 (T-K₂O), く溶性苦土 (C-MgO), く溶性マンガン (C-MnO), く溶性ほう素 (C-B₂O₃), ひ素 (As) 及びカドミウム (Cd) の 12 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 (2016)⁶⁾を次のとおり例示した。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、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.a(蒸留法)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。

(4) リン酸全量(T-P₂O₅)は、肥料等試験法 4.2.1.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) 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。

(6) 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。

(7) 加里全量(T-K₂O)は、肥料等試験法 4.3.1.a(フレイム原子吸光法又はフレイム光度法)の(4.1)により試料溶液を調製し、同項(4.2)により定量。

(8) 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。

(9) く溶性マンガン(C-MnO)は、肥料等試験法 4.7.2.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。

(10) く溶性ほう素(C-B₂O₃)は、肥料等試験法 4.8.1.a(アゾメチン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。

(11) ひ素(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。

(12) カドミウム(Cd)は、肥料等試験法 5.3.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。

(13) 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。

(14) 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.b(可溶性石灰及び可溶性苦土よりの算出)の(2)により算出。

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z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。

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

標準化されたロバスト標準偏差($NIQR$)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。

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

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。

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

(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。

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

- (6) 全データの標準偏差(s)。
- (7) 標準化されたロバスト標準偏差($NIQR$)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。

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

- (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、 $CRSD_R$ 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(2016)⁶⁾に示されている室間再現精度の目安($CRSD_R$)及びそれらから算出(式1)した推定室間再現標準偏差($\hat{\sigma}_R$)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の検定を実施した。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。次に、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3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(2016)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

s_r : 併行標準偏差

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_{bb} : 試料間標準偏差

s_{b+r} : 併行精度を含む試料間標準偏差

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	14.69	0.01	0.04	0.04	3	0.44	0.13
	C-MnO	10	0.283	0.002	0.003	0.004	6	0.017	0.005
鉍さいけい酸質肥料	C-MgO	10	4.29	0.02	0.02	0.03	4	0.17	0.05

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

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推定室間再現標準偏差

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、鉍さいけい酸質肥料中の可溶性石灰が 93 %と最も高く、化成肥料中のカドミウムが 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、化成肥料の加里全量並びにひ素及び鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土が 12 %とそれぞれ最も高い結果であった。昨年度と比較すると、「満足($|z| \leq 2$)」と評価された試験室の割合は昨年度が 78 %～96 %、「不満足($|z| \geq 3$)」と評価された試験室の割合は昨年度が 0 %～14 %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、一部の試験項目で Mean と Median の差が認められた。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。全ての試験成分において、 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。

2006～2017 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 6 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	126	107	85	10	8	9	7
T-N	126	111	88	8	6	7	6
A-N	116	100	86	14	12	2	2
T-P ₂ O ₅	121	103	85	6	5	12	10
C-P ₂ O ₅	115	93	81	10	9	12	10
W-P ₂ O ₅	118	99	84	7	6	12	10
T-K ₂ O	113	94	83	6	5	13	12
C-MgO	114	94	82	11	10	9	8
C-MnO	107	96	90	7	7	4	4
C-B ₂ O ₃	99	81	82	12	12	6	6
As	41	33	80	3	7	5	12
Cd	50	39	78	6	12	5	10
(鉱さいけい酸質肥料)							
S-SiO ₂	58	51	88	2	3	5	9
AL	71	58	82	5	7	8	11
S-CaO	57	53	93	2	4	2	4
S-MgO	57	45	79	5	9	7	12
C-MgO	69	62	90	5	7	2	3

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	126	3.45	3.45	0.03	0.30	0.17	4.9	- ^{j)}	- ^{j)}
T-N	126	10.49	10.52	0.02	0.17	0.12	1.1	3	4.5
A-N	116	8.74	8.73	0.04	0.27	0.22	2.5	4	6
T-P ₂ O ₅	121	15.21	15.25	0.04	0.42	0.20	1.3	3	4.5
C-P ₂ O ₅	115	14.61	14.63	0.03	0.40	0.14	1.0	3	4.5
W-P ₂ O ₅	118	10.77	10.77	0.04	0.61	0.22	2.0	3	4.5
T-K ₂ O	113	8.97	9.02	0.04	0.47	0.23	2.5	4	6
C-MgO	114	3.59	3.59	0.02	0.14	0.09	2.5	4	6
C-MnO	107	0.281	0.283	0.003	0.018	0.015	5.4	6	9
C-B ₂ O ₃	99	0.170	0.170	0.003	0.024	0.015	8.9	6	9
As	41	4.03	3.96	0.12	0.86	0.38	9.5	16	24
Cd	50	1.32	1.34	0.04	0.28	0.13	10.0	16	24
(鉱さいけい酸質肥料)									
S-SiO ₂	58	37.05	37.22	0.16	1.19	0.61	1.6	2.5	3.8
AL	71	37.57	36.95	0.25	2.21	1.06	2.9	2.5	3.8
S-CaO	57	29.53	29.46	0.26	1.15	0.99	3.3	2.5	3.8
S-MgO	57	5.27	5.24	0.03	0.31	0.10	1.8	4	6
C-MgO	69	4.43	4.36	0.04	0.45	0.19	4.3	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) As, Cdはmg/kg, その他の成分は%(質量分率)

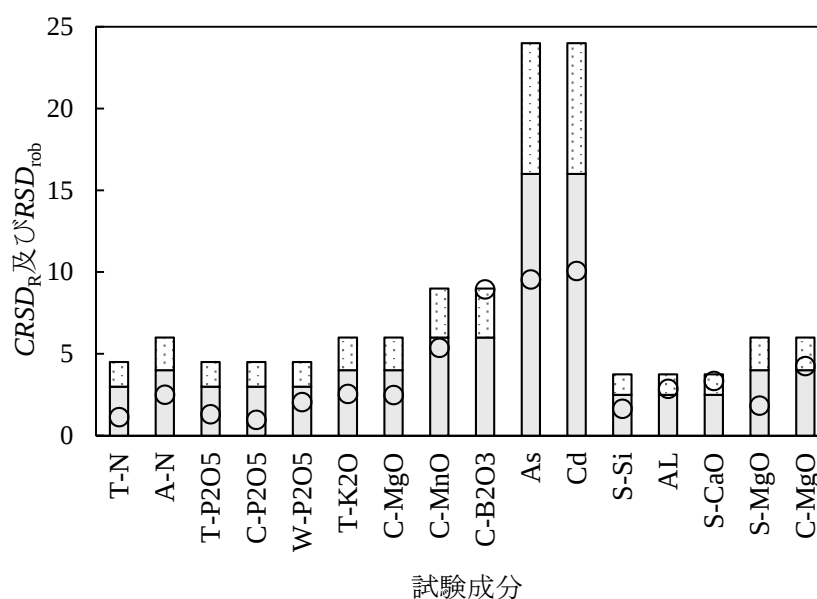
j) $CRSD_R$ は水分測定のような経験的分析法には適用できない。

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2006～2017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)}
	2017		126	3.45	0.17	4.9	- ^{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
	2017	有機質肥料	126	10.52	0.12	1.1	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できない。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
	2017	硫酸アンモニア, りん酸アンモニア	116	8.73	0.22	2.5	4	6.0
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
	2017	有機質肥料	121	15.25	0.20	1.3	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
	2017	りん酸アンモニア	115	14.63	0.14	1.0	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

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-P ₂ O ₅	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
	2017	りん酸アンモニア	118	10.77	0.22	2.0	3	4.5
T-K ₂ O	2017	有機質肥料, 塩化加里	113	9.02	0.23	2.5	4	6
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
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
	2017	副産苦土肥料	114	3.59	0.09	2.5	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
	2017	熔成微量元素複合肥料	107	0.28	0.02	5.4	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
	2017	熔成微量元素複合肥料	99	0.17	0.02	8.9	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)} (%)
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
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
	2017		41	3.96	0.38	9.5	16	24
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
	2017		50	1.34	0.13	10.0	16	24
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2006～2017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)} (%) ^{h)}	NIQR ^{b)} (%) ^{h)}	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
	2017	58	37.22	0.61	1.6	2.5	3.8
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
	2017	71	36.95	1.06	2.9	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
	2017	57	29.46	0.99	3.3	2.5	3.8

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

h) 質量分率

表5-2 (続き)

試験項目	実施年	参加 試験室数	Median ^{a)} (%) ^{h)}	NIQR ^{b)} (%) ^{h)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
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
	2017	57	5.24	0.10	1.8	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
	2017	69	4.36	0.19	4.3	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)} (%) ^{f)}	NIQR ^{b)} (%) ^{f)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	1.5×CRSD _R ^{e)} (%)
(化成肥料)							
Mois	乾燥器による乾燥減量法	123	3.45	0.17	5.0	-	-
T-N	ケルダール法	111	10.52	0.11	1.1	3	4.5
	燃焼法	15	10.44	0.13	1.2	3	4.5
A-N	蒸留法	112	8.73	0.21	2.4	4	6.0
T-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム 吸光光度法	109	15.26	0.20	1.3	3	4.5
	(抽出方法) ケルダール分解	79	15.29	0.16	1.0	3	4.5
	灰化－塩酸煮沸	14	15.08	0.41	2.7	3	4.5
	灰化－王水分解	16	15.26	0.13	0.9	3	4.5
C-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム 吸光光度法	114	14.63	0.14	1.0	3	4.5
W-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム 吸光光度法	117	10.77	0.22	2.1	3	4.5
T-K ₂ O	フレイム原子吸光法	82	9.06	0.22	2.4	4	6.0
	フレイム光度法	28	8.97	0.20	2.2	4	6.0
C-MgO	フレイム原子吸光法	106	3.59	0.09	2.4	4	6
C-MnO	フレイム原子吸光法	97	0.28	0.01	5.2	6	9.0
	ICP-OES法	7	0.28	0.01	3.4	6	9.0
C-B ₂ O ₃	アゾメチンH法	91	0.171	0.013	7.4	6	9
	ICP-OES法	6	0.135	0.006	4.5	6	9
As	水素化物発生原子吸光法	16	4.23	0.29	6.9	16	24
	ジエチルジチオカルバミン酸銀法	19	3.84	0.30	7.7	16	24
Cd	フレイム原子吸光法	44	1.34	0.11	8.6	16	24
(鉍さいけい酸質肥料)							
S-SiO ₂	ふっ化カリウム法	40	37.10	0.43	1.2	2.5	3.8
	過塩素酸法	16	37.30	0.72	1.9	2.5	3.8
AL	エチレンジアミン四酢酸塩法	12	42.27	3.97	9.4	2.5	3.8
	フレイム原子吸光法	53	36.77	0.68	1.9	2.5	3.8
S-CaO	フレイム原子吸光法	57	29.46	0.99	3.3	2.5	3.8
S-MgO	フレイム原子吸光法	53	5.23	0.09	1.7	4	6
C-MgO	フレイム原子吸光法	62	4.36	0.18	4.2	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) 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 $C-P_2O_5$ 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 $T-P_2O_5$ と $C-P_2O_5$ 等)である.

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.

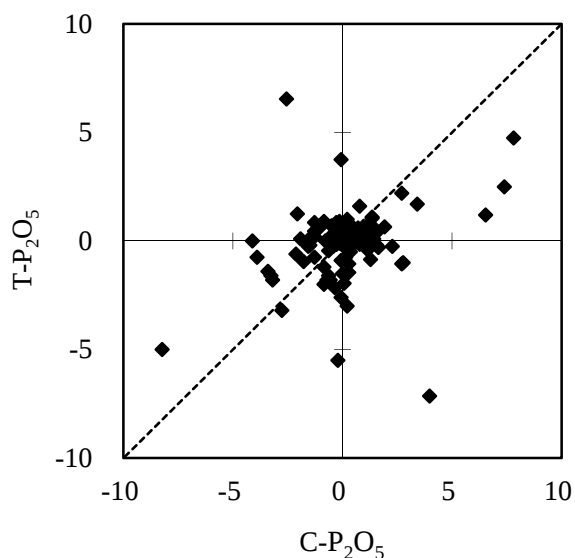


図2-1 化成肥料中の $T-P_2O_5$ － $C-P_2O_5$ の z スコアの関係

◆ 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)

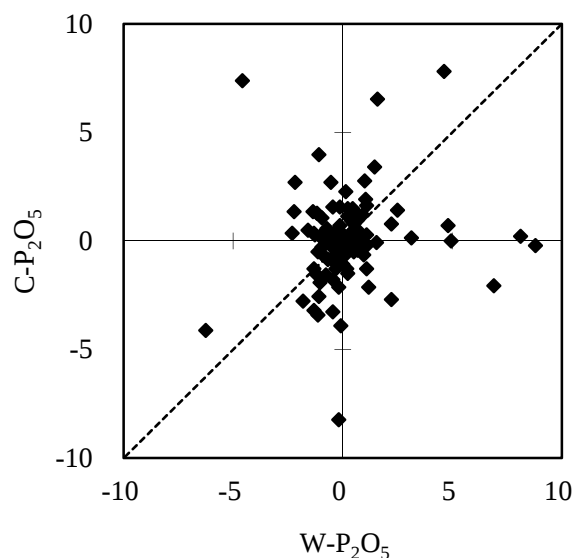


図2-2 化成肥料中の $C-P_2O_5$ － $W-P_2O_5$ の z スコアの関係

◆ 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)

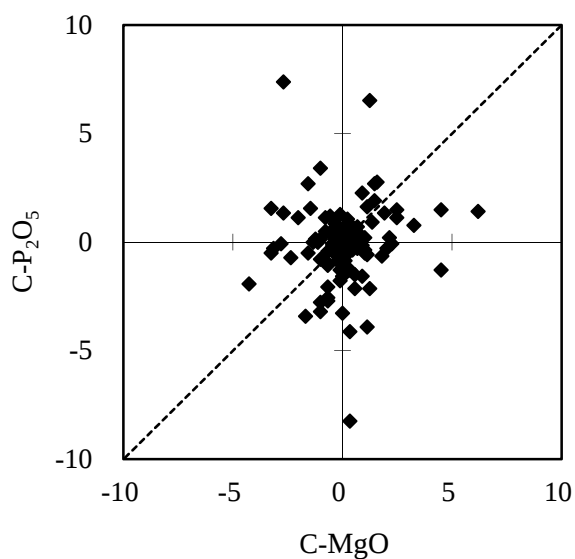


図2-3 化成肥料中のC-P₂O₅－C-MgOのzスコアの関係

◆ 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)

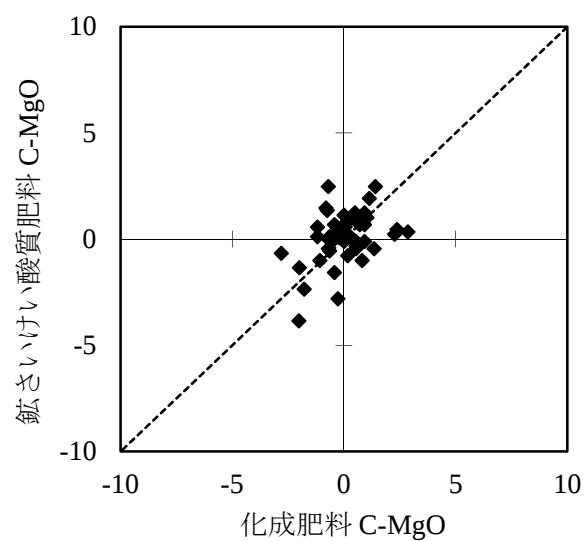


図2-4 化成肥料中及び鉬さいけい酸質肥料中のC-MgOのzスコアの関係

◆ 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)

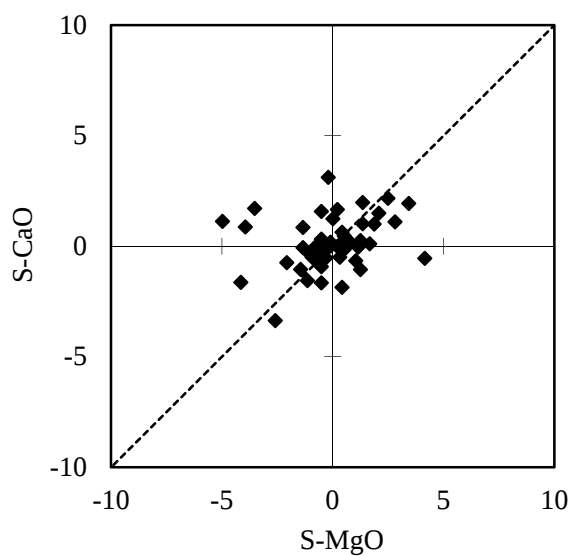


図2-5 鉬さいけい酸質肥料中のS-MgO－S-CaOのzスコアの関係

◆ 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)

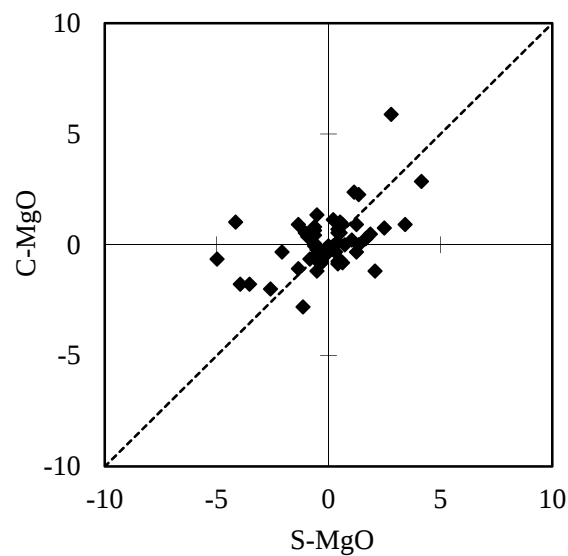


図2-6 鉬さいけい酸質肥料中のS-MgO－C-MgOのzスコアの関係

◆ 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 (Moist)

参加 126 試験室のうち, 123 試験室が乾燥器による乾燥減量法, 3 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. 平均値及び Median は 3.45 % (質量分率), NIQR は 0.17 % (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 107 試験室であった. 「不満足」と評価された試験室は全体の 7 % である 9 試験室が該当した. 水分測定の際は, 乾燥機内の温度分布は一定ではなく, 位置によっては実際の温度が設定温度と異なることがあるため, 強制循環式恒温乾燥器を使用することが望ましい. また, 装置内の気流により試料が飛散することがあるので留意されたい.

(2) 化成肥料中の窒素全量 (T-N)

参加 126 試験室のうち, 111 試験室がケルダール法, 15 試験室が燃焼法, 1 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 10.49 % (質量分率), Median は 10.52 % (質量分率), NIQR は 0.12 % (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 88 % となる 111 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 5 試験室がケルダール法, 2 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「不満足」と評価された試験室を除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.

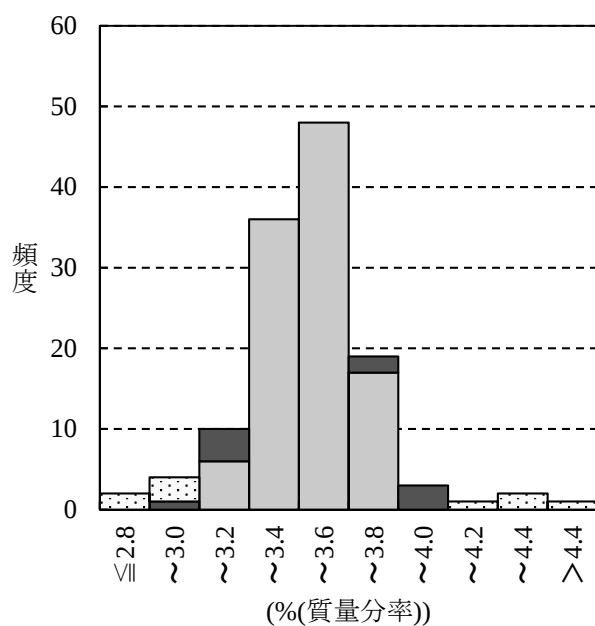


図3-1 化成肥料中の水分の分析成績

不満足 疑わしい 満足

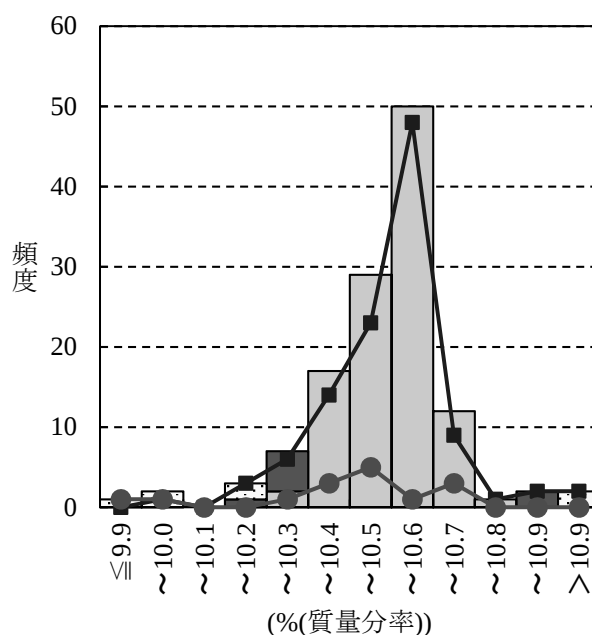


図3-2 化成肥料中の窒素全量の分析成績

不満足 疑わしい 満足
ケルダール法 燃焼法

(3) 化成肥料中のアンモニア性窒素 (A-N)

参加 116 試験室のうち, 1 試験室がホルムアルデヒド法, 112 試験室が蒸留法, 1 試験室が自動分析装置, 2

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8.74 % (質量分率), Medianは8.73 % (質量分率), NIQRは0.22 % 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86 %となる100試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の2 %である2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。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でよう注意する必要がある。また, 有機物を含む試料は, アルカリ剤に水酸化ナトリウムを使用すると, 有機物由来の窒素により高値となる場合があるので, アルカリ剤の選択に注意する必要がある。

(4) 化成肥料中のりん酸全量(T-P₂O₅)

参加121試験室のうち, 109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, 1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3-4に示す。平均値は15.21 % (質量分率), Medianは15.25 % (質量分率), NIQRは0.20 % (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103試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の10 %にあたる12試験室が該当し, これらはすべて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。試料溶液の調製方法について聞き取りを行ったところ, ケルダール分解で行った試験室は79試験室, 灰化-塩酸煮沸で行った試験室は14試験室, 灰化-王水分解で行った試験室は16試験室であった。試料溶液の調製方法を2方法間で平均値の差による検定を3種類行ったところ, いずれも有意水準5 %で有意な差は認められなかった。

