

肥料研究報告

第15号

2022年

Research Report of Fertilizer

Vol. 15

2022



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、農林水産行政と密接に連携しつつ、農業生産資材(肥料、農薬、飼料及び土壌改良資材)や食品を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全の確保、食品等の品質の改善・表示の適正化等に技術で貢献することを使命に掲げ、検査業務に取り組んでいます。

このうち、肥料及び土壌改良資材については、肥料の品質の確保等に関する法律(肥料法)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うことで、肥料等の品質の保全、公正な取引と安全な施用の確保に貢献しています。

肥料等の品質を保全し、公正な取引と安全な施用を確保するためには、国際的に要求される性能を有する方法を用いて、精度を適切に管理して肥料等の分析を行い、信頼できる分析値を得ることが重要となります。今般の肥料法の改正により、新たな制度の下で産業副産物や堆肥などを利用した新しいタイプの肥料が生産されることから、これらの肥料の主成分、有害物質等を適正に評価する分析法の開発・改良、性能評価がこれまでも増して必要とされています。このため、FAMICでは新たな原料の組み合わせに対応した分析法の改良や、最新の分析機器を活用した分析法の開発、分析法の性能評価などの調査研究に取り組んでおり、これらの成果を「肥料等試験法」に収載し、公表しています。

令和3年度は、ICP-OESを用いた主成分の分析方法の開発、昨年度改良したアンモニア性窒素及び硝酸性窒素の分析法について共同試験による性能評価を行うとともに、肥料中の有害物質の土壌中での挙動や作物への吸収などの調査研究に取り組みました。また、肥料分析事業者対象の外部精度管理試験を実施し、その結果の解析を行いました。これらの成果は「肥料等試験法」に反映させるとともに、得られた知見をこの「肥料研究報告(第15号)」に取りまとめました。

最後に、本研究報告が肥料の品質の保全、公正な取引と安全な施用の確保の一助となることを期待するとともに、関係各位におかれましては、FAMICの技術レベルの向上のために、引き続き御指導、御鞭撻を賜りますよう、お願い申し上げます。なお、本号については、昨年同様、新型コロナウイルスが猛威を振るい、在宅勤務等の感染拡大防止対策を徹底したことにより、計画的に業務を進めることが大きく制約され、また、感染に対する不安がある中、職員一人一人が使命感を持って、担当した課題に取り組んだ成果がまとめられたものであることを申し添えます。

2022年10月

独立行政法人農林水産消費安全技術センター
理事長 木内 岳志

肥料研究報告 第15号

– 2022 –

目次

<試験法等の検討及び妥当性確認>

1	ICP-OES を用いた肥料中のりん酸全量及び加里全量の分析法の開発 山西正将, 橋本良美, 平田絵理香, 白井裕治	1
2	ICP-OES を用いた肥料中の可溶性りん酸の分析法の開発 青山恵介	24
3	硝酸性窒素分析のためのフェノール硫酸法の改良と性能評価 ー室間共同試験による妥当性確認ー 白澤優子, 加藤公栄	33
4	く溶性マンガン及び水溶性マンガン測定のためのフレイム原子吸光法(波長 403.1 nm)の 性能評価ー室間共同試験による妥当性確認ー 八木寿治, 天野忠雄	44
5	HPLC を用いた肥料中の DMPP(硝酸化成抑制材)の分析法の性能評価 ー室間共同試験による妥当性確認ー 平田絵理香, 橋本良美, 大島舞弓	54
6	LC-MS/MS を用いた肥料中の PFOS 及び PFOA の分析法の性能評価 ー室間共同試験による妥当性確認ー 沼寄佳奈子, 白井裕治	66

<調査・試験業務>

7	有機ふっ素化合物の分析 白井裕治, 沼寄佳奈子, 秋元里乃	87
8	汚泥肥料の連用によるカドミウム等の土壌への蓄積, 作物への吸収試験(継続) ー2020年冬作・2021年夏作ー 浅尾直紀, 小林涼斗, 増井亮太, 村山和晃, 阿部文浩	108

<試験成績の信頼性確保関連>

9	2021 年度 全国共通試料を用いた肥料の外部精度管理試験成績の解析 大島舞弓, 白澤優子, 恵智正宏, 天野忠雄, 神川孝文, 田中雄大, 秋元里乃, 引地典雄	135
10	肥料認証標準物質の開発 -FAMIC-C(汚泥肥料)の調製- 松尾信吾, 八木啓二, 田中雄大, 吉村英美, 秋元里乃	155
11	2021 年度 肥料認証標準物質の開発 -高度化成肥料 FAMIC-A-17, 普通化成肥料 FAMIC-B-14 及び汚泥発酵肥料 FAMIC-C-18-2 の長期安定性評価- 神川孝文, 青山恵介, 川口伸司, 岩本直樹, 秋元里乃	169

注 : 本研究報告における操作方法及び用語等は, 肥料等試験法(2021)の「1.総則 1.1 共通事項 (2) 共通する一般事項、操作方法及び用語」に従い記載している表現に基づく。

Research Report of Fertilizer Volume 15

– 2022–

Index

<Development and Validation for Determination Methods>

- 1 Development of Determination Method of Total Phosphoric Acid and Total Potassium in Fertilizers by ICP-OES
..... YAMANISHI Masayuki, HASHIMOTO Yoshimi,
HIRATA Erika, SHIRAI Yuji 1
- 2 Development of Determination Method of Citrate-soluble Phosphoric Acid in Fertilizers by ICP-OES
..... AOYAMA Keisuke 24
- 3 Improved Determination and Performance Evaluation of Analysis Method for Nitrate Nitrogen by Phenol Sulfuric Acid :Harmonized Collaborative Validation
..... SHIRASAWA Yuko, KATO Kimie 33
- 4 Performance Evaluation of Analysis Method for Citric Acid-soluble and Water-soluble Manganese using Flame Atomic Absorption Spectrometry (wavelength 403.1 nm)
:Harmonized Collaborative Validation
..... YAGI Toshiharu, AMANO Tadao 44
- 5 Performance Evaluation of Analysis Method for 3,4-Dimethylpyrazole Phosphate (DMPP) in Fertilizers using HPLC :Harmonized Collaborative Validation
..... HIRATA Erika, HASHIMOTO Yoshimi, OSHIMA Mayu 54
- 6 Performance Evaluation of Determination Method for PFOS and PFOA in Fertilizers by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) :Harmonized Collaborative Validation
..... NUMAZAKI Kanako, SHIRAI Yuji 66

<Investigation and Research>

- 7 Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)
..... SHIRAI Yuji, NUMAZAKI Kanako, AKIMOTO Satono 87

8	Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued Report) - Winter 2020 and Summer 2021- ASAO Naoki, KOBAYASHI Ryoto, MASUI Ryota, MURAYAMA Kazuaki, ABE Fumihiro	108
< Assurance Practices for Reliable Analytical Data >		
9	Result of Proficiency Testing for Determination of Major Components and Harmful Elements in Ground Fertilizers Conducted in Fiscal Year 2021 OSHIMA Mayu, SHIRASAWA Yuko, ECHI Masahiro, AMANO Tadao, KAMIKAWA Takafumi, TANAKA Yudai, AKIMOTO Satono, HIKICHI Norio	135
10	Preparation of Certified Reference Material (CRM) for Determination of Major Components, Organic Carbon and Harmful Components: Sludge Fermented Fertilizer (FAMIC-C-21) MATSUO Shingo, YAGI Keiji, TANAKA Yudai, YOSHIMURA Hidemi, AKIMOTO Satono	155
11	Long-term Stability Evaluation of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-17) , Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-14) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-18-2) KAMIKAWA Takafumi, AOYAMA Keisuke, KAWAGUCHI Shinji IWAMOTO Naoki, and AKIMOTO Satono	169

Annotation: The operation methods and terms used in this research report are described in accordance with "1. General rule 1.1 Common items (2) General matters in common, procedures and terms " in Testing Methods for Fertilizers (2021)

1 ICP-OES を用いた肥料中のりん酸全量及び加里全量の分析法の開発

山西正将¹, 橋本良美¹, 平田絵理香², 白井裕治¹

キーワード 肥料, りん酸, 加里, カリウム, ICP-OES

1. はじめに

肥料中のりん酸全量(T-P₂O₅)及び加里全量(T-K₂O)は, 肥料の品質の確保等に関する法律¹⁾で含有を保証する成分の最小量を保証成分量として保証票に表示することが義務づけられている。また, 公定規格²⁾では肥料の種類ごとに保証成分量として表示できる最小量が規定され, その分析方法は肥料等試験法³⁾によることが定められている。

現在, 肥料等試験法では肥料中のりん酸全量の分析法はバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法及びキノリン重量法が, 加里全量についてはフレイム原子吸光光度法, フレイム光度法及びテトラフェニルほう酸ナトリウム重量法が記載されている。

FAMIC ではこれまで, 分析の効率化の観点から, 誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES)を用いた主成分等の分析法について検討し, 2011年に汚泥肥料中の有害重金属の分析法⁴⁾, 2015年に液状肥料中の水溶性主成分の分析法⁵⁾, 2016年に液状肥料中の効果発現促進材成分の分析法⁶⁾, 2017年にチタンの分析法⁷⁾, 2018年に固形肥料中のく溶性主成分の分析法⁸⁾, 2019年に固形肥料中の水溶性主成分の分析法⁹⁾及び2020年に固形肥料中の可溶性石灰と苦土の分析法¹⁰⁾について単一試験室における妥当性確認, また同年に液状肥料中の水溶性主成分及び効果発現促進材成分の分析法¹¹⁾について共同試験による室間再現性の確認結果を報告してきた。

今回, これまで検討していなかった ICP-OES を用いた肥料中のりん酸全量及び加里全量の分析法について検討を行い, 単一試験室による妥当性確認を行ったので報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

Table 1 に示した肥料を収集した。汚泥肥料については肥料等試験法³⁾2.3.1 により, 粉碎前に 40 °C で 60～70 時間乾燥した。肥料等試験法 2.3.3 により 500 μm のふるいを通過するまで粉碎機で粉碎したものを分析用試料とした。なお, 対象成分が任意の濃度となるよう Table 2 の試薬を Table 3 の割合で配合したのも併せて分析用試料(調製試料)とした。

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肥飼料安全検査部 (現)札幌センター

Table 1 Samples and materials

Measurement component	Type and number of samples	Materials	
T-P ₂ O ₅	Sewage sludge fertilizer	1	Ammonium sulfate, Ammonium chloride, Urea, Byproduct nitrogen fertilizer, Byproduct liquid nitrogen fertilizer, Superphosphate, Concentrated superphosphate, Potassium sulfate, Potassium chloride, Potassium magnesium sulfate, Fish meal, Steamed wool waste, Steamed bone meal, Steamed leather meal, Soybean meal, Rape seed meal, Castor pomace, Processed poultry manure, Fertilizer from corn steep liquor, Byproduct organic fertilizer of plant origin, Organic fertilizer mixture, Dried microbes, Compound fertilizer, Ammonium phosphate, Potassium phosphite, Byproduct mixed fertilizer, Magnesium sulfate fertilizer, Byproduct magnesium fertilizer, Manganese sulfate fertilizer, Borax, Fritted micronutrient mixture, Composted sludge fertilizer, Sewage sludge, Sludge from fecal treatment plant, Industrial sludge fertilizer, Crustacean fertilizer, Rice bran, Fermented rice bran, Cow dung, Chicken manure, Chicken manure burning ash, Compost, Textile waste, Ammonia, Urea-formaldehyde mixture, Phosphoric acid, Animal-based and plant-based organic materials, Woody peat, Sulfuric acid
	Sludge from fecal treatment plant	3	
	Calcined sludge fertilizer	2	
	Composted sludge fertilizer	7	
	Crustacean fertilizer	1	
	Byproduct organic fertilizer of plant origin	1	
	Compound fertilizer	17	
	Molded compound fertilizer	1	
	Mixed compost compound fertilizer	2	
	Home garden-use fertilizer	1	
T-K ₂ O	Sewage sludge fertilizer	1	Ammonium sulfate, Urea, Ureaform, Byproduct nitrogen fertilizer, Superphosphate, Concentrated superphosphate, Potassium sulfate, Potassium chloride, Potassium magnesium sulfate, Fish meal, Steamed wool waste, Steamed bone meal, Steamed leather meal, Soybean meal, Rape seed meal, Castor pomace, Rice bran meal, Processed poultry manure, Fertilizer from corn steep liquor, Byproduct organic fertilizer of vegetable origin, Organic fertilizer mixture, Dried microbes, Byproduct organic fertilizer from animal origin, Compound fertilizer, Ammonium phosphate, Potassium phosphite, Byproduct mixed fertilizer, Fluid mixed fertilizer, Byproduct magnesium fertilizer, Manganese sulfate fertilizer, Borax, Fritted micronutrient mixture, Sewage sludge, Sludge from fecal treatment plant, Industrial sludge fertilizer, Rice bran, Fermented rice bran, Dried algae, Cow dung, Chicken manure, Chicken manure burning ash, Compost, Ammonia, Phosphoric acid, Potassium hydroxide, Animal-based and plant-based organic materials, By-products of alcohol production, Woody peat, Sulfuric acid
	Sludge from fecal treatment plant	3	
	Industrial sludge fertilizer	1	
	Composted sludge fertilizer	4	
	Castor pomace	1	
	Byproduct organic fertilizer of plant origin	1	
	Compound fertilizer	16	
	Molded compound fertilizer	1	
	Mixed compost compound fertilizer	1	
	Fluid mixed fertilizer	2	

Table 2 Reagents used to prepare analytical samples % (Mass fraction)

Reagents	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
A Urea (CO(NH ₂) ₂)	46.65		
B Calcium Dihydrogenphosphate Monohydrate ((Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O)	-	56.31	-
C Potassium Chloride (KCl)	-	-	63.18
D Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	-	-	-

Table 3 Mixing ratio of reagents and component concentration of prepared sample

Preparation sample number	Mixing ratio (%) ^{a)}				Design component concentration of prepared sample (%) ^{a)}		
	A	B	C	D	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
1	20.0	55.0	5.0	20.0	9.33	30.97	3.16
2	27.5	27.5	25.0	20.0	12.83	15.49	15.79
3	24.5	5.5	50.0	20.0	11.43	3.10	31.59
4	55.0		40.0	5.0	25.66	0	25.27
5	55.0	40.0		5.0	25.66	22.52	0.00

a) Mass fraction

2) 試薬等の調製

- (1) りん標準液 (P 10 000 mg/L): シグマアルドリッチ ICP 用
- (2) カリウム標準液 (K 10 000 mg/L): シグマアルドリッチ ICP 用
- (3) 金標準液 (Au 1000 mg/L): 富士フイルム和光純薬 JCSS
- (4) ベリリウム標準液 (Be 1000 mg/L): 富士フイルム和光純薬 JCSS
- (5) リチウム標準液 (Li 1000 mg/L): 富士フイルム和光純薬 JCSS
- (6) 塩化セシウム: 富士フイルム和光純薬 特級
- (7) 塩酸: 富士フイルム和光純薬 有害金属測定用
- (8) 塩酸 (V₁+V₂): (7)の塩酸の体積 V₁ と水の体積 V₂ とを混合したもの。
- (9) 干渉抑制剤溶液: 塩化セシウム 12.668 g に塩酸 (1+5) 250 mL 加えて溶かし, 水で 1000 mL とした。
- (10) りん標準液 (P 1000 mg/L): (1)の標準液を希釈し調製した。なお, 希釈時には塩酸 (1+23) を用いた。
- (11) 検量線用りん標準液: (10)の標準液を任意の容量の全量フラスコに一定量分取し, 塩酸 (1+23) を標線まで加えて, 検量線用標準液 (P: 1 mg/L~200 mg/L) を調製した。
- (12) 検量線用りん空試験液: 塩酸 (1+23) を使用した。
- (13) りん測定用内標準液: (4)の標準液を任意の容量の全量フラスコに一定量分取し, 塩酸 (1+23) を標線まで加えて, りん測定用内標準液 1 (横方向測定用) (Be: 100 mg/L) 及びりん測定用内標準液 2 (軸方向測定用) (Be: 20 mg/L) を調製した。
- (14) 混合標準液: (1)及び(2)の標準液を任意の容量の全量フラスコに一定量分取し, 塩酸 (1+23) を標線まで加えて, 混合標準液 (横方向測定用) (P: 1000 mg/L, K: 1000 mg/L) 及び混合標準液 (軸方向測定用) (P: 1000 mg/L, K: 25 mg/L) を調製した。
- (15) 検量線用混合標準液: (14)の混合標準液を任意の容量の全量フラスコに一定量分取し, 干渉抑制剤溶液を最終溶液の 1/10 容量加え, 塩酸 (1+23) を標線まで加えて, 検量線用標準液 (横方向測定用) (P: 1 mg/L~200 mg/L, K: 1 mg/L~200 mg/L) 及び検量線用標準液 (軸方向測定用) (P: 1 mg/L~200 mg/L, K: 0.025 mg/L~5 mg/L) を調製した。
- (16) 検量線用混合空試験液: 任意の容量の全量フラスコの 1/10 容量の干渉抑制剤溶液に塩酸 (1+23) を標線まで加えて調製した。

(17) 混合内標準液: (4)及び(5)の標準液を任意の容量の全量フラスコに一定量分取し, 干渉抑制剤溶液を最終溶液の 1/10 容量加え, 塩酸(1+23)を標線まで加えて, 検量線用標準液(横方向測定用)(Be: 100 mg/L, Li: 50 mg/L)及び検量線用標準液(軸方向測定用)(Be: 20 mg/L, Li: 5 mg/L)を調製した.

(18) 硝酸: 富士フィルム和光純薬 有害金属測定用

(19) 尿素: 富士フィルム和光純薬 特級

(20) りん酸二水素アンモニウム: 富士フィルム和光純薬 特級

(21) 塩化カルシウム 2 水和物: 富士フィルム和光純薬 特級

(22) 塩化カリウム: 富士フィルム和光純薬 特級

(23) ビス(りん酸二水素)カルシウム一水和物: 富士フィルム和光純薬 特級

(24) スクロース: 富士フィルム和光純薬 特級

(25) 塩化ナトリウム: 富士フィルム和光純薬 特級

(26) 塩化マグネシウム 6 水和物: 関東化学 特級

(27) アルミニウム標準液(Al 1000 mg/L): 富士フィルム和光純薬 JCSS

(28) 鉄標準液(Fe 1000 mg/L): 富士フィルム和光純薬 JCSS

(29) 水: 超純水製造装置(Direct-Q UV5, Millipore)で精製した JIS K 0557 に規定する A4 の水を用いた.