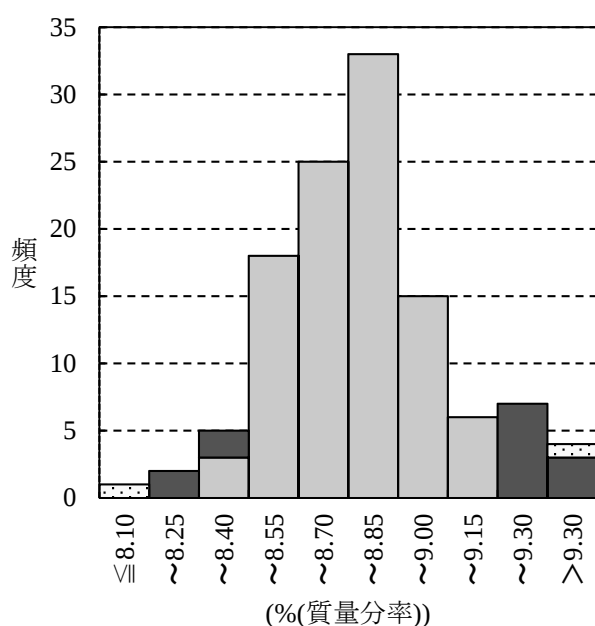


図3-3 化成肥料中のアンモニア性窒素の分析成績

● 不満足 ■ 疑わしい □ 満足

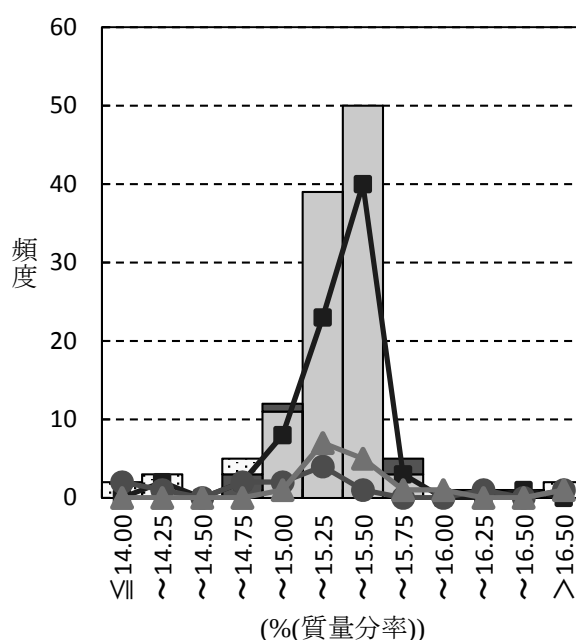


図3-4 化成肥料中のりん酸全量の分析成績

● 不満足 ■ 疑わしい □ 満足
 ■ ケルダール分解
 ● 灰化-塩酸煮沸 ▲ 灰化-王水分解

(5) 化成肥料中の可溶性りん酸(C-P₂O₅)

参加115試験室のうち, 114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3-5に示す。平均値は14.61 % (質量分率), Medianは14.63 % (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81%となる93試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の10%にあたる12試験室が該当し、これらはすべて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、試料液を硝酸で十分に煮沸すること、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留意されたい。

(6) 化成肥料中の水溶性りん酸(W-P₂O₅)

参加118試験室のうち、117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3-6に示す。平均値10.77%(質量分率)とMedian 10.77%(質量分率)、NIQRは0.22%(質量分率)であり、「満足」と評価された試験室は全体の84%であった。「不満足」と評価された試験室は全体の10%にあたる12試験室が該当し、これらはすべて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。

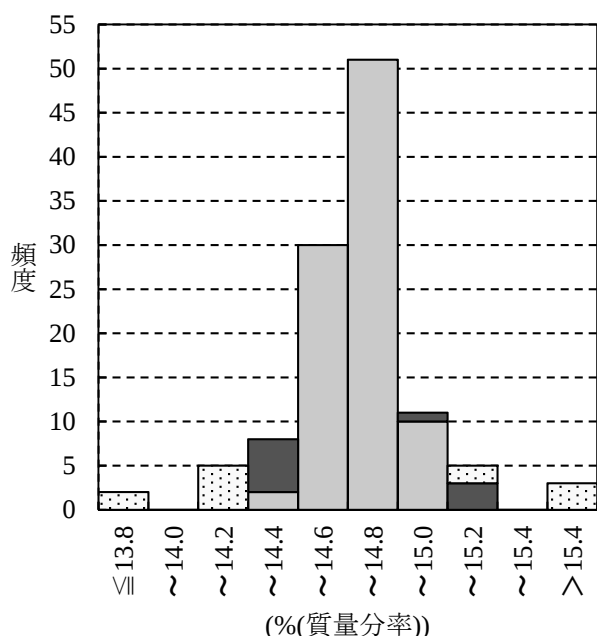


図3-5 化成肥料中のく溶性りん酸の分析成績

⋯ 不満足 ■ 疑わしい □ 満足

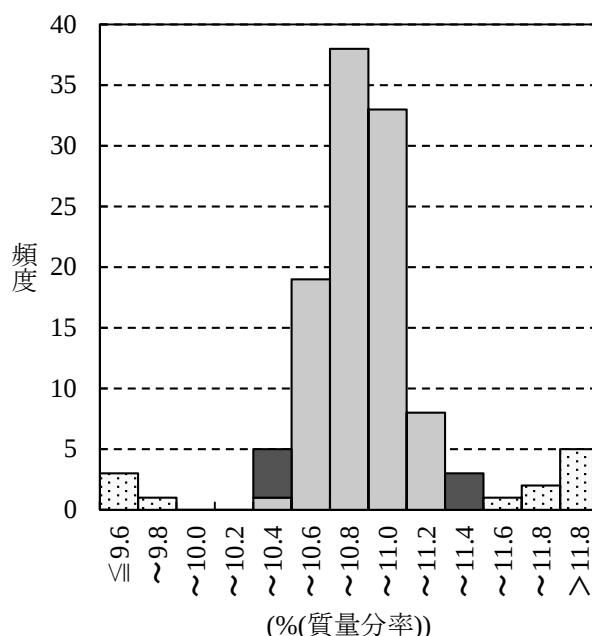


図3-6 化成肥料中の水溶性りん酸の分析成績

⋯ 不満足 ■ 疑わしい □ 満足

(7) 化成肥料中の加里全量(T-K₂O)

参加113試験室のうち、82試験室がフレイム原子吸光法、28試験室がフレイム光度法、2試験室がICP発光分光分析法、1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3-7に示す。平均値8.97%(質量分率)とMedian 9.02%(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83%であった。「不満足」と評価された試験室は全体の12%にあたる13試験室が該当し、内訳はフレイム光度法が1試験室、ICP発光分光分析法が2試験室及びICP質量分析法が1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%で有意な差は認められなかった。試料溶液の調製方法について聞き取りを行ったところ、灰化－塩酸煮沸で行った試験室は75試験室、灰化－王水分解で行った試験室は22試験室であった。これら試料溶液の調

製方法を平均値の差による検定を行ったところ、いずれも有意水準 5 % で有意な差は認められなかった。フレー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。また、定量には試料溶液の噴霧効率が影響するため、測定時には試料液及び標準液の温度、酸組成及び酸濃度を同一とすることが望ましい。

(8) 化成肥料中のく溶性苦土 (C-MgO)

参加 114 試験室のうち、106 試験室がフレーム原子吸光法、2 試験室が EDTA 法、5 試験室が ICP 発光分光分析法及び 1 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 3-8 に示す。平均値と Median とともに 3.59 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 82 % であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 8 % にあたる 9 試験室が該当し、内訳はフレーム原子吸光法が 7 試験室、EDTA 法が 1 試験室、ICP 発光分光分析法が 1 試験室であった。

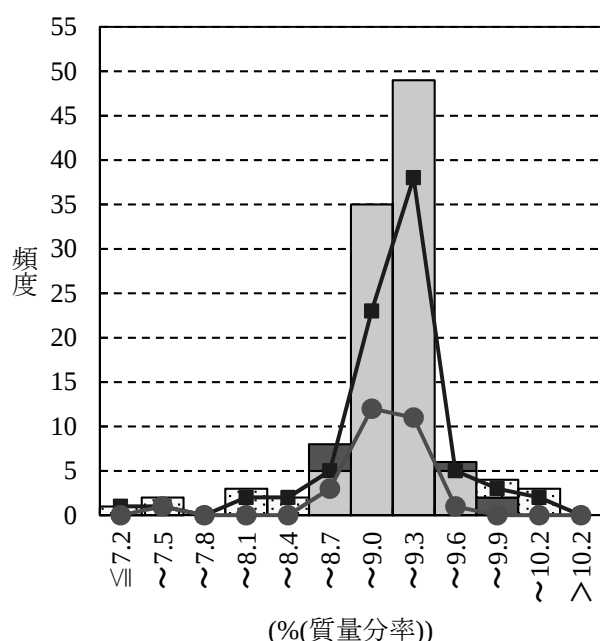


図3-7 化成肥料中の加里全量の分析成績

..... 不満足 ■ 疑わしい
 ■ 満足 ■ フレーム原子吸光法
 ● フレーム光度法

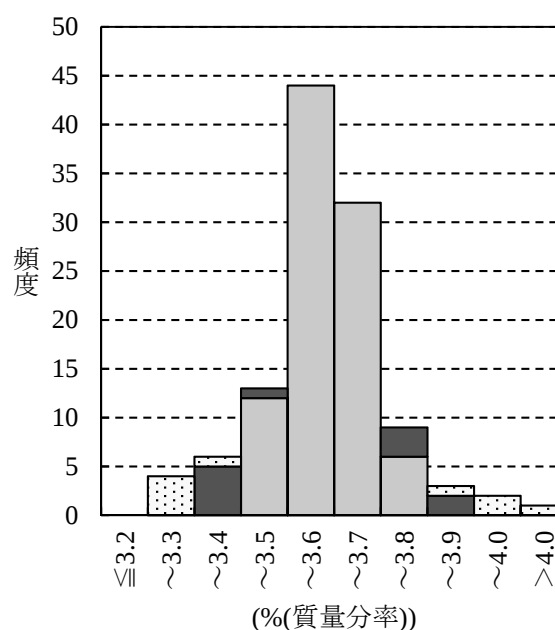


図3-8 化成肥料中のく溶性苦土の分析成績

..... 不満足 ■ 疑わしい ■ 満足

(9) 化成肥料中のく溶性マンガン (C-MnO)

参加 107 試験室のうち、97 試験室がフレーム原子吸光法、2 試験室が過よう素酸カリウム法、7 試験室が ICP 発光分光分析法及び 1 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 0.281 % (質量分率) と Median 0.283 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 90 % 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、すべてがフレーム原子吸光法であった。フレーム原子吸光法及び ICP 発光分光分析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) 化成肥料中のく溶性ほう素 (C-B₂O₃)

参加 99 試験室のうち, 91 試験室がアゾメチン H 法, 1 試験室がクルクミン法, 6 試験室が ICP 発光分光分析法, 1 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 3-10 に示す. 平均値と Median とともに 0.170 % (質量分率) であり, 「満足」と評価された試験室は全体の 82 % 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 6 試験室が該当し, すべてアゾメチン H 法であった. アゾメチン H 法及びその他の分析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 % で有意な差が認められた. また, 表 4 で示しているとおり RSD_{rob} は $CRSD_R$ の 1.5 倍値相当であった. 当該試料は有機物を含み, 試料溶液抽出時に着色がみられた. 発色させて定量を行うアゾメチン H 法が他の方法に比較し値が高く測定される傾向にあったことから, 試料溶液の着色が影響を及ぼしたと推察された.

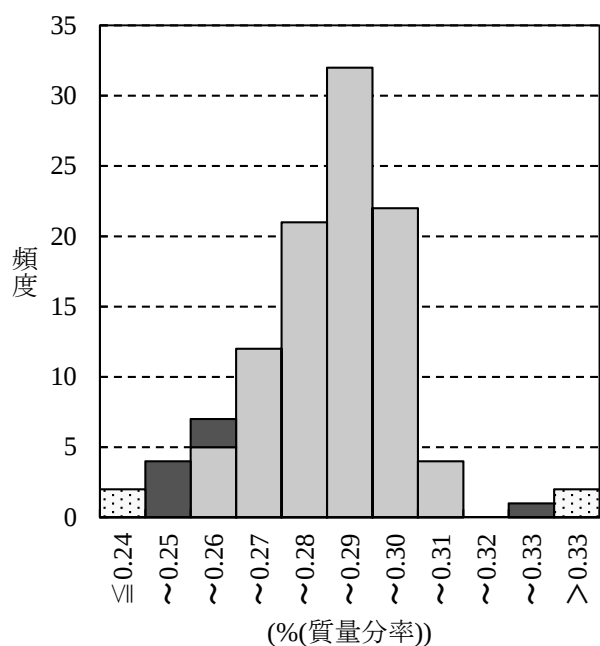


図3-9 化成肥料中のく溶性マンガンの分析成績

不満足 疑わしい 満足

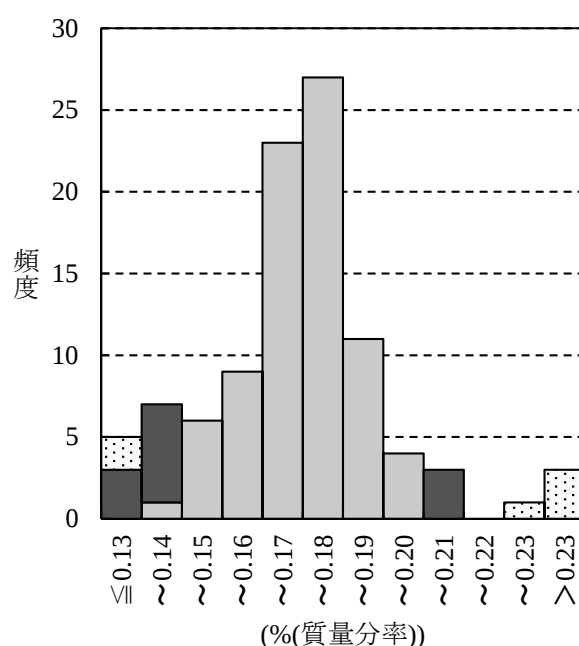


図3-10 化成肥料中のく溶性ほう素の分析成績

不満足 疑わしい 満足

(11) 化成肥料中のひ素 (As)

参加 41 試験室のうち, 16 試験室が水素化物発生原子吸光法, 19 試験室がジエチルジチオカルバミン酸銀法, 5 試験室が ICP 発光分光分析法, 1 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 3-11 に示す. 平均値は 4.03 mg/kg, Median は 3.96 mg/kg, NIQR は 0.38 mg/kg であり, 「満足」と評価された試験室は全体の 80 % となる 33 試験室であった. 「不満足」と評価された試験室は全体の 12 % にあたる 5 試験室が該当し, 水素化物発生原子吸光法が 2 試験室, ジエチルジチオカルバミン酸銀法, ICP 発光分光分析法及び ICP 質量分析法が各 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.

(12) 化成肥料中のカドミウム(Cd)

参加 50 試験室のうち、44 試験室がフレイム原子吸光法、5 試験室が ICP 発光分光分析法、1 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 3-12 に示す。平均値は 1.32 mg/kg, Median は 1.34 mg/kg, NIQR は 0.13 mg/kg であり、「満足」と評価された試験室は全体の 78 %となる 39 試験室であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 10 %にあたる 5 試験室が該当し、フレイム原子吸光法が 3 試験室、ICP 発光分光分析法及び ICP 質量分析法が各 1 試験室ずつであった。

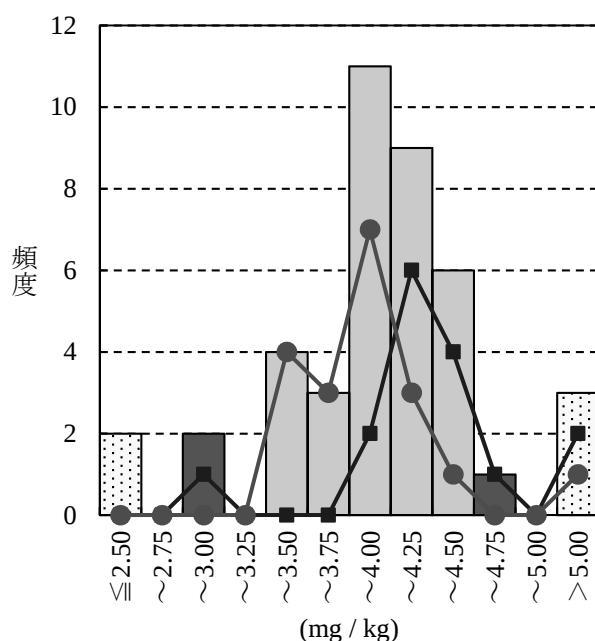


図3-11 化成肥料中のひ素の分析成績

..... 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

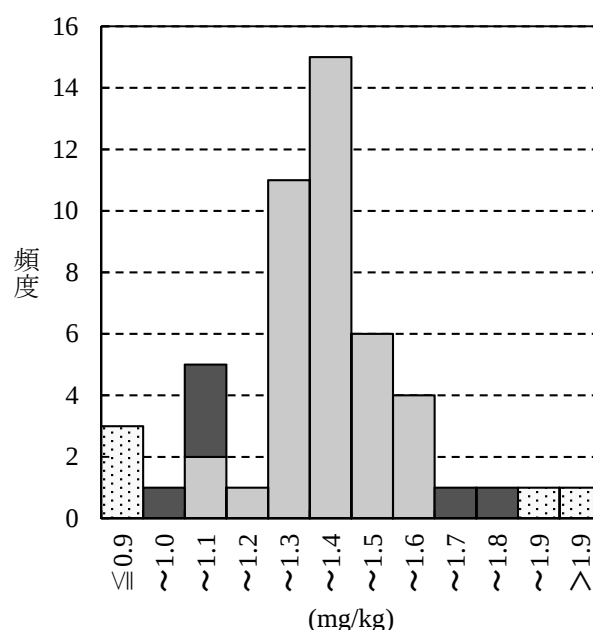


図3-12 化成肥料中のカドミウムの分析成績

..... 不満足 ■ 疑わしい ■ 満足

(13) 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、40 試験室がふっ化カリウム法、16 試験室が過塩素酸法、1 試験室が塩酸法、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 4-1 に示す。平均値 37.05 % (質量分率) と Median 37.22 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 88 %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 5 試験室であり、ふっ化カリウム法が 4 試験室、過塩素酸法が 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。

(14) 鉍さいけい酸質肥料中のアルカリ分(AL)

参加 71 試験室のうち、53 試験室がフレイム原子吸光法、12 試験室が EDTA 法、4 試験室が ICP 発光分光分析法、1 試験室が EDTA 法で測定した可溶性石灰とフレイム原子吸光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 37.57 % (質量分率), Median 36.95 % (質量分

率)であり、「満足」と評価された試験室は全体の 82 %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 8 試験室が該当し、7 試験室が EDTA 法を用い、フレイム原子吸光法を用いた試験室が 1 試験室であった。フレイム原子吸光法及び EDTA 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 %で有意な差が認められた。これは今回の試料として用いた鉍さいけい酸質肥料にく溶性マンガンの 9 %程度含まれていることが要因の一つと考えられる。

マンガンが含まれる試料を EDTA 法により分析する場合、カルシウムやマグネシウムと同様にマンガンも EDTA と反応しキレート化合物を生成するため、マンガンは高値の要因となる。肥料分析法では測定を行う前にペルオキシ二硫酸アンモニウム液を用いて取り除くか、滴定の際にシアン化カリウムを加えてマスキングを行なうとされており(以下「マスキング等処理」と記載)、注意が必要である。

実際 EDTA 法による分析のうち「疑わしい」「不満足」となった試験室について、マスキング等処理の詳細を聞き取ったところ、多くがそれらの処理が行われていなかった。

フレイム原子吸光法を用いた 57 試験室、EDTA 法を用いた 2 試験室及び ICP 発光分光分析法を用いた 3 試験室の合計 57 試験室から S-CaO を、フレイム原子吸光法を用いた 53 試験室、EDTA 法を用いた 1 試験室及び ICP 発光分光分析法を用いた 3 試験室の合計 57 試験室から S-MgO の分析値の報告を受けた。それらの試験成績の度数分布を図 4-3 及び図 4-4 に示す。S-CaO は平均値が 29.53 % (質量分率)、Median が 29.46 % (質量分率)であり、「不満足」と評価された試験室は全体の 4 %にあたる 2 試験室であった。一方、S-MgO の平均値が 5.27 % (質量分率)と Median が 5.24 % (質量分率)であり、「不満足」と評価された試験室は、全体の 12 %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。