3) 器具及び装置

(1) ICP-OES: 島津製作所 ICPE-9820

(2) 原子吸光分析装置: 日立ハイテクノロジー Z-2310

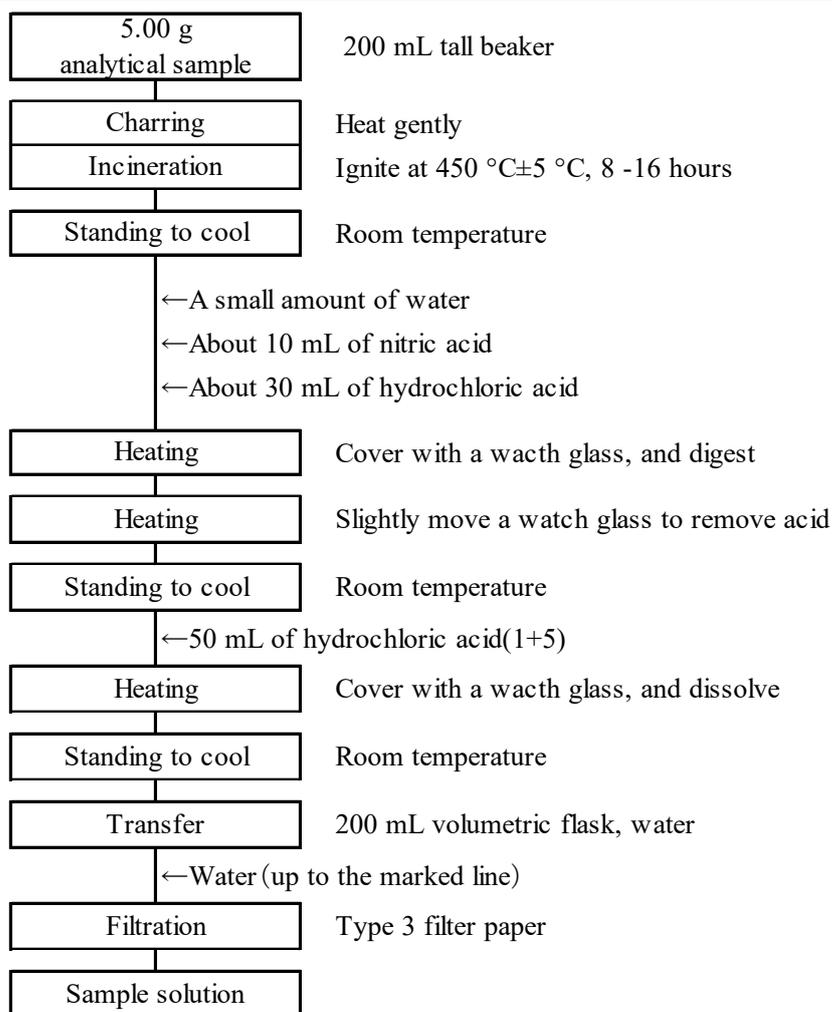
(3) 紫外可視分光光度計: 島津製作所 UV-1800

(4) 粉碎機: Retsch ZM-200

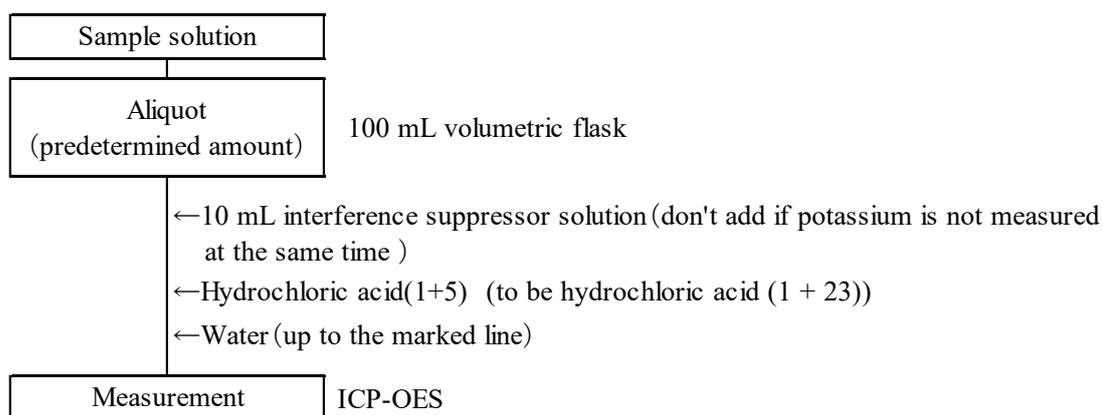
4) 試験操作

(1) 測定溶液の調製

200 mL トールビーカーに分析試料 5 g をはかりとり, 電気炉に入れ穏やかに加熱して炭化させ, 450 °C±5 °C で 8 時間~16 時間強熱して灰化させた. 放冷後, 少量の水で残留物を潤し, 硝酸約 10 mL 及び塩酸約 30 mL を加えた. トールビーカーを時計皿で覆い, ホットプレート又は砂浴上で加熱して残留物を分解後, 時計皿をずらし, 砂浴上で加熱を続けて乾固近くまで濃縮した. 放冷後, 塩酸(1+5) 50 mL を分解物に加え, トールビーカーを時計皿で覆い, 加熱して溶解した. 放冷後, 溶解液を水で 200 mL 全量フラスコに移し入れ, 標線まで水を加え, ろ紙 3 種でろ過し, 試料溶液とした. 試料溶液一定量を 100 mL 全量フラスコにとり, P のみを測定する場合は塩酸(1+23)となるように塩酸(1+5)を加えた後に標線まで水を加え, 測定溶液とし, P 及び K を測定する場合は干渉抑制剤溶液を 10 mL 入れ, 塩酸(1+23)となるように塩酸(1+5)を加えた後に標線まで水を加え, 測定溶液とした(Scheme 1 及び Scheme 2).



Scheme 1 Flow sheet for measuring total phosphoric acid and total potassium in fertilizer by ICP-OES (preparation of sample solution)



Scheme 2 Flow sheet for measuring total phosphoric acid and total potassium in fertilizer by ICP-OES (measurement)

(2) 測定及び濃度の算出

測定溶液及び混合内標準液をそれぞれ 9:1 の割合で、ICP-OES に導入し Table 4 の波長を測定し、得られた指示値を同表の組み合わせで内標準補正をした。

同時に、検量線用標準液について Table 4 の波長を測定し、得られた指示値について同様に内標準補正をし、検量線を作成して分析用試料中の P 濃度及び K 濃度を算出し、換算係数 2.2914 (P から P_2O_5 への換算), 1.2046 (K から K_2O への換算) を乗じて、分析試料中の T- P_2O_5 及び T- K_2O を算出した。なお、ICP-OES の測定条件は Table 5 のとおり。

Table 4 Wavelength of measurement element

Measuring elements and wavelength(nm)	Internal standard element and wavelength (nm)
P (I) ^{a)} 178.287	Au (I) ^{a)} 197.819
	Au (I) ^{a)} 242.795
	Au (I) ^{a)} 267.595
	Be (I) ^{a)} 234.861
K (I) ^{a)} 766.490	Li (I) ^{a)} 610.364
	Li (I) ^{a)} 670.784
K (I) ^{a)} 769.896	Li (I) ^{a)} 610.364
	Li (I) ^{a)} 670.784

a) I: Atomic beam

Table 5 Measuring condition of ICP-OES

High frequency output (kW)	1.2
Plasma gas (L/min)	14.0
Auxiliary gas (L/min)	1.2
Carrier gas (L/min)	0.7
Observation direction	Axial and Radial
Observation height	Low position

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

(1) 塩類共存下での内標準による補正効果の確認

ICP-OES で測定する際には、マトリックスを原因とした非スペクトル干渉により各測定波長の指示値が増減することが知られている¹²⁾。増減の程度を内標準で補正するためには内標準の選定に当たって目的元素の分光特性(発光線の線種, 励起エネルギー等)を考慮する必要がある。

そこで、P については、比較的波長の近い原子線を持つ Au 及び Be を、K については、同族元素で波長が近い Li を候補として選定した (Table 4)。

続いて、肥料中に含まれるマトリックス (Na, K, Ca, Mg) について、Na は NaCl, K は KCl, Ca は $CaCl_2$, Mg は $MgCl_2$ として、標準液 (P は P 20 $\mu\text{g/mL}$, K は K 0.2 $\mu\text{g/mL}$) に段階的に 0 % ~ 1 % となるように各試薬を添

加し、P 及び K の各測定波長の指示値を内標準候補の指示値を用いて補正した。なお、観測方向は軸方向、内標準の濃度は標準液と同じ濃度とした。

その結果は Fig. 1～Fig. 3 のとおりであり、P (I) 178.287 nm の内標準として Au のいずれの波長よりも Be (I) 234.861 nm が適していると考えられた。一方で、K についてはいずれの波長においても塩類添加時の干渉の影響が大きかった。

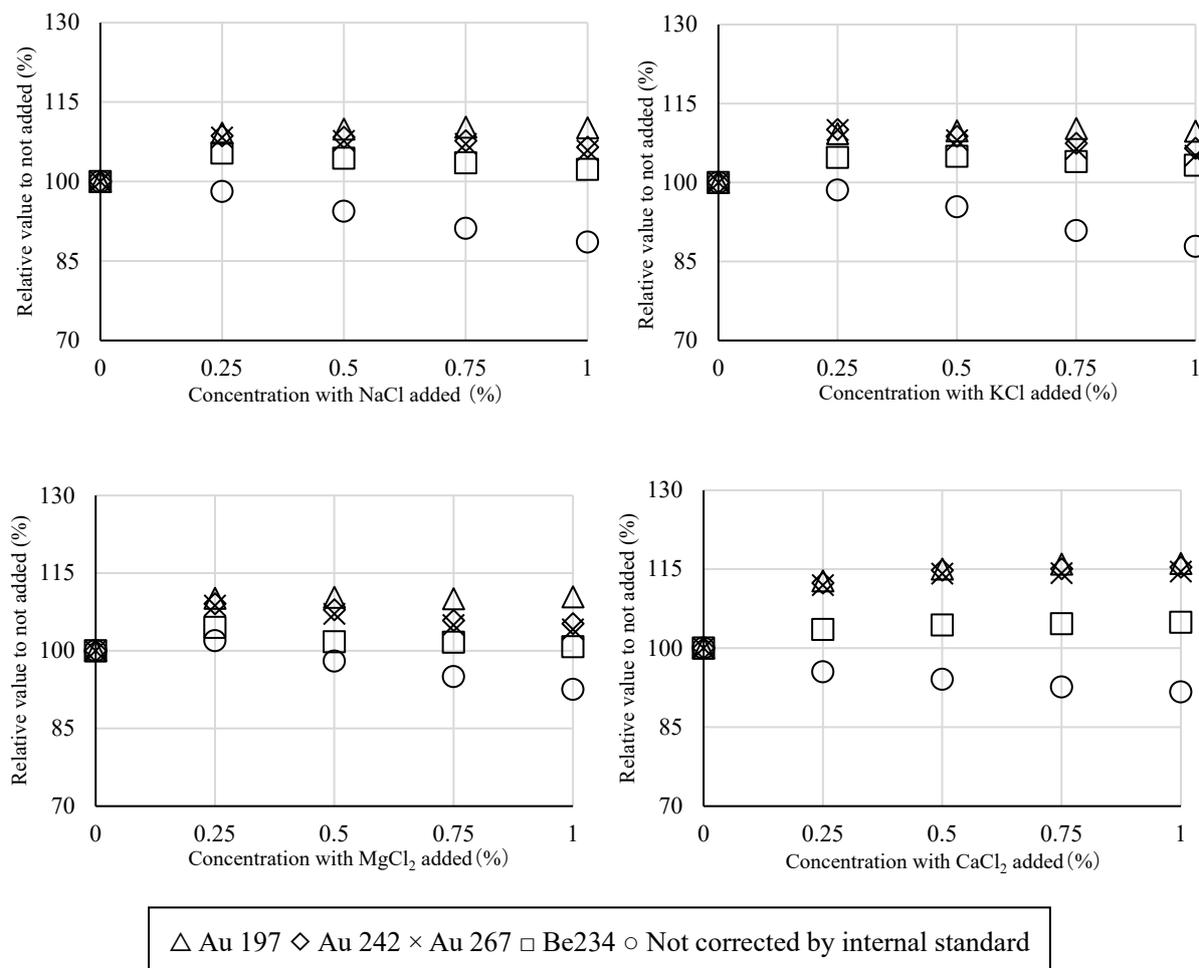


Fig. 1 Investigation of correction effect to determine internal standard (P (I) 178.287 nm)

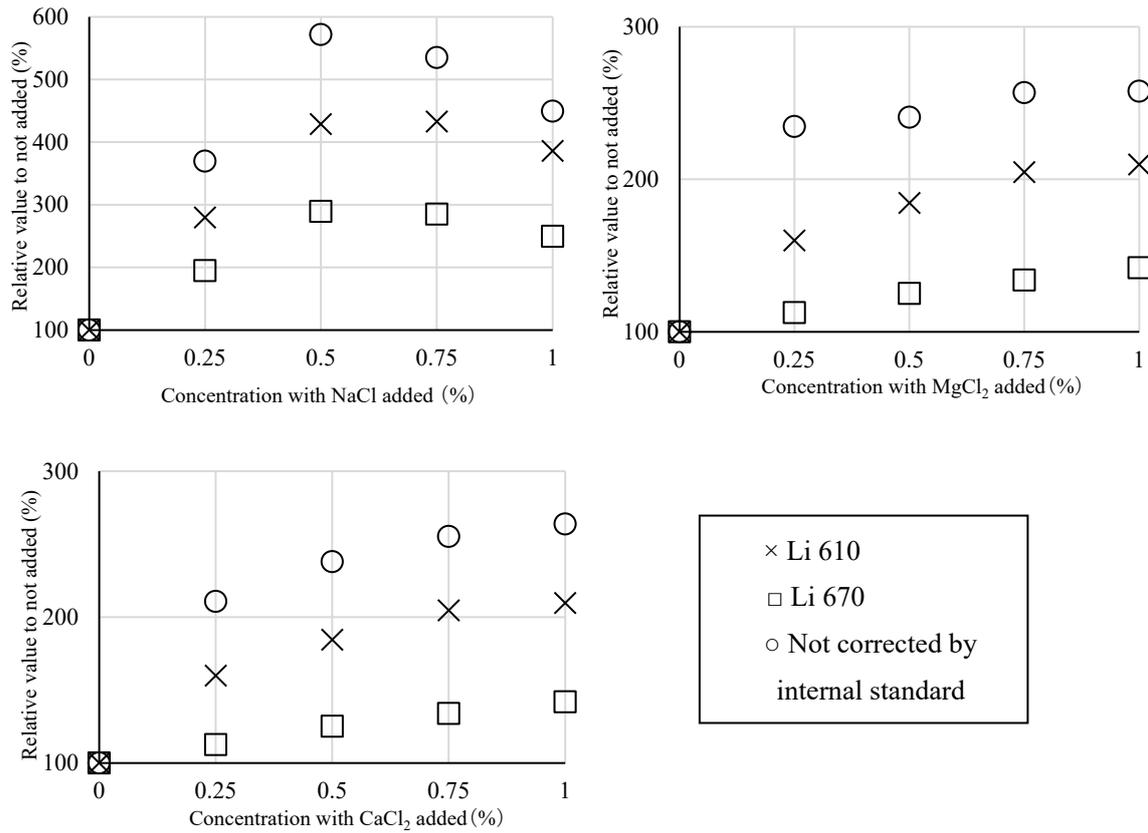


Fig. 2 Investigation of correction effect to determine internal standard (K (I) 766.490 nm)

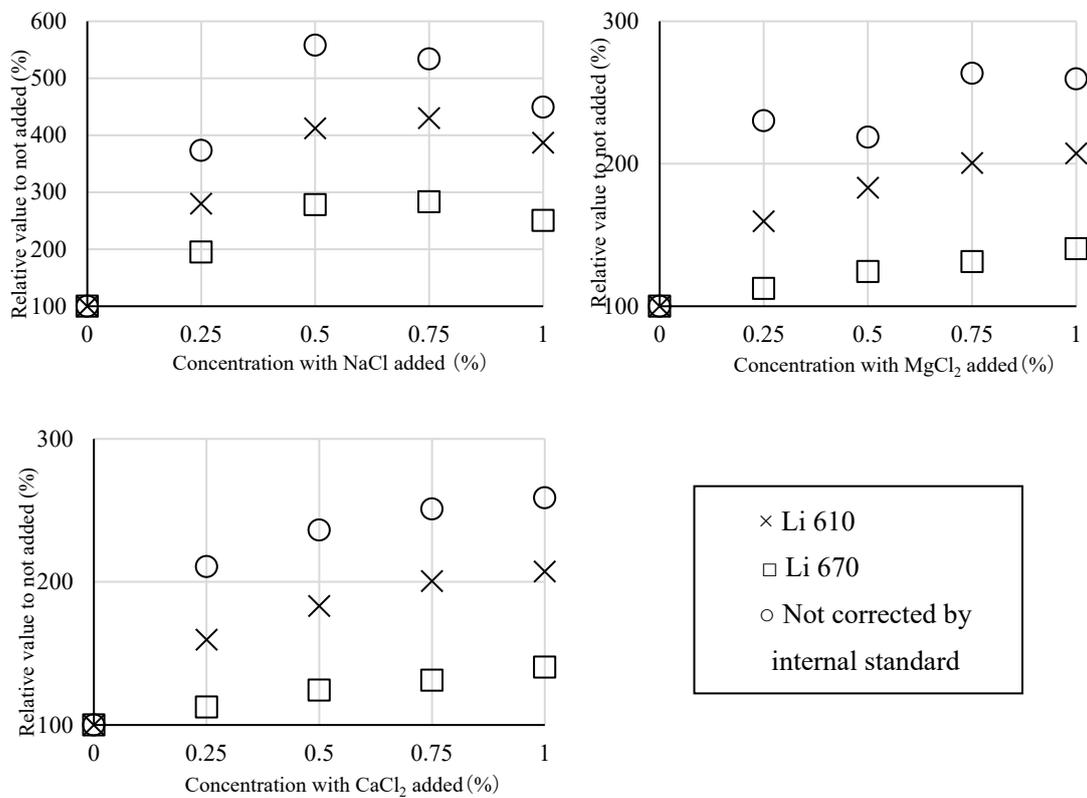


Fig. 3 Investigation of correction effect to determine internal standard (K (I) 769.896 nm)

(2) 試料溶液の希釈による干渉の影響の変化

肥料中における Na, MgO 及び CaO 濃度を考慮し, Na については Na 5 % の試料を, Mg については MgO 10 % の試料を, Ca については CaO 20 % の試料を想定して, 試料溶液の希釈倍率に相当する濃度となるように K 標準液に NaCl, MgCl₂・6H₂O 又は CaCl₂・2H₂O を添加した溶液及び各塩類を無添加の K 標準液を調製し, 各溶液における K の各測定波長及び内標準の候補の波長を ICP-OES で測定し, K の各測定波長の指示値を内標準の候補の指示値を用いて補正した. なお, 想定した塩類濃度の試料の試料溶液を 50 倍希釈した場合の測定溶液中の各塩類濃度は NaCl が 0.006 % 程度, MgCl₂ が 0.012 % 程度, CaCl₂ が 0.02 % 程度となる. 得られた各指示値について, 塩類無添加溶液の指示値に対する添加溶液の指示値の相対値を算出した. 観測方向, K 及び内標準の濃度は (1) と同じ条件とした.

その結果は Fig. 4 及び Fig. 5 のとおりであり, 肥料中における Na, MgO 及び CaO 濃度を想定した場合, Mg 及び Ca から受ける干渉については, Li (I) 670.784 nm で内標準補正を行った結果, いずれの波長・希釈倍率においても塩類無添加と比較して 99 % ~ 106 % であった. 一方で, Na から受ける干渉の影響については Li (I) 670.784 nm で内標準補正を行った結果, 塩類無添加と比較して 105 % ~ 113 % であった.

補正の有無により相対値に差が見られたことから, 肥料を想定した場合には試料液を 200 倍希釈したとしてもイオン化干渉による影響が見られ, また, Na の方が Mg 及び Ca から受ける干渉の影響より大きいことが確認された.

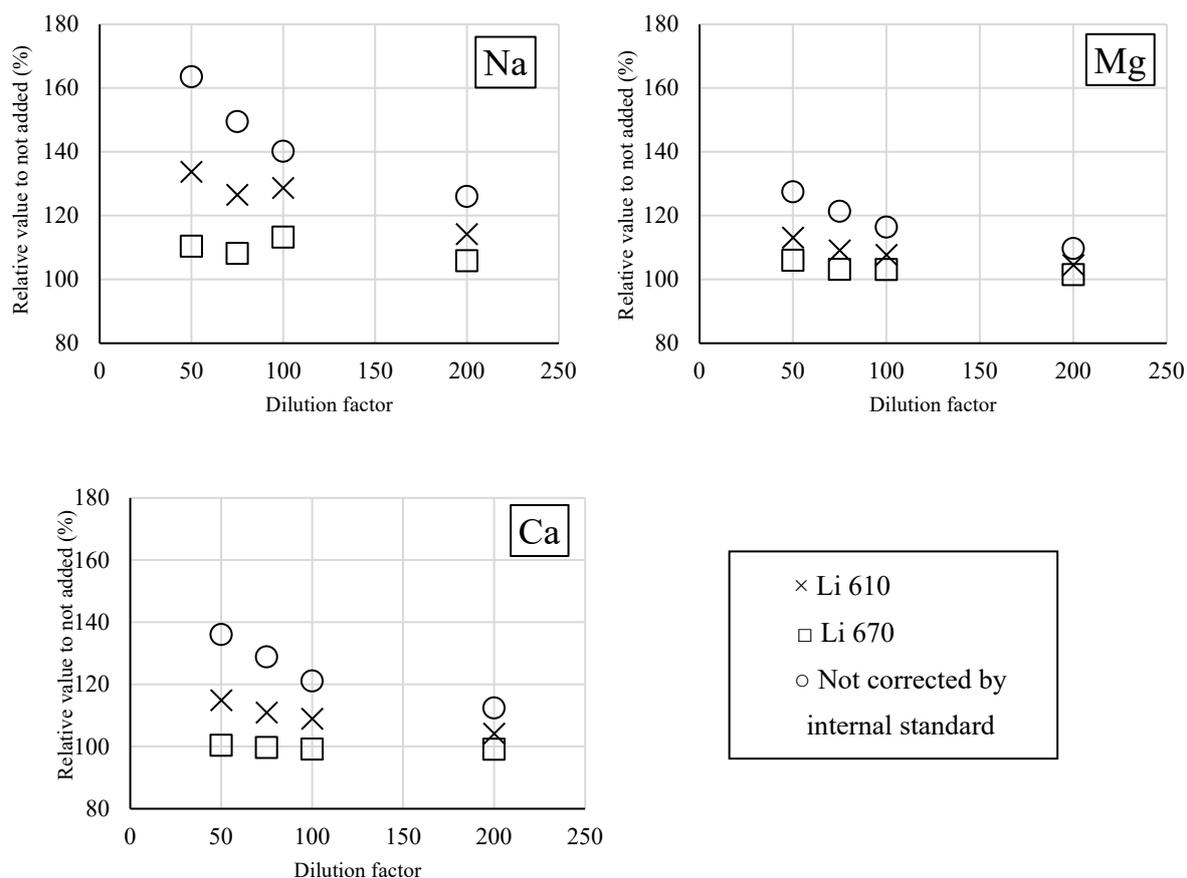


Fig. 4 Investigation of the effect of dilution of sample solution on non-spectral interference when considering the salt concentration in fertilizer (K (I) 766.490 nm)