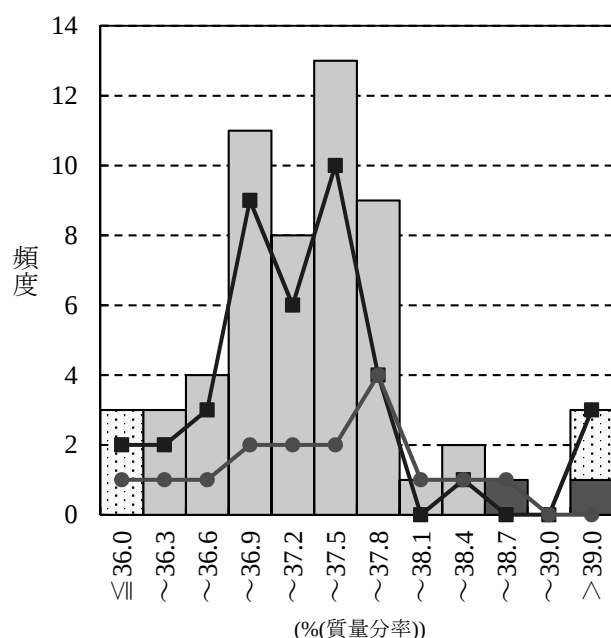


図4-1 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性けい酸の分析成績

..... 不満足
 ■ 満足
 ● 過塩素酸法
 ■ 疑わしい
 ■ ふっ化カリウム法

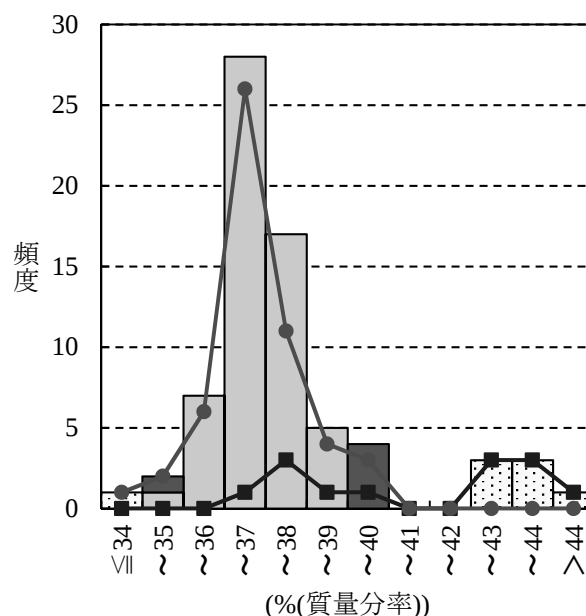


図4-2 鉍さいけい酸質肥料中のアルカリ分の分析成績

..... 不満足
 ■ 満足
 ● フレイム原子吸光法
 ■ 疑わしい
 ■ EDTA法

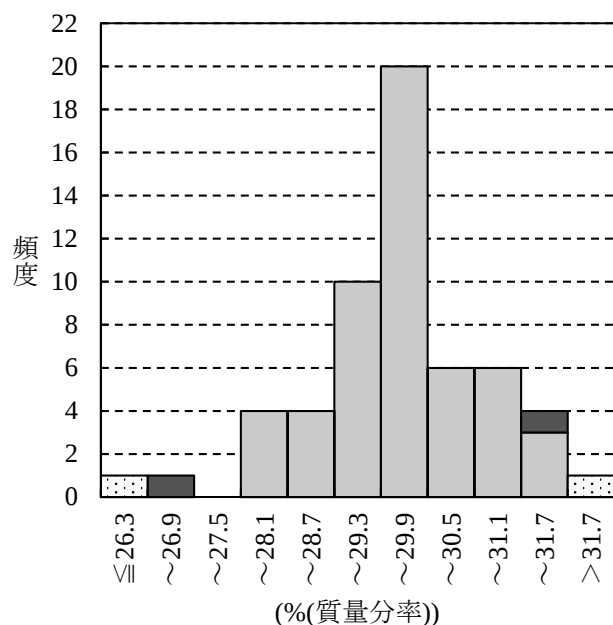


図4-3 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性石灰の分析成績

□ 不満足 ■ 疑わしい □ 満足

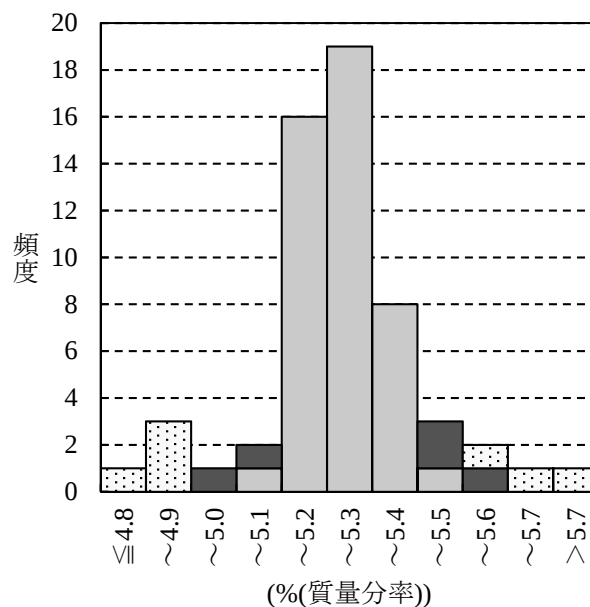


図4-4 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土の分析成績

□ 不満足 ■ 疑わしい □ 満足

(15) 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土(C-MgO)

参加 69 試験室のうち、62 試験室がフレイム原子吸光法を用い、3 試験室が EDTA 法、4 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 4-5 に示す。平均値が 4.43 % (質量分率) と Median が 4.36 % (質量分率) であり、「満足」と評価された試験室は全体の 90 % であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 3 % にあたる 2 試験室が該当し、いずれも EDTA 法であった。これは当該試料にマンガンが含まれており、アルカリ分と同様にマスキング等処理を行わずに高値になったと推察された。

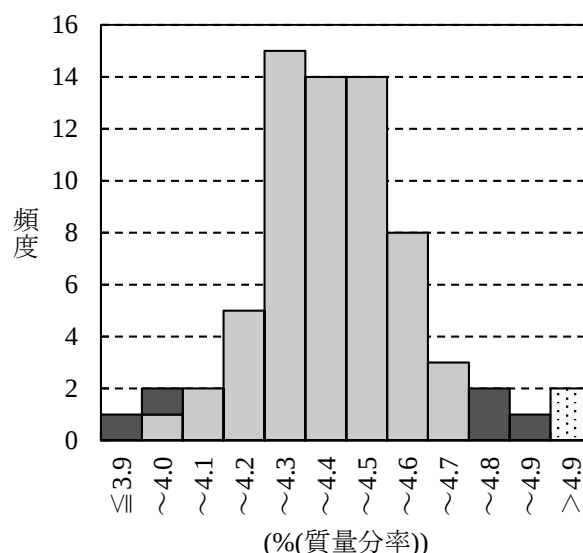


図4-5 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土の分析成績

□ 不満足 ■ 疑わしい □ 満足

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、昨年と同様に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、147 試験室(全体の 97 %)から回答があった。90 試験室(全体の 59 %)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、57 試験室(全体の 38 %)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 22 %)が認証標準物質、50 試験室(全体の 33 %)が過去の共通試料、13 試験室(全体の 9 %)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 49 試験室のうち、43 試験室は認証標準物質の使い方⁷⁾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 50 試験室のうち、46 試験室は 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や、肥料を用いて過去の分析値を統計処理して用いる事例が多いことがうかがえた。

また、試験成分毎に使用した内部品質管理試験の実施状況と今回実施した共通試料の z スコアを比較した結果を表 9 及び表 10 に示した。C-MnO、S-SiO₂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⁷⁾。

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	90	49	50	13
内部品質管理試験不実施	57	-	-	-
無回答	5	-	-	-

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
T-P ₂ O ₅ ・T-K ₂ O	りん酸二水素カリウム	理論値との比較
C-B ₂ O ₃	ほう酸	理論値との比較
C-MnO	過マンガン酸カリウム	理論値との比較
T-N・C-P ₂ O ₅ ・C-MgO	化成肥料	過去の平均値
T-K ₂ O	油かす	独自のzスコア
As・Cd	汚泥肥料	過去の分析値との比較
As	ひ素	添加回収率

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		不満足割合 (%)	処置限界範囲外 試験室 ^{a)}
		回答	不満足 ($ z \geq 3$)		
T-N	無	71	4	6	-
	有	55	3	5	5
A-N	無	65	2	3	-
	有	51	0	0	3
T-P ₂ O ₅	無	59	10	17	-
	有	55	2	4	3
C-P ₂ O ₅	無	59	9	15	-
	有	55	3	5	4
W-P ₂ O ₅	無	66	8	12	-
	有	54	4	7	5
T-K ₂ O	無	44	9	20	-
	有	71	4	6	1
C-MgO	無	61	6	10	-
	有	54	3	6	0
C-MnO	無	61	2	3	-
	有	54	2	4	2
C-B ₂ O ₃	無	61	6	10	-
	有	54	0	0	3
As	無	69	4	6	-
	有	22	1	5	1
Cd	無	25	4	16	-
	有	20	1	5	1

a) 内部品質管理試験結果が不適切(処置限界範囲外等)であった試験室.

表10 鉬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		不満足割合 (%)	処置限界範囲外 試験室 ^{a)}
		回答	不満足 ($ z \geq 3$)		
S-SiO ₂	無	26	2	8	-
	有	32	3	9	2
AL	無	43	6	14	-
	有	28	2	7	1
S-CaO	無	27	1	4	-
	有	30	1	3	1
S-MgO	無	27	2	7	-
	有	30	0	0	1
C-MgO	無	31	2	6	-
	有	38	0	0	1

a) 内部品質管理試験結果が不適切(処置限界範囲外等)であった試験室.

6) く溶性りん酸及び水溶性りん酸における活性炭処理の影響

今年度試験に用いた化成肥料は抽出を行うと着色が認められる。肥料等試験法のバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法によるく溶性りん酸及び水溶性りん酸の試験では、試料溶液が着色して定量に影響がある場合には活性炭を用いて処理を行うことが記載されている(以下「活性炭処理」と記載)。この活性炭処理の影響を表 11 に示した。

バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法でく溶性りん酸を分析した 114 試験室のうち活性炭処理が行われたのは 26 試験室であり、88 試験室では活性炭処理は行われなかった。活性炭処理の有無それぞれによる分析成績(「不満足」となった分析値を除く)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 5 % で差が認められた。活性炭処理を行なった場合の平均値は活性炭処理を行わなかった場合の平均値より低く、その差は 0.10 % であった。

同様にバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法で水溶性りん酸を分析した 117 試験室のうち 27 試験室で活性炭処理が行われ、90 試験室では活性炭処理は行われなかった。活性炭処理の有無それぞれによる分析成績(「不満足」となった分析値を除く)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 5 % で差が認められなかった。

表11 バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法を用いたく溶性りん酸及び水溶性りん酸における活性炭処理の影響

成分	活性炭処理あり		活性炭処理なし	
	試験室数 ^{a)}	平均値 ^{a)} (%)	試験室数 ^{a)}	平均値 ^{a)} (%)
く溶性りん酸	26	14.55 ^{b)}	88	14.65 ^{b)}
水溶性りん酸	27	10.73	90	10.77

a) 不満足($|z| \geq 3$)となった試験室及び分析値を除く。

b) t 検定により有意水準5 % で差が認められた。

6. 総 括

2017 年度外部精度管理のための共同試験は、化成肥料 12 成分に 140 試験室、鉬さいけい酸質肥料 3 成分に 73 試験室が参加した。各成分において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 % ~ 93 % , 「不満足 ($|z| \geq 3$)」と評価された試験室の割合は 3 % ~ 12 % 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、アルカリ(AL)において EDTA 法とフレイム原子吸光法の方法間で有意な差が認められた。これは鉬さいけい酸質肥料にマンガンが含まれていることが要因と考えられた。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、ジェイカムアグリ株式会社小名浜工場及び新日本電工株式会社日高工場の関係者各位に深く感謝致します。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2017): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2018, 「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) 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>
- 7) 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 2017

Satoko SAKAIDA¹, Hisanori ARAYA², Toshiaki HIROI³, Takao YAMAOKA⁴, Masayuki YAMANISHI⁵,
Erika HIRATA⁶, Yuji SHIRAI¹, Norio HIKICHI⁷, and Toshiaki IMAGAWA⁷

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

(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo 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 Japan Fertilizer and Feed Inspection Association

A proficiency testing of analytical laboratories was conducted in fiscal year 2017, 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), total phosphorus (T-P₂O₅), citric acid-soluble phosphorus (C-P₂O₅), water-soluble phosphorus (W-P₂O₅), total potassium (T-K₂O), citric acid-soluble magnesium (C-MgO), citric acid-soluble manganese (C-MnO), citric acid-soluble boron (C-B₂O₃), arsenic (As), cadmium (Cd) 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 140 participants which received a ground compound fertilizer sample, 41~126 results were returned for each element. From the 73 participants which received a silicate slag fertilizer sample, 57~69 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 %~93 % 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 1 element (AL).

Key words proficiency testing, compound fertilizer, silicate slug fertilizer, ISO/IEC 17043, z score

(Research Report of Fertilizer, **11**, 129~158, 2018)

11 2017年度 肥料認証標準物質の開発

― 高度化成肥料 FAMIC-A-17 の調製 ―

秋元里乃¹, 小塚健志², 坂井田里子², 伊藤浩平³,
中村信仁², 橋本良美², 白井裕治²

キーワード 認証標準物質, 高度化成肥料, 主成分, ISO/IEC Guide 31,
ISO/IEC Guide 35, 共同試験

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, 安全な肥料の流通を確保するために立入検査を実施し, その際に収去した肥料の主成分及び有害成分の分析を実施しているが, これらの分析を行うにあたり試験法の信頼性確保が求められている. 従前より, 肥料生産事業場の品質管理室, 生産事業場からの分析依頼を受けた分析機関, 肥料検査機関等の試験室では, 試験成績の信頼性維持及び分析技術の向上のため, 管理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, 更に共通試料を用いた試験室間の共同試験に参加して外部精度管理を実施している. 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 17025:2017(JIS Q17025:2018)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. その要求事項において「認証標準物質の定期的な使用」及び「試験所間の比較又は技能試験プログラムへの参加」が推奨されている.

現在, FAMIC においては, 肥料認証標準物質 A(高度化成肥料), 肥料認証標準物質 B(普通化成肥料)及び肥料認証標準物質 C(汚泥発酵肥料)を調製・販売しており, 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)³⁾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)⁴⁾を参考に解析を行った上で ISO Guide 31:2000(JIS Q 0031:2002)⁵⁾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. 2017年度は新たに肥料認証標準物質 A(FAMIC-A-17)を調製し, その主要な成分等について 16 試験室で共同試験を実施し, 認証値の値付けをしたので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 基材の選定

肥料認証標準物質 A の基材として, リン酸アンモニア, 硫酸アンモニア, 尿素, 塩化加里, 軽焼マグネシア, ほう酸塩肥料及び熔成微量元素複合肥料を原料として製造された市販の高度化成肥料を用いた. 基材の選定にあたっては, 尿素を使用し, アンモニア及び硫酸を添加して造粒していることを確認し選定した.

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 (現)農林水産省関東農政局

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 肥飼料安全検査部 (現)農薬検査部

2) 認証標準物質候補の調製

購入した肥料は、FAMIC 肥飼料安全検査部肥料調製室においてハンマー式粉砕機(目開き 1 mm)で粉砕した後、超遠心粉砕機(目開き 500 μm)で粉砕した。その後、目開き 500 μm ふるいを通過させた。基材選定時と成分量が大きく変動していないことを確認後、よく混合し均質化し、約 140 g ずつ褐色ガラス瓶に小分けし、密封した。

3) 試験項目

平成 28 年度肥料認証標準物質調製部会において協議し、表 1 の 11 成分を試験項目とした。

表 1 肥料認証標準物質候補 A の試験成分及び試験法

試験成分	試験項目 番号 ^{a)}	試験法の概要	
		試料溶液調製方法等	測定方法
水分 (H_2O)	3.1.a	—	乾燥器による乾燥減量法
窒素全量 (T-N)	4.1.1.a	ケルダール硫酸分解	蒸留法-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.a	—	蒸留法-中和滴定法
	4.1.2.b	塩化カリウム溶液抽出	ホルムアルデヒド法-中和滴定法
	備考6.		
く溶性りん酸 ($\text{C-P}_2\text{O}_5$)	4.2.3.a	2 % くえん酸溶液抽出	バナドモリブデン酸 アンモニウム吸光光度法
く溶性加里 ($\text{C-K}_2\text{O}$)	4.3.2.a	2 % くえん酸溶液抽出	フレイム原子吸光法 又は フレイム光度法
く溶性苦土 (C-MgO)	4.6.2.a	2 % くえん酸溶液抽出	フレイム原子吸光法
く溶性マンガン (C-MnO)	4.7.2.a	2 % くえん酸溶液抽出	フレイム原子吸光法
く溶性ほう素 ($\text{C-B}_2\text{O}_3$)	4.8.1.a	2 % くえん酸溶液抽出	アゾメチンH法
水溶性ほう素 ($\text{W-B}_2\text{O}_3$)	4.8.2.a	煮沸抽出	アゾメチンH法
尿素性窒素 (U-N)	6.3.b	水抽出	高速液体クロマトグラフ法
ビウレット性窒素 (B-N)	5.10.a	水抽出	高速液体クロマトグラフ法

a) 肥料等試験法(2016)の試験項目番号

4) 分析方法

各試験項目の試験法として肥料等試験法⁶⁾(表 1)を用いた。アンモニア性窒素については尿素入り肥料であるため、分析方法の選択としてはホルムアルデヒド法を選択すべきところであるが、ホルムアルデヒドの使用は忌避される(労働安全衛生法により特定業務従事者の健康診断が義務づけ)ことを考慮し、蒸留法でも実施した。

5) 均質性確認試験

IUPAC の技能試験プロトコル⁷⁾の均質性試験に従い、認証標準物質候補 A(400 本)からランダムに 10 試料を抜き取って均質性確認試験用試料とし、それぞれの試験項目を 2 点併行でランダムな順序で試験して均質性確認試験の成績とした。なお、窒素全量については燃焼法で、アンモニア性窒素についてはホルムアルデヒド法で実施した。

6) 共同試験

本標準物質の認証値設定のため、FAMIC 6 試験室、公益財団法人日本肥糧検定協会 2 試験室の他、肥料品質保全協議会主催「平成 27 年度全国共通試料による分析」に参加し、満足する成績を修めていた 8 分析室に協力を願い、全部で 16 試験室による共同試験を実施した。各試験室に共同試験用試料(製品と同様品)を 2 本配付し、それぞれの試料について日を変えて 3 点併行で試験を実施した。報告値は、C-MnO、C-B₂O₃ 及び W-B₂O₃ は小数第 4 位を四捨五入して小数第 3 位まで、ビウレット性窒素は小数第 5 位を四捨五入して小数第 4 位まで、それ以外の成分については小数第 3 位を四捨五入して小数第 2 位までに丸めることとした。

・共同試験参加試験室(五十音順)

エムシー・ファーターイコム株式会社 いわき工場

エムシー・ファーターイコム株式会社 宇部工場

小野田化学工業株式会社 新潟工場

片倉コープアグリ株式会社 関西支店姫路工場

コープエンジニアリング株式会社 新潟分析センター

公益財団法人 日本肥糧検定協会 関西支部

公益財団法人 日本肥糧検定協会 本部

ジェイカムアグリ株式会社 富士工場

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 仙台センター

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 本部

日東エフシー株式会社 名古屋工場

北海道肥料株式会社 室蘭工場

3. 結果及び考察

1) 均質性確認試験

均質性確認試験の成績及びその成績の一元配置による分散分析等から得られた統計量を表 2 に示した。Cochran 検定(上側危険率 1 %)による外れ値はすべての成分において認められなかった。

次に、一元配置による分散分析の *F* 検定(片側有意水準 5 %)を実施した結果、すべての成分について試料間に有意な差は認められなかった⁷⁾。水分を除いた併行相対標準偏差は 0.5 %~4.6 %であった。

表 2 均質性確認試験の結果

試験成分	試料数 ^{a)}	平均値 ^{b)} (%) ^{k)}	s_r ^{c)} (%) ^{k)}	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%) ^{k)}	s_{b+r} ^{g)} (%) ^{k)}	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	F 値 ^{i),j)}
水分 (H ₂ O)	10 (0)	1.33	0.26	19.8	2	0	0.26	19.8	0.43
窒素全量 (T-N)	10 (0)	14.03	0.07	0.5	1.5	0	0.07	0.5	0.57
アンモニア性窒素 (A-N)	10 (0)	11.32	0.05	0.4	1.5	0	0.05	0.4	0.79
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	10 (0)	13.30	0.07	0.5	1.5	0	0.07	0.5	0.44
く溶性加里 (C-K ₂ O)	10 (0)	14.34	0.20	1.4	1.5	0	0.20	1.4	0.65
く溶性苦土 (C-MgO)	10 (0)	3.70	0.04	1.0	2	0	0.04	1.0	0.59
く溶性マンガン (C-MnO)	10 (0)	0.355	0.015	4.2	3	0	0.01	4.2	0.65
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	10 (0)	0.561	0.026	4.6	3	0.01	0.03	4.9	1.29
水溶性ほう素 (W-B ₂ O ₃)	10 (0)	0.467	0.008	1.7	3	0	0.01	1.7	0.24
尿素性窒素 (U-N)	10 (0)	2.27	0.02	0.8	4	0.01	0.02	0.8	1.25
ビウレット性窒素 (B-N)	10 (0)	0.0078	0.0001	1.3	6	0	0.0001	1.3	0.63

a) 外れ値除外後の試料数,

() の値は Cochran 検定により外れ値となった試料数

b) 総平均値 (外れ値除外後の試料数×2点併行分析)

c) 併行標準偏差

d) 併行相対標準偏差

e) 併行相対標準偏差の目安

f) 試料間標準偏差

g) 併行精度を含む試料間標準偏差

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

h) 併行精度を含む試料間相対標準偏差

i) 一元配置分散分析により算出された分散比

j) F 境界値; $F(9,10;0.05)=3.02$

k) 質量分率

2) 共同試験成績

各試験室から報告された共同試験成績を表 3 に示した。2 試験方法についての方法間比較を窒素全量について行ったところ、 F 検定により等分散であることを確認し、 t 検定により有意差が認められなかったため、2 方法の結果を合わせて解析することとした。一方、アンモニア性窒素については、2 試験方法間の分散は等分散ではなかったが、等分散でないと仮定した t 検定を行い有意差は認められなかった。そのため、アンモニア性窒素についても 2 試験方法の結果を合わせて解析することとした。

各試験項目の試験成績について ISO 5725-2:1994 (JIS Z 8402-2:1999)⁸⁾を参考に統計処理することとし、試験成績の外れ値を検出するために、Cochran 検定及び Grubbs 検定を実施し、有意水準 1 % の外れ値を除外した。

Cochran 検定での棄却数は参加試験室の 2/9 まで⁹⁾とした。また、ビウレット性窒素については分析値 (含有量) が定量下限付近であったため参考値とし、Cochran 検定による棄却を行わなかった。その後 Grubbs 検定を行ったが、シングル Grubbs 検定、ペア Grubbs 検定のいずれでも除外される試験室はなかった。

表 3 共同試験成績

(質量分率%)

試験項目	試験室 ^{a)}	一回目			二回目		
		測定値	測定値	測定値	測定値	測定値	測定値
水分	A	1.15	1.16	1.15	1.17	1.14	1.16
	B	1.36	1.36	1.31	1.42	1.46	1.43
	C	1.14	1.18	1.16	1.03	1.04	1.04
	D	1.23	1.26	1.25	1.21	1.24	1.27
	E	1.24	1.17	1.19	1.27	1.22	1.18
	F	1.64	1.61	1.73	1.68	1.76	1.83
	G	1.66	1.60	1.78	1.53	1.45	1.64
	H	1.40	1.38	1.37	1.54	1.60	1.59
	I	1.75	1.78	1.76	1.52	1.54	1.56
	J	2.11	2.07	2.03	1.94	1.75	1.95
	K	1.56	1.56	1.63	1.67	1.64	1.67
	L	1.30	1.22	1.25	1.04	1.03	1.06
	M	1.56	1.61	1.48	1.54	1.47	1.40
	N	1.46	1.61	1.50	1.40	1.45	1.39
	O	1.76	1.76	1.76	1.87	1.74	1.75
	P	1.13	1.59	1.15	1.70	1.64	1.56 ^{b)}
窒素全量	A	14.11	14.07	13.96	14.03	14.03	13.99
	B	14.31	14.32	14.28	14.37	14.33	14.40
	C	13.93	13.94	13.94	13.87	13.87	13.87
	D	14.13	14.15	14.16	14.13	14.17	14.21
	E	14.24	14.23	14.17	14.25	14.26	14.32
	F	14.08	14.12	14.08	14.08	14.11	14.10
	G	14.21	14.13	14.12	14.15	14.16	14.17
	H	14.10	14.12	14.09	14.11	14.12	14.13
	I	14.02	14.11	14.00	14.07	14.01	13.99
	J	14.09	14.09	14.09	14.08	14.15	14.07
	K	13.55	13.70	13.20	12.83	13.10	13.10 ^{b)}
	L	14.03	14.03	13.92	14.04	14.01	14.08
	M	14.05	13.99	13.99	13.97	13.95	13.97
	N	14.20	13.76	13.80	13.94	14.09	14.07 ^{b)}
	O	14.03	14.06	14.04	14.03	14.01	14.01
	P	13.81	13.71	14.05	14.01	14.12	14.11 ^{b)}
	K*	14.20	14.20	14.02	14.08	14.06	14.09
	L*	14.15	14.21	14.22	14.16	14.12	14.15
	M*	13.95	14.04	14.15	14.06	14.00	14.11
	N*	14.21	14.16	14.17	14.13	14.20	14.18
	O*	13.88	13.83	13.76	13.65	13.61	13.73
	P*	14.15	14.00	13.90	14.01	14.63	14.50 ^{b)}

a) 共同試験に参加した試験室の記号(順不同)

* 試験室は窒素全量をケルダール法の他に燃焼法で、アンモニア性窒素をホルムアルデヒド法の他に蒸留法で分析を実施した試験室

b) コクラン検定による外れ値

表 3 続き

試験項目	試験室 ^{a)}	一回目			二回目		
		測定値	測定値	測定値	測定値	測定値	測定値
アンモニア性窒素	A	11.92	11.99	12.04	12.00	11.99	12.00
	B	11.41	11.54	11.54	11.45	11.52	11.45
	C	11.56	11.49	11.52	11.73	11.68	11.70
	D	11.73	11.71	11.76	11.80	11.79	11.77
	E	11.90	11.91	11.82	11.93	11.93	11.99
	F	11.75	11.81	11.73	11.71	11.68	11.76
	G	11.60	11.63	11.63	11.65	11.70	11.65
	H	11.67	11.69	11.68	11.68	11.70	11.69
	I	11.76	11.80	11.77	11.82	11.85	11.75
	J	12.17	12.17	12.21	12.10	12.16	12.11
	K	12.03	12.06	12.09	12.12	12.03	12.02
	L	11.47	11.46	11.47	11.44	11.45	11.45
	M	11.69	11.66	11.69	11.66	11.64	11.69
	N	11.62	11.59	11.66	11.63	11.67	11.61
	O	11.56	11.50	11.62	11.88	11.73	11.86
	P	11.31	11.24	11.35	11.66	11.65	11.68
	A*	11.70	11.62	11.67	11.65	11.66	11.65
	K*	11.50	11.70	11.70	11.50	11.60	11.60
	L*	11.65	11.65	11.64	11.74	11.81	11.69
	M*	11.83	11.82	11.73	11.75	11.65	11.73
	N*	11.58	11.62	11.56	11.41	11.71	11.65
	O*	11.54	11.57	11.50	11.64	11.62	11.66
	P*	11.68	11.55	11.52	11.76	11.67	11.69
く溶性りん酸	A	13.24	13.25	13.22	13.21	13.21	13.20
	B	13.12	13.49	13.23	13.62	13.48	13.53
	C	13.34	13.37	13.37	13.32	13.35	13.33
	D	13.31	13.29	13.25	13.33	13.27	13.28
	E	13.27	13.23	13.24	13.22	13.23	13.26
	F	13.20	13.23	13.36	13.30	13.32	13.35
	G	13.28	13.46	13.33	13.42	13.34	13.34
	H	13.26	13.27	13.22	13.21	13.19	13.21
	I	13.28	13.19	13.24	13.26	13.31	13.22
	J	13.61	13.53	13.43	13.63	13.37	13.41
	K	13.48	13.49	13.49	13.36	13.38	13.28
	L	13.38	13.21	13.40	13.33	13.27	13.31
	M	13.36	13.45	13.38	13.44	13.43	13.31
	N	13.21	13.13	13.26	13.35	13.44	13.17
	O	13.41	13.50	13.37	13.24	13.39	13.33
	P	13.24	13.26	13.36	13.24	13.29	13.23

b)

b)

b)

表 3 続き

試験項目	試験室 ^{a)}	一回目			二回目		
		測定値	測定値	測定値	測定値	測定値	測定値
＜溶性加里＞	A	13.89	13.88	13.85	13.83	13.83	13.94
	B	14.51	14.52	14.39	14.14	14.17	14.25
	C	13.62	13.68	13.65	13.68	13.67	13.65
	D	14.10	13.86	13.75	13.92	13.81	13.82
	E	13.70	13.72	13.77	13.78	13.87	13.70
	F	14.06	14.14	14.01	13.94	13.96	14.11
	G	14.15	14.11	14.01	13.96	13.98	14.05
	H	13.83	13.78	13.81	13.52	13.53	13.50
	I	13.78	13.93	13.80	13.86	13.85	13.84
	J	13.98	13.90	13.83	13.99	13.86	13.83
	K	14.02	14.00	13.74	13.69	14.23	13.72
	L	14.20	14.38	14.20	14.08	13.98	13.93
	M	14.24	14.12	14.28	14.11	14.19	14.22
	N	13.66	13.91	13.71	14.21	13.82	13.70
	O	13.93	13.92	13.82	13.93	13.96	14.03
	P	14.05	14.52	14.58	14.26	14.43	14.37
＜溶性苦土＞	A	3.60	3.59	3.62	3.61	3.56	3.62
	B	3.42	3.39	3.39	3.43	3.41	3.39
	C	3.61	3.63	3.64	3.59	3.65	3.62
	D	3.47	3.43	3.49	3.35	3.44	3.53
	E	3.58	3.54	3.55	3.58	3.52	3.54
	F	3.50	3.43	3.42	3.47	3.46	3.46
	G	3.52	3.45	3.44	3.61	3.57	3.57
	H	3.54	3.54	3.52	3.53	3.57	3.52
	I	3.54	3.56	3.51	3.61	3.51	3.62
	J	3.71	3.69	3.74	3.63	3.60	3.61
	K	3.61	3.54	3.61	3.49	3.54	3.51
	L	3.55	3.59	3.62	3.59	3.57	3.54
	M	3.51	3.57	3.51	3.52	3.51	3.53
	N	3.44	3.45	3.44	3.46	3.42	3.52
	O	3.53	3.47	3.50	3.60	3.57	3.61
	P	3.67	3.74	3.72	3.64	3.64	3.61

表 3 続き

試験項目	試験室 ^{a)}	一回目			二回目		
		測定値	測定値	測定値	測定値	測定値	測定値
く溶性 マンガン	A	0.297	0.301	0.300	0.303	0.301	0.298
	B	0.317	0.319	0.320	0.319	0.319	0.317
	C	0.334	0.340	0.340	0.332	0.334	0.333
	D	0.325	0.316	0.317	0.324	0.322	0.320
	E	0.329	0.323	0.325	0.319	0.318	0.327
	F	0.303	0.295	0.301	0.295	0.306	0.298
	G	0.305	0.311	0.304	0.314	0.306	0.313
	H	0.296	0.290	0.293	0.290	0.294	0.292
	I	0.320	0.321	0.323	0.309	0.311	0.311
	J	0.313	0.315	0.315	0.311	0.318	0.318
	K	0.318	0.314	0.310	0.310	0.309	0.319
	L	0.333	0.322	0.328	0.324	0.331	0.324
	M	0.318	0.319	0.324	0.321	0.321	0.320
	N	0.314	0.316	0.324	0.296	0.299	0.299 ^{b)}
	O	0.298	0.296	0.297	0.293	0.297	0.301
	P	0.335	0.368	0.382	0.318	0.328	0.326 ^{b)}
く溶性 ほう素	A	0.554	0.566	0.554	0.556	0.562	0.558
	B	0.568	0.568	0.561	0.542	0.553	0.538
	C	0.571	0.565	0.567	0.577	0.573	0.574
	D	0.556	0.555	0.560	0.563	0.565	0.563
	E	0.547	0.539	0.530	0.515	0.531	0.522
	F	0.549	0.546	0.547	0.537	0.543	0.549
	G	0.548	0.548	0.552	0.563	0.566	0.563
	H	0.530	0.528	0.530	0.533	0.530	0.530
	I	0.500	0.498	0.491	0.500	0.493	0.491
	J	0.553	0.551	0.549	0.563	0.555	0.558
	K	0.573	0.575	0.572	0.566	0.563	0.491 ^{b)}
	L	0.566	0.564	0.561	0.550	0.550	0.550
	M	0.603	0.578	0.597	0.582	0.573	0.588
	N	0.566	0.572	0.567	0.582	0.583	0.583
	O	0.570	0.554	0.558	0.588	0.566	0.553
	P	0.561	0.561	0.573	0.568	0.570	0.573

表 3 続き

試験項目	試験室 ^{a)}	一回目			二回目		
		測定値	測定値	測定値	測定値	測定値	測定値
水溶性 ほう素	A	0.445	0.436	0.444	0.444	0.444	0.447
	B	0.454	0.474	0.461	0.462	0.461	0.470
	C	0.448	0.455	0.450	0.452	0.457	0.453
	D	0.458	0.460	0.455	0.456	0.445	0.444
	E	0.460	0.466	0.466	0.460	0.454	0.463
	F	0.443	0.444	0.451	0.445	0.455	0.453
	G	0.464	0.465	0.470	0.462	0.469	0.466
	H	0.454	0.456	0.458	0.454	0.452	0.457
	I	0.433	0.427	0.429	0.424	0.425	0.424
	J	0.433	0.443	0.429	0.462	0.464	0.454
	K	0.445	0.447	0.445	0.446	0.444	0.438
	L	0.430	0.433	0.437	0.444	0.442	0.444
	M	0.462	0.460	0.455	0.459	0.463	0.456
	N	0.440	0.444	0.448	0.462	0.458	0.466
	O	0.433	0.436	0.421	0.437	0.437	0.440
	P	0.470	0.456	0.466	0.474	0.460	0.467
尿素性窒素	E	2.03	2.01	2.01	2.00	2.04	2.05
	F	2.50	2.71	2.53	2.44	2.43	2.46
	G	2.25	2.22	2.24	2.23	2.25	2.24
	J	2.26	2.18	2.33	2.19	2.22	2.27
	K	2.35	2.37	2.35	2.37	2.36	2.34
	L	2.21	2.19	2.23	2.27	2.24	2.30
	M	2.25	2.24	2.25	2.24	2.23	2.25
	N	2.16	2.27	2.28	2.15	2.13	2.15
	O	2.27	2.29	2.28	2.21	2.22	2.21
	P	2.27	2.26	2.26	2.54	2.36	2.33
ビウレット性 窒素	E	0.0086	0.0087	0.0085	0.0086	0.0085	0.0084
	F	0.0036	0.0036	0.0036	0.0037	0.0037	0.0036
	G	0.0102	0.0116	0.0115	0.0101	0.0102	0.0102
	J	0.0092	0.0092	0.0090	0.0093	0.0093	0.0093
	K	0.0102	0.0102	0.0103	0.0104	0.0105	0.0108
	L	0.0089	0.0109	0.0099	0.0081	0.0082	0.0087
	M	0.0080	0.0081	0.0082	0.0089	0.0089	0.0088
	N	0.0100	0.0090	0.0097	0.0124	0.0122	0.0123
	O	0.0121	0.0119	0.0121	0.0123	0.0118	0.0121
	P	0.0077	0.0078	0.0077	0.0089	0.0075	0.0073

b)

3) 共同試験成績の評価

外れ値を除外した試験成績より算出した平均値, 室内標準偏差(s_W : 同一試験室で日を変えて試験を実施していることから日間変動を含む), 室間再現標準偏差(s_R), 室間再現相対標準偏差(RSD_R)及び肥料等試験法における室間再現相対標準偏差の目安($CRSD_R$)を表 4 に示した. なお, 2 日間にわたる測定をプールせずに枝分かれ解析したところ, 平均値及び拡張不確かさは同じ値となることを確認した.

室間再現相対標準偏差(RSD_R)は水分及びビウレット性窒素を除く試験成分において肥料等試験法における室間再現相対標準偏差の目安($CRSD_R$)以内であった。

表 4 共同試験成績の解析結果

試験成分	試験室数 ^{a)}	平均値 ^{b)} (%) ^{g)}	s_w ^{c)} (%) ^{g)}	s_R ^{d)} (%) ^{g)}	RSD_R ^{e)} (%)	$CRSD_R$ ^{f)} (%)
水分(H ₂ O)	15	1.47	0.083	0.271	18.4	4
窒素全量(T-N)	18	14.08	0.048	0.137	1.0	3
アンモニア性窒素(A-N)	21	11.72	0.057	0.185	1.6	3
く溶性りん酸(C-P ₂ O ₅)	15	13.32	0.065	0.099	0.7	3
く溶性加里(C-K ₂ O)	16	13.96	0.127	0.242	1.7	3
く溶性苦土(C-MgO)	16	3.54	0.042	0.084	2.4	4
く溶性マンガン(C-MnO)	14	0.313	0.004	0.013	4.1	6
く溶性ほう素(C-B ₂ O ₃)	15	0.554	0.008	0.023	4.2	6
水溶性ほう素(W-B ₂ O ₃)	15	0.451	0.005	0.013	2.8	6
尿素性窒素(U-N)	10	2.26	0.058	0.136	6.0	8
ビウレット性窒素(B-N)	10	0.0091	0.001	0.002	26.4	11

a) 解析に用いたのべ試験室数

b) 総平均値(n =試験室数×併行試験数(3)
×試験日数(2))

c) 室内標準偏差(日間変動を含む)

d) 室間再現標準偏差

e) 室間再現相対標準偏差

f) 肥料等試験法における室間
再現相対標準偏差の目安

g) 質量分率

4) 認証値及び不確かさ

ISO Guide 31:2015 (JIS Q 0031:2018)⁵⁾において認証標準物質の認証書の必須内容として要求されている認証値及び不確かさを表 5 に示した。また, ISO Guide 33:2000 (JIS Q 0033:2002)¹⁰⁾において肥料認証標準物質の使用にあたり必要となる参考データ(共同試験における室内標準偏差, 室間再現標準偏差及び解析に用いた試験室数)を同表に示した。

(1) 拡張不確かさの算出方法

共同試験の総平均値の標準不確かさ(u)は ISO/TS 21748:2004 (JIS Z 8404-1:2006)¹¹⁾に従い, 共同試験の室内標準偏差(s_w), 室間再現標準偏差(s_R), 試験室数(p = 10~21)及び各試験室での繰返し試験数(n = 6)から, (a)式により求めた。平均値の不確かさは, 拡張不確かさとし, 標準不確かさ(u)を有効数字 1 桁に丸め, それに包含係数(k)を乗じて求め((b)式), 肥料等試験法における定量下限までに丸めた。ただし, 2 試験方法を併せて平均値を算出した窒素全量及びアンモニア性窒素については, 標準不確かさの桁まで表記することとした。なお, 包含係数(k)については正規分布の信頼水準約 95 %に相当する $k=2$ とした。

$$\text{標準不確かさ}(u) = \sqrt{\frac{(s_R^2 - s_w^2) + \frac{s_w^2}{n}}{p}} \quad \dots (a)$$

$$\text{拡張不確かさ}(U_{95\%}) = k \times u \quad \cdots (b)$$

s_R : 室間再現標準偏差

s_W : 室内標準偏差

n : 共同試験の室内繰返し試験数($n = 6$)

p : 共同試験の試験室数

k : 包含係数($k = 2$)

(2) 認証値の決定方法

水分及びビウレット性窒素については室間再現相対標準偏差が肥料等試験法における室間再現相対標準偏差の目安($CRSD_R$)を大きく上回っていることから、認証値とせずに参考情報(表 6)として提供し、その他の試験成分(窒素全量をはじめとする 9 成分)を認証することとした。なお、認証値及び参考値は肥料等試験法における定量下限の桁に丸めて¹²⁾表示することとし、ただし 2 試験方法を併せて平均値を算出した窒素全量及びアンモニア性窒素については、上記(1)で算出した標準不確かさの桁に丸めることとした。

表 5 認証書に記載する項目

試験成分	認証する項目		参考データ		
	認証値 (%) ^{e)}	拡張不確かさ ^{a)} (%) ^{e)}	s_W ^{b)} (%) ^{e)}	s_R ^{c)} (%) ^{e)}	試験室数 ^{d)}
窒素全量(T-N)	14.08	0.06	0.05	0.14	18
アンモニア性窒素(A-N)	11.72	0.08	0.06	0.19	21
く溶性りん酸(C-P ₂ O ₅)	13.32	0.04	0.07	0.10	15
く溶性加里(C-K ₂ O)	13.96	0.10	0.13	0.24	16
く溶性苦土(C-MgO)	3.54	0.04	0.04	0.08	16
く溶性マンガン(C-MnO)	0.313	0.006	0.004	0.013	14
く溶性ほう素(C-B ₂ O ₃)	0.55	0.01	0.01	0.02	15
水溶性ほう素(W-B ₂ O ₃)	0.45	0.01	0.01	0.01	15
尿素性窒素(U-N)	2.26	0.08	0.06	0.14	10

a) 包含係数($k=2$)

b) 室内標準偏差

c) 室間再現標準偏差

d) 解析に用いたのべ試験室数

e) 質量分率

表 6 認証書に参考情報として掲載する項目

	参考値 (%) ^{e)}	拡張不確かさ ^{a)} (%) ^{e)}	s_W ^{b)} (%) ^{e)}	s_R ^{c)} (%) ^{e)}	試験室数 ^{d)}
水分(H ₂ O)	1.47	0.14	0.08	0.27	15
ビウレット性窒素(B-N)	0.009	0.002	0.001	0.002	10

脚注は表5と同じ

5) 認証標準物質の有効期限

前々ロットの肥料認証標準物質 FAMIC-A-10(高度化成肥料)の安定性は、長期安定性の評価のための試験結果により、開発から5年6ヶ月確認されている¹³⁾。本認証標準物質候補AとFAMIC-A-10とを比較した場合に、原料による変動は考えにくく、製造方法も安定的な製法であることから、安定性も同等と判断した。これにより、本認証標準物質候補Aの有効期限を5年半後の2023年6月末に設定することとした。

また、販売開始後も継続的に安定性モニタリングを実施し、安定性に問題があった成分については、認証値から参考値にするなどの処置を行うこととした。

4. まとめ

2017年度は肥料認証標準物質として高度化成肥料を調製し、その認証値の決定のための共同試験を行い、ISO Guide 35:2006 (JIS Q 0035:2008)⁴⁾を参考に解析し、ISO Guide 31:2015 (JIS Q 0031:2018)⁵⁾の要求事項に基づいて認証書及びラベルを作成した。これらのことについて、肥料認証標準物質調製部会の審議を受けて承認された後、2018年4月より肥料認証標準物質 FAMIC-A-17の販売を開始した。

肥料の認証標準物質は、国内には他に作製している例がなく、また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いない。このような観点から、この標準物質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。

謝 辞

肥料認証標準物質の開発において、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門 安井明美博士、内藤成弘博士、国立研究開発法人産業技術総合研究所黒岩貴芳博士、公益財団法人日本肥糧検定協会今川俊明博士、全国農業協同組合連合会相崎万裕美博士及び一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所伊佐川聡博士には、ご指導いただき感謝いたします。また、共同試験にご協力いただいたエムシー・ファーティコム株式会社、小野田化学工業株式会社、片倉コープアグリ株式会社、コープエンジニアリング株式会、公益財団法人日本肥糧検定協会、ジェイカムアグリ株式会社、日東エフシー株式会社及び北海道肥料株式会社の各位に謝意を表します。

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 (2017): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025: 2018, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 3) 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」)
- 4) 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」)
- 5) ISO Guide 31 (2015): “Reference materials—Contents of certificates and labels” (JIS Q 0031: 2018, 「標準

物質－認証書及びラベルの内容」)

- 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/shikenho_2016.pdf>
- 7) Thompson, M., R. Ellison, S. Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemical Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78** (1), 145~196 (2006)
- 8) ISO 5725-2 (1994): “Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of standard measurement method” (JIS Z 8402-2: 1999, 「測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度)－第 2 部:標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本方法」)
- 9) Horwitz, W. Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Collaborative Studies. *Pure & Appl. Chem.*, **60**(6), 855-864(1988)
- 10) ISO Guide 33 (2000): “Uses of certified reference materials” (JIS Q 0033: 2002, 「認証標準物質の使い方」)
- 11) ISO/TS 21748 (2004): “Measurement uncertainty-Part 1: Guidance for the use of repeatability reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation” (JIS Z 8404-1 :2006, 「測定の不確かさ-第 1 部:測定の不確かさの評価における併行精度, 再現精度及び真度の推定値の利用の指針」)
- 12) ISO 31-0 (1992): “Quantities and units—Part 0: General principles, Annex B (Informative) (Guide to the rounding of numbers)” (JIS Z 8401 : 1999, 「数値の丸め方」)
- 13) 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: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―, 平成 28 年度肥料等技術検討会資料

Preparation of Certified Reference Material (CRM) for Determination of Major Components: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-17)

Satono AKIMOTO¹, Takeshi KOZUKA², Satoko SAKAIDA², Kohei ITO³,
Nobuhito NAKAMURA², Yoshimi HASHIMOTO² and Yuji SHIRAI²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kanto Regional Agricultural Administration Office

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

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

Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) has developed a certified reference material (CRM): high-analysis compound fertilizer (FAMIC-A-17), for analysis of major components. FAMIC-A-17 was certified for the contents of total nitrogen (T-N), ammonium nitrogen (A-N), citric acid-soluble phosphorus (C-P₂O₅), citric acid-soluble potassium (C-K₂O), citric acid-soluble magnesium (C-MgO), citric acid-soluble manganese (C-MnO), citric acid-soluble boron (C-B₂O₃), water-soluble boron (W-B₂O₃) and urea nitrogen (U-N). In addition, It is stated as a reference value that biuret nitrogen (B-N) and moisture content (H₂O). The certified values were obtained from a statistical analysis of the results of a collaborative study on the chemical analysis of the candidate for CRM. Sixteen laboratories participated in this study (Several laboratories analyzed the total nitrogen and ammonium nitrogen by 2 test methods.). In a statistical analysis of data which were reported from participants, outliers were removed by Cochran test and Grubbs test, followed by the usual statistical procedure. The CRMs were expected to be useful for the quality assurance and the quality control in the analysis of major components in high-analysis compound fertilizer.