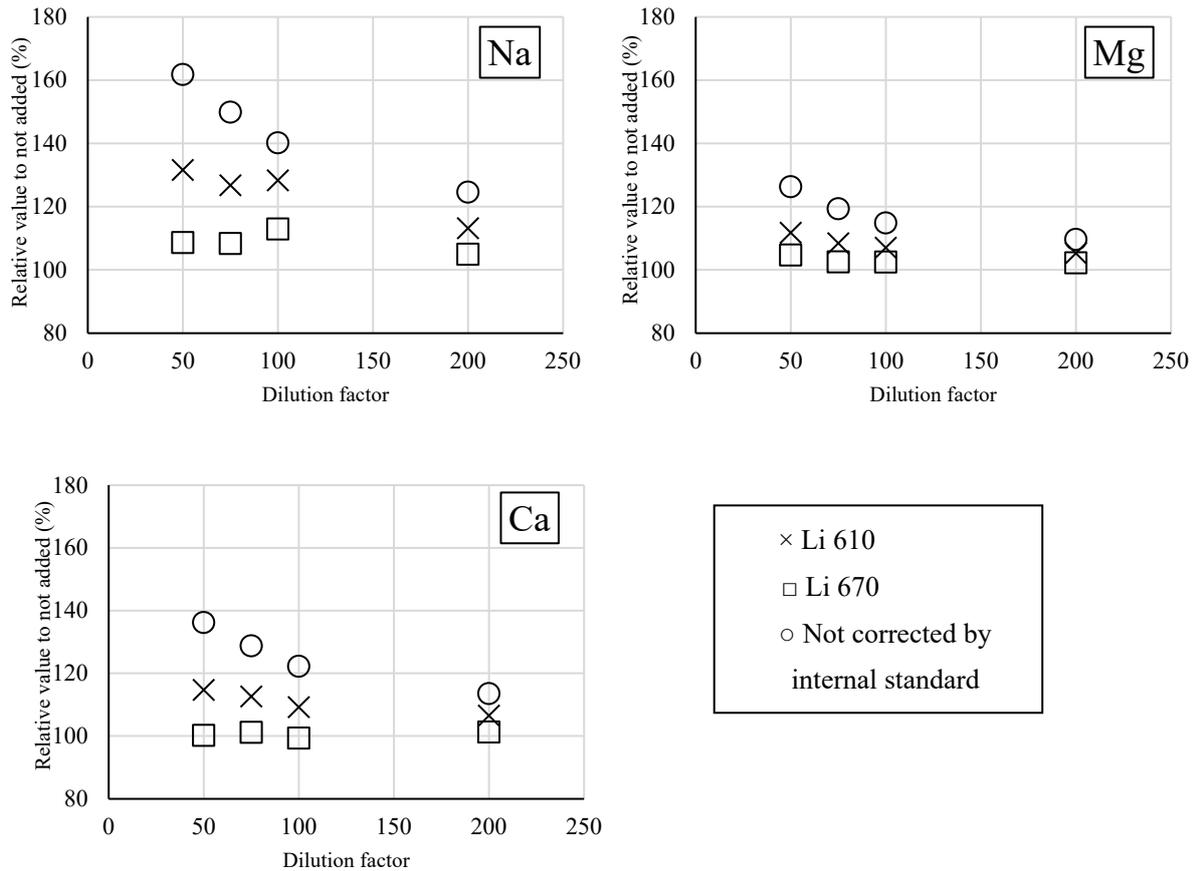


Fig. 5 Investigation of the effect of dilution of sample solution on non-spectral interference when considering the salt concentration in fertilizer (K (I) 769.896 nm)

(3) 干渉抑制剤溶液添加及び試料溶液の希釈による干渉の影響の変化

K 測定時の干渉を抑制するために、Na よりも第 1 イオン化エネルギーが小さい Cs を干渉抑制剤として使用した。干渉抑制剤溶液 (CsCl 溶液) の濃度はネブライザー、トーチ等の機器への影響を考慮し、測定溶液中濃度で Cs として 0.1 %とした。

(2)と同様に肥料中の Na 濃度を考慮し、Na については Na 5 %の試料を想定して、試料溶液の希釈倍率に相当する Na 濃度となるように K 標準液に NaCl を添加し、各溶液における K の各測定波長及び内標準の候補の波長を ICP-OES にて測定し、K の各測定波長の指示値を内標準の候補の指示値を用いて補正した。得られた各指示値について、塩類無添加溶液の指示値に対する添加溶液の指示値の相対値を算出した。観測方向、K 及び内標準の濃度は(1)と同じ条件とした。

その結果は Fig. 6 のとおりであり、干渉抑制剤として CsCl を Cs として 0.1 %添加し、かつ試料溶液を 25 倍以上に希釈した場合、塩類無添加溶液の指示値に対する添加溶液の指示値の相対値が内標準補正なしの場合とありの場合でほぼ一致しており、イオン化干渉による影響をほとんど受けなくなると考えられた。

以上の結果から、K 測定時の測定溶液調製方法については、干渉抑制剤を添加した上で、試料溶液を 25 倍以上希釈することとした。なお、K 測定時の内標準については波長の近い Li (I) 670.784 nm とした。

また、6 種類の試料を用いて試料溶液の希釈倍率を変えて ICP-OES で測定し、分析値を算出したところ、希釈倍率を変えても分析値に影響は見られなかった。また、標準添加法で測定・算出した分析値に対しても同等の分析値であったことから、試料を用いた場合でもイオン化干渉の影響は受けていないと考えられた (Fig. 7)。

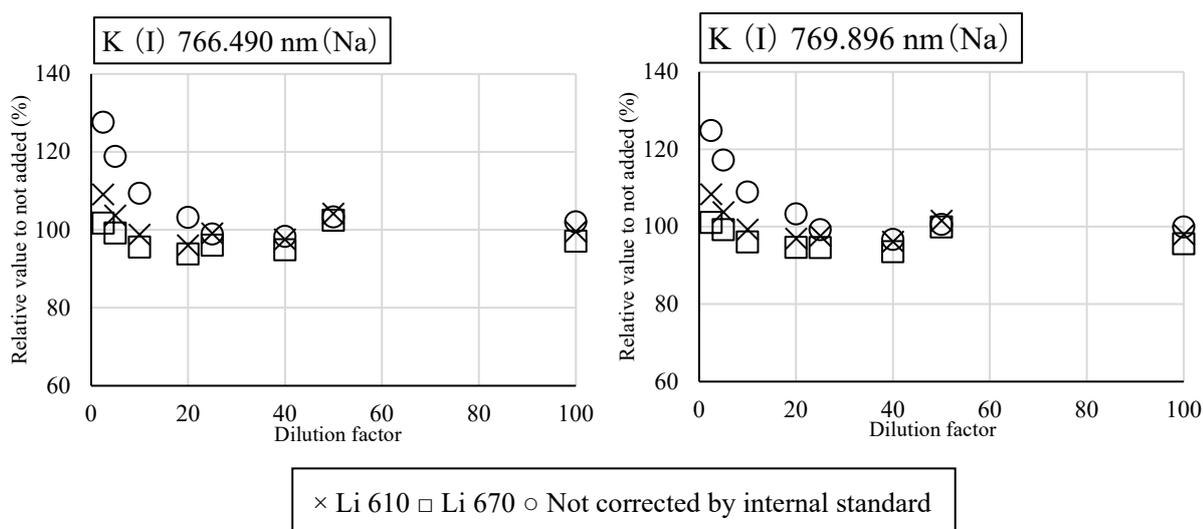


Fig. 6 Investigation of the effect of dilution of interference suppressor solution and sample solution on non-spectral interference

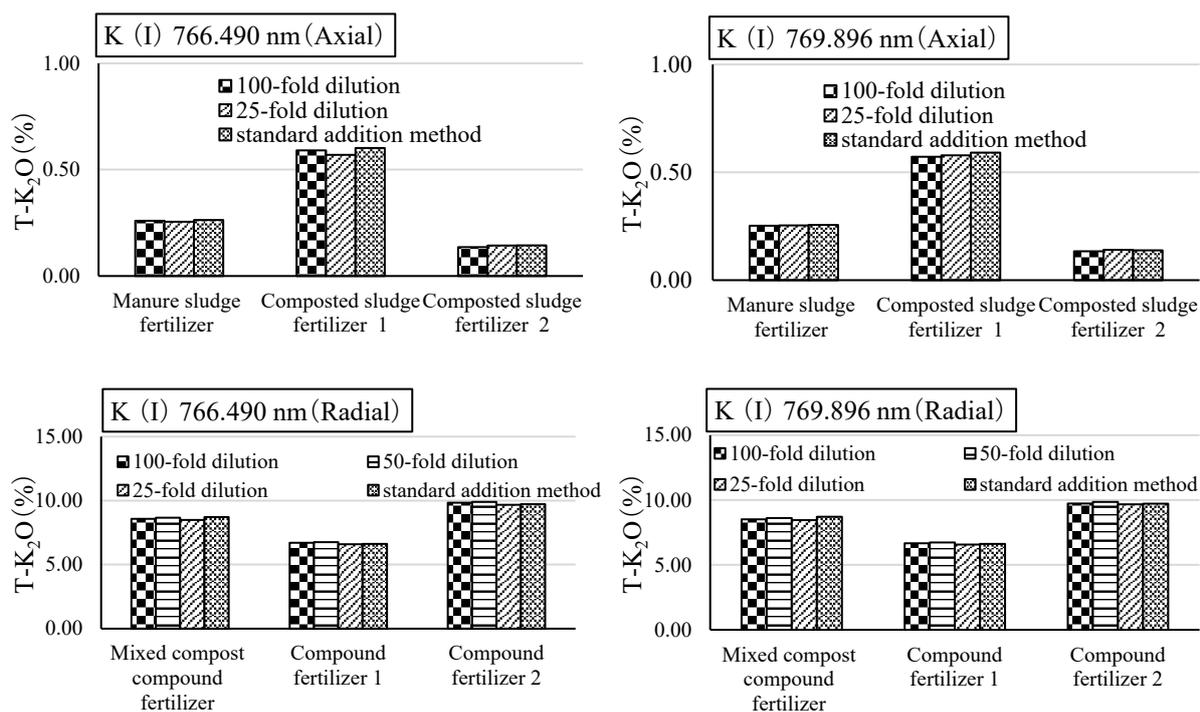


Fig. 7 T-K₂O analysis value for each dilution ratio of sample solution

2) 検量線の直線性

2. 2) に従って調製した検量線用標準液及び内標準液について、P 及び K を ICP-OES で測定し、検量線を作成したところ、Fig. 8 及び Fig. 9 のとおり、検量線用りん標準液については、P 1 mg/L~200 mg/L 範囲で決定係数(r^2)が 0.999 以上であった。検量線用混合標準液については、P については P 1 mg/L~200 mg/L 範囲で決定係数(r^2)が 0.999 以上、K については K 0.025 mg/L~5 mg/L(軸方向)、K 1 mg/L~200 mg/L(横方向)の範囲で決定係数(r^2)が 0.999 以上であった。

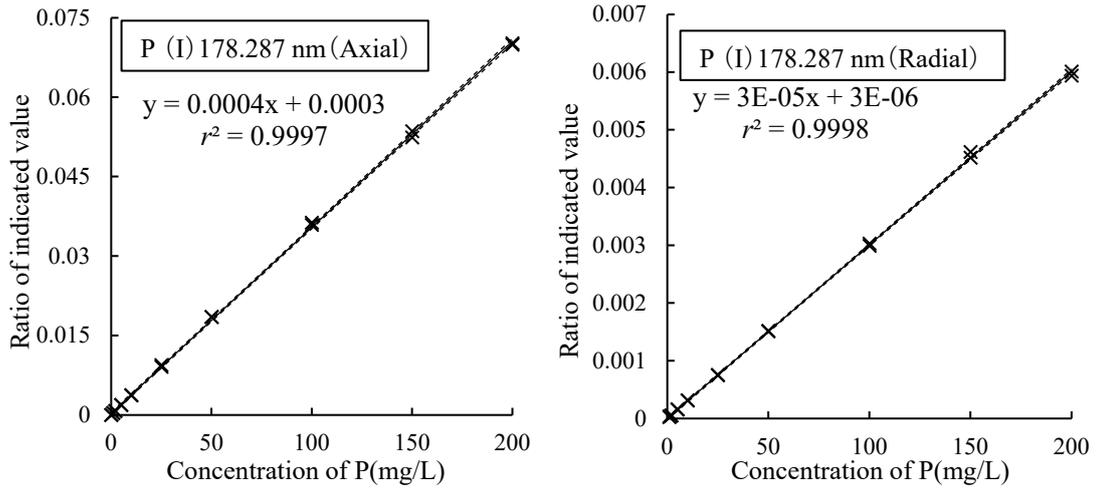


Fig.8 Calibration curve with P single standard solution

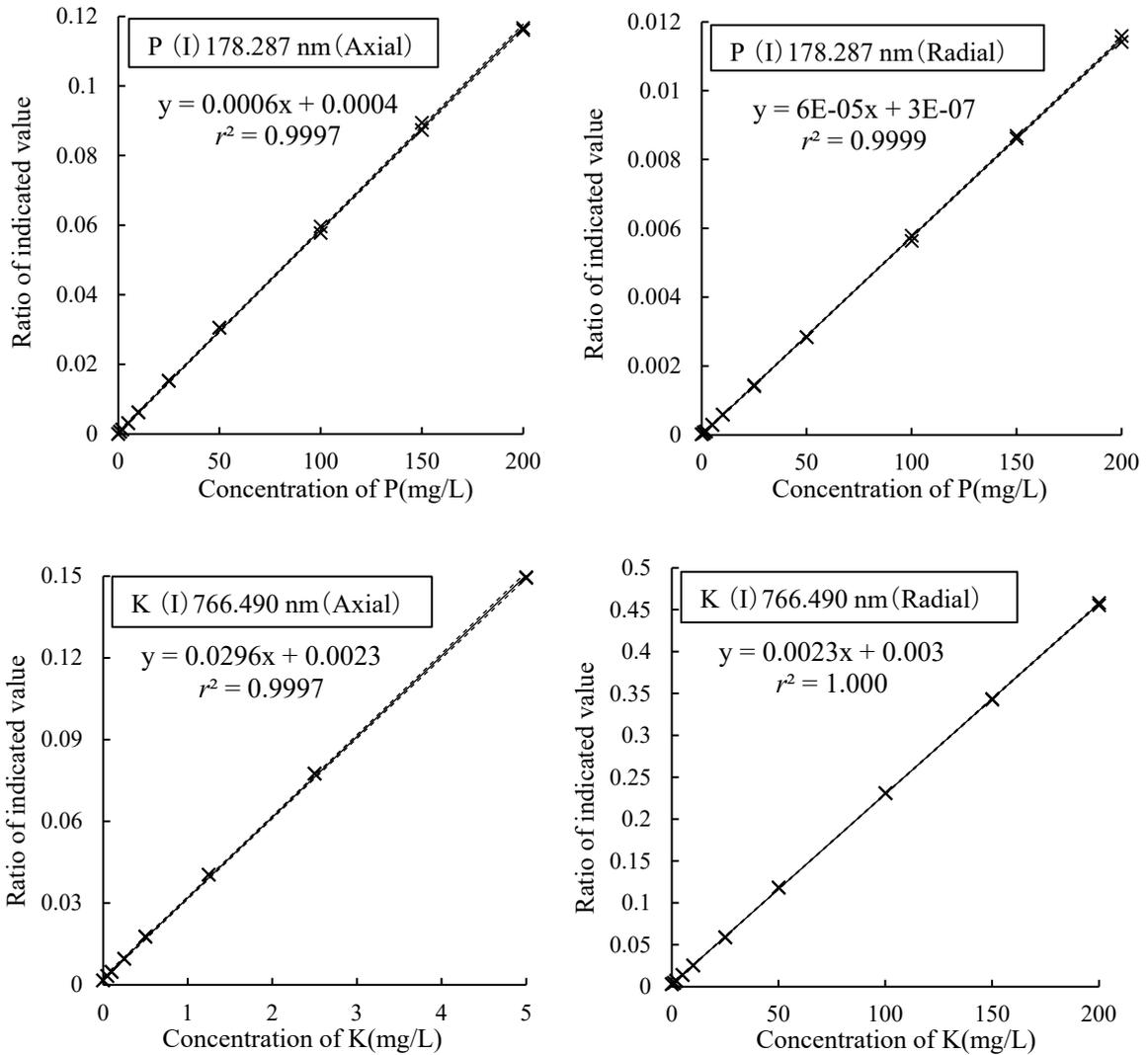


Fig.9 Calibration curve with standard solution of P and K mixed

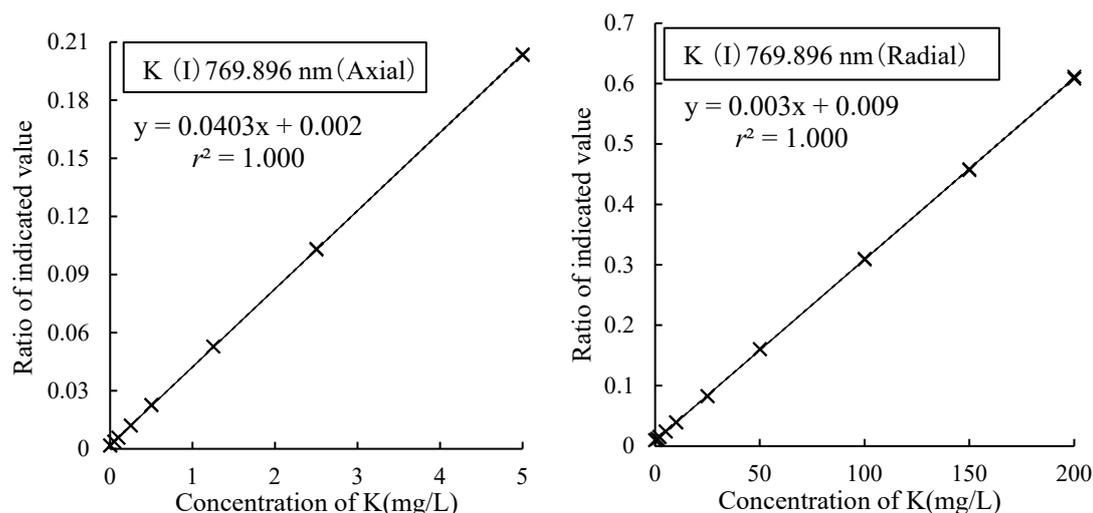


Fig.9 Continue

3) 真度の評価

真度を評価するため、肥料認証標準物質を用いて **2.4) 試験操作** (以下、本法という) により 3 点併行分析、本法と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又は原子吸光法 (以下「従来法」) の分析値との比較及び添加回収試験を行った。なお、使用可能であった試料及び濃度範囲に合わせて複数の手法を用いて評価した。

(1) 肥料認証標準物質を用いた真度の評価

真度を評価するため、肥料認証標準物質 FAMIC-C-18-2 を用いて、本法により T-P₂O₅ 及び T-K₂O を 3 点併行で分析した。結果は Table 6 に示すとおりであり、いずれも平均値は認証値に対する警戒限界の範囲内であり、肥料等試験法³⁾に示されている真度の目標を満たしていた。

Table 6 The Estimation of trueness using certified reference material

Certified reference material	Component	Wavelength (nm)	Standard solution ^{a)}	Observation direction	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	Certified value (%) ^{c)}	Warnig limit for the certified value (%) ^{c)}		
FAMIC-C-18-2	T-P ₂ O ₅	178.287	single	Axial	4.76	4.66	4.44	~	4.88
				Radial	4.75				
				Axial	4.71				
				Radial	4.73				
	T-K ₂ O	766.490	Mixed	Axial	0.13	0.12	0.11	~	0.14
				Radial	0.12				
		769.896		Axial	0.13				
				Radial	0.12				

a) single: P, Mixed: P and K

b) Mean value (n=3)

c) Mass fraction

(2) 従来法との比較による真度の評価

本法と従来法について、 $T\text{-P}_2\text{O}_5$ は肥料 36 点、 $T\text{-K}_2\text{O}$ は肥料 31 点を用いて分析値の比較をした。回帰直線の相関係数、回帰直線の傾き並びに切片の 95 %信頼区間を算出し、相関図及び 95 %予測区間とともに Fig. 10 に示した。なお、本法による分析値の算出に当たって、 $T\text{-P}_2\text{O}_5$ については P 単独及び PK 混合標準液を使用し、 $T\text{-K}_2\text{O}$ については PK 混合標準液を使用した。

その結果、 $T\text{-P}_2\text{O}_5$ の軸方向以外は回帰直線の相関係数は 0.99 以上であり回帰直線の傾きの 95 %信頼区間に 1 が含まれ、切片の 95 %信頼区間に 0 が含まれており肥料等試験法³⁾に示されている真度の目標を満たしていた (Table 7)。