Key words certified reference material (CRM), high-analysis compound fertilizer, major component, ISO Guide 31, ISO Guide 35, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **11**, 159~172, 2018)

12 2017年度 肥料認証標準物質の開発

―高度化成肥料 FAMIC-A-13, 普通化成肥料 FAMIC-B-14
及び汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2 の長期安定性評価―

稲葉茂幸¹, 川口伸司¹, 伊藤 潤¹,
松尾信吾², 船木紀夫¹, 山西正将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収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 17025:2017(JIS Q 17025:2018)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-13), 同 B(普通化成肥料 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-13」「標準物質 B-14」「標準物質 C-12-2」という.)を調製^{3~6)}, 販売しており(表 1), 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)⁷⁾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)⁸⁾を参考に解析を行った上で ISO Guide 31:2015(JIS Q 0031:2018)⁹⁾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. 2017年度は, 標準物質 A-13, B-14 及び C-12-2 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-13, B-14 及び C-12-2 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¹⁰⁾(表 2A, 表 2B 及び表 2C を参照)。
- d) 試験時期・・・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, 37 ヶ月後, 43 ヶ月後及び 49 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, 22 ヶ月後, 28 ヶ月後及び 34 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, 50 ヶ月後, 56 ヶ月後及び 62 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 0035:2008⁸⁾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-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, 可溶性りん酸, 水溶性加里, 可溶性苦土, 可溶性マンガ、可溶性ほう素(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)	2021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

(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-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, 2017 年 4 月～5 月及び 2017 年 10 月～11 月の計 9 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, 2017 年 4 月～5 月及び 2017 年 10～11 月の計 7 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, 2016 年 10 月～11 月, 2017 年 4 月～5 月及び 2017 年 10 月～11 月の計 11 回試験を実施した。

各試験時とも未開封の標準物質 A-13, 標準物質 B-14 及び標準物質 C-12-2 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-13 及び B-14 については, 有害成分 (As, Cd, Ni), 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 (現物濃度) とした。

表2A 標準物質A-13の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ¹⁾	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
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	4.2.3.a	くえん酸 (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
く溶性苦土 (C-MgO)	4.6.2.a	くえん酸 (20 mg/mL) 抽出	フレイム原子吸光法
く溶性マンガン (C-MnO)	4.7.2.a	くえん酸 (20 mg/mL) 抽出	フレイム原子吸光法
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	4.8.1.a	くえん酸 (20 mg/mL) 抽出	アゾメチンH発色／ 吸光光度法

1) 肥料等試験法の試験項目番号

表2B 標準物質B-14の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ¹⁾	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
ニッケル (Ni)	5.4.a	王水分解	フレイム原子吸光法

脚注は表2Aを参照。

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 ¹⁾	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
ヒ素 (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-13, 標準物質 B-14 及び標準物質 C-12-2 の試験成分の安定性試験成績を表 3A～表 3C に示した。ISO/IEC 17025:2017 (JIS Q 17025:2018)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-13 の試験期間の 49 ヶ月後、標準物質 B-14 の試験期間の 34 ヶ月後及び標準物質 C-12-2 の試験期間の 62 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 1A～図 1C に示し、更に警戒限界及び処置限界を描いた。なお、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、技能評価のための標準偏差、警戒限界及び処置限界を求めた⁹⁾。その結果、標準物質 A-13, 標準物質 B-14 及び標準物質 C-12-2 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3A 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)		く溶性りん酸 (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	13.12
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
43	14.94	15.01	10.48	10.49	10.69	10.79	12.92	12.95
49	14.65	14.70	10.47	10.49	10.67	10.69	12.92	13.19

表3A (続き) (質量分率 %)

経過月	く溶性苦土 (C-MgO)		く溶性マンガン (C-MnO)		く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	
0	3.18	3.29	0.359	0.381	0.214	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
43	3.19	3.22	0.352	0.363	0.210	0.210
49	3.10	3.13	0.337	0.346	0.194	0.199

表3B 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	8.23
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
28	7.98	8.00	9.10	9.13	6.69	6.71	8.17	8.28
34	7.93	8.03	9.10	9.11	6.69	6.73	8.27	8.54

表3B (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	38.3
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
28	3.01	3.08	3.70	3.78	36.3	36.6
34	3.06	3.10	4.43	4.44	38.3	39.1

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	20.6
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
56	4.58	4.61	8.48	8.54	0.605	0.608	5.79	5.87	19.9	20.2
62	4.58	4.61	8.59	8.60	0.570	0.579	5.77	5.82	19.3	19.5

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	1.84
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
56	587	589	996	1002	21.4	23.7	1.85	1.91
62	554	561	997	1006	21.1	21.6	1.77	1.82

経過月	表3C (続き) (mg/kg)							
	水銀 (Hg)		ニッケル (Ni)		クロム (Cr)		鉛 (Pb)	
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
56	0.466	0.476	76.1	76.3	80.5	82.1	36.8	37.3
62	0.466	0.476	74.3	74.4	77.2	79.3	34.6	35.1

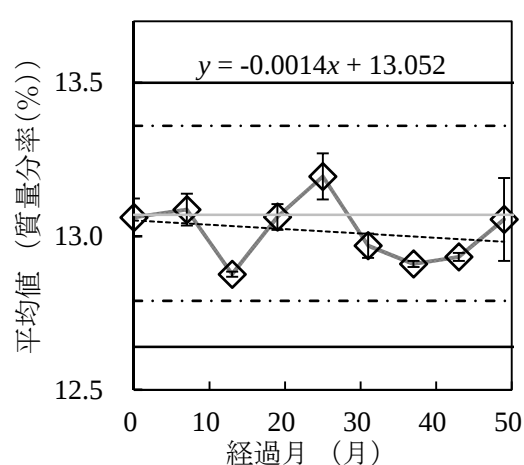
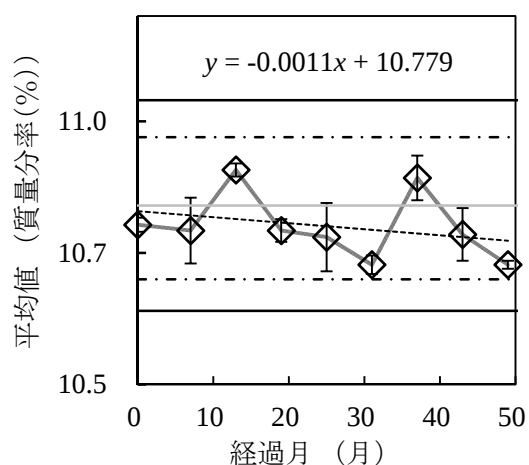
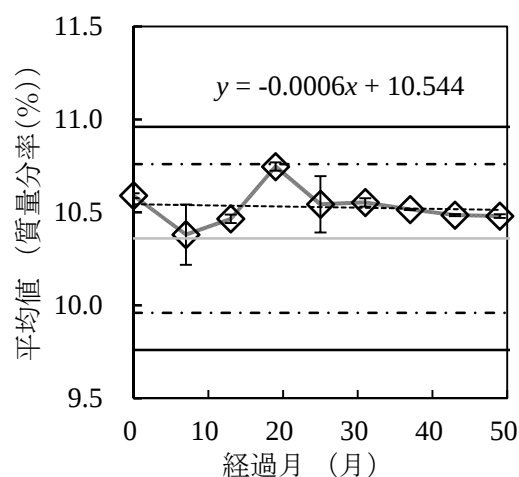
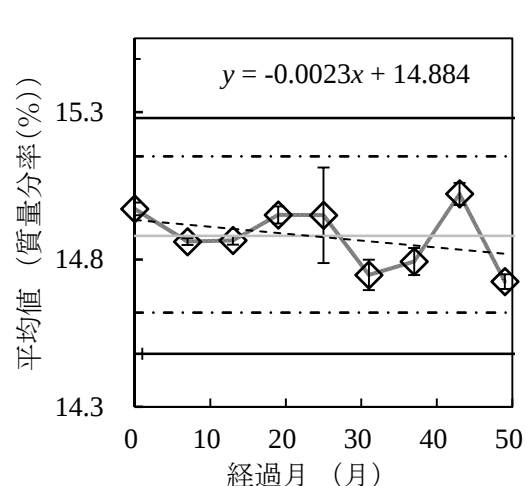


図 1A 標準物質 A13 のモニタリング試験成績

◇: 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 灰色実線: 認証値

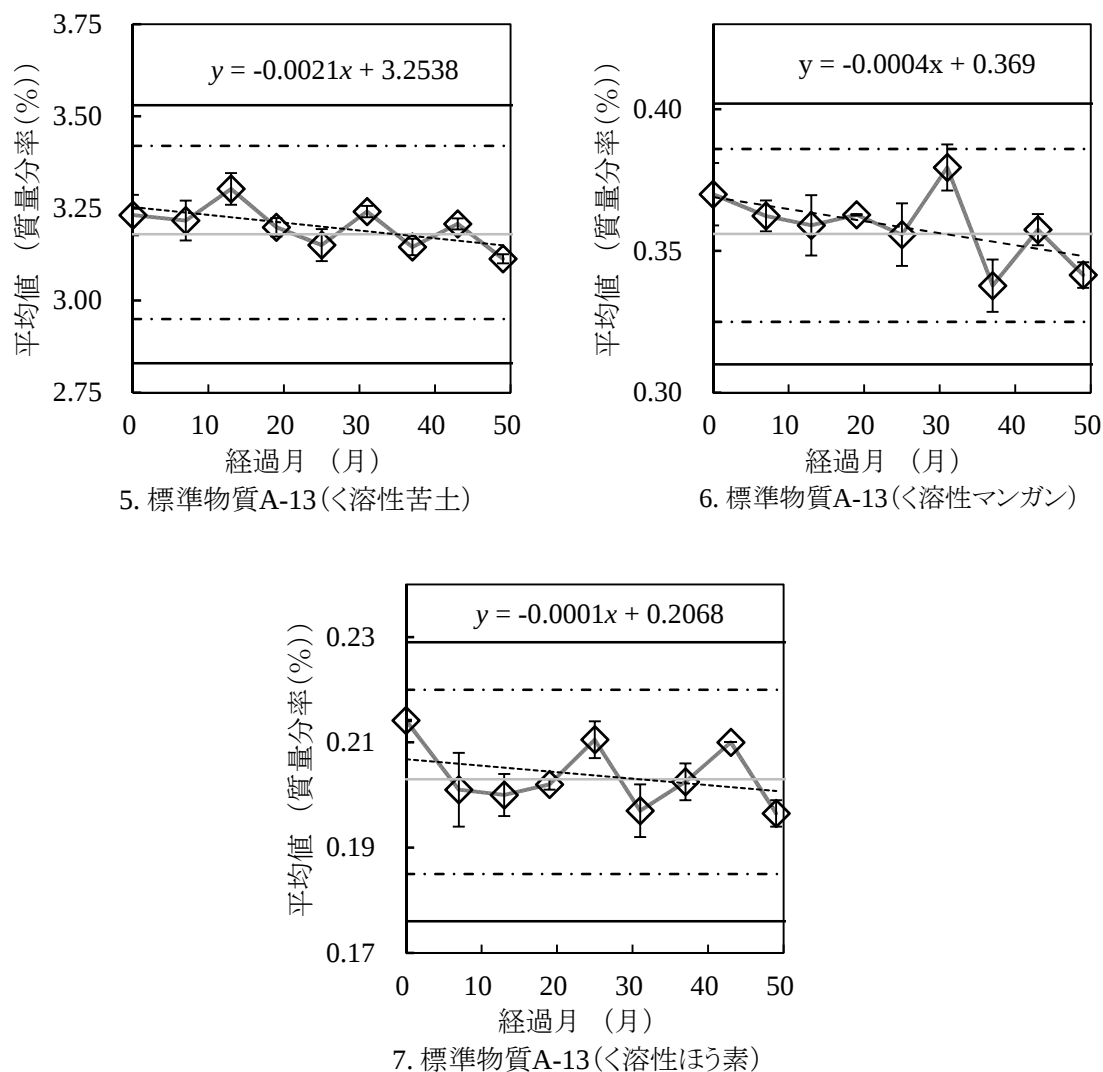


図 1A (続き)

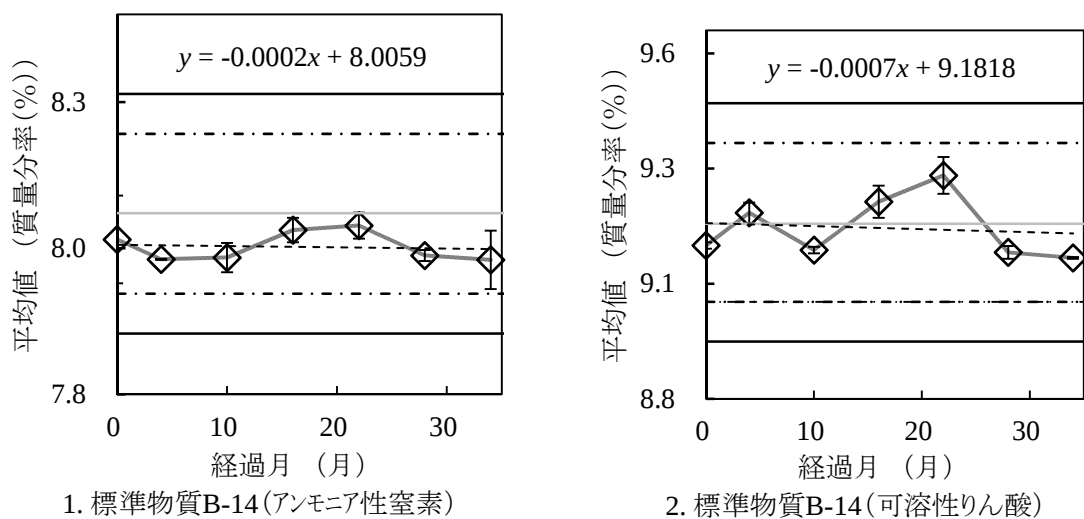
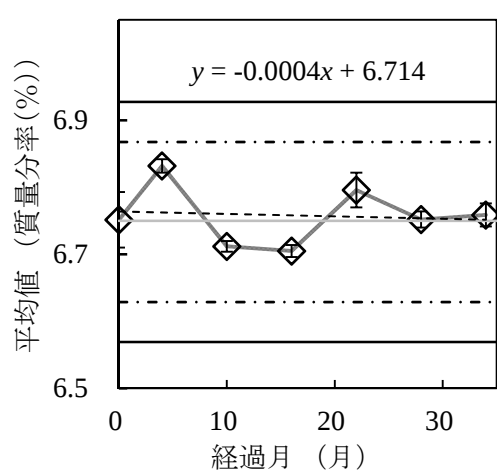
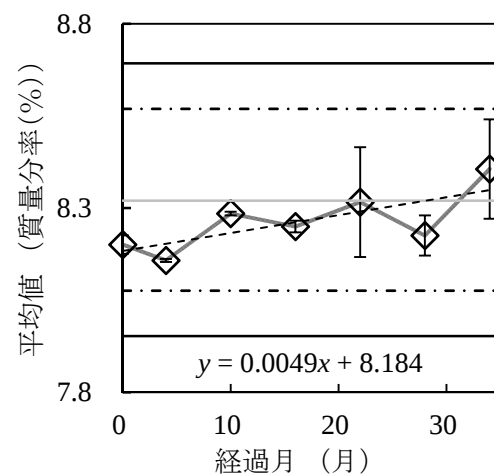


図 1B 標準物質 B14 のモニタリング試験成績

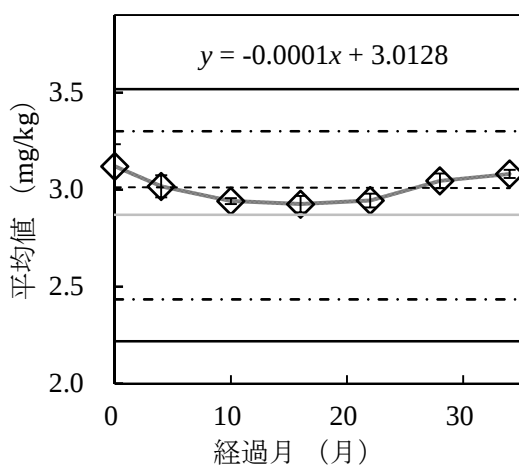
(脚注は図 1A 参照)



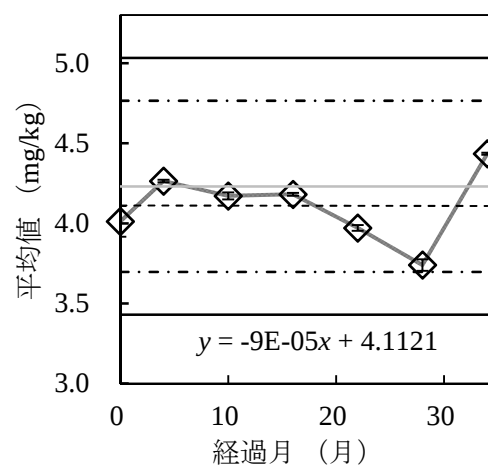
3. 標準物質B-14(水溶性りん酸)



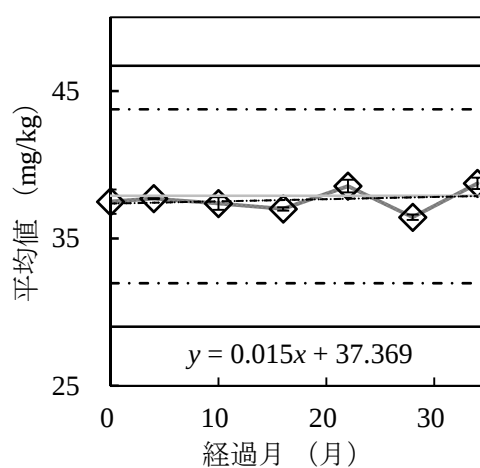
4. 標準物質B-14(水溶性加里)



5. 標準物質B-14(ひ素)



6. 標準物質B-14(カドミウム)



7. 標準物質B-14(ニッケル)

図 1B (続き)