一方、 $T\text{-P}_2\text{O}_5$ の軸方向については、回帰直線の傾きの 95 %信頼区間に 1 が含まれなかったが、Table 8 に示す試料において、本法による $T\text{-P}_2\text{O}_5$ 分析値が従来法による分析値に対して高値となったためであった。これらの試料について、 $T\text{-P}_2\text{O}_5$ を軸方向で試料溶液の希釈倍率を変えて測定した分析値、従来法の分析値及び標準添加法による分析値を求めたところ (Fig. 11)、希釈倍率が小さいほど分析値が大きくなった。また、従来法と標準添加法の値が近かったことから、軸方向の分析値が高値となった原因は非スペクトル干渉であると考えられた。

高値となった試料のうち、焼成汚泥肥料については P と同程度の Al 又は Fe を含有することが報告されている¹³⁾。P 25 mg/L 標準液に Al 25 mg/L 又は Fe 25 mg/L となるように Al 標準液又は Fe 標準液を添加し、各溶液を内標準溶液 (Be) とともに ICP-OES を用いて測定し、添加溶液及び無添加溶液における指示値の比 (P/Be) を比較した結果、Al 及び Fe を添加した標準液は無添加の場合と比較して指示値の比が有意に高い結果となった (Table 9)。また、P 0 mg/L 標準液に Al 25 mg/L 又は Fe 25 mg/L となるように Al 標準液又は Fe 標準液を添加した溶液について、P (I) 178.287 nm の波長でピークが確認されなかったことから、 $T\text{-P}_2\text{O}_5$ の軸方向の分析値が一部の肥料で高値となった原因の一つとしては肥料中の Al, Fe による非スペクトル干渉であると考えられた。

一方で、化成肥料については複数の原料を使用された肥料であること、また原料の産出元で成分組成が大きく異なる可能性があることから、原料組成から原因となる成分等を解明することが難しいと考えられた。

なお、 $T\text{-P}_2\text{O}_5$ の軸方向の分析値が一部の試料で従来法の分析値と比較して高くなった原因について、全てを明らかにすることは困難だったため、また非スペクトル干渉に対して有効な標準添加法での定量は肥料生産現場での品質管理の作業及び測定効率が低下することから、 $T\text{-P}_2\text{O}_5$ の軸方向については本法の測定条件に含めないこととした。

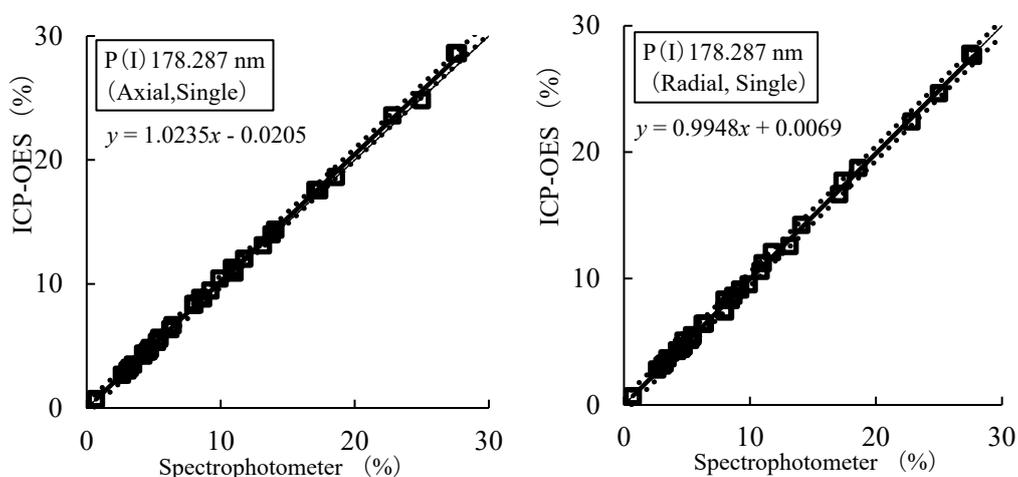


Fig.10 Comparison of the measurements in between two methods

Thick line: Regression line, Dotted line: 95 % prediction interval, Thin line: $y=x$

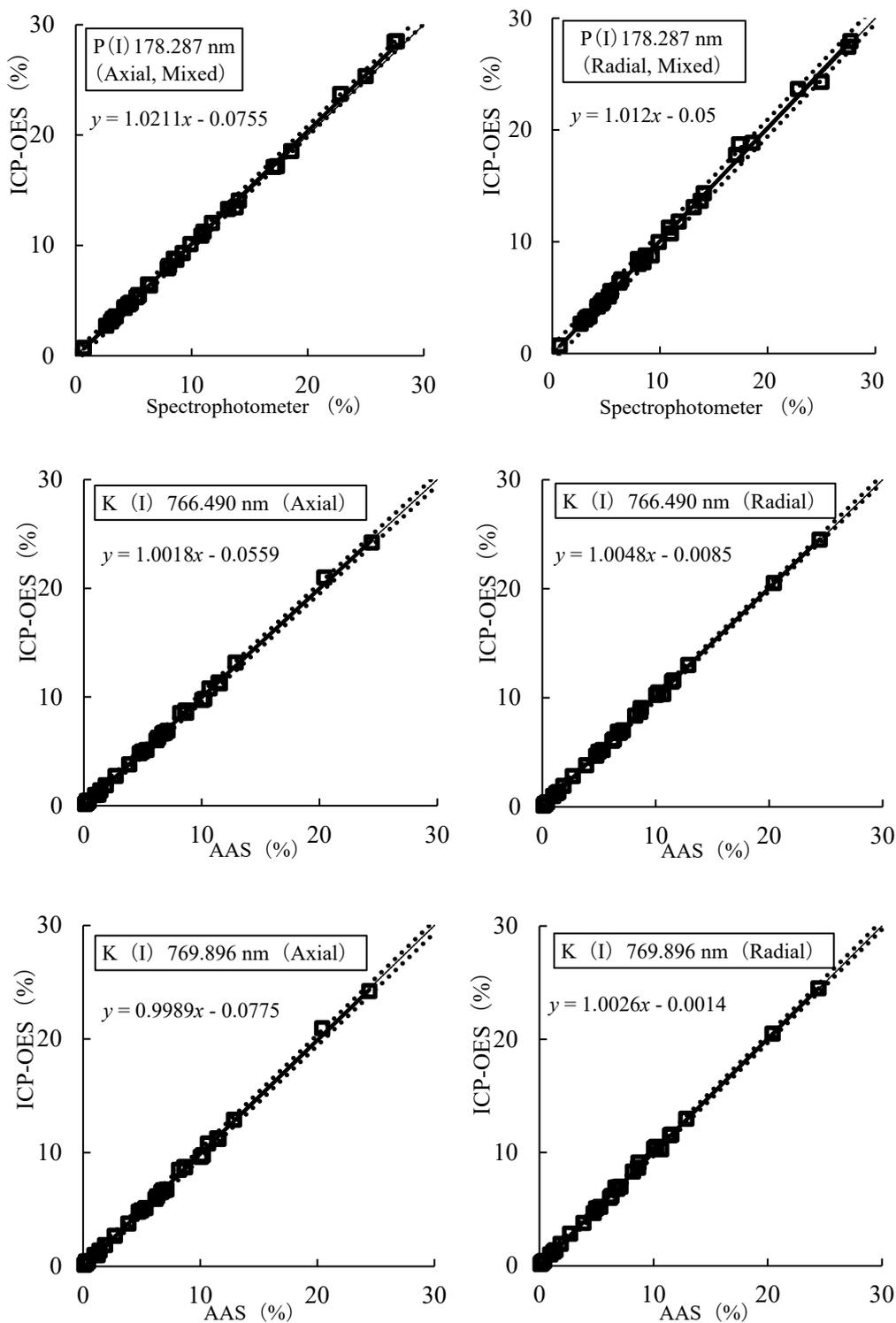


Fig.10 Continue

Table 7 The 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line in between measurement wavelength

Component	Wavelength (nm)	Standard solution ^{a)}	Observation direction	95 % confidence interval		Correlation coefficient (<i>r</i>)
				Inclination (<i>b</i>)	Intercept (<i>a</i>)	
T-P ₂ O ₅	178.287	Single	Axial	1.012 ~ 1.034	-0.155 ~ 0.114	1.000
			Radial	0.982 ~ 1.007	-0.153 ~ 0.167	0.999
		Mixed	Axial	1.010 ~ 1.032	-0.204 ~ 0.053	1.000
			Radial	0.995 ~ 1.029	-0.258 ~ 0.158	0.998
T-K ₂ O	766.490	Mixed	Axial	0.988 ~ 1.015	-0.173 ~ 0.061	0.999
			Radial	0.996 ~ 1.013	-0.083 ~ 0.066	1.000
	769.896		Axial	0.985 ~ 1.013	-0.197 ~ 0.042	0.999
			Radial	0.993 ~ 1.013	-0.090 ~ 0.087	1.000

a) Single : P, Mixed: P and K

Table 8 Analytical value of T-P₂O₅ in high-concentration sample

Sample	Analytical value of T-P ₂ O ₅ (%(mass fraction))		
	ICP-OES		Spectrophotometer
	Axial	Radial	
Calcined sludge fertilizer 1	28.62	27.77	27.50
Calcined sludge fertilizer 2	28.59	27.61	27.70
Compound fertilizer 3	23.59	22.42	22.82
Compound fertilizer 4	23.74	22.85	22.97

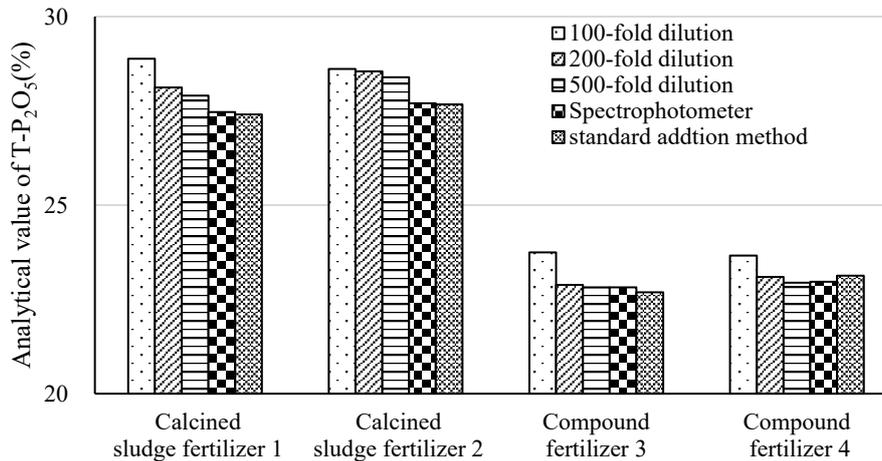


Fig.11 Differences in quantitative values due to measurement method and dilution ratio

Table 9 Effect on the ratio of indicated values when Al and Fe are added

Measurement component	Spiked component	Mean of indicated value ratio ^{a)}	<i>F</i> test		<i>t</i> test	
			Variance ratio	Critical value	<i>t</i> -value	Critical value
P	-	0.0122	1.27	3.79	7.54	2.14
	Al	0.0126				
	-	0.0122	1.11	3.79	5.26	2.14
	Fe	0.0124				

a) Mean value($n=8$)

(3) 添加回収による真度の評価

真度を評価するため、**2. 1)**により調製した試料を用いて添加回収を実施した。結果は Table 10 に示したとおりであり、いずれの回収率も肥料等試験法³⁾に示されている真度の目標を満たしていた。なお、分析値の算出に当たって、T-P₂O₅についてはP単独及びPK混合標準液を使用し、T-K₂OについてはPK混合標準液を使用した。

Table 10 Result of recovery test

Measurement component	Wavelength (nm)	Observation direction	Standard solution ^{a)}	Design component ^{b)} (%)	Recovery ^{c)} (%)	Relative standard deviation (%)	Criteria of the recovery ^{d)} (%)
T-P ₂ O ₅	178.287	Radial	Single	30.97	99.9	1.9	98 ~ 102
				15.49	101.1	3.8	97 ~ 103
				3.10	101.0	3.7	96 ~ 104
				30.97	99.4	1.7	98 ~ 102
				15.49	99.3	3.9	97 ~ 103
				3.10	97.2	2.3	96 ~ 104
T-K ₂ O	766.490	Axial	Mixed	31.59	101.6	0.5	98 ~ 102
				15.79	99.5	0.6	97 ~ 103
				3.16	100.6	0.6	96 ~ 104
		31.59		101.2	0.7	98 ~ 102	
		15.79		99.5	1.0	97 ~ 103	
		3.16		99.9	0.9	96 ~ 104	
	769.896	Axial	31.59	98.7	0.3	98 ~ 102	
			15.79	98.7	1.7	97 ~ 103	
			3.16	101.0	1.0	96 ~ 104	
		Radial	31.59	101.0	0.5	98 ~ 102	
			15.79	98.9	0.5	97 ~ 103	
			3.16	99.7	0.6	96 ~ 104	

a) Single: P, Mixed: P and K

b) %(mass fraction)

c) Mean value($n=3$)

d) Criteria of the recovery shown in Testing Methods of Fertilizers

4) 併行精度及び中間精度の推定

本法の併行精度及び中間精度を推定するため、汚泥発酵肥料、家庭園芸用複合肥料及び化成肥料2点を用いて、それぞれ2点併行で日を変えて5回分析を行った。なお、分析値の算出に当たって、T-P₂O₅について

は P 単独及び PK 混合標準液を使用し, T-K₂O については PK 混合標準液を使用した. それぞれの分析値は Table 11 に示すとおりであった. 得られた分析値を基に併行精度及び中間精度を推定し, 結果を Table 13 に示した.

その結果, いずれも肥料等試験法³⁾附属書 A 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)の許容範囲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 11 Individual result of repetition test of changing the date(%(mass fraction))

Test day	T-P ₂ O ₅ (Radial, Single ^{a)})				T-P ₂ O ₅ (Radial, Mixed ^{a)})			
	Home garden-use fertilizer		Compound fertilizer 5		Home garden-use fertilizer		Compound fertilizer 5	
1	0.70	0.70	23.72	23.40	0.71	0.70	23.68	23.51
2	0.72	0.70	23.37	23.41	0.70	0.69	23.61	23.18
3	0.69	0.71	23.64	23.81	0.69	0.69	23.72	23.43
4	0.68	0.69	23.50	23.69	0.71	0.70	23.56	23.07
5	0.69	0.69	23.76	23.99	0.70	0.70	23.76	23.66

Test day	T-K ₂ O (K (I) 766.490 nm, Axial)				T-K ₂ O (K (I) 769.896 nm, Axial)			
	Composted sludge fertilizer 3		Compound fertilizer 6		Composted sludge fertilizer 3		Compound fertilizer 6	
1	0.13	0.14	19.77	19.60	0.13	0.14	19.81	19.63
2	0.14	0.13	20.09	19.89	0.14	0.13	20.00	19.79
3	0.14	0.14	19.88	20.01	0.13	0.13	20.04	20.07
4	0.14	0.14	20.16	20.33	0.13	0.13	20.31	20.38
5	0.13	0.14	20.13	20.32	0.13	0.13	20.09	20.27

Test day	T-K ₂ O (K (I) 766.490 nm, Radial)				T-K ₂ O (K (I) 769.896 nm, Radial)			
	Composted sludge fertilizer 3		Compound fertilizer 6		Composted sludge fertilizer 3		Compound fertilizer 6	
1	0.13	0.12	19.79	19.96	0.12	0.12	19.79	19.88
2	0.14	0.14	19.88	19.76	0.12	0.13	19.92	19.72
3	0.14	0.13	20.28	20.35	0.13	0.13	20.24	20.30
4	0.13	0.13	20.01	20.11	0.13	0.13	20.04	20.14
5	0.14	0.13	20.05	20.21	0.14	0.13	20.05	20.21

a) Single: P, Mixed: P and K

Table 12 Statistical analysis of repetition test result for estimating precision

Measurement component	Wavelength (nm)	Observation direction	Standard solution ^{a)}	Samples	Mean ^{b)(c)} (%)	Repeatability			Intermediate precision		
						s_r ^{c)(d)} (%)	RSD_r ^{e)} (%)	$CRSD_r$ ^{f)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)(g)} (%)	$RSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ⁱ⁾ (%)
T-P ₂ O ₅	178.287	Radial	Single	Home garden-use fertilizer	0.70	0.01	1.4	3.0	0.01	1.5	4.5
				Compound fertilizer 5	23.6	0.1	0.6	1.5	0.2	0.9	2.5
				Home garden-use fertilizer	0.70	0.004	0.6	3.0	0.007	1.0	4.5
				Compound fertilizer 5	23.5	0.2	1.0	1.5	0.2	1.0	2.5
				Composted sludge fertilizer 3	0.14	0.004	2.7	3.0	0.004	2.7	4.5
				Compound fertilizer 6	20.02	0.1	0.6	1.5	0.2	1.2	2.5
T-K ₂ O	766.490	Axial	Mixed	Composted sludge fertilizer 3	0.13	0.004	2.9	3.0	0.006	4.3	4.5
				Compound fertilizer 6	20.04	0.09	0.4	1.5	0.2	1.0	2.5
		Radial		Composted sludge fertilizer 3	0.13	0.003	2.3	3.0	0.003	2.3	4.5
				Compound fertilizer 6	20.04	0.1	0.5	1.5	0.3	1.3	2.5
		Axial		Composted sludge fertilizer 3	0.13	0.003	2.3	3.0	0.003	2.3	4.5
				Compound fertilizer 6	20.04	0.1	0.5	1.5	0.3	1.3	2.5
Radial	Composted sludge fertilizer 3	0.13	0.003	2.3	3.0	0.005	3.9	4.5			
	Compound fertilizer 6	20.03	0.09	0.5	1.5	0.2	1.0	2.5			

a) Single: P, Mixed: P and K

b) Mean value (n = sample number of parallel test (2) × number of test days (5))

c) Mass fraction

d) Repeatability standard deviation

e) Repeatability relative standard deviation

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

g) Intermediate standard deviation

h) Intermediate relative standard deviation

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

5) 定量下限等の確認

Table 3 により調製した試料 4 及び試料 5 について、Table 13 の添加濃度となるようにりん酸二水素アンモニウム又は塩化カリウムを用いて P 又は K を添加し、本法に従って T-P₂O₅ 及び T-K₂O として 7 点併行で分析し、その結果を同表に示した。なお、分析値の算出に当たって、T-P₂O₅ については P 単独及び PK 混合標準液を使用し、T-K₂O については PK 混合標準液を使用した。この分析によって得られた併行分析の標準偏差及び検量線(T-P₂O₅(横方向)は P 1 mg/L~25 mg/L, T-K₂O(軸方向)は K 0.05 mg/L~0.5 mg/L, T-K₂O(横方向)は K 1 mg/L~25 mg/L)の残差の標準偏差を用いて、肥料等試験法³⁾附属書 A 試験法の妥当性確認の手順に従って定量下限及び検出下限を Table 14 及び Table 15 のとおり推定した。その結果、本法の定量下限は、T-P₂O₅ については 0.05 %程度、T-K₂O(766.490 nm)については軸方向で 0.005 %程度、横方向で 0.2 %程度、T-K₂O(769.896 nm)については軸方向で 0.005 %程度、横方向で 0.2 %程度と推定された。これらは化成肥料の公定規格²⁾における含有すべき主成分の最小量の 1/5 以下であった。

Table 13 Results of parallel analysis to estimate the lower limit of quantification

Measurement component	Wavelength (nm)	Observation direction	Standard solution ^{a)}	Spiked level (%) ^{b)}	Recovery ^{c)} (%)	Standard deviation (%) ^{b)}
T-P ₂ O ₅	178.287	Radial	Single	0.05	98.5	0.003
					100.9	0.004
T-K ₂ O	766.490	Axial	Mixed	0.01	98.9	0.0005
		Radial			0.2	97.8
	769.896	Axial		0.01	105.5	0.0005
		Radial		0.2	97.7	0.005

a) Single:P, Mixed:P and K

b) Mass fraction

c) Mean value($n=7$)Table 14 Result of estimation of *LOQ* and *LOD*

Method for the estimation of <i>LOQ</i> and <i>LOD</i>	T-P ₂ O ₅ (Radial)			
	Single standard solution		Mixed standard solution	
	<i>LOQ</i> (%) ^{c)}	<i>LOD</i> (%) ^{c)}	<i>LOQ</i> (%) ^{c)}	<i>LOD</i> (%) ^{c)}
By parallel test ^{a)}	0.03	0.01	0.04	0.01
By calibration curves ^{b)}	0.04	0.02	0.05	0.02

a) Procedure(3.6.1) and (3.7.1) for validating the testing method in attachment of Testing Methods of Fertilizers

b) Procedure(3.6.2) and (3.7.2) for validating the testing method in attachment of Testing Methods of Fertilizers

c) Mass fraction

Table 15 Result of estimation of *LOQ* and *LOD*

Method for the estimation of <i>LOQ</i> and <i>LOD</i>	T-K ₂ O							
	766.490 nm (Axial)		769.896 nm (Axial)		766.490 nm (Radial)		769.896 nm (Radial)	
	<i>LOQ</i> (%) ^{c)}	<i>LOD</i> (%) ^{c)}						
By parallel test ^{a)}	0.005	0.002	0.005	0.002	0.03	0.01	0.05	0.02
By calibration curves ^{b)}	0.003	0.001	0.003	0.002	0.2	0.1	0.2	0.1

The foot note is shown in Table 14

4. まとめ

ICP-OES を用いた肥料中の T-P₂O₅ 及び T-K₂O の分析法について測定条件を検討し、単一試験室による妥当性を確認したところ、次の結果を得た。

1) 塩類を段階的に添加し、内標準を選定した結果、P 178.287 nm の測定時の内標準については Be 234.861 nm とした。

2) K 測定時には干渉抑制剤として CsCl 溶液を Cs として 0.1 % 添加し、試料溶液の希釈倍率を 25 倍以上とすればイオン化干渉による影響を受けないことが確認された。K (766.490 nm 及び 769.896 nm) の内標準は Li 670.784 nm とした。

3) P 及び K の検量線を作成したところ、検量線用りん標準液については、P 1 mg/L ~ 200 mg/L 範囲で決定係数 (r^2) が 0.999 以上であった。検量線用混合標準液については、P については P 1 mg/L ~ 200 mg/L 範囲で決定係数 (r^2) が 0.999 以上、K については K 0.025 mg/L ~ 5 mg/L (軸方向)、K 1 mg/L ~ 200 mg/L (横方向) の範囲で決定係数 (r^2) が 0.999 以上であった。

4) 真度評価のため、肥料認証標準物質の分析、本法と従来法の分析値との比較及び添加回収を行った結果、P 軸方向の分析値が一部 P 高濃度含有肥料において非スペクトル干渉の影響により、ICP-OES による分析値が従来法と比較して高値となったため、T-P₂O₅ の測定条件については横方向のみとした。

その他については、いずれも肥料等試験法附属書 A に示されている真度の目標を満たしていた。

5) 併行精度及び中間精度の推定を行った結果、T-P₂O₅ については併行相対標準偏差が 0.6 % ~ 1.4 %、中間相対標準偏差は 0.9 % ~ 1.5 %、T-K₂O については併行相対標準偏差が 0.4 % ~ 2.9 %、中間相対標準偏差は 1.0 % ~ 4.3 % であり、いずれの成分、濃度レベルにおいても肥料等試験法附属書 A に示されている精度の目安以下であった。

6) 併行分析の標準偏差及び検量線 (T-P₂O₅ (横方向) は P 1 mg/L ~ 25 mg/L、T-K₂O (軸方向) は K 0.05 mg/L ~ 0.5 mg/L、T-K₂O (横方向) は K 1 mg/L ~ 25 mg/L) の残差の標準偏差を用いて、肥料等試験法³⁾ 附属書 A 試験法の妥当性確認の手順に従って定量下限を推定した結果、本法の定量下限は、T-P₂O₅ については 0.05 % (質量分率) 程度、T-K₂O (766.490 nm) については軸方向で 0.005 % (質量分率) 程度、横方向で 0.2 % (質量分率) 程度、T-K₂O (769.896 nm) については軸方向で 0.005 % (質量分率) 程度、横方向で 0.2 % (質量分率) 程度と推定された。これらは化成肥料の公定規格における含有すべき主成分の最小量の 1/5 以下であることを確認した。

以上のことから、本法は P については横方向、K については軸方向及び横方向の測定条件の下で肥料中の T-P₂O₅ 及び T-K₂O を分析するために、十分な性能を有していることが確認された。

文 献

- 1) 肥料の品質の確保等に関する法律、昭和 25 年 5 月 1 日、法律 127 号、最終改正令和元年 12 月 4 日、法律 62 号
- 2) 農林水産省告示：肥料の品質の確保等に関する法律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、最終改正令和 4 年 2 月 15 日、農林水産省告示第 302 号 (2020)
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) : 肥料等試験法 (2021)

< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2021.pdf >

- 4) 惠智正宏, 井上智江, 田淵恵, 野村哲也:汚泥肥料中のカドミウム, 鉛, ニッケル, クロム, 銅及び亜鉛の同時測定 -ICP 発光分光分析 装置の適用-, 肥料研究報告, **4**, 30~35 (2011)
- 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**, 1~9 (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)
- 7) 青山恵介:ICP 発光分光分析法によるチタンの測定, 肥料研究報告, **10**, 29~40 (2017)
- 8) 松尾信吾: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, 肥料研究報告, **11**, 14~28 (2018)
- 9) 船木紀夫:ICP-OES 法による固形肥料中の水溶性主成分の測定法の開発 , 肥料研究報告, **12**, 28~51 (2019)
- 10) 船木紀夫:ICP-OES 法による肥料中の可溶性石灰及び可溶性苦土の測定法の開発 , 肥料研究報告, **13**, 1~35 (2020)
- 11) 山西正将, 加藤まどか, 白井裕治:ICP-OES 法による液状肥料中の有効成分の測定法の性能評価 , 肥料研究報告, **13**, 123~145 (2020)
- 12) (公社)日本分析化学会関東支部:ICP 発光分析・ICP 質量分析の基礎と実際, オーム社, 57 (2014)
- 13) 中村洋裕, 大塚将成, 治多伸介, 大森大輔:し尿汚泥焼却灰の化学組成とリン溶出について , 環境化学 (Journal of Environmental Chemistry), **vol.28**, 127~139 (2018)

Development of Determination Method of Total phosphoric acid and Total potassium in Fertilizers by ICP-OES

YAMANISHI Masayuki¹, HASHIMOTO Yoshimi¹, HIRATA Erika², SHIRAI Yuji¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fertilizer and Feed Inspection Department

² FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department, (Now) FAMIC, Sapporo Regional Center

A single-laboratory validation study was conducted for the simultaneous determination of Total phosphoric acid (T-P₂O₅) and Total potassium (T-K₂O) in fertilizers by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). The sample was ashed and extracted with aqua regia. Solution to suppress ionization interference and internal standard (IS, using Be and Li) was added to the fixed amount of extract solution, diluted with water, and analyzed with ICP-OES.

Result of 3 replicate analysis in CRM, and of comparison with the method of fertilizer and 3 replicate analysis in 6 samples prepared to contain with T-P₂O₅ and T-K₂O at 3 % - 30 % (mass fraction), this method were cleared the criteria of trueness described in the procedure for identifying the characteristics of the test method described in Testing Methods for Fertilizers. Intermediate relative standard deviation ($RSD_{I(T)}$) of T-P₂O₅ and T-K₂O were estimated 0.9 % - 1.5 % (T-P₂O₅) and 1.0 % - 4.3 % (T-K₂O), respectively. The quantification limit (LOQ) of T-P₂O₅ and T-K₂O were estimated to be less than 1/5 of the minimum guaranteed component amount of compound fertilizers.

Those results indicated that the developed method was valid for the analysis of T-P₂O₅ and T-K₂O in fertilizers.

Key words Fertilizer, Total phosphoric acid, Total potassium, ICP-OES

(Research Report of Fertilizer, **15**, 1-23, 2022)

2 ICP-OES を用いた肥料中の可溶性りん酸の分析法の開発

青山恵介¹

キーワード 肥料, 可溶性りん酸, ICP-OES

1. はじめに

誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES)を用いた肥料の分析法については、2011年に汚泥肥料中の有害重金属の分析法¹⁾、2015年に液状肥料中の水溶性主成分の分析法²⁾、2016年に液状肥料中の効果発現促進材の分析法³⁾、2017年にチタンの分析法⁴⁾、2018年に固形肥料中の可溶性主成分の分析法⁵⁾、2019年に固形肥料中の水溶性主成分の分析法⁶⁾、そして2020年に肥料中の可溶性石灰及び可溶性苦土の分析法⁷⁾が、それぞれFAMICから報告され、肥料等試験法⁸⁾に記載されている。

そこで本検討では、アンモニアアルカリ性くえん酸アンモニウム溶液可溶性りん酸(ペーテルマンくえん酸塩溶液可溶性りん酸ともいう)(可溶性りん酸(S-P₂O₅)(以下、SPという))の測定についてICP-OESを用いた分析法(以下、本法という)を開発し、単一試験室による妥当性確認を行った。さらに、肥料の品質の確保等に関する法律⁹⁾が令和元年12月に改正され、それまで生産する事が認められていなかった特殊肥料と普通肥料を混合した肥料(特殊肥料等入り指定混合肥料)を生産する事が可能となったことから、特殊肥料等入り指定混合肥料への適用についても検討したので報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

Table 1 に示した肥料については、500 μm のふるいを通過するまで粉砕機で粉砕したものを分析用試料とした。牛糞堆肥及びバーク堆肥については、乾燥器を用いて 65 °C で 5 時間以上乾燥させた後、500 μm のふるいを通過するまで粉砕機で粉砕したものを分析用試料とした。その他、肥料認証標準物質 FAMIC-B-14 を用いた。

Table 1 Samples

Kind of fertilizers	Number	Materials
Chemical fertilizer	13	Ammonia, Ammonia chloride, Ammonia phosphate, Ammonium sulfate, Ammonium nitrate, Borate fertilizer, By-product magnesium fertilizer, Canola oil, residue, Coated urea fertilizer,
Mixed fertilizer	4	Dried cells, Fermented rice bran, Fishmeal, Lightly baked magnesium, Liquid compound fertilizer, Magnesium sulfate, Manganese sulfate, Potassium chloride, Potassium sulphate,
Superphosphate	2	Steamed bone powder, Steamed feather meal, Steamed leather powder, Superphosphate,
Triple superphosphate	1	Urea

2) 試薬等の調製

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- (2) 硝酸: 富士フィルム和光純薬 精密分析用
- (3) アンモニア水: 富士フィルム和光純薬 特級(NH₃ 28%(質量分率))

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

- (4) くえん酸一水和物：富士フィルム和光純薬 特級
- (5) ペーテルマンくえん酸塩溶液：JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 173 g を水に加えて溶かし、窒素 42 g に相当するアンモニア水を冷却しながら徐々に加え、水を加えて 1000 mL とした。
- (6) 塩酸：富士フィルム和光純薬 精密分析用
- (7) 塩酸(1+23)：(6)の塩酸の体積 1 と水の体積 23 とを混合したもの。
- (8) ベリリウム標準液(Be 1000 mg/L)：富士フィルム和光純薬 JCSS
- (9) ベリリウム標準液(Be 100 mg/L)：ベリリウム標準液(Be 1000 mg/L) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線まで塩酸(1+23)を加える。
- (10) りん標準液(P 10 000 mg/L)：シグマアルドリッチ ICP 用
- (11) りん標準液(P 1000 mg/L)：りん標準液(P 10 000 mg/L) 50 mL を 500 mL 全量フラスコにとり、塩酸(1+23)を標線まで加えて混合した。
- (12) りん標準液(100 mg/L)：りん標準液(P 10 000 mg/L) 5 mL を 500 mL 全量フラスコにとり、塩酸(1+23)を標線まで加えて混合した。
- (13) 検量線用標準液(P 10 mg/L~200 mg/L)：りん標準液(P 1000 mg/L) 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL 及び 20 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、さらにベリリウム標準液(Be 100 mg/L)を各全量フラスコに 10 mL ずつ加えた後、塩酸(1+23)を標線まで加えて混合した。なお、調製した検量線用標準液の濃度は P として 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L 及び 200 mg/L であり、それぞれ内標準として Be を 10 mg/L 含有する。
- (14) 検量線用標準液(P 0.5 mg/L~5 mg/L)：りん標準液(P 100 mg/L) 0.5 mL, 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、さらにベリリウム標準液(Be 100 mg/L)を各全量フラスコに 10 mL ずつ加えた後、塩酸(1+23)を標線まで加えて混合した。なお、調製した検量線用標準液の濃度は P として 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L 及び 5 mg/L であり、それぞれ内標準として Be を 10 mg/L 含有する。
- (15) 検量線用空試験液：塩酸(1+23)を使用した。

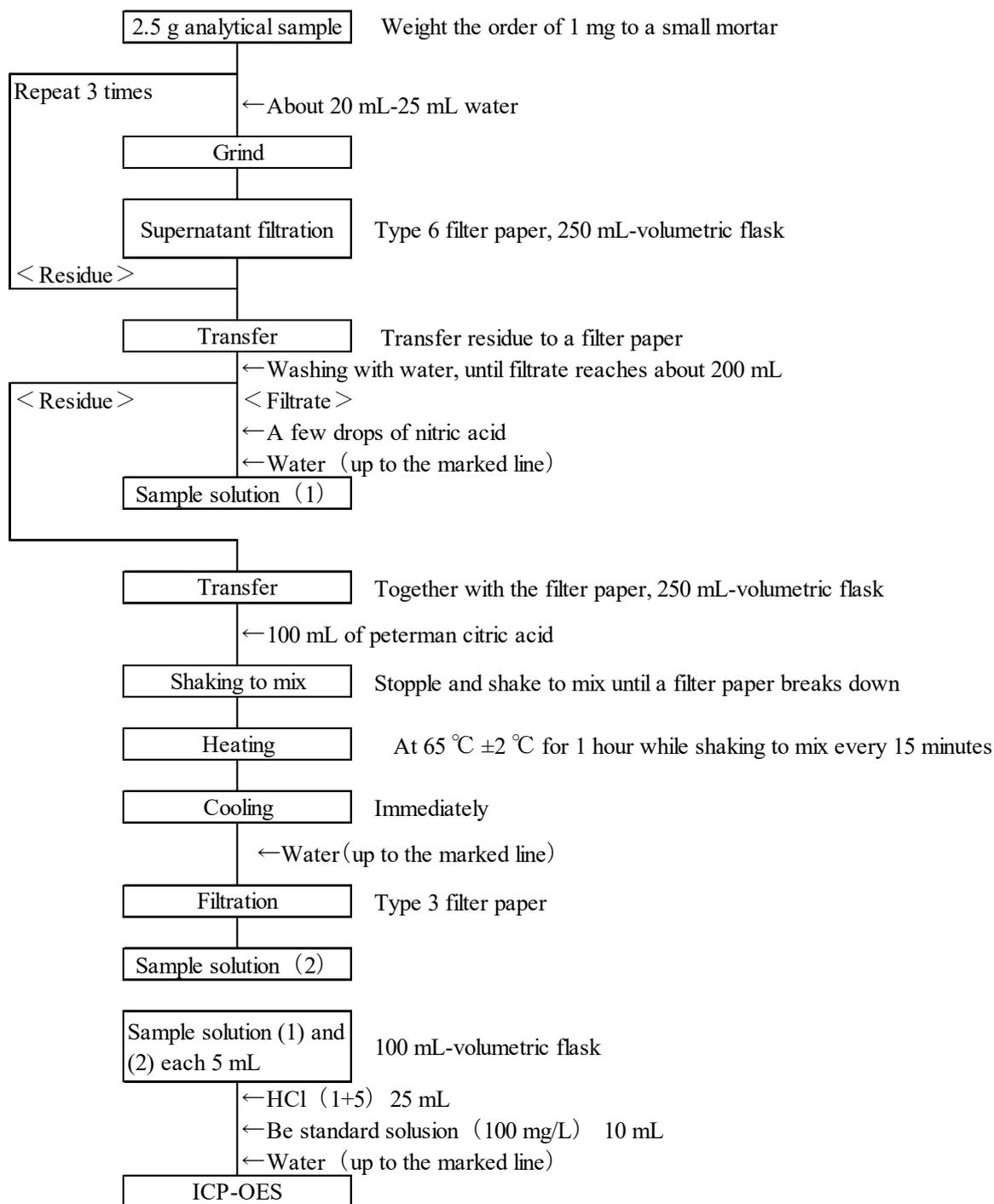
3) 器具及び装置

- (1) ICP-OES: 島津製作所 ICPE-8100(横方向観測方式, シーケンシャル形分光器)
- (2) 分光光度計: 島津製作所 UV-1800
- (3) 超遠心粉碎機: Retsch ZM-200
- (4) ウォーターバス: Thermo Fisher Scientific FSGPD28
- (5) 小型乳鉢
- (6) ろ紙 6 種
- (7) ろ紙 3 種

4) 分析方法

分析試料 2.5 g を小型乳鉢に入れ、水約 20 mL~25 mL を加えすりつぶし、その上澄み液をろ紙 6 種で 250 mL 全量フラスコにろ過した。さらに水約 20 mL~25 mL を加える操作からろ過までの操作を合計 3 回繰り返した後、小型乳鉢内の不溶解物を水でろ紙上に移し入れ、ろ液が約 200 mL になるまで水でろ紙上の不溶解物を洗浄した。ろ液に少量の硝酸を加え、更に標線まで水を加え、試料溶液 (1) とした。ろ紙上の不溶解物をろ紙とともに別の 250 mL 全量フラスコに移し入れ、ペーテルマンくえん酸塩溶液 100 mL を加えて栓をし、ろ紙が崩れるまで振り混ぜた。さらに全量フラスコを 65 °C±2 °C の水浴中で

15分ごとに振り混ぜながら1時間加熱した。速やかに冷却した後、標線まで水を加えた。ろ紙3種でろ過し、試料溶液(2)とした。試料溶液(1)及び試料溶液(2)からそれぞれ5 mLを100 mL全量フラスコに入れ、ベリリウム標準液(Be 100 mg/L)を10 mL加え、さらに塩酸(1+5)を25 mL加え、標線まで水を加えたものを試料溶液とし、ICP-OESを用いてPの濃度を定量した。なお、ICP-OESによる定量は、Pは178.287 nm、Beは234.861 nmの波長について分析し、P濃度と指示値の比P/Beを用いて検量線を作成し、試料中のPの濃度を求め、換算係数2.2914を乗じて分析試料中のりん酸(P₂O₅)濃度を求めた。Scheme 1に本法のフローシートを示した。



Scheme 1 Flow sheet for citrate-soluble phosphoric acid in fertilizers by ICP-OES

3. 結果及び考察

1) 検量線の直線性

P の濃度が 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L 及び 200 mg/L の検量線用標準液を ICP-OES でランダムに 2 回測定し, P の濃度と指示値の比 P/Be による検量線を Fig. 1 のとおり作成した. 決定係数 (r^2) が 0.999 以上であり, 切片の 95 %信頼区間に原点が含まれていた.

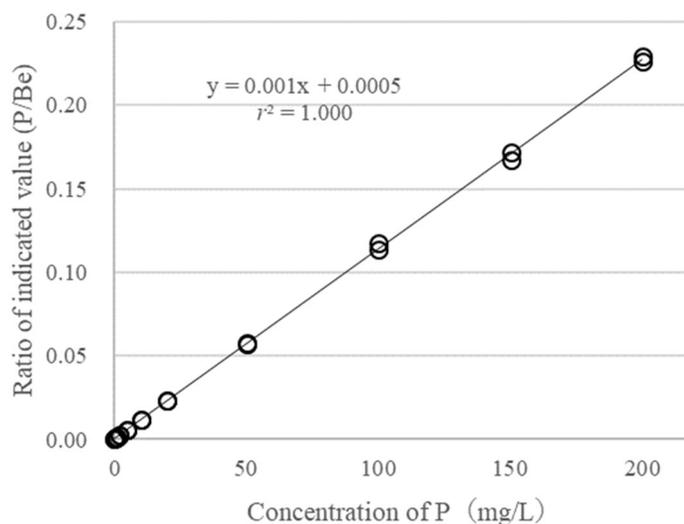


Fig. 1 Calibration curve of P

2) 真度の評価

(1) 肥料認証標準物質を用いた真度の評価

本法の真度を評価するため, 肥料認証標準物質 FAMIC-B-14 を 3 点併行により分析した. 結果は Table 2 のとおり, 平均値は認証値に対する警戒限界の範囲内であり, 肥料等試験法附属書 A に示されている真度の目標を満たしていた.

Table 2 The estimation of trueness using certified reference materials

Ingredients	Certified reference material	Mean ^{a)} % (Mass fraction)	Certified value % (Mass fraction)	Warning limit for the certified value	
				% (Mass fraction)	
SP	FAMIC-B-14	9.23	9.18	9.01	~ 9.36

a) Mean value ($n=3$)

(2) 妥当性が確認された試験法との比較による真度の評価

Table 1 に示した試料について, 本法と肥料等試験法に記載されているバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法により分析を行い, 異なる 2 つの分析法による分析値の相関図を作成して, 本法の真度を評価した. 相関図は Fig. 2 のとおり. さらに, 回帰直線の傾き, 切片及び相関係数を算出し, さらに予測区間を確認した結果, 回帰直線の相関係数は 0.99 以上であり回帰直線の傾きの 95 %信頼区間に 1 が含まれ, 切片の 95 %信頼区間に 0 が含まれており肥料等試験法附属書 A に示されている真度の目標を満たしていた.