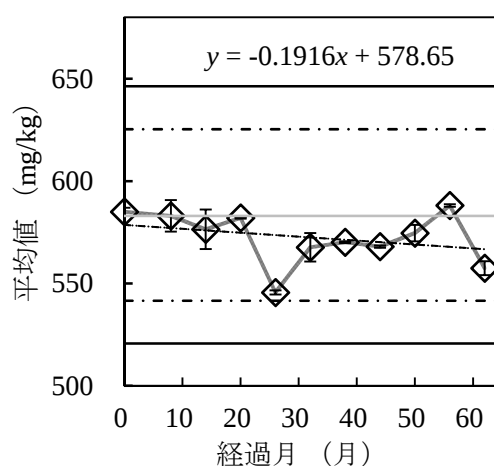
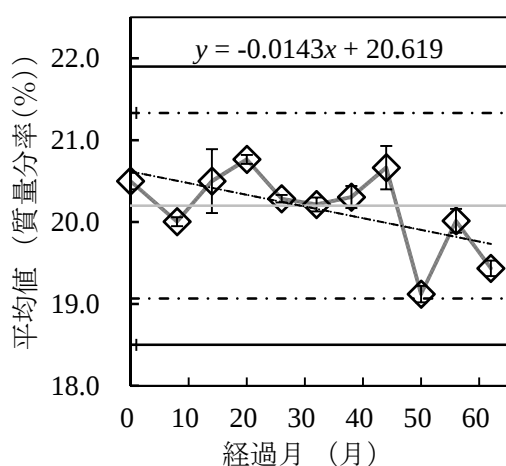
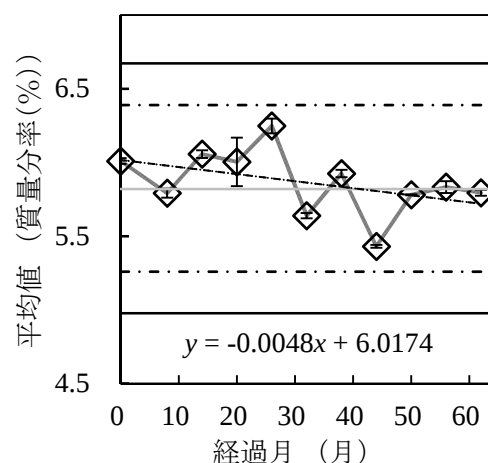
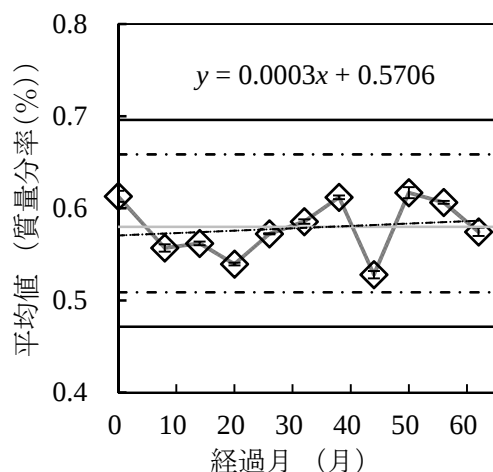
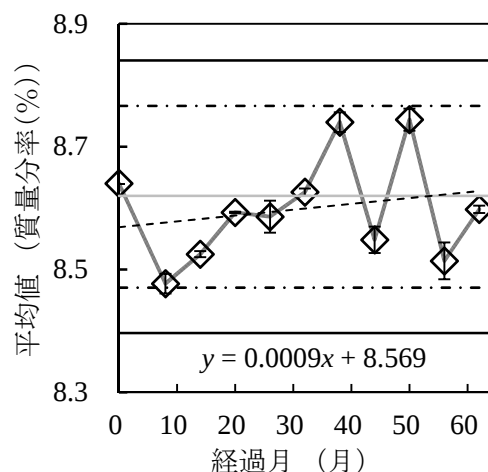
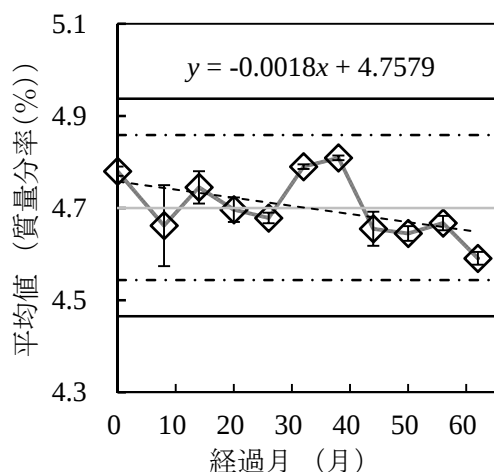
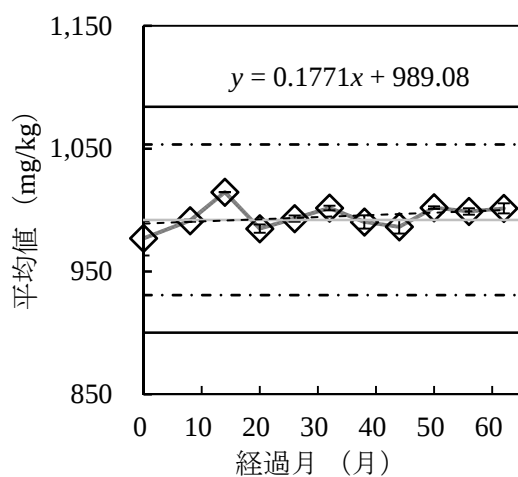
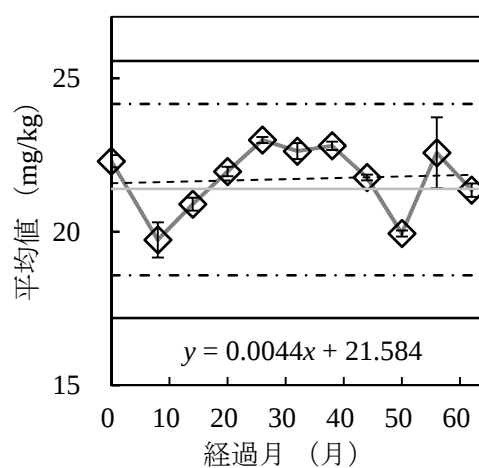


図 1C 標準物質 C12-2 のモニタリング試験成績

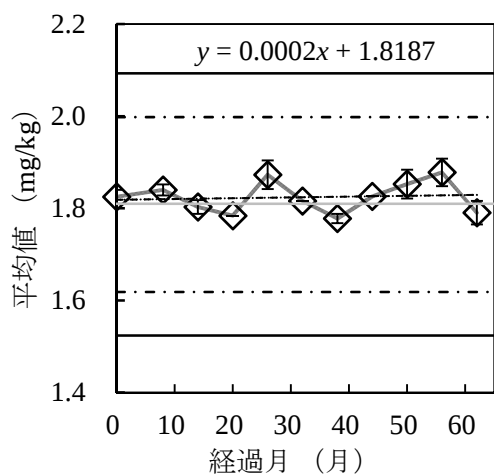
(標準物質 C12-2(水銀), (鉛)は再認証したため経過月 44 ヶ月以降, 認証値, 警戒限界, 処置限界が変更. その他脚注は図 1A①参照)



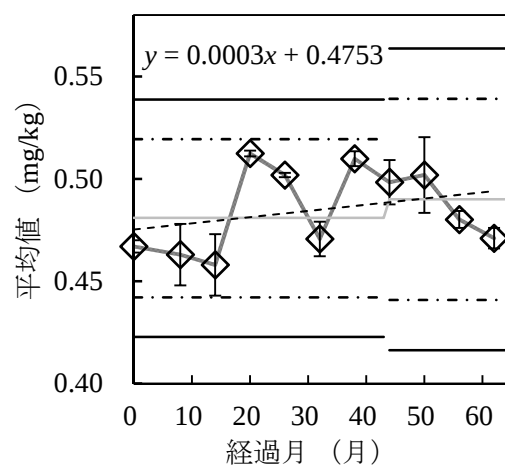
7. 標準物質C-12-2(亜鉛)



8. 標準物質C-12-2(ヒ素)

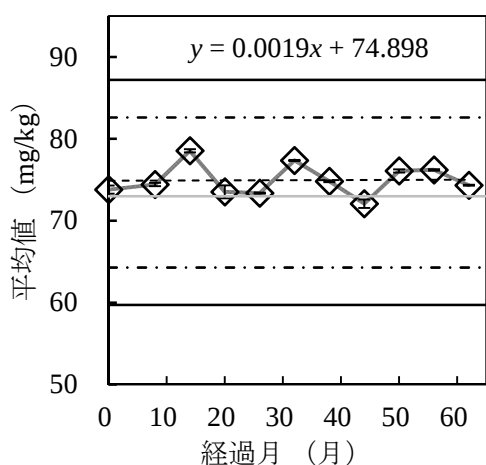


9. 標準物質C-12-2(カドミウム)

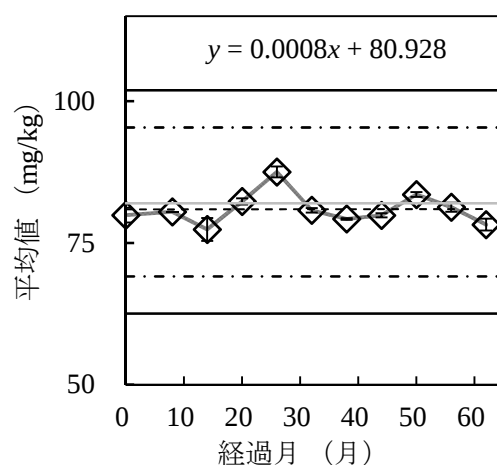


10. 標準物質C12-2(水銀)

※限界値等の変更は、P-10 の脚注参照

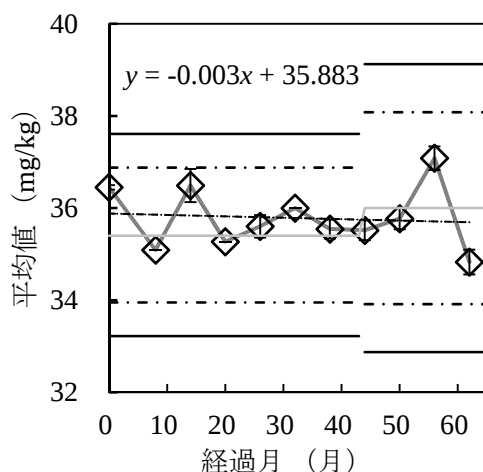


11. 標準物質C-12-2(ニッケル)



12. 標準物質C-12-2(クロム)

図 1C (続き)



13. 標準物質C-12-2(鉛)

図 1C (続き)

※限界値等の変更は、図 1C の脚注参照

2) 肥料認証標準物質の長期安定性評価

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, 37 ヶ月後, 43 ヶ月後及び 49 ヶ月後, 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, 22 ヶ月後, 28 ヶ月後及び 34 ヶ月後並びに標準物質 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, 50 ヶ月後, 56 ヶ月後及び 62 ヶ月後までの経過月並びに各回の測定 of 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)⁸⁾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-13, 標準物質 B-14 及び標準物質 C-12-2 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-13, 標準物質 B-14 及び標準物質 C-12-2 の認証成分は, モニタリング試験実施時から 4 年 1 ヶ月, 2 年 10 ヶ月, 5 年 2 ヶ月間安定であった.

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^T (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^T (x_i - \bar{x})^2} \quad \cdots (d)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad \cdots (e)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{T-2} \sum_{i=1}^T (y_i - \hat{y}_i)^2} = \sqrt{\frac{1}{T-2} \sum_{i=1}^T (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2} \quad \cdots (f)$$

$$s_{b_1} = s / \sqrt{\sum_{i=1}^T (x_i - \bar{x})^2} \quad \cdots (g)$$

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-13(9回), B-14(7回), C-12-2(11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

$t_{0.95, m-2}$: 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)}	$\bar{y}$ ^{c)}	回帰分析結果			s_{b_1} ^{g)}	判定 基準 ^{h)}	判定 ⁱ⁾
	(mon.)	(%) ^{j)}	b_1 ^{d)}	b_0 ^{e)}	s ^{f)}	$\left(\frac{\%}{\text{mon.}}\right)^{j)}$	$\left(\frac{\%}{\text{mon.}}\right)^{j)}$	
			$\left(\frac{\%}{\text{mon.}}\right)^{j)}$	(%) ^{j)}	(%) ^{j)}			
(標準物質A-13)								
窒素全量 (T-N)	24.9	14.826	-0.0023	14.88	0.104	0.0022	0.0052	○
アンモニア性窒素 (A-N)	24.9	10.529	-0.0006	10.544	0.108	0.0023	0.0054	○
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	24.9	10.751	-0.0011	10.779	0.064	0.0014	0.0032	○
水溶性加里 (W-K ₂ O)	24.9	13.017	-0.0014	13.052	0.106	0.0022	0.0053	○
く溶性苦土 (C-MgO)	24.9	3.201	-0.0021	3.254	0.049	0.0010	0.0025	○
く溶性マンガン (C-MnO)	24.9	0.358	-0.00042	0.369	0.012	0.0002	0.00058	○
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	24.9	0.204	-0.0001	0.207	0.006	0.0001	0.0003	○
(標準物質B-14)								
アンモニア性窒素 (A-N)	16.3	8.00	-0.0002	8.01	0.03	0.001	0.002	○
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	16.3	9.17	-0.0007	9.18	0.07	0.002	0.006	○
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	16.3	6.71	-0.0004	6.71	0.05	0.002	0.004	○
水溶性加里 (W-K ₂ O)	16.3	8.26	0.0049	8.18	0.06	0.002	0.005	○
(標準物質C-12-2)								
窒素全量 (T-N)	31.8	4.70	-0.0018	4.76	0.06	0.001	0.002	○
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	31.8	8.60	0.0009	8.57	0.09	0.001	0.003	○
加里全量 (T-K ₂ O)	31.8	0.58	0.0003	0.57	0.03	0.001	0.001	○
石灰全量 (T-CaO)	31.8	5.87	-0.0048	6.02	0.21	0.003	0.01	○
有機炭素 (O-C)	31.8	20.16	-0.0143	20.62	0.44	0.01	0.02	○

- a) 標準物質A-13は調製後の試験実施日から起算して49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34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62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-13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B-14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C-12-2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))
- 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4-2 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)} ($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$)	判定 基準 ^{h)} ($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$)	判定 ⁱ⁾
			b_1 ^{d)}	b_0 ^{e)}	s ^{f)}			
			($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$)	(mg/kg)	(mg/kg)			
(標準物質B-14)								
ひ素 (As)	16.3	3.01	-0.0001	3.01	0.08	0.003	0.01	○
カドミウム (Cd)	16.3	4.11	-0.0001	4.11	0.25	0.01	0.02	○
ニッケル (Ni)	16.3	37.6	0.0150	37.4	0.87	0.03	0.07	○
(標準物質C-12-2)								
銅全量 (T-Cu)	31.8	573	-0.1916	579	12.8	0.20	0.45	○
亜鉛全量 (T-Zn)	31.8	995	0.1771	989	10.2	0.16	0.36	○
ひ素 (As)	31.8	21.7	0.0044	21.6	1.18	0.02	0.04	○
カドミウム (Cd)	31.8	1.82	0.0002	1.82	0.04	0.001	0.001	○
水銀 (Hg)	31.8	0.48	0.0003	0.48	0.02	0.0003	0.001	○
ニッケル (Ni)	31.8	75.0	0.0019	74.9	2.01	0.03	0.07	○
クロム (Cr)	31.8	81.0	0.0008	80.9	2.93	0.05	0.10	○
鉛 (Pb)	31.8	35.8	-0.0030	35.9	0.70	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

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-13 は認証値設定から3年7ヶ月間、標準物質 B-14 は認証値設定から2年7ヶ月間、標準物質 C-12-2 は認証値設定から4年11ヶ月間の安定性が確認された。

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-13)、標準物質 B (普通化成肥料 FAMIC-B-14) 及び標準物質 C (汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2) 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-13、B-14 及び C-12-2 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-13、B-14 及び C-12-2 について認証値設定後、各々3年7ヶ月間、2年7ヶ月間、4年11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 (2017): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2018, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 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－普通化成肥料 FAMIC-B-14 の調製－, 肥料研究報告, **8**, 140~152 (2015)
- 6) 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)
- 7) 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」)
- 8) 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」)
- 9) ISO Guide 31 (2015): “Reference materials—Contents of certificates and labels” (JIS Q 0031 : 2018, 「標準物質－認証書及びラベルの内容」)
- 10) 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>
- 11) 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」)

**Long-term Stability Evaluation of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements:
High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-13) and Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-14) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-12-2)**

Shigeyuki INABA¹, Shinji KAWAGUCHI¹, Jun ITOU¹,
Shingo MATUO², Norio FUNAKI¹, Masayuki YAMANISHI¹, and Yuji SHIRAI³

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, 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-13), ordinary compound fertilizer (FAMIC-B-14) and composted sludge fertilizer (FAMIC-C-12-2) for analysis of major components and harmful elements. FAMIC-A-13 is certified for the concentrations 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-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), and nickel (Ni). 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 (FAMIC-A-13 : 3 years 7 months after preparation, FAMIC-B-14 : 2 years 7 months after preparation, FAMIC-C-12-2 : 3 years 7 months after preparation) were stable. 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, **11**, 173~189, 2018)

13 試験紙による肥料成分の検出

齋藤晴文¹, 佐久間健太², 白井裕治¹, 阿部文浩¹

キーワード 定性試験, 定性試験紙, 肥料, カルシウムイオン, 銅イオン, 亜鉛イオン

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試験法は, 分析機器による測定または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.

平成 28 年度に, 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, 分析機器を使用しない簡便な定性試験法としての利用の可否を検討¹⁾し, 一定の成果を得られたことから, 平成 29 年度はカルシウムイオン, 銅イオン及び亜鉛イオンを検出する試験紙について検討を実施した.

2. 材料及び方法

1) 供試試料

流通している汚泥肥料 6 銘柄(し尿汚泥肥料 2 銘柄, 汚泥発酵肥料 3 銘柄及び焼成汚泥肥料 1 銘柄)及び堆肥 4 銘柄を乾燥後, 目開き 500 μm のふるいを全通するまで粉碎したものを試料として用いた.

なお, 各肥料の成分含有量は表 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) 硝酸カルシウム四水和物: 特級(和光純薬工業)
- (4) 硫酸銅(Ⅱ)五水和物: 特級(関東化学)
- (5) 硫酸亜鉛七水和物: 特級(関東化学)
- (6) 塩化カルシウム: 特級(和光純薬工業)
- (7) 硝酸: 有害金属測定用(和光純薬工業)
- (8) 硝酸銅三水和物: 鹿特級(関東化学)

3) 器具及び装置

(1) 試験紙: 市販されている MQuantTM シリーズ(Merck Millipore)及び QUANTOFIX[®] シリーズ(MACHERY-NAGEL)を用いた. 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.

(2) 100 mL ポリプロピレン製容器

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)名古屋センター

(3) 10 mL ポリエチレンテレフタレート製チューブ

表1 試験に用いた流通肥料の機器分析値(回転振り混ぜ器による抽出)

肥料の種類	水溶性 カルシウム a)	く溶性 カルシウム b)	水溶性 銅 ^{a)}	く溶性 銅 ^{b)}	水溶性 亜鉛 ^{a)}	く溶性 亜鉛 ^{b)}
	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
グループA ^{c)}	し尿汚泥肥料①	N.D. ^{e)}	0.71	— ^{f)}	—	—
	汚泥発酵肥料①	—	—	N.D.	N.D.	14
	堆肥①	N.D.	1.03	—	—	—
	堆肥②	—	—	N.D.	N.D.	17
グループB ^{d)}	汚泥発酵肥料②	0.10	14.65	N.D.	N.D.	14
	焼成汚泥肥料	0.09	10.80	N.D.	15	10
	堆肥③	0.10	3.34	N.D.	N.D.	12
	堆肥④	0.10	0.76	N.D.	N.D.	11
	し尿汚泥肥料②	—	—	—	264	—
	汚泥発酵肥料③	—	—	—	52	—

a) 回転振り混ぜ器を使用し、室温で30分間振とう

b) 回転振り混ぜ器を使用し、30℃で1時間振とう

c) 添加試験に使用した肥料

d) 流通肥料の試験に使用した肥料

e) 定量下限未満

f) 機器分析実施せず

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 Calcium Test	カルシウムイオン	10 ～ 100
QUANTOFIX [®] Calcium		10 ～ 100
MQuant TM Copper Test	銅イオン	10 ～ 300
QUANTOFIX [®] Copper		10 ～ 300
MQuant TM Zinc Test	亜鉛イオン	4 ～ 50
QUANTOFIX [®] Zinc		2 ～ 100

4) 試験方法

(1) 抽出

(i) 水による抽出

分析試料 5 g をはかりとり、100 mL ポリプロピレン製容器に入れた。採取量の約 20 倍量の水を加え、30 秒間振り混ぜ又は 30 秒間振り混ぜ後 1 時間静置して得た液を、ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とした。

(ii) くえん酸溶液による抽出

分析試料 5 g をはかりとり、100 mL ポリプロピレン製容器に入れた。採取量の約 20 倍量のくえん酸溶液を加え、30 秒間振り混ぜ又は 30 秒間振り混ぜ後 1 時間静置して得た液を、ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とした。

(2) 定性反応操作及び判定

(i) カルシウムイオン

試料溶液約 5 mL を 10 mL ポリエチレンテレフタレート製チューブに入れ、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いた。付属のさじですり切り一杯の粉状の付属試薬を試料溶液に入れて振り混ぜ溶かし、液状の付属試薬 10 滴を加えて振り混ぜ、試験紙の反応部分をこの試液中に 45 秒間入れた。試験紙を取り出した後余分な水分を除き、試験紙が橙色に発色した場合、試料溶液にカルシウムイオンが含まれていると判定した。

(ii) 銅イオン

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、MQuant™ Copper Test については 30 秒間、QUANTOFIX® Copper については 20 秒間、それぞれ静置した。試験紙が紫色に発色した場合、試料溶液に銅イオンが含まれていると判定した。

(iii) 亜鉛イオン

試料溶液約 5 mL を 10 mL ポリエチレンテレフタレート製チューブに入れ、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液中に 1 秒間入れた。試験紙を取り出した後余分な水分を除き、MQuant™ Zinc Test については 15 秒間、QUANTOFIX® Zinc については 30 秒間、それぞれ静置し、試験紙が橙色から赤紫色に発色した場合、試料溶液に亜鉛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)

汚泥肥料及び堆肥に、硝酸カルシウム四水和物についてはカルシウムとして 1.0 %及び 4.0 % (質量分率、以下同じ。)相当量、硫酸銅(Ⅱ)五水和物及び硫酸亜鉛七水和物については銅及び亜鉛として 0.1 %及び 0.4 %相当量を添加した試料について、水による抽出(30 秒間振とう抽出)をした後、定性反応操作を行った。また、ブランクとして、水に試料に添加したのと同量の試薬を添加した水溶液について、試料と同様の抽出及び定性反応操作を行った。その定性結果を表 3 及び写真 1~6 に示した。

硝酸カルシウム四水和物の添加試験では、1.0 %相当量添加試料、4.0 %相当量添加試料ともにカルシウムイオンの定性反応を示した(写真 1~2)。ただし、QUANTOFIX® Calcium において、4.0 %相当量添加試料及び 4.0 %相当量添加試料に添加したのと同量の試薬を添加した水溶液において、定性反応が不鮮明になった(写真 2)。

硫酸銅(Ⅱ)五水和物の添加試験では、0.1 %相当量添加試料、0.4 %相当量添加試料ともに銅イオンの定性反応を示した。ただし、汚泥肥料及び堆肥の 0.1 %相当量添加試料では、水に同量の硫酸銅(Ⅱ)五水和物を添加した水溶液より銅イオンの定性反応が弱かった(写真 3~4)。この原因として、汚泥肥料及び堆肥に、何らかの定性反応を妨害する物質が含まれている可能性または銅が汚泥肥料及び堆肥に吸着した可能性が考えられた。また、MQuant™ Copper Test において、0.4 %相当量添加試料に添加したのと同量の試薬を添加した水溶液において、定性反応が不鮮明になった(写真 3)。

硫酸亜鉛七水和物の添加試験では、0.1 %相当量添加試料、0.4 %相当量添加試料ともに亜鉛イオンの定性反応を示した。ただし、QUANTOFIX® Zinc において、汚泥肥料及び堆肥の 0.1 %相当量添加試料では、水に同量の硫酸亜鉛七水和物を添加した水溶液より亜鉛イオンの定性反応が弱かった(写真 5~6)。この原因として、汚泥肥料及び堆肥に、何らかの定性反応を妨害する物質が含まれている可能性が考えられた。

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)}	試験紙の種類	ブランク (水)	し尿汚泥 肥料①	堆肥①	汚泥発酵 肥料①	堆肥②
硝酸カルシウム 四水和物 (カルシウムイオン)	4.0	MQuant TM Calcium Test	+ ^{b)}	+	+	N.E. ^{c)}	N.E.
		QUANTOFIX [®] Calcium	+	+	+	N.E.	N.E.
	1.0	MQuant TM Calcium Test	+	+	+	N.E.	N.E.
		QUANTOFIX [®] Calcium	+	+	+	N.E.	N.E.
	0	MQuant TM Calcium Test	—	—	+	N.E.	N.E.
		QUANTOFIX [®] Calcium	—	—	—	N.E.	N.E.
硫酸銅(Ⅱ) 五水和物 (銅イオン)	0.4	MQuant TM Copper Test	+	N.E.	N.E.	+	+
		QUANTOFIX [®] Copper	+	N.E.	N.E.	+	+
	0.1	MQuant TM Copper Test	+	N.E.	N.E.	+	+
		QUANTOFIX [®] Copper	+	N.E.	N.E.	+	+
	0	MQuant TM Copper Test	—	N.E.	N.E.	—	—
		QUANTOFIX [®] Copper	—	N.E.	N.E.	—	—
硫酸亜鉛七水和物 (亜鉛イオン)	0.4	MQuant TM Zinc Test	+	N.E.	N.E.	+	+
		QUANTOFIX [®] Zinc	+	N.E.	N.E.	+	+
	0.1	MQuant TM Zinc Test	+	N.E.	N.E.	+	+
		QUANTOFIX [®] Zinc	+	N.E.	N.E.	+	+
	0	MQuant TM Zinc Test	—	N.E.	N.E.	—	—
		QUANTOFIX [®] Zinc	—	N.E.	N.E.	—	—

a) 質量分率

b) +: 定性試験陽性, + -: 定性試験陽性(微弱), -: 定性試験陰性

c) 試験実施せず



写真1 硝酸カルシウム四水和物の添加試験結果

試験紙: MQuantTM Calcium Test

写真2 硝酸カルシウム四水和物の添加試験結果

試験紙: QUANTOFIX[®] Calcium

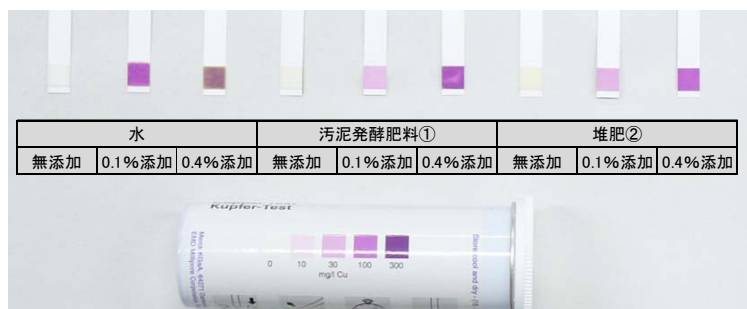


写真3 硫酸銅(II)五水和物の添加試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

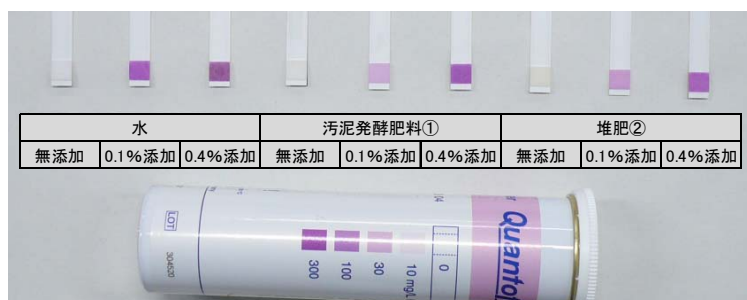


写真4 硫酸銅(II)五水和物の添加試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Copper

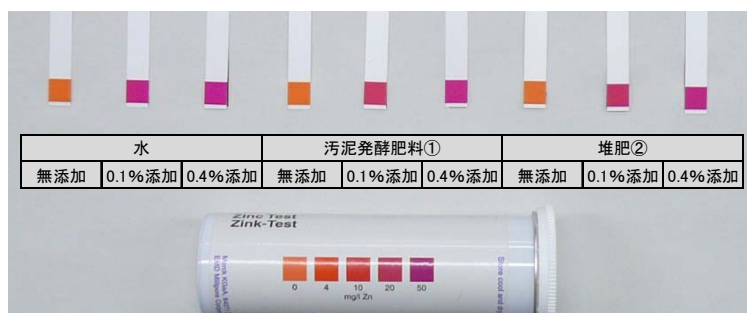


写真5 硫酸亜鉛七水和物の添加試験結果

試験紙:MQuant™ Zinc Test

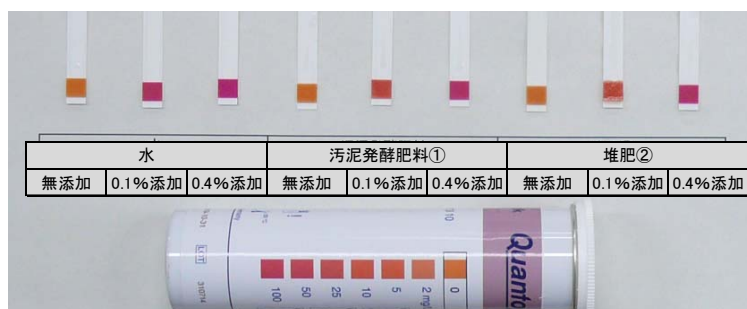


写真6 硫酸亜鉛七水和物の添加試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

2) 添加試験の結果(くえん酸溶液による抽出)

汚泥肥料及び堆肥に、硝酸カルシウム四水和物についてはカルシウムとして1.0%及び4.0%相当量を、硫酸銅(II)五水和物及び硫酸亜鉛七水和物については銅及び亜鉛として0.1%及び0.4%相当量を添加した試料について、くえん酸溶液による抽出(30秒間振とう抽出)をした後、定性反応操作を行った。また、ブランクとして、くえん酸溶液に試料に添加したのと同量の試薬を添加したくえん酸溶液について、試料と同様の抽出及び定性反応操作を行った。その定性結果を表4及び写真7～12に示した。

硝酸カルシウム四水和物の添加試験では、1.0%相当量添加試料、4.0%相当量添加試料ともにカルシウムイオンの定性反応を示した。ただし、汚泥肥料、堆肥ともに可溶性カルシウムを多く含み、硝酸カルシウム四水和物を添加しなくてもカルシ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(写真7～

8).

硫酸銅(Ⅱ)五水和物及び硫酸亜鉛七水和物の添加試験では、0.1 %、0.4 %相当量添加試料ともに銅イオン及び亜鉛イオンの定性反応を示した(写真9～12)。ただし、MQuantTM Copper Testにおいて、0.4 %相当量添加試料に添加したのと同量の試薬を添加したくえん酸溶液において、定性反応が不鮮明になった(写真9)。

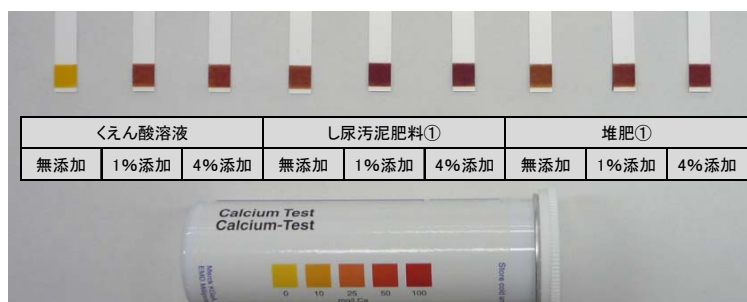
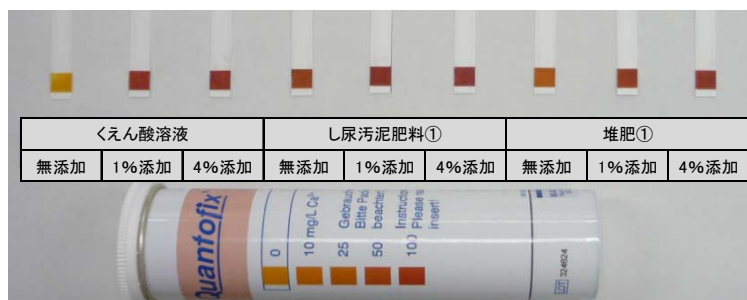
表4 添加試験の結果(くえん酸溶液による抽出)

添加成分 (検出対象イオン)	添加割合 (%) ^{a)}	試験紙の種類	ブランク (くえん酸 溶液)	し尿汚泥 肥料①	堆肥①	汚泥発酵 肥料①	堆肥②
硝酸カルシウム 四水和物 (カルシウムイオン)	4.0	MQuant TM Calcium Test	+ ^{b)}	+	+	N.E. ^{c)}	N.E.
		QUANTOFIX [®] Calcium	+	+	+	N.E.	N.E.
	1.0	MQuant TM Calcium Test	+	+	+	N.E.	N.E.
		QUANTOFIX [®] Calcium	+	+	+	N.E.	N.E.
	0	MQuant TM Calcium Test	—	+	+	N.E.	N.E.
		QUANTOFIX [®] Calcium	—	+	+	N.E.	N.E.
硫酸銅(Ⅱ) 五水和物 (銅イオン)	0.4	MQuant TM Copper Test	+	N.E.	N.E.	+	+
		QUANTOFIX [®] Copper	+	N.E.	N.E.	+	+
	0.1	MQuant TM Copper Test	+	N.E.	N.E.	+	+
		QUANTOFIX [®] Copper	+	N.E.	N.E.	+	+
	0	MQuant TM Copper Test	—	N.E.	N.E.	—	—
		QUANTOFIX [®] Copper	—	N.E.	N.E.	—	—
硫酸亜鉛七水和物 (亜鉛イオン)	0.4	MQuant TM Zinc Test	+	N.E.	N.E.	+	+
		QUANTOFIX [®] Zinc	+	N.E.	N.E.	+	+
	0.1	MQuant TM Zinc Test	+	N.E.	N.E.	+	+
		QUANTOFIX [®] Zinc	+	N.E.	N.E.	+	+
	0	MQuant TM Zinc Test	—	N.E.	N.E.	—	—
		QUANTOFIX [®] Zinc	—	N.E.	N.E.	—	—

a) 質量分率

b) +: 定性試験陽性, +-: 定性試験陽性(微弱), -: 定性試験陰性

c) 試験実施せず

写真7 硝酸カルシウム四水和物の添加
試験結果試験紙: MQuantTM Calcium Test写真8 硝酸カルシウム四水和物の
添加試験結果試験紙: QUANTOFIX[®] Calcium

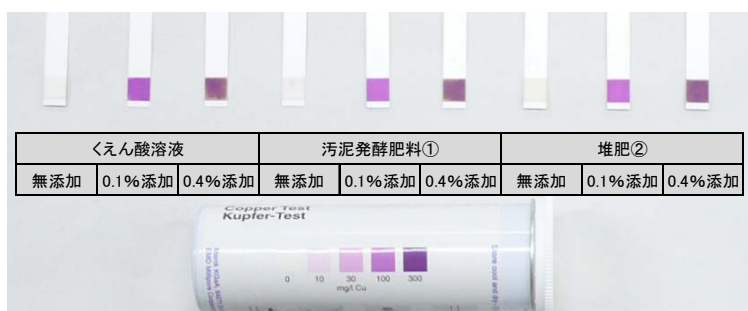


写真9 硫酸銅(Ⅱ)五水和物の添加
試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

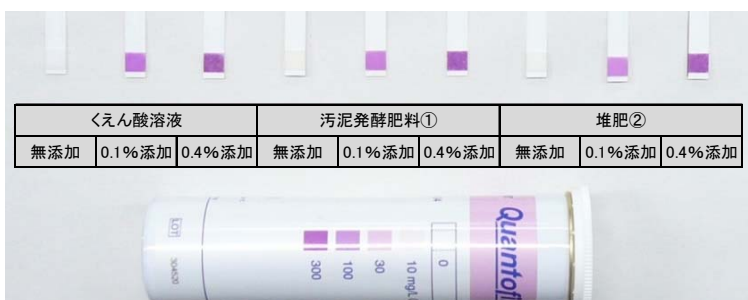


写真10 硫酸銅(Ⅱ)五水和物の添加
試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Copper

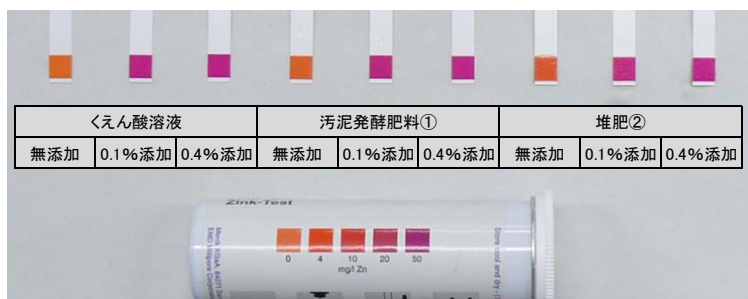


写真11 硫酸亜鉛七水和物の添加
試験結果

試験紙:MQuant™ Zinc Test

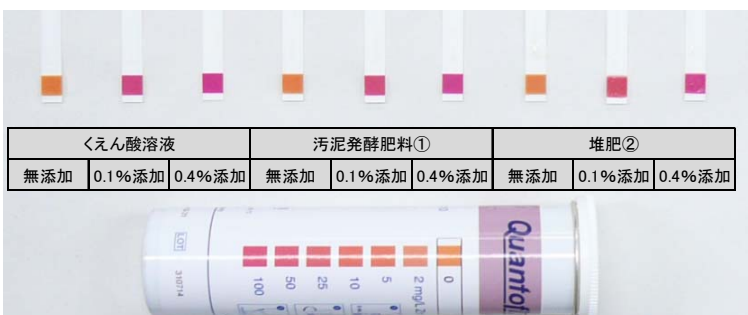


写真12 硫酸亜鉛七水和物の添加
試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

3) 流通肥料の試験結果(水による抽出)

汚泥発酵肥料1 銘柄, 焼成汚泥肥料1 銘柄及び堆肥2 銘柄を用いて, 水による抽出を行った溶液の定性結果を表5及び写真13~24に示した。試料に含まれるカルシウム, 銅及び亜鉛が30秒間振とうでは溶出しづらい可能性を考慮し, 30秒間振とう後に1時間静置する抽出方法も実施した。

焼成汚泥肥料において, 30秒間振とうによる抽出と比較して30秒間振とう後1時間静置による抽出の方が, 強くカルシウムイオンの定性反応を示した。一方, 堆肥④において, MQuant™ Calcium Testについては, 30秒間振とう後1時間静置による抽出と比較して30秒間振とうによる抽出の方が強くカルシウムイオンの定性反応を示した(写真13~14)。QUANTOFIX® Calciumについては, 30秒間振とうによる抽出ではカルシウムイオンの定性反応を示したが, 30秒間振とう後1時間静置による抽出では, カルシウムイオンの定性反応を示さなかった(写真15~16)。この原因として, 1時間静置の間に試料から定性反応を妨害する物質が多く溶出した可能性や, カルシウムが不溶性の形態に変化した可能性が考えられた。

MQuant™ Copper, QUANTOFIX® Copper Test, MQuant™ Zinc Test 及び QUANTOFIX® Zinc については、すべての試料で、30 秒間振とう、30 秒間振とう後 1 時間静置のいずれの抽出法でも、銅イオン及び亜鉛イオンの定性反応を示さなかった(写真 17～24)。

表5 流通肥料の試験結果(水による抽出)

検出対象イオン	試験紙の種類	汚泥発酵 肥料②		焼成汚泥 肥料①		堆肥⑤		堆肥⑥	
		30 s ^{a)}	1 h	30 s	1 h	30 s	1 h	30 s	1 h
カルシウムイオン	MQuant™ Calcium Test	+ ^{b)}	+	+-	+	+	+	+	+-
	QUANTOFIX® Calcium	+	+	+-	+	+	+	+	-
銅イオン	MQuant™ Copper Test	-	-	-	-	-	-	-	-
	QUANTOFIX® Copper	-	-	-	-	-	-	-	-
亜鉛イオン	MQuant™ Zinc Test	-	-	-	-	-	-	-	-
	QUANTOFIX® Zinc	-	-	-	-	-	-	-	-

a) 30 s: 30秒間振とう, 1 h: 30秒間振とう後, 1時間静置

b) +: 定性試験陽性, +-: 定性試験陽性(微弱), -: 定性試験陰性

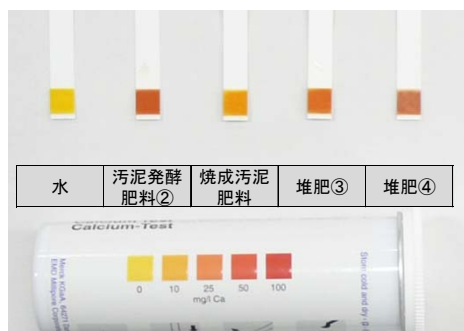


写真 13 流通肥料の試験結果

試験紙: MQuant™ Calcium Test

抽出方法: 30 秒間振とう

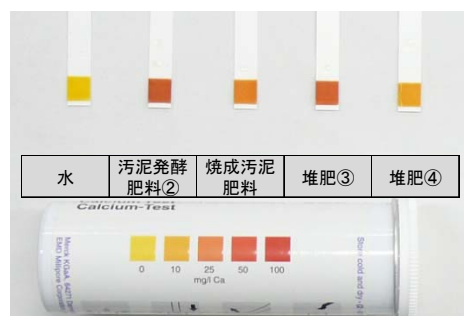


写真 14 流通肥料の試験結果

試験紙: MQuant™ Calcium Test

抽出方法: 30 秒間振とう後, 1 時間静置



写真 15 流通肥料の試験結果

試験紙: QUANTOFIX® Calcium

抽出方法: 30 秒間振とう



写真 16 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX[®] Calcium

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置

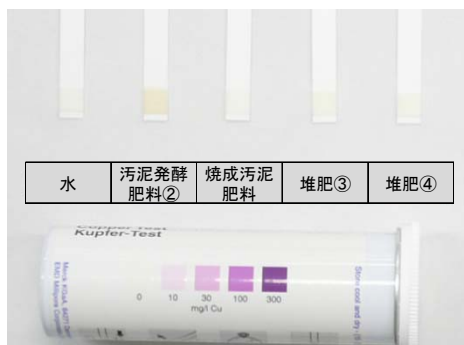


写真 17 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant[™] Copper Test

抽出方法:30 秒間振とう



写真 18 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant[™] Copper Test

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置

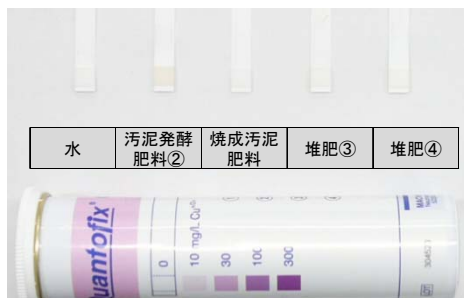


写真 19 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX[®] Copper

抽出方法:30 秒間振とう



写真 20 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX[®] Copper

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置



写真 21 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant™ Zinc Test

抽出方法:30 秒間振とう



写真 22 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant™ Zinc Test

抽出方法:30 秒間振とう後、1 時間静置

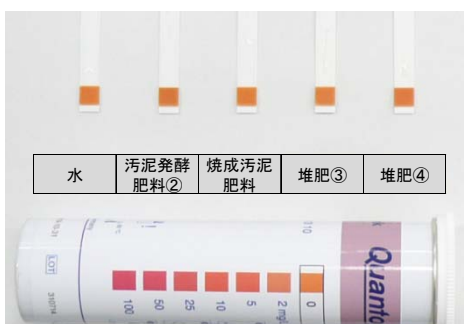


写真 23 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

抽出方法:30 秒間振とう

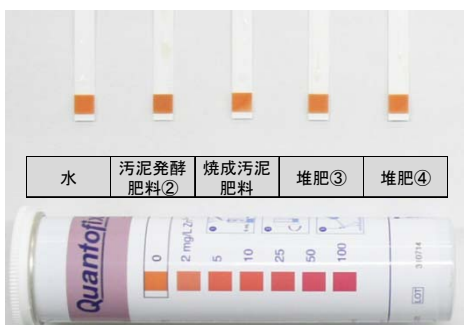


写真 24 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

抽出方法:30 秒間振とう後、1 時間静置

4) 流通肥料の試験結果(くえん酸溶液による抽出)

汚泥発酵肥料 2 銘柄, 焼成汚泥肥料 1 銘柄, し尿汚泥肥料 1 銘柄及び堆肥 2 銘柄を用いて, くえん酸溶液による抽出を行った溶液の定性結果を表 6 及び写真 25~44 に示した. 試料に含まれるカルシウム, 銅及び亜鉛が 30 秒間振とうでは溶出しづらい可能性を考慮し, 30 秒間振とう後に 1 時間静置する抽出方法も実施した.

MQuant™ Calcium Test 及び QUANTOFIX® Calcium については, すべての試料で, 30 秒間振とう, 30 秒間振とう後 1 時間静置のいずれの抽出法でも, カルシウムイオンの定性反応を示した(写真 25~28).