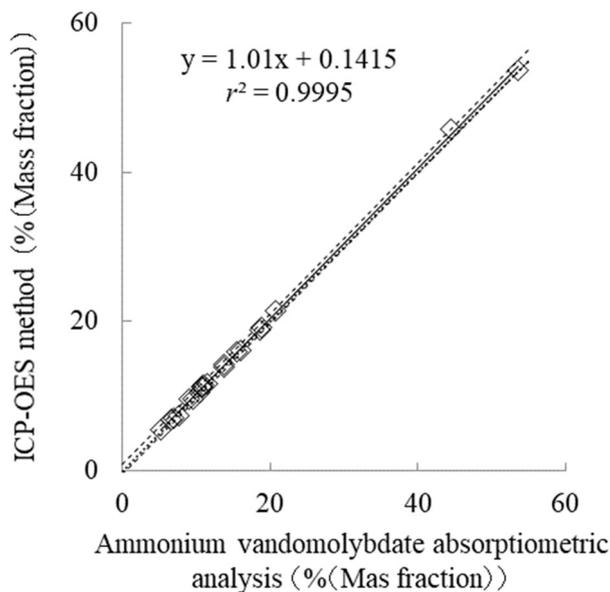


Fig. 2 Comparison of the measurements in between two methods

Thick line: Regression line, Dotted line: 95 % prediction interval, Thin line: $y=x$

3) 特殊肥料等入り指定混合肥料への適用

特殊肥料等入り指定混合肥料についても分析値を元に保証票に成分量を表示することが可能であることから、本法が特殊肥料等入り指定混合肥料に含まれるSPの分析への適用が可能か検討した。特殊肥料等入り指定混合肥料として牛ふん堆肥に過りん酸石灰 A を混合した調製試料と、バーク堆肥に過りん酸石灰 B を混合した調製試料を用いて検討した。なお、調製試料の原料の混合割合及び分析結果は Table 3 及び Table 4 のとおりであり、原料及び調製試料の分析は本法により実施した。

牛ふん堆肥と過りん酸石灰 A を混合した調製試料については Table 3 のとおり、SP の設計値が 5.34% (質量分率) に対して分析値は 5.16 % (質量分率)、回収率は 97 %であった。バーク堆肥と過りん酸石灰 B を混合した調製試料については Table 4 のとおり、SP の設計値が 3.12 % (質量分率) に対して分析値は 3.11 % (質量分率)、回収率は 100 %であった。いずれの調製試料においても分析して得られた回収率は、肥料等試験法附属書 A で定められている真度の目標を満たしていた。したがって、これらの原料を混合した場合であっても、本法が十分な性能を有していることが確認された。

Table 3 Analysis result of fertilizer prepared by mixing cow dung compost and superphosphate

Materials	Raw material analysis value	Blending ratio (%)	Raw material analysis value × Blending ratio (%) ^{a)}
Cow dung compost	3.83 ± 0.16 ^{b)}	90	3.45
Superphosphate A	18.9 ± 0.1 ^{b)}	10	1.89
	Desing value of adjustment sample		5.34
	Analysis value of adjustment sample		5.16 ± 0.2 ^{b)}
	Recovery rate		97 %

a) Mass fraction

b) Mean($n=3$) ± Standard Deviation

Table 4 Analysis result of fertilizer prepared by mixing composted bark and superphosphate

Materials	Raw material analysis value	Blending ratio (%)	Raw material analysis value × Blending ratio (%) ^{a)}
Composted bark	1.31 ± 0.01 ^{b)}	90	1.18
Superphosphate B	19.4 ± 0.6 ^{b)}	10	1.94
Desing value of adjustment sample			3.12
Analysis value of adjustment sample			3.11 ± 0.03 ^{b)}
Recovery rate			100 %

a) Mass fraction

b) Mean($n=3$) ± Standard Deviation

4) 併行精度及び中間精度の評価

本法の併行精度及び中間精度を確認するため、化成肥料 A、過りん酸石灰及び化成肥料 B を 2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った結果は Table 5 のとおり。さらに、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求めた結果は Table 6 のとおり。併行相対標準偏差は 0.7 %~1.9 %、中間相対標準偏差は 0.8 %~2.0 %であり、肥料等試験法附属書 A に示されている精度の目安以下であったことから、本法は十分な精度を有していることが確認された。

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

Test day	Compound fertilizer A		Superphosphate		Compound fertilizer B	
1	5.30	5.47	18.85	18.78	53.18	53.97
2	5.48	5.44	19.45	18.68	53.00	53.44
3	5.42	5.36	19.24	19.33	53.67	54.31
4	5.53	5.51	18.96	18.14	53.30	53.23
5	5.44	5.39	18.90	19.16	53.57	53.20

Table 6 Statistical analysis result of repeatability test

Sample	Mean ^{a)} % (Mass fraction)	Repeatability precision			Intermediate precision		
		s_r ^{b)} % (Mass fraction)	RSD_r ^{c)} (%)	$CRSD_r$ ^{d)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)} % (Mass fraction)	$RSD_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)
Compound fertilizer A	5.43	0.06	1.2	2	0.07	1.3	3.5
Superphosphate	18.95	0.37	1.9	1.5	0.38	2.0	2.5
Compound fertilizer B	53.49	0.37	0.7	1	0.41	0.8	2

a) Total mean (test-days(5) × parallel analysis(2))

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

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

e) Intermediate standard deviation

f) Intermediate relative standard deviation

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

5) 定量下限等の確認

P の濃度が 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L 及び 5 mg/L の検量線用標準液を ICP-OES で測定して作成した検量線を用いて定量下限及び検出下限を推定した。検量線の残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差と検量線の傾きを用いて定量下限及び検出下限を推定した結果, 0.02 % (質量分率) 及び 0.01 % (質量分率) 程度と推定された。これは, 肥料の公定規格で定められている含有すべき主成分の最小量である家庭園芸用複合肥料の 0.1 % (質量分率) に対して 1/5 程度の濃度であった。

4. まとめ

ICP-OES を用いた肥料中の可溶性りん酸の分析法について単一試験室による妥当性を確認したところ, 次の結果を得た。

- 1) P 濃度が 0.5 mg/L~200 mg/L の範囲で検量線を作成した結果, 決定係数 (r^2) が 0.999 以上であり, 切片の 95 %信頼区間に原点が含まれていることを確認した。
- 2) 真度を評価するため, 肥料認証標準物質 FAMIC-B-14 を分析した結果, 肥料等試験法附属書 A に示されている真度の目標を満たしていた。また, 妥当性が確認された試験法であるバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法の測定値と比較した結果, 同等の試験法であることを確認した。
- 3) 特殊肥料等入り指定混合肥料を想定した調製試料を用いて分析した結果は, 可溶性りん酸の濃度の設計値に対する回収率は肥料等試験法附属書 A で定められている真度の目標を満たしていた。
- 4) 併行精度及び中間精度の推定を行った結果, 併行相対標準偏差は 0.7 %~1.9 %, 中間相対標準偏差は 0.8 %~2.0 % であり, 肥料等試験法附属書 A に示されている精度の目安以下であった。
- 5) 検量線を用いて定量下限及び検出下限を推定した結果, 0.02 % (質量分率) 及び 0.01 % (質量分率) 程度と考えられた。

以上のことから, 本法は肥料中の可溶性りん酸を測定するために, 十分な性能を有していることが確認された。

文 献

- 1) 恵智正宏, 井上智江, 田淵恵, 野村哲也: 汚泥肥料中のカドミウム, 鉛, ニッケル, クロム, 銅及び亜鉛の同時測定 - ICP 発光分光分析装置の適用 -, 肥料研究報告, **4**, 30~35 (2011)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 青山恵介: ICP 発光分光分析法によるチタンの測定, 肥料研究報告, **10**, 29~40 (2017)
- 5) 松尾信吾: ICP 発光分光分析 (ICP-OES) 法による固形肥料中の可溶性主成分の測定, 肥料研究報告, **11**, 14~28 (2018)
- 6) 船木紀夫: ICP 発光分光分析 (ICP-OES) 法による固形肥料中の水溶性主成分の測定, 肥料研究報告, **12**, 28~51 (2019)
- 7) 船木紀夫: ICP-OES 法による肥料中の可溶性石灰及び可溶性苦土の測定法の開発, 肥料研究報告, **13**, 1

～35(2020)

8) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2021)

< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2021.pdf >

9) 肥料の品質の確保等に関する法律, 昭和 25 年 5 月 1 日, 法律 127 号, 最終改正令和元年 12 月 4 日, 法律 62 号

Development of Determination Method of Citrate-soluble Phosphoric Acid in Fertilizers by ICP-OES

AOYAMA Keisuke¹

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

Regarding the analysis method of citrate-soluble phosphoric acid (S-P₂O₅) using ICP-OES, the performance of the analysis method by a single laboratory was confirmed.

Water was added to the analysis sample for extraction, then Peterman citrate solution was added for extraction, then equal amounts of each extract were mixed, and Be was added as an internal standard to analyze the sample solution using ICP-OES.

The analytical values obtained of this method were equivalent to Ammonium Vanadomolybdate Absorption Photometry listed in Testing Methods for Fertilizers.

The authenticity of this analysis method was confirmed using a fertilizer in which cow dung compost was mixed with superphosphate and a fertilizer in which bark compost was mixed with superphosphate. By the way, these fertilizers can be newly produced from December 2019. As a result of analyzing these fertilizers, the SP recovery rates were 97 % and 100 %, and it was possible to apply this analysis method to fertilizers produced by mixing these raw materials.

The repeatability standard deviation and intermediate relative standard deviation were calculated by analyzing the parallel analysis for 5 days, and the results were 0.7 %–1.9 % and 0.8 %–2.0 %. The lower limit of quantification was estimated to be about 0.02 % (mass fraction).

Key words Fertilizer, citrate-soluble phosphoric acid, ICP-MS

(Research Report of Fertilizer, 15, 24-32, 2022)

3 硝酸性窒素分析のためのフェノール硫酸法の改良と性能評価

— 室間共同試験による妥当性確認 —

白澤優子¹, 加藤公栄¹

キーワード 上下転倒式回転振り混ぜ機, 垂直往復振とう機, 硝酸性窒素, 肥料, 共同試験

1. はじめに

市場のグローバル化が進む中, 適合性評価に係る手続きが国際貿易の障害となることが無いように, WTO/TBT 協定では国際規格を用いることが義務づけられており, 我が国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)¹⁾を踏まえた分析結果の信頼性確保が重要視されている. ISO/IEC 17025 では, 分析を行う際には国際・国家規格等又は妥当性が確認された方法を選定することを要求している. また, 肥料の品質の確保等に関する法令で定められた肥料の主成分^{2~4)}に係る定量及び量の算出方法については, 農林水産省告示^{4~6)}により肥料等試験法⁷⁾が指定されている. このため, 肥料等試験法は妥当性が確認されている必要がある.

現在, 肥料等試験法に記載されているフェノール硫酸法を用いた硝酸性窒素の分析法について, 白澤ら⁸⁾が固形肥料については垂直往復振とう機を用いた試料溶液調製の方法を, 液状肥料については手振り混ぜを行う試料溶液調製方法を検討し, 改良した分析法について, 単一試験室における妥当性 (SLV: Single Laboratory Validation) を確認⁸⁾している. 今回, 改良した分析法について, 国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認 (HCV: Harmonized Collaborative Validation) を実施したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 均質性確認用試料及び共同試験用試料の調製

①試験用試料の選定: 今般の肥料法制度の改正を踏まえ, 本共同試験では分析用試料として硝酸性窒素を保証成分量としている肥料の他に, 硝酸性窒素を含有しているが保証成分量としていなかった比較的有機質の多い肥料を事前に探索し, 該当した堆肥 1 銘柄を固形肥料の試料に含めた. 固形肥料として, 配合肥料 (無機配合肥料), 化成肥料 1 (数字は番号. 以下同じ) (無機化成肥料), 化成肥料 2 (効果発現促進材として硝酸石灰を添加), また液状肥料として, 液状複合肥料 1 (有機入り複合肥料), 家庭園芸用複合肥料 1 及び液状複合肥料 2 (効果発現促進材として硝酸石灰を添加) を使用した. その含有する硝酸性窒素の量が流通肥料の保証成分量として多い濃度範囲を網羅するように選定した.

②固形肥料の試料調製: 硝酸ソーダ, 化成肥料 (2 種類), 配合肥料, 堆肥を目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉碎後, 均質になるようによく混合した. 次に, 5 種類の肥料について, 円筒ポリ容器に約 1.9 g 充填したものを各 56 個作成し, 各容器に乱数表を用いてランダムに番号 (1~280) を貼付したものを試料とした. これらの識別した 5 種類の試料から乱数表を用いてランダムに 10 個ずつ抜き取り均質性確認用試料とした.

③液状肥料の試料調製: 液状窒素肥料, 液状複合肥料 (2 種類), 家庭園芸用複合肥料 (2 種類) をねじ式ポリ容器に約 0.76 g 分注したものを各 56 個作成し, 各容器に乱数表を用いてランダムに番号 (1~280) を貼付し

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

たものを試料とした。

また、固形肥料及び液状肥料の各 5 種類の試料から無作為にそれぞれ 2 個ずつ抽出したものを共同試験用試料とし、以下の試験室に送付した。

(共同試験参加試験室)

- ・ 片倉コープアグリ株式会社 旭川工場
- ・ サンアグロ株式会社 砂川工場
- ・ 清和肥料工業株式会社 いわき工場
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 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 肥飼料検査課
- ・ 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 肥飼料検査課
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部 肥飼料安全検査部 肥料鑑定課
- ・ 福栄肥料株式会社 石巻工場
- ・ ホクレン肥料株式会社 北見工場
- ・ ホクレン肥料株式会社 釧路工場
- ・ ホクレン肥料株式会社 空知工場

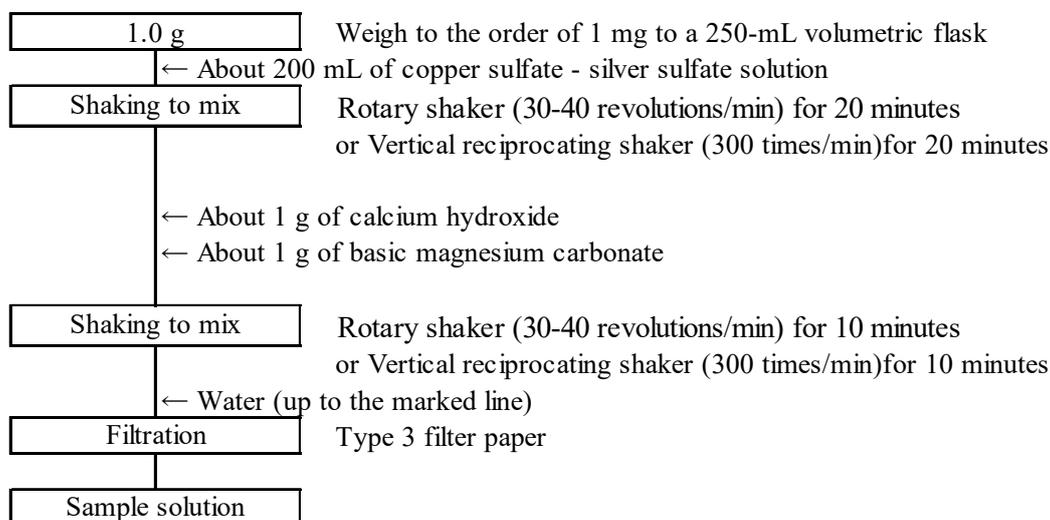
(敬称略 50 音順)

2) 装置

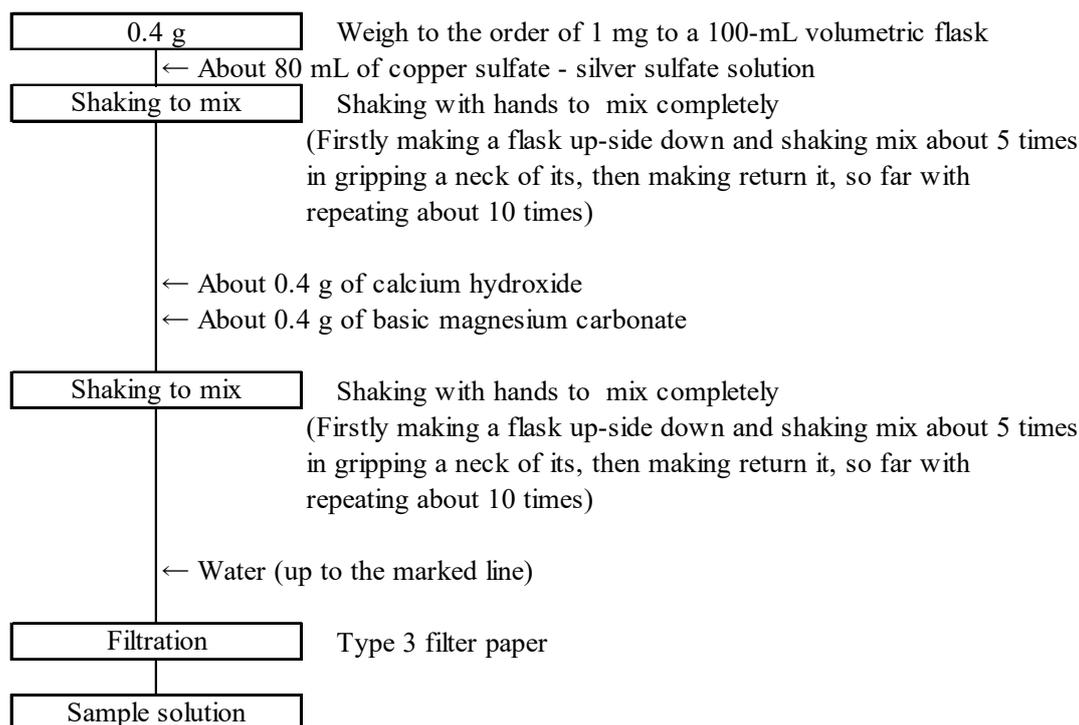
化学天秤、上下転倒式回転振り混ぜ機(または垂直往復振とう機)、水浴、分光光度計、は各試験室が保有しているものを使用した。

3) 分析方法

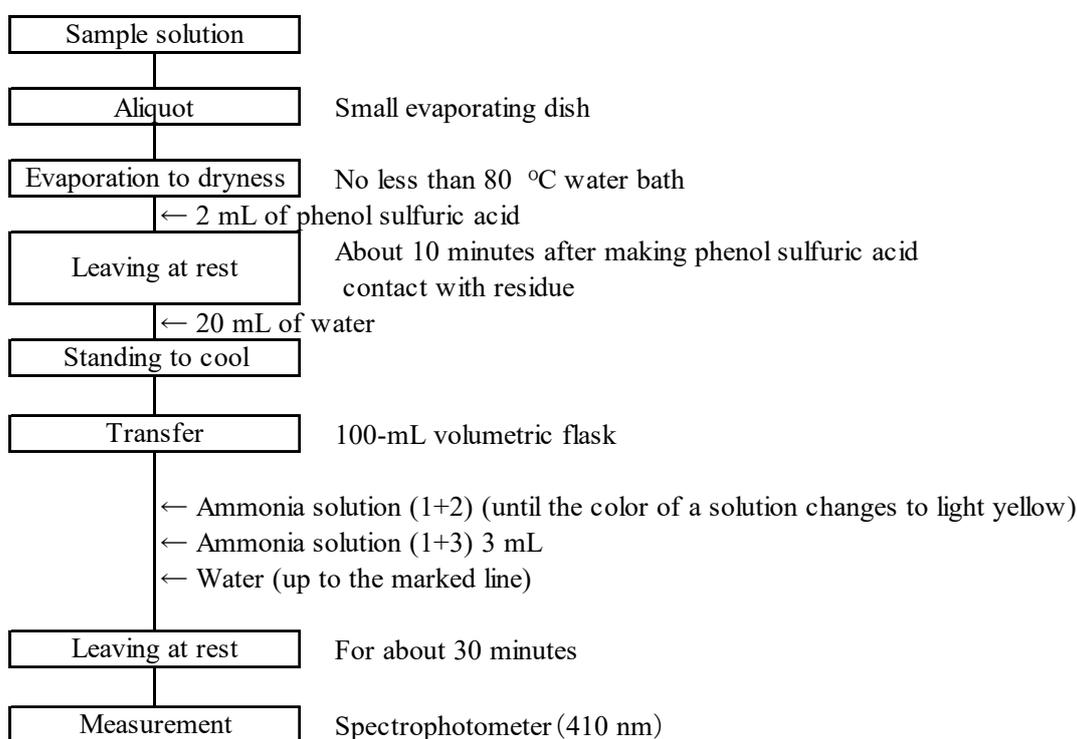
肥料等試験法 4.1.3 硝酸性窒素 4.1.3.c フェノール硫酸法により測定した。なお、参考のため、フローシートを Scheme 1 に示した。



Scheme 1 The flow sheet of extraction procedure in solid fertilizer



Scheme 2 Simple extraction procedure (Shaking to mix completely) in liquid fertilizer



Scheme 3 Flow sheet for quantitation method of nitrate nitrogen in fertilizers

4) 共同試験用試料の均質性確認

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁹⁾に従い, 1)により調製, 抽出した合計 50 試料について各試料に

つき 2 点併行で分析して均質性を確認した。

5) 共同試験

共同試験に参加した 13 試験室の各試験室で使用した分光光度計の型式及び測定波長, 並びに振り混ぜ機器の種類は Table 1 のとおり. それぞれの試験室に 1) により調製した計 20 試料(固形肥料として 10 試料, 液状肥料として 10 試料), その他に分析手順確認用試料として固形肥料と液状肥料を各 2 点, 並びに試験実施要領を配付し, 各試験室において 2021 年 11 月 4 日~2021 年 12 月 24 日の期間(追加で依頼した一部の試験室は 2022 年 1 月 14 日までの期間)に, 各試料に対応する 3) の分析法に従って分析した.