MQuant™ Copper Test 及び QUANTOFIX® Copper については, すべての試料で, 30 秒間振とう, 30 秒間振とう後 1 時間静置のいずれの抽出法でも, 銅イオンの定性反応を示さなかった(写真 29~36). く溶性の銅を

多く含むし尿汚泥肥料②でも銅イオンの定性反応を示さなかった原因として、くえん酸溶液による 30 秒間振とうの抽出力が回転振り混ぜ器を用いた方法と比較して弱いこと及び試料中に何らかの定性反応を妨害する物質が含まれる可能性が考えられた。

MQuant™ Zinc Test については、汚泥発酵肥料②、焼成汚泥肥料、し尿汚泥肥料②及び汚泥発酵肥料③で、30 秒間振とう及び 30 秒間振とう後 1 時間静置のいずれの抽出法でも、亜鉛イオンの定性反応を示した(写真 37～40)。QUANTOFIX® Zinc については、し尿汚泥肥料②及び汚泥発酵肥料③で、30 秒間振とう、30 秒間振とう後 1 時間静置のいずれの抽出法でも、亜鉛イオンの定性反応を示した(写真 41～44)。

表6 流通肥料の試験結果(くえん酸溶液による抽出)

検出対象 イオン	試験紙の種類	汚泥発酵 肥料②		焼成汚泥 肥料		堆肥⑤		堆肥⑥		し尿汚泥 肥料②		汚泥発酵 肥料③	
		30 s ^{a)}	1 h	30 s	1 h	30 s	1 h	30 s	1 h	30 s	1 h	30 s	1 h
カルシウム イオン	MQuant™ Calcium Test	+ ^{b)}	+	+	+	+	+	+	+	N.E. ^{c)}	N.E.	N.E.	N.E.
	QUANTOFIX® Calcium	+	+	+	+	+	+	+	+	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
銅イオン	MQuant™ Copper Test	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	QUANTOFIX® Copper	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
亜鉛イオン	MQuant™ Zinc Test	+—	+—	+—	+—	—	—	—	—	+	+	+	+
	QUANTOFIX® Zinc	—	—	—	—	—	—	—	—	+—	+—	+—	+—

a) 30 s: 30秒間振とう, 1 h: 30秒間振とう後, 1時間静置

b) +: 定性試験陽性, +—: 定性試験陽性(微弱), —: 定性試験陰性

c)試験実施せず

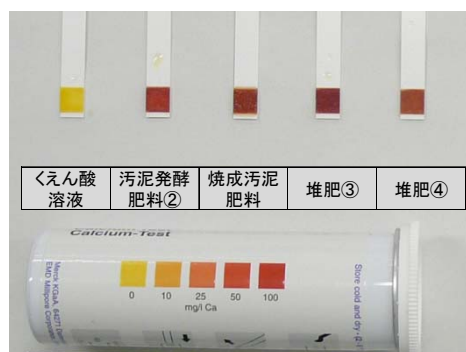


写真 25 流通肥料の試験結果

試験紙: MQuant™ Calcium Test

抽出方法: 30 秒間振とう

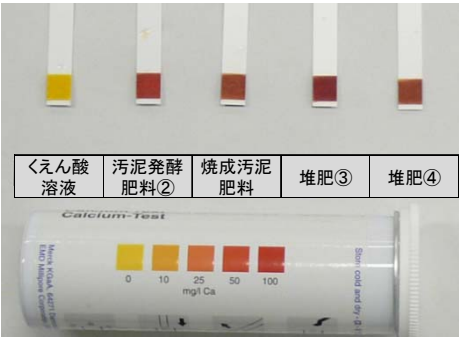


写真 26 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant™ Calcium Test

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置

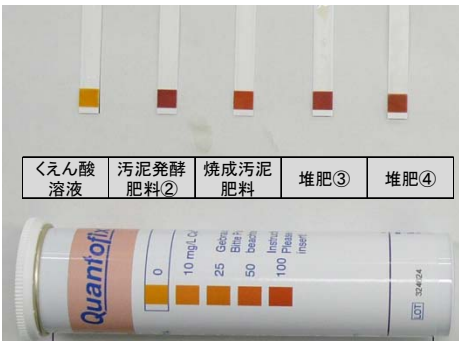


写真 27 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Calcium

抽出方法:30 秒間振とう

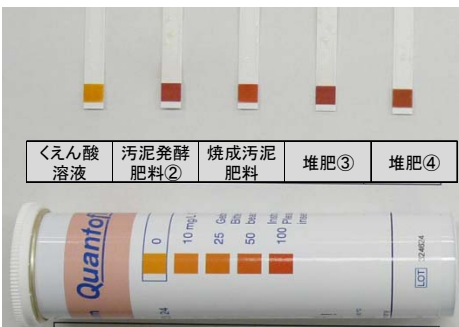


写真 28 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Calcium

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置

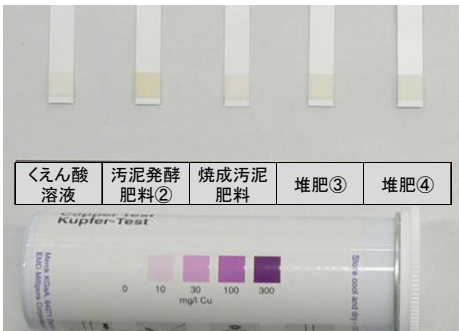


写真 29 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

抽出方法:30 秒間振とう



写真 30 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置



写真 31 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

抽出方法:30 秒間振とう

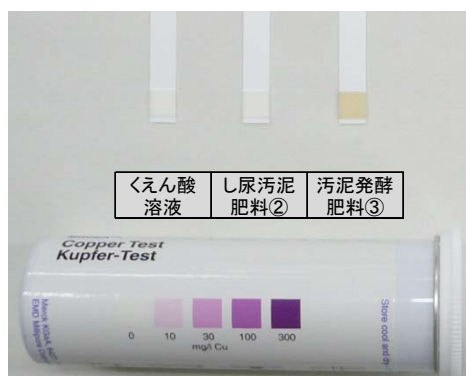


写真 32 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置

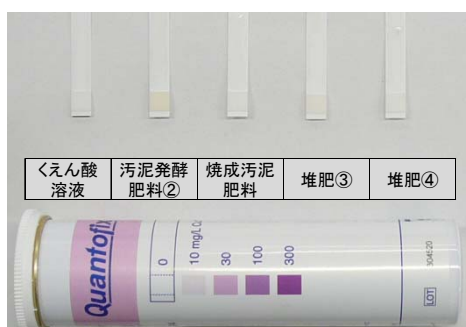


写真 33 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Copper

抽出方法:30 秒間振とう

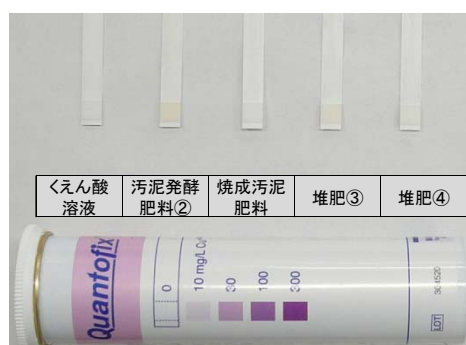


写真 34 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Copper

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置



写真 35 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Copper

抽出方法:30 秒間振とう



写真 36 流通肥料の試験結果

試験紙: QUANTOFIX[®] Copper

抽出方法: 30 秒間振とう後, 1 時間静置



写真 37 流通肥料の試験結果

試験紙: MQuant[™] Zinc Test

抽出方法: 30 秒間振とう



写真 38 流通肥料の試験結果

試験紙: MQuant[™] Zinc Test

抽出方法: 30 秒間振とう後, 1 時間静置



写真 39 流通肥料の試験結果

試験紙: MQuant[™] Zinc Test

抽出方法: 30 秒間振とう



写真 40 流通肥料の試験結果

試験紙:MQuant™ Zinc Test

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置

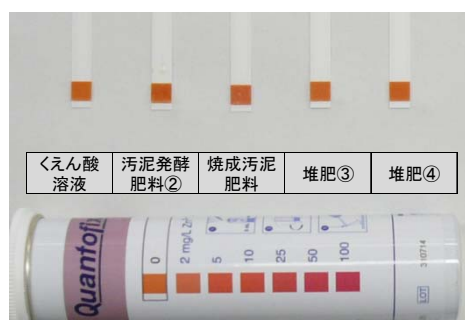


写真 41 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

抽出方法:30 秒間振とう

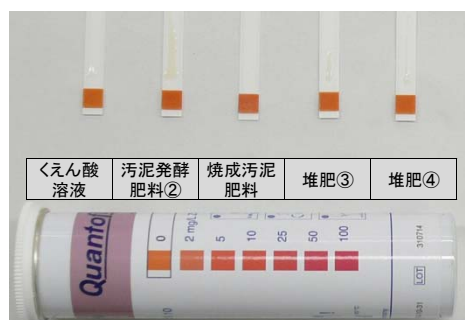


写真 42 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置

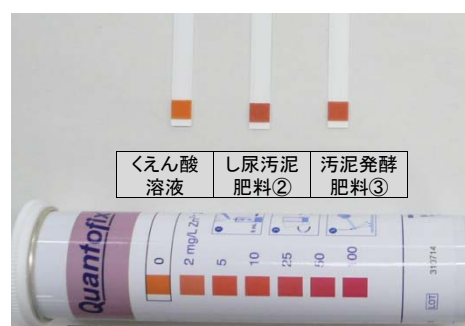


写真 43 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

抽出方法:30 秒間振とう

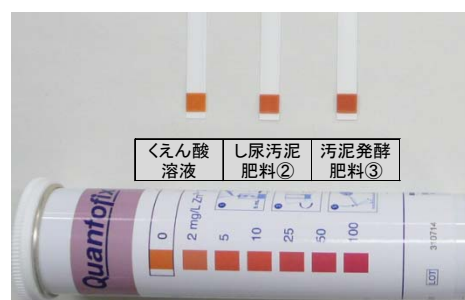


写真 44 流通肥料の試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

抽出方法:30 秒間振とう後, 1 時間静置

5) 高濃度添加時における定性反応の確認試験

3.1) 及び 2) の添加試験において、低濃度添加試料と比較して高濃度添加試料の定性反応が不鮮明になる場合があった。そのため、カルシウム、銅及び亜鉛として、試料 5 g に対し様々な割合(%)で添加した場合と同量を水に添加することで、高濃度域での試験紙の定性反応を確認する試験を実施した。結果は写真 45～57 のとおり。

水に硝酸カルシウム四水和物を添加した水溶液について定性反応試験を実施したところ、MQuant™ Calcium Test は、カルシウムとして 1.0 %相当量添加水溶液及び 4.0 %相当量添加水溶液でカルシウムイオンの定性反応を示したが、10.0 %及び 20.0 %相当量添加水溶液で反応が不鮮明になった(写真 45)。QUANTOFIX® Calcium は、カルシウムとして 1.0 %相当量添加水溶液でカルシウムイオンの定性反応を示したが、4.0 %～20.0 %相当量添加水溶液でカルシウムイオンの定性反応が不鮮明になった(写真 46)。MQuant™ Calcium Test が高濃度添加水溶液で定性反応が弱まった原因を特定するため、水に塩化カルシウムを段階的に増やして添加した水溶液を用いて定性反応試験を実施したところ、添加量が増えるに従い MQuant™ Calcium Test, QUANTOFIX® Calcium ともにカルシウムイオンの定性反応が不鮮明になった、(写真 47 及び 48)。一方、水にカルシウムとして 0.1 %相当量の硝酸カルシウム四水和物を添加し、更に硝酸を段階的に増やして添加した水溶液を用いて試験を実施したところ、MQuant™ Calcium Test, QUANTOFIX® Calcium ともに、硝酸の添加量の増加に伴う変化は見られなかった(写真 49～50)。以上の結果から、MQuant™ Calcium Test の反応が弱くなるのは、高濃度のカルシウムが原因と考えられた。

水に硫酸銅(Ⅱ)五水和物を添加した水溶液を用いて定性反応試験を実施したところ、MQuant™ Copper test は、銅として 0.1 %相当量添加水溶液で銅イオンの定性反応を示したが、0.4 %相当量添加水溶液では定性反応が不鮮明になり、1.0 %～2.0 %相当量添加水溶液では茶色に呈色した(写真 51)。QUANTOFIX® Copper は、銅として 0.1 %～2.0 %相当量添加水溶液で銅イオンの定性反応を示した(写真 52)。MQuant™ Copper test が、高濃度添加水溶液で定性反応が不鮮明になる原因を特定するため、水に硝酸銅三水和物を段階的に増やして添加した水溶液を用いて定性反応試験を実施したところ、銅として 0.1 %相当量添加水溶液で銅イオンの定性反応を示したが、0.4 %相当量添加水溶液では定性反応が不鮮明になり、1.0 %～2.0 %相当量添加水溶液では茶色に呈色した(写真 53)。QUANTOFIX® Copper は、銅として 1.0 %～2.0 %相当量添加水溶液で銅イオンの定性反応を示した(写真 54)。一方、水に銅として 0.1 %相当量の硝酸銅三水和物を添加し、更に硝酸を段階的に増やして添加した水溶液を用いて定性反応試験を実施したところ、MQuant™ Copper test, QUANTOFIX® Copper ともに添加量の増加に伴う変化は見られなかった(写真 55)。これらの結果から、MQuant™ Copper test の定性反応が不鮮明になること及び試験紙が茶色に呈色することは、高濃度の銅が原因と考えられた。

MQuant™ Zinc Test 及び QUANTOFIX® Zinc は、亜鉛として 0.1 %～2.0 %相当量添加試料で、亜鉛イオンの定性反応を示した(写真 56～57)。

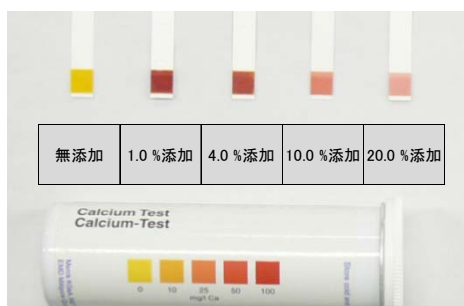


写真 45 硝酸カルシウム四水和物の高濃度添加試験結果

試験紙: MQuant™ Calcium Test

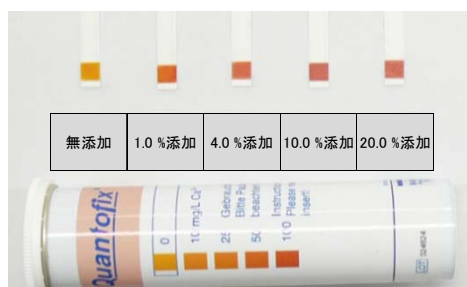


写真 46 硝酸カルシウム四水和物の高濃度添加試験結果

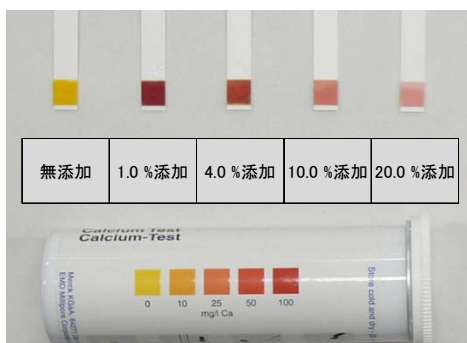
試験紙:QUANTOFIX[®] Calcium

写真 47 塩化カルシウムの高濃度添加試験結果

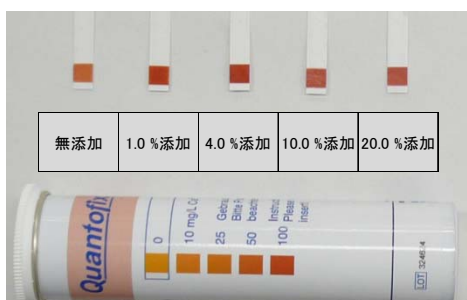
試験紙:MQuant[™] Calcium Test

写真 48 塩化カルシウムの高濃度添加試験結果

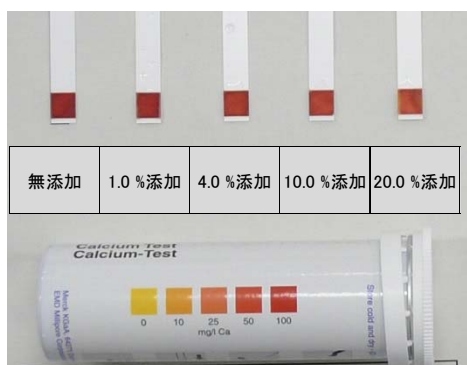
試験紙:QUANTOFIX[®] Calcium

写真 49 0.1 %相当量硝酸カルシウム四水和物溶液への硝酸添加試験結果

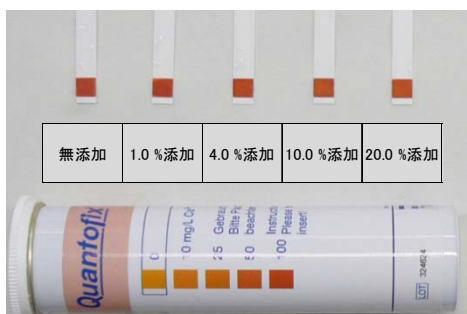
試験紙:MQuant[™] Calcium Test

写真 50 0.1 %相当量硝酸カルシウム四水和物溶液への硝酸添加試験結果

試験紙:QUANTOFIX[®] Calcium

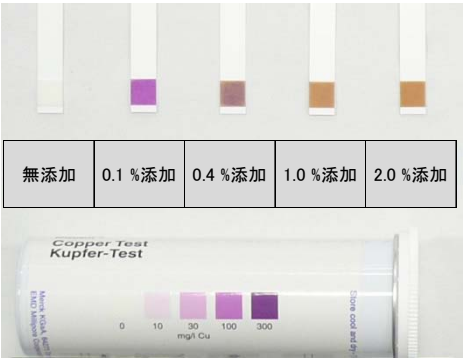


写真 51 硫酸銅(Ⅱ)五水和物の高濃度添加試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

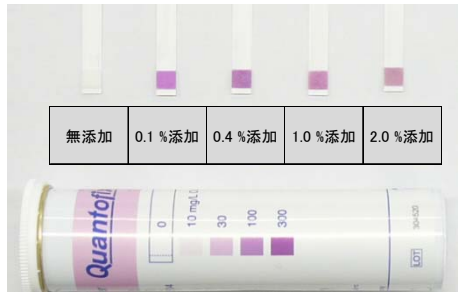


写真 52 硫酸銅(Ⅱ)五水和物の高濃度添加試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Copper

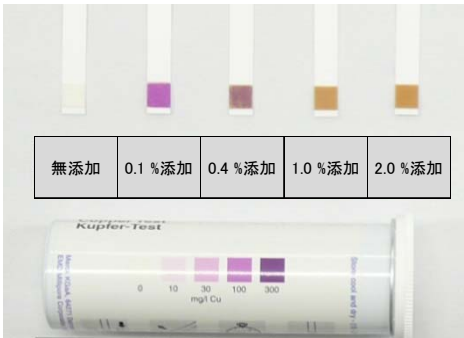


写真 53 硝酸銅三水和物の高濃度添加試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

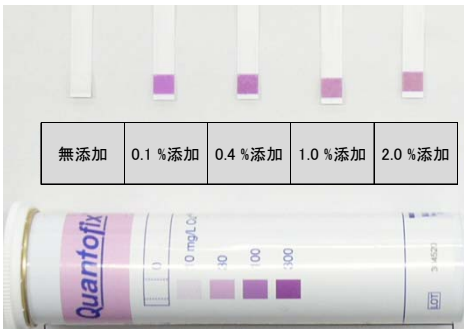


写真 54 硝酸銅三水和物の高濃度添加試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Copper



写真 55 0.1 %相当量硝酸銅三水和物溶液への硝酸添加試験結果

試験紙:MQuant™ Copper Test

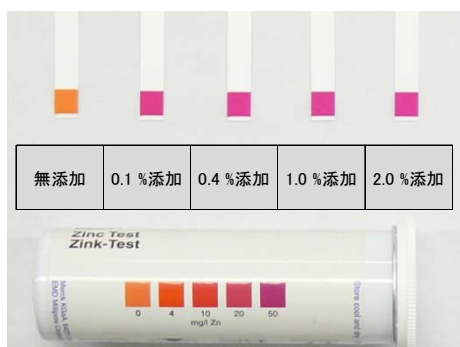


写真 56 硫酸亜鉛七水和物の高濃度添加試験結果

試験紙:MQuant™ Zinc Test

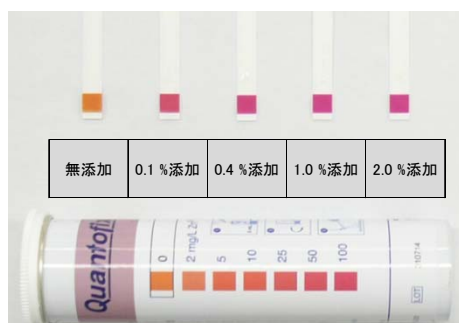


写真 57 硫酸亜鉛七水和物の高濃度添加試験結果

試験紙:QUANTOFIX® Zinc

4. まとめ

肥料中のカルシウム、銅及び亜鉛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) カルシウムイオン用試験紙については、添加試験及び流通肥料の試験の結果、多くの組み合わせで含有する成分を正確に検出できたことから、汚泥肥料及び堆肥中のカルシウムの定性試験法として利用可能と考えられた。ただし、流通肥料の試験において、水を抽出溶媒として用いた場合、30秒間振とう後の1時間静置の有無により、定性反応の結果に差が生じた試料があったことから、1時間静置を行う場合と行わない場合の両方の抽出方法を行うことで、判定の精度を上げることが可能と考えられた。また、メーカー推奨測定対象範囲を超える高濃度のカルシウムを含む溶液において、定性反応が不鮮明になる等の反応を示す場合があったことから、カルシウムを多く含有する試料の定性の際には、試料溶液の希釈が必要と考えられた。

(2) 銅イオン用試験紙については、添加試験において、汚泥肥料及び堆肥に添加された銅を検出できたものの、流通肥料の試験において、銅を比較的多く含む汚泥肥料でも銅イオンの定性反応を示さなかった。流通肥料の銅含量を考慮すれば、汚泥肥料及び堆肥中の銅の定性試験法としての利用は困難と考えられた。

(3) 亜鉛イオン用試験紙については、添加試験及び流通肥料の試験の結果、多くの組み合わせで含有する成分を正確に検出できたことから、汚泥肥料及び堆肥中の亜鉛の定性試験法として利用可能と考えられた。

文献

- 1) 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 : 試験紙による肥料成分の検出, 肥料研究報告, **10**, 242~266(2017)

The Qualitative Test by Means of Test Paper

Harufumi SAITO¹, Kenta SAKUMA², Yuji SHIRAI¹, Fumihiro Abe¹

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) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

We investigated the qualitative test by means of test paper about calcium, copper and zinc 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 sludge fertilizer and compost spiked with calcium at 1.0 % and 4.0 %, copper and zinc at 0.1 % and 0.4 %, we detected added ingredients in many combinations. As results of the test of fertilizers, which distributed in the market, we could detect ingredients except copper. In the calcium ion test paper and copper ion test paper, we observed abnormal reaction when target ions were contained exceeding the application concentration range of the test paper. In this case, it is necessary to dilute the solution.

Key words qualitative test, test paper, fertilizer, calcium, copper, zinc

(Research Report of Fertilizer, **11**, 190~209, 2018)

肥料研究報告編集委員

委員長 山本 実

副委員長 荻野 喜江

青山 恵介

白井 裕治

阿部 文浩

高橋 賢

小森谷 敏一

野崎 友春

清水 昭

肥料研究報告 第 11 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 30 年 12 月

編集 肥料研究報告編集委員会

印刷 名取印刷工業有限会社
東京都新宿区新小川町 7 番 11 号 名取第 2 ビル
TEL 03-3260-4767