Table 1 Equipment used

Lab ID ^{a)}	Model of spectrophotometer	Shaker (Selected in preparing the sample solution in solid fertilizer)
A	SHIMADZU, UV-1800	Vertical reciprocating shaker
B	HITACHI, U-1900	(Constant temperature) upside down rotary shaker
C	SHIMADZU, UV-1800	(Constant temperature) upside down rotary shaker
D	HITACHI, U-1800	(Constant temperature) upside down rotary shaker
E	SHIMADZU, UV-1800	Vertical reciprocating shaker
F	JASCO, V-670	(Constant temperature) upside down rotary shaker
G	HITACHI, U-5100	(Constant temperature) upside down rotary shaker
H	SHIMADZU, UV-1800	Vertical reciprocating shaker
I	SHIMADZU, UV-1800	Vertical reciprocating shaker
J	SHIMADZU, UV-1850	(Constant temperature) upside down rotary shaker
K	HITACHI, UH5300	(Constant temperature) upside down rotary shaker
L	SHIMADZU, UVmini-1240	Vertical reciprocating shaker
M	SHIMADZU, UVmini-1240	Vertical reciprocating shaker

a) Laboratory identification (random order)

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

固形肥料について各 5 種類の試料を 2 点併行で分析した総平均値(\bar{x}), 一元配置分散分析の統計量から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 Table 2 に示した. さらに, 肥料等試験法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($\hat{\sigma}_R$)を同じく Table 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の手順を参考に実施した. まず, 等分散性を確認するため, 分析結果について Cochran の検定を実施した. その結果, 2 試料の分析値が外れ値と判定され除外した. 外れ値除外後の分析結果について, 一元配置分散分析を実施し, 併行標準偏差(s_r)及び試料間標準偏差(s_{bb})を求め, (式 3)により併行標準偏差(s_r)を評価した. 次に, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの十分に均質の判定式(式 2)を用いて均質性の判定を行った. その結果, 全ての試料で判定式(式 2)を満たしていたことから, 共同試験用試料として妥当な均質性を有していることを確認した. なお, 参考のため, 併行精度

を評価する式(式 3)を下記に示す. また(式 4)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, いずれの試料も推定室間再現標準偏差($\hat{\sigma}_R$)と比較して小さい値であった.

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

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

$$s_r < 0.5\sigma_p = 0.5\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 3)$$

$$s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2} \quad \dots (式 4)$$

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$: 肥料等試験法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

Table 2 Homogeneity test results

Sample	No. of Sample p/q^a	\bar{x}^b (%) ^c	$CRSD_R^d$ (%)	$\hat{\sigma}_R^e$ (%) ^e	s_{bb}^f (%) ^c	$0.3\hat{\sigma}_R^g$ (%) ^c	s_r^h (%) ^c	$0.5\hat{\sigma}_R^i$ (%) ^c	s_{b+r}^j (%) ^c
Sodium nitrate	9 (1)	17.21	3	0.52	0.03	0.155	0.041	0.26	0.052
Formulated fertilizer	9 (1)	11.69	3	0.35	0 ^k	0.105	0.064	0.18	0.064
Compound fertilizer 1	10 (0)	6.96	4	0.28	0 ^k	0.084	0.045	0.14	0.045
Compound fertilizer 2	10 (0)	0.739	6	0.04	0 ^k	0.013	0.005	0.02	0.005
Compost	10 (0)	0.178	6	0.01	0.001	0.003	0.004	0.01	0.004

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

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

c) Mass fraction

d) Criteria of precision for Reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2021

e) The estimated standard deviation of reproducibility calculated based on $CRSD_R$

f) Standard deviation of sample-to-sample

g) The value for the test : $s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R$

h) Repeatability standard deviation

i) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (S_r)

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

k) When the variance between groups < the variance within a group, s_{bb}^2 was considered as 0

2) 共同試験結果及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験結果を Table 3-1 及び 3-2 に示した. 試験室 G の結果については検量線

用標準液調製の手順に不備があると考えられたため、以降の統計解析には用いないこととした。試験室 G を外した 12 試験室の結果について、IUPAC の共同試験プロトコルに従って統計解析を実施した。まず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 試験室のうち、固形肥料については、硝酸ソーダで 1 試験室、配合肥料で 1 試験室、化成肥料 1 で 1 試験室、化成肥料 2 で 1 試験室が、液状肥料については液状窒素肥料で 1 試験室、液状複合肥料で 2 試験室、家庭園芸用複合肥料 1 で 2 試験室、液状複合肥料 2 で 1 試験室が外れ値として判定された。

Table 3-1 Individual result of nitrate nitrogen (in Solid Fertilizer) (%)^{a)}

Lab ID ^{b)}	Sodium nitrate		Formulated fertilizer		Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compost	
A	16.75	16.77	11.39	11.55	6.88	6.94	0.743	0.735	0.195	0.193
B	16.40	16.40	11.20	11.00	6.80	6.80	0.700	0.700	0.150	0.167
C	16.84	16.69	11.72 ^{d)}	11.11 ^{d)}	6.94	6.96	0.740	0.721	0.183	0.188
D	16.12	16.20	11.06	11.02	6.76	6.76	0.667	0.660	0.190	0.190
E	16.62	16.64	11.28	11.18	6.80	6.78	0.702	0.700	0.162	0.162
F	15.09 ^{d)}	15.95 ^{d)}	11.21	11.17	6.93	6.85	0.710 ^{d)}	1.76 ^{d)}	0.196	0.200
G ^{c)}	17.85	17.92	12.06	12.21	9.24	9.27	1.18	1.26	0.554	0.620
H	16.49	16.71	11.72	11.51	6.90	6.86	0.753	0.737	0.202	0.198
I	16.26	16.38	11.32	11.37	6.91	6.91	0.716	0.723	0.167	0.166
J	15.95	15.90	11.20	11.07	6.62 ^{d)}	5.98 ^{d)}	0.716	0.718	0.169	0.178
K	16.51	16.05	11.32	11.28	6.97	6.77	0.692	0.734	0.191	0.183
L	17.24	17.15	11.77	11.91	7.08	7.12	0.753	0.746	0.187	0.183
M	16.02	16.22	11.28	11.37	6.58	6.44	0.690	0.716	0.130	0.145

a) Mass fraction

b) Laboratory identification (random order)

c) Not Adopted the result for flaw of analytical procedure

d) Outlier of Cochran test

e) Outlier of Single Grubbs test

f) Outlier of Paired Grubbs test

Lab ID ^{b)}	Liquid nitrogen fertilizer		Liquid mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 1		Liquid mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 2	
A	8.74	8.80	7.02	6.92	4.42	4.50	1.73	1.73	1.04	1.03
B	8.00	8.20	6.60	6.60	4.60	4.80	1.55 ^{d)}	1.75 ^{d)}	0.950	1.00
C	8.81	8.66	6.97	6.72	4.76 ^{d)}	4.28 ^{d)}	1.72	1.68	1.04	1.01
D	8.48	8.56	6.88	6.80	4.48	4.40	1.66	1.62	1.01	0.980
E	8.67	8.69	6.98	6.92	4.35	4.33	1.69	1.69	1.00	1.01
F	8.72	8.85	8.52 ^{f)}	7.74 ^{f)}	4.52 ^{d)}	5.25 ^{d)}	1.77	1.83	1.08	1.05
G ^{c)}	9.72	9.86	8.37	8.44	5.28	5.65	2.01	2.07	1.39	1.45
H	8.38	8.35	6.80	6.68	4.30	4.24	1.61	1.65	0.996	1.01
I	7.27 ^{e)}	7.61 ^{e)}	5.84 ^{f)}	6.21 ^{f)}	3.64	3.64	1.51	1.53	0.872	0.957
J	8.60	8.42	6.70	6.68	4.45	4.45	1.63	1.59	1.05	1.01
K	8.45	8.27	6.37	6.83	4.11	3.96	1.60	1.67	1.00	0.990
L	8.90	8.99	7.20	7.12	4.54	4.57	1.77	1.76	1.05	1.05
M	8.93	8.88	7.10	7.23	4.57	4.57	1.78	1.75	1.06	1.07

The foot note is shown in Table 3-1

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した分析結果により算出^{10, 11)}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 4-1 及び 4-2 に示した.

固形肥料については 5 種類の試料について統計解析した結果, 平均値は 0.178 % (質量分率) ~16.47 % (質量分率) であり, その併行標準偏差 (s_r) は 0.01 % (質量分率) ~0.13 % (質量分率), 併行相対標準偏差 (RSD_r) は 0.8 % ~3.1 %, 室間再現標準偏差 (s_R) は 0.02 % (質量分率) ~0.37 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 2.2 % ~10.8 % であり, 液状肥料についても同様に平均値は 1.01 % (質量分率) ~8.61 % (質量分率) であり, その併行標準偏差 (s_r) は 0.02 % (質量分率) ~0.13 % (質量分率), 併行相対標準偏差 (RSD_r) は 1.0 % ~2.4 %, 室間再現標準偏差 (s_R) は 0.05 % (質量分率) ~0.31 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.1 % ~7.2 % であった.

今回, 固形肥料及び液状肥料について, いずれの試料においても併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) も肥料等試験法附属書 A 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許容範囲内であったことから, 本法の精度は肥料等試験法の性能規準の要求事項に適合していた.

Table 4-1 Statistical analysis of Collaborative study results (in Solid Fertilizer)

Sample	Labs $p(q)^a$	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r^d (%) ^{c)}	RSD_r^e (%)	$2*CRSD_r^f$ (%)	s_R^g (%) ^{c)}	RSD_R^h (%)	$2*CRSD_R^i$ (%)
Sodium nitrate	11 (1)	16.47	0.13	0.8	3	0.37	2.3	6
Formulated fertilizer	11 (1)	11.33	0.09	0.8	3	0.25	2.2	6
Compound fertilizer 1	11 (1)	6.85	0.06	0.8	4	0.15	2.2	8
Compound fertilizer 2	11 (1)	0.716	0.01	1.7	6	0.03	3.7	12
Compost	12 (0)	0.178	0.01	3.1	6	0.02	10.8	12

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

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

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Repeatability relative standard deviation

f) Criteria of repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

g) Standard deviation of reproducibility

h) Reproducibility relative standard deviation

i) Criteria of reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

Table 4-2 Statistical analysis of Collaborative study results (in Liquid Fertilizer)

Sample	Labs $p(q)^a$	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r^d (%) ^{c)}	RSD_r^e (%)	$2*CRSD_r^f$ (%)	s_R^g (%) ^{c)}	RSD_R^h (%)	$2*CRSD_R^i$ (%)
Liquid nitrogen fertilizer	11 (1)	8.61	0.09	1.0	4	0.27	3.1	8
Liquid mixed fertilizer 1	10 (2)	6.86	0.13	1.9	4	0.23	3.3	8
Home garden-use mixed fertilizer 1	10 (2)	4.35	0.06	1.5	4	0.31	7.2	8
Liquid mixed fertilizer 2	11 (1)	1.68	0.03	1.6	4	0.08	5.1	8
Home garden-use mixed fertilizer 2	12 (0)	1.01	0.02	2.4	4	0.05	4.5	8

The foot note is shown in Table 4-1

4. まとめ

肥料等試験法に記載された硝酸性窒素のフェノール硫酸法による分析法について、13 試験室において固形肥料と液状肥料についてそれぞれ 5 種類(10 点)の試料を用いて国際的に標準とされる共同試験を実施し、室間再現性の評価を行った。

その結果、固形肥料については平均値 0.178 % (質量分率) ~16.47 % (質量分率) の範囲において、室間

再現相対標準偏差(RSD_R)は2.2%~10.8%であり、液状肥料については平均値1.01%(質量分率)~8.61%(質量分率)の範囲において、室間再現相対標準偏差(RSD_R)は3.1%~7.2%であり、肥料等試験法附属書Aに示されている各濃度レベルにおける精度の目安を満たした。

今回検討した、固形肥料について2種類の振り混ぜ機を使用する分析法、液状肥料については手振り混ぜを行う分析法は、すでに単一試験室による分析法の妥当性確認(SLV)がされていることから、本法は肥料等試験法における試験法分類 Type B(HCV 及び SLV)の結果が肥料等試験法附属書Aの要求事項を満たした試験法)に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力いただきました片倉コープアグリ株式会社 旭川工場、サンアグロ株式会社 砂川工場、清和肥料工業株式会社 いわき工場、福栄肥料株式会社 石巻工場、ホクレン肥料株式会社 北見工場、ホクレン肥料株式会社 釧路工場、ホクレン肥料株式会社 空知工場の各位に謝意を表します。

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) 肥料の品質の確保等に関する法律施行令, 昭和 25 年 6 月 20 日, 政令第 198 号, 最終改正令和 2 年 10 月 14 日, 農林水産省令第 308 号(2020)
- 3) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律施行規則第十一条第八項第三号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, 令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1018 号(2021)
- 4) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律第十七条第一項第三号の規定に基づき、同法第四条第一項第三号並びに同条第二項第三号及び第四号に掲げる普通肥料の保証票にその含有量を記載する主要な成分を定める件, 平成 12 年 1 月 27 日, 農林水産省告示第 96 号, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1011 号(2021)
- 5) 農林水産省告示:特殊肥料の品質表示基準を定める件, 平成 12 年 8 月 31 日農林水産省告示第 1163 号, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1012 号(2021)
- 6) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律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, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1010 号(2021)
- 7) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2021)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2021.pdf >
- 8) 白澤優子, 加藤公栄:フェノール硫酸法にける硝酸性窒素の試料溶液調製方法の改良, 肥料研究報告, **14**, 12~24(2021)
- 9) 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)
- 10) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2) , 331~343 (1995)

-
- 11) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

Improved Determination and Performance Evaluation of Analysis Method for Nitrate Nitrogen by Phenol Sulfuric Acid : — Harmonized Collaborative Validation —

SHIRASAWA Yuko¹ and KATO Kimie¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Sapporo Regional Center

We conducted a collaborative study on analysis method for the nitrate nitrogen by phenol sulfuric acid due to evaluating performance of Testing Methods for Fertilizers 2021 test procedures, using (constant-temperature) upside down rotary shaker (hereinafter, referred to as rotary shaker) or commercially vertical reciprocating shaker and on simple extraction procedure shaking with hand (hereinafter, to as simple extraction method). In this collaborative study, all collaborators selected shaker for extraction of solid fertilizers, and performed simple extraction method of liquid one.

Each of five solid samples passed the test for homogeneity and five liquid samples, send to 13 collaborators as blind duplicates. In the test using solid samples, after identification of a result not adopted and outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of nitrate nitrogen were reported 0.178 % - 16.47 % as a mass fraction and 2.2 % - 10.8 %, respectively. In liquid one, those of determination of nitrate nitrogen were reported 1.01 % - 8.61 % as a mass fraction and 3.1 % - 7.2 %, respectively.

These results indicated that each method has acceptable precision for determination of nitrate nitrogen in these concentration ranges. In conclusion, those results demonstrated the validity of these methods for nitrate nitrogen in solid fertilizer using rotary shaker or commercially vertical reciprocating shaker and in liquid fertilizer on simple extraction method.

Key words upside down rotary shaker vertical reciprocating shaker nitrate nitrogen, fertilizer,
Harmonized collaborative validation

(Research Report of Fertilizer, **15**, 33-43, 2022)

4 く溶性マンガン及び水溶性マンガン測定のための フレイム原子吸光法(波長 403.1 nm)の性能評価

—室間共同試験による妥当性確認—

八木寿治¹, 天野忠雄¹

キーワード マンガン, フレイム原子吸光法, 共同試験, 波長 403.1 nm

1. はじめに

市場のグローバル化が進む中, 適合性評価に係る手続きが国際貿易の障壁とならないように, WTO/TBT 協定では国際規格を用いることが義務づけられている. 我が国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)¹⁾を踏まえた分析結果の信頼性確保が重要視され, ISO/IEC 17025 では, 国際・国家規格等又は妥当性が確認された方法を選定することを要求している. また, 肥料の品質の確保等に関する法令で定められた肥料の主成分^{2~4)}に係る定量及び量の算出方法については, 農林水産省告示^{4~6)}により肥料等試験法⁷⁾が指定されている. このため, 肥料等試験法は妥当性が確認されている必要がある.

波長 279.5 nm を用いたフレイム原子吸光法によるく溶性マンガン及び水溶性マンガンの分析法については, 国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認 (HCV: Harmonized Collaborative Validation)⁸⁾が行われ, 肥料等試験法に記載されているが, 波長 403.1 nm を用いた同分析法については記載されていなかった. このため, 令和 2 年度に測定波長の追加のため, 単一試験室における妥当性確認 (SLV: Single Laboratory Validation)を行ったところである⁹⁾.

今回, HCV による評価を行うため, フレイム原子吸光法(波長 403.1 nm)を用いたく溶性マンガン及び水溶性マンガンの分析法について室間共同試験を実施したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 均質性確認用試料及び共同試験用試料の調製

肥料として流通している化成肥料(2 種類), 鉍さいマンガン肥料, 鉍さいけい酸質肥料, 混合微量要素肥料(4 種類)及び配合肥料(2 種類)を用意した. 使用した肥料の特徴として, 化成肥料は有機入り化成肥料及び無機化成肥料, 鉍さいけい酸質肥料はフェロマンガン鉍さいを使用し粒状化促進材を添加した肥料, 混合微量要素肥料は効果発現促進材として鉄, 銅, 亜鉛及びモリブデンを添加した肥料, 配合肥料も同様な効果発現促進材を添加した肥料等であり, 構成や性状が様々なものとなるように選定した.

試料は目開き 500 μm (鉍さいマンガン肥料及び鉍さいけい酸質肥料については 212 μm) の網ふるいを通過するまで粉碎し, 均質になるように混合した. これらの試料から, 試験項目ごとに 5 種類を選択し, く溶性マンガン分析用試料は各約 1.9 g, 水溶性マンガン分析用試料は各約 9.5 g をそれぞれねじ式ポリ容器に 1 種類の肥料ごと 44 個充填して密封した.

試験項目ごとに使用する試料 220 個(44 \times 5)に乱数表を用いてランダムに番号を貼付し, 試料を識別した. これらの識別した試料から乱数表を用いてランダムに 10 個ずつ抜き取り, 均質性確認用試料とした. 次に, 試験項目ごとに 5 種類の肥料からランダムにそれぞれ 2 個ずつ抽出し, 一試験室に送付する共同試験用試料と

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

し、参加試験室数に必要な試料を準備した。

試料の均質性を確認した後、共同試験用試料を共同試験参加試験室に送付した。

(共同試験参加試験室)

- ・ 九鬼肥料工業株式会社 本社工場
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 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 肥飼料検査課
- ・ 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 肥飼料検査課
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 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 飼料検査課
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター 本部 肥飼料安全検査部 肥料鑑定課
- ・ 日東エフシー株式会社 名古屋工場
- ・ 日本肥糧株式会社 半田工場

一部試験室は一成分のみ共同試験に参加

(50音順)

2) 装置及び器具

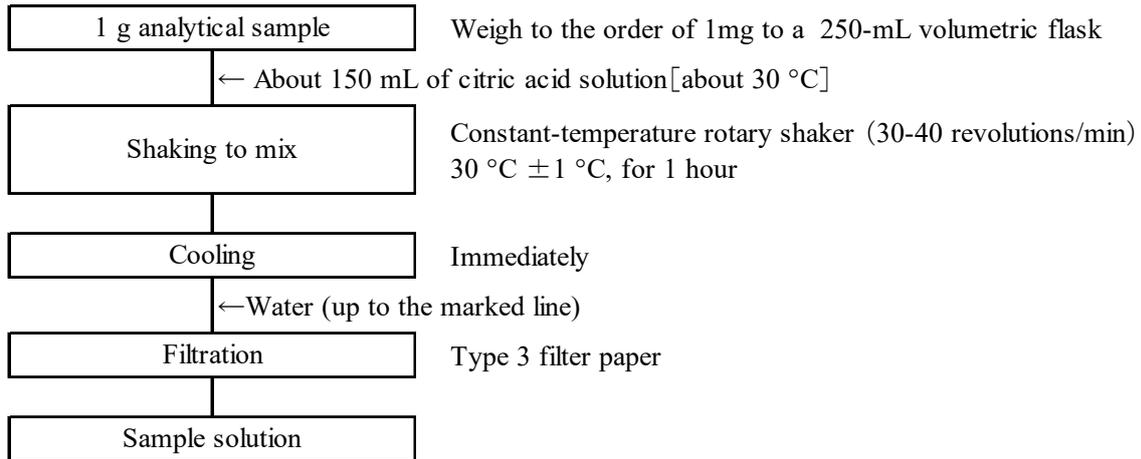
各試験室に設置している化学天秤、原子吸光分析装置を用い、く溶性マンガンの抽出の際には恒温上下転倒式回転振り混ぜ機または水平往復振とう恒温水槽、水溶性マンガンの抽出の際には上下転倒式回転振り混ぜ機または垂直往復振とう機を使用した。

3) 分析方法

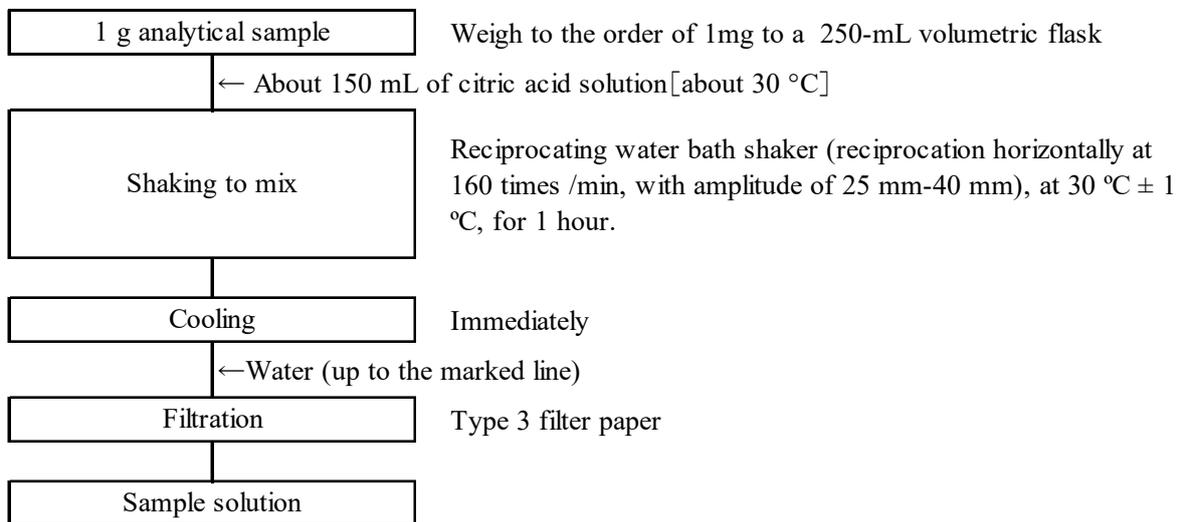
く溶性マンガン及び水溶性マンガンの抽出及び測定は、Table 1 のとおり肥料等試験法⁷⁾の各試験方法を用いた。なお、参考のため、各試験方法のフローシート(Scheme 1 及び Scheme 2)を示した。

Table 1 Component and Measurement

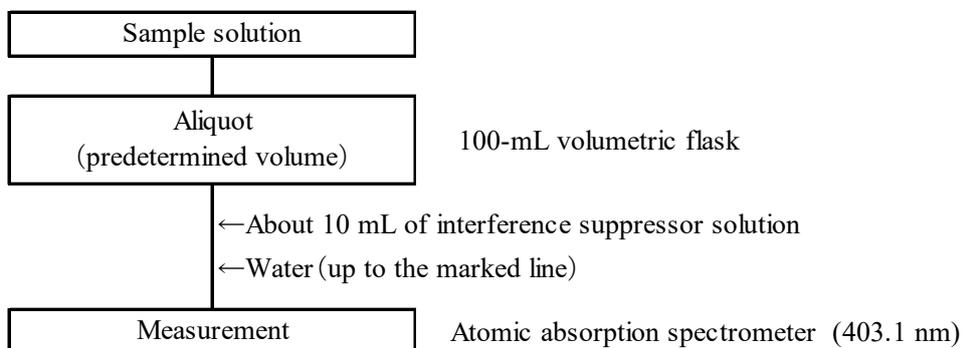
Test item number	Component	Testing Methods for Fertilizers (2021)	
		Measurement	
1	Citric acid-soluble manganese (C-MnO)	4.7.2.a	Flame atomic absorption spectrometry
		(4.1.1)	Citric acid solution—Constant temperature rotary shaking (30 °C)
		(4.1.2)	Citric acid solution—Reciprocating water bath shaking (30 °C)
2	Water-soluble manganese (W-MnO)	4.7.3.a	Flame atomic absorption spectrometry
		(4.1.1)	Water—Rotary shaking
		(4.1.1.1)	Water—Vertical shaking



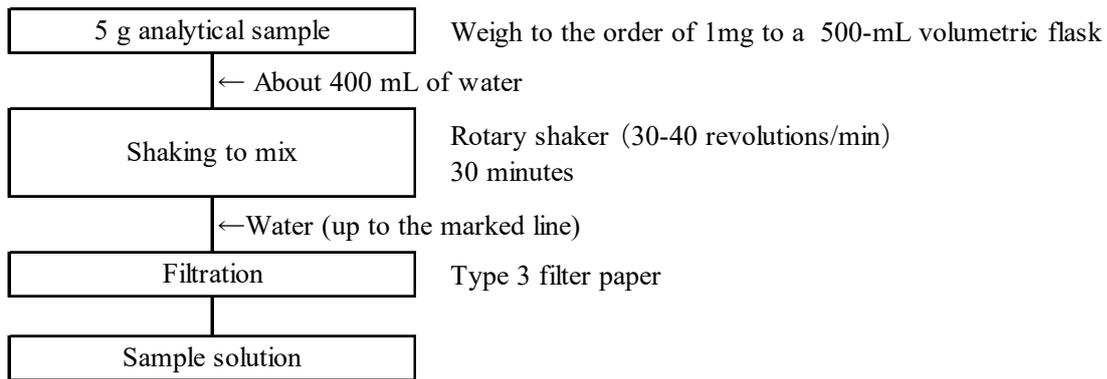
Scheme 1-1 The flow sheet for citric acid-soluble manganese in fertilizers
(Extraction)



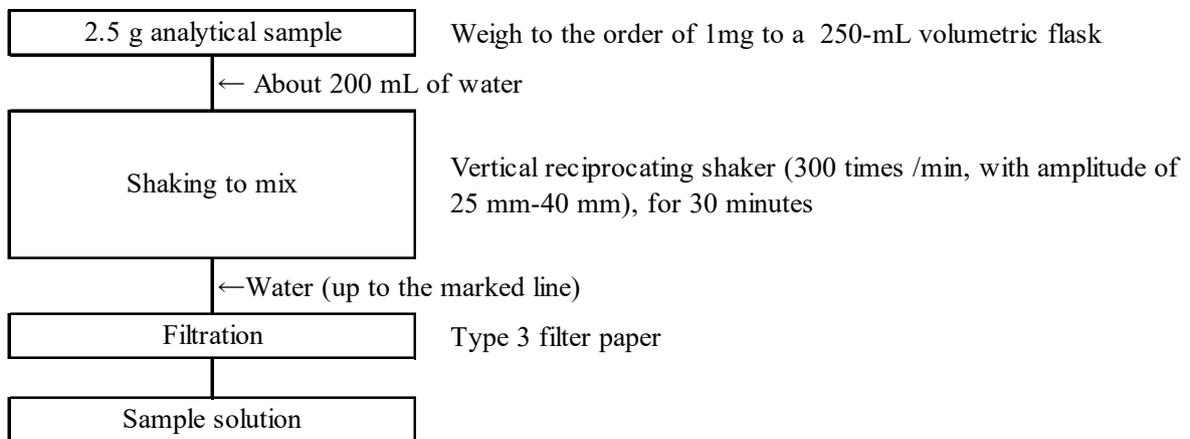
Scheme 1-2 The flow sheet for citric acid-soluble manganese in fertilizers
(Extraction)



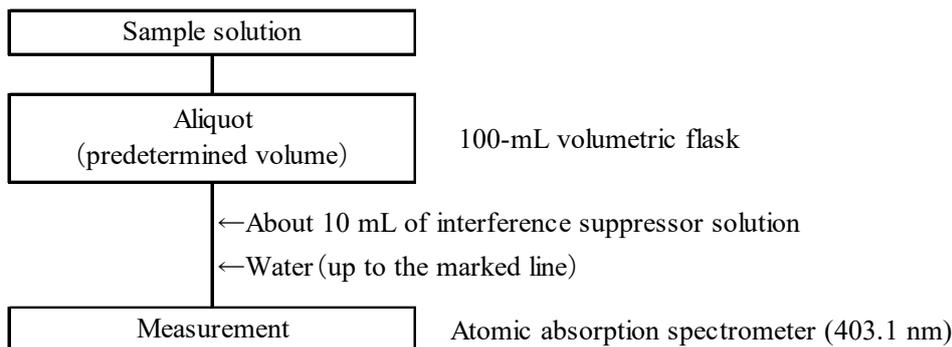
Scheme 1-3 The flow sheet for citric acid-soluble manganese in fertilizers
(Measurement)



Scheme 2-1 The flow sheet for water-soluble manganese in fertilizers
(Extraction)



Scheme 2-2 The flow sheet for water-soluble manganese in fertilizers
(Extraction)



Scheme 2-3 The flow sheet for water-soluble manganese in fertilizers
(Measurement)

4) 共同試験用試料の均質性確認

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル¹⁰⁾に従い、1)により抽出した合計 100 試料について各試料につき 2 点併行で分析した。

5) 共同試験

共同試験に参加した 10 試験室の各試験室で使用した原子吸光分析装置の型式は Table 2 のとおりであり、それぞれの試験室に 1) により調製された計 20 試料(分析項目ごと 10 試料), 分析手順確認用試料を分析項目ごと各 1 点及び試験実施要領を配付し、各試験室において 2021 年 8 月 4 日～2021 年 10 月 13 日の期間、各試料に対応する 3) の分析法に従って分析した。

Table 2 Equipment used

Lab ID ^{a)}	Model of atomic absorption spectrometer	Shaker (Selected when the sample solution is prepared)	
		Citric acid-soluble manganese (C-MnO)	Water-soluble manganese (W-MnO)
A	Thermo Fisher Scientific, iCE 3300	Constant temperature rotary shaker	Rotary shaker
B	HITACHI, Z-2310	Constant temperature rotary shaker	Rotary shaker
C	SHIMADZU, AA-7000	Constant temperature rotary shaker	Vertical shaker
D	HITACHI, Z-2310	Reciprocating water bath shaker	Vertical shaker
E	HITACHI, Z-5310	Constant temperature rotary shaker	Rotary shaker
F	Thermo Fisher Scientific, iCE 3000	Constant temperature rotary shaker	Rotary shaker
G	HITACHI, ZA3300	Constant temperature rotary shaker	Rotary shaker
H	HITACHI, ZA3300	Constant temperature rotary shaker	Rotary shaker
I	Thermo Fisher Scientific, iCE 3300	Constant temperature rotary shaker	—
J	SHIMADZU, AA-7000	—	Rotary shaker

a) Laboratory identification (random order)

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

各 5 種類の試料を 2 点併行で分析した結果の総平均値 (\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 Table 3 に示した。さらに、肥料等試験法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 ($\hat{\sigma}_R$) を同じく Table 3 に示した。

均質性の判定は、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの手順を参考に実施した。まず、分析結果の等分散性を確認するため、Cochran の検定を実施した。その結果、すべての試料において外れ値は認められなかったため、これらの分析結果について一元配置分散分析を実施し、併行標準偏差 (s_r) 及び試料間標準偏差 (s_{bb}) を求め、(式 3) により併行標準偏差 (s_r) を評価した。次に、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの十分に均質の判定式(式 2)を用いて均質性の判定を行った。その結果、全ての試料で判定式(式 2)を満たしていたことから、共同試験用試料として妥当な均質性を有していることが確認された。また、(式 4)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、いずれの試料も推定室間再現標準偏差 ($\hat{\sigma}_R$) と比較して小さい値であった。

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

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

$$s_r < 0.5\sigma_p = 0.5\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 3)$$

$$s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2} \quad \dots (式 4)$$

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$: 肥料等試験法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

Table 3 Homogeneity test results

Component	Sample	No. of Sample	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{e)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (%) ^{b)}	s_r ^{g)} (%) ^{b)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}	s_{b+r} ⁱ⁾ (%) ^{b)}
Citric acid-soluble manganese (C-MnO)	Mineral manganese fertilizer	10	12.72	3	0.38	0 ^{j)}	0.114	0.131	0.191	0.13
	Mixed micro element fertilizer 1	10	11.98	3	0.36	0.106	0.108	0.094	0.180	0.14
	Mineral silicic acid fertilizer	10	4.11	4	0.16	0.023	0.049	0.046	0.082	0.05
	Compound fertilizer 1	10	1.37	4	0.05	0.010	0.016	0.017	0.027	0.02
	Formulated fertilizer 1	10	0.385	6	0.02	0.004	0.007	0.007	0.012	0.01
Water-soluble manganese (W-MnO)	Mixed micro element fertilizer 2	10	4.27	4	0.17	0 ^{j)}	0.051	0.015	0.085	0.01
	Mixed micro element fertilizer 3	10	6.44	4	0.26	0.045	0.077	0.052	0.129	0.07
	Mixed micro element fertilizer 4	10	2.58	4	0.10	0.016	0.031	0.028	0.052	0.03
	Formulated fertilizer 2	10	0.474	6	0.03	0 ^{j)}	0.009	0.004	0.014	0.004
	Compound fertilizer 2	10	0.194	6	0.01	0.0031	0.0035	0.004	0.006	0.01

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

b) Mass fraction

c) Criteria of precision for Reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2021

d) The estimated standard deviation of reproducibility calculated based on $CRSD_R$

e) Standard deviation of sample-to-sample

f) The value for the test : $s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R$

g) Repeatability standard deviation

h) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (s_r)

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

j) When the variance between groups < the variance within a group, s_{bb}^2 was considered as 0

2) 共同試験結果及び外れ値検定

各試験室から報告された、く溶性マンガンについての共同試験結果を Table 4-1、水溶性マンガンについての共同試験結果を Table 4-2 に示した。なお、水溶性マンガンの試料配付量は約 9 g のため、抽出の際に垂直往復振とう機を用いた試験室においては試料の使い切り量である 3 回分の測定値を提出させ、解析時に乱数により 1 回分の測定値を選び出し使用した。各系列の分析試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{11, 12)}に従って統計処理した。分析結果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。

試験室の分析結果のうち、く溶性マンガンでは、5 試料のうち 1 試料で 1 試験室が外れ値として判定された。

水溶性マンガンでは、5 試料のうち 2 試料でそれぞれ 1 試験室が外れ値として判定された。

Table 4-1 Individual result of citric acid-soluble manganese (C-MnO) (w/w %)

Lab ID ^{a)}	Mineral manganese fertilizer		Mixed micro element fertilizer 1		Mineral silicic acid fertilizer		Compound fertilizer 1		Formulated fertilizer 1	
A	13.3	12.9	14.0	13.6	4.03 ^{b)}	4.53 ^{b)}	1.49	1.61	0.413	0.416
B	12.9	12.9	13.0	13.2	4.36	4.38	1.41	1.40	0.378	0.390
C	13.1	13.0	12.8	13.3	4.41	4.15	1.60	1.54	0.396	0.413
D	12.2	12.3	13.1	13.0	4.11	4.03	1.38	1.39	0.400	0.394
E	12.7	12.4	13.1	13.0	4.36	4.41	1.45	1.40	0.385	0.378
F	12.7	12.5	12.5	12.0	4.33	4.24	1.42	1.40	0.386	0.388
G	12.5	12.3	12.4	12.1	4.26	4.21	1.50	1.44	0.389	0.397
H	13.1	12.9	12.9	12.9	4.27	4.25	1.41	1.40	0.377	0.373
I	14.1	14.1	13.5	14.4	4.71	4.66	1.50	1.54	0.427	0.404

a) Laboratory identification (random order)

b) Outlier of Cochran test

Table 4-2 Individual result of water-soluble manganese (W-MnO) (w/w %)

Lab ID ^{a)}	Mixed micro element fertilizer 2		Mixed micro element fertilizer 3		Mixed micro element fertilizer 4		Formulated fertilizer 2		Compound fertilizer 2	
A	4.11	4.08	6.35	6.27	2.31 ^{c)}	2.31 ^{c)}	0.462	0.463	0.187	0.191
B	4.29	4.22	6.50	6.57	2.49	2.49	0.467	0.465	0.194	0.198
C	4.35	4.31	6.82	6.84	2.47	2.52	0.497	0.475	0.191	0.203
D	4.32	4.36	6.65	6.61	2.52	2.57	0.479	0.472	0.185	0.186
E	4.32	4.28	6.62	6.66	2.62	2.56	0.475	0.477	0.198	0.204
F	4.21	4.28	6.43	6.51	2.49	2.50	0.473	0.465	0.178	0.181
G	4.20	4.16	6.56	6.45	2.52	2.53	0.467	0.460	0.176	0.173
H	4.22	4.20	6.45	6.48	2.50	2.50	0.470	0.467	0.178	0.176
J	4.22	4.22	6.53	6.49	2.52	2.57	0.445 ^{b)}	0.485 ^{b)}	0.197	0.199

a) Laboratory identification (random order)

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Single grubbs test

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した分析結果により算出^{11, 12)}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 5 に示した。

く溶性マンガンの平均値は 0.395 % (質量分率) ~ 13.03 % (質量分率) であり, その併行標準偏差 (s_r) は 0.01 % (質量分率) ~ 0.29 % (質量分率), 併行相対標準偏差 (RSD_r) は 1.2 % ~ 2.6 %, 室間再現標準偏差 (s_R) は 0.02 % (質量分率) ~ 0.62 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.9 % ~ 5.1 % であった。水溶性マンガンの平均値は 0.189 % (質量分率) ~ 6.54 % (質量分率) であり, その併行標準偏差 (s_r) は 0.004 % (質量分率) ~ 0.04 % (質量分率), 併行相対標準偏差 (RSD_r) は 0.7 % ~ 1.9 %, 室間再現標準偏差 (s_R) は 0.01 % (質

量分率)~0.15%(質量分率), 室間再現相対標準偏差(RSD_R)は1.6%~5.5%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⁷⁾附属書 A 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以下であることから, これらの分析法の精度は肥料等試験法の性能基準に適合していることを確認した.

Table 5 Statistical analysis of Collaborative study results

Component	Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$2*CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$2*CRSD_R$ ⁱ⁾
		$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Citric acid-soluble manganese (C-MnO)	Mineral manganese fertilizer	9 (0)	12.88	0.15	1.2	3	0.54	4.2	6
	Mixed micro element fertilizers 1	9 (0)	13.03	0.29	2.2	3	0.62	4.7	6
	Mineral silicic acid fertilizer	8 (1)	4.32	0.08	1.7	4	0.18	4.2	8
	Compound fertilizer 1	9 (0)	1.46	0.04	2.6	4	0.08	5.1	8
	Formulated fertilizer 1	9 (0)	0.395	0.01	2.0	6	0.02	3.9	12
Water-soluble manganese (W-MnO)	Mixed micro element fertilizers 2	9 (0)	4.24	0.03	0.7	4	0.08	1.9	8
	Mixed micro element fertilizers 3	9 (0)	6.54	0.04	0.7	4	0.15	2.3	8
	Mixed micro element fertilizers 4	8 (1)	2.52	0.03	1.1	4	0.04	1.6	8
	Formulated fertilizer 2	8 (1)	0.471	0.01	1.4	6	0.01	1.9	12
	Compound fertilizer 2	9 (0)	0.189	0.004	1.9	6	0.01	5.5	12

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

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

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Repeatability relative standard deviation

f) Criteria of repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

g) Standard deviation of reproducibility

h) Reproducibility relative standard deviation

i) Criteria of reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

4. まとめ

肥料等試験法⁷⁾に記載されたフレイム原子吸光法(波長 403.1 nm)によるく溶性マンガン及び水溶性マンガンの分析法について, 試験項目別に 9 試験室で各 10 個(5 種類×2 個)の試料を用い国際的に標準とされる共同試験を実施し, 室間再現性の評価を行った.

その結果, く溶性マンガンは平均値 0.395%(質量分率)~13.03%(質量分率)の範囲でその室間再現相対標準偏差(RSD_R)は3.9%~5.1%, 水溶性マンガンは平均値 0.189%(質量分率)~6.54%(質量分率)の範囲でその室間再現相対標準偏差(RSD_R)は1.6%~5.5%であった. 共同試験結果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)は, 肥料等試験法 附属書 A⁷⁾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以下であった。

今回検討した分析法は、既に単一試験室による分析法の妥当性確認 (SLV) がされていることから、本法は肥料等試験法における試験法分類 Type B (HCV 及び SLV の結果が肥料等試験法 附属書 A の要求事項を満たした試験法) に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力いただいた九鬼肥料工業株式会社 本社工場、日東エフシー株式会社 名古屋工場及び日本肥糧株式会社 半田工場の各位に謝意を表します。

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) 肥料の品質の確保等に関する法律施行規則, 昭和 25 年 6 月 20 日, 農林省令第 64 号, 最終改正令和 4 年 2 月 15 日, 農林水産省令第 10 号(2022)
- 3) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律施行規則第十一条第八項第三号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, 令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1018 号(2021)
- 4) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律第十七条第一項第三号の規定に基づき、同法第四条第一項第三号並びに同条第二項第三号及び第四号に掲げる普通肥料の保証票にその含有量を記載する主要な成分を定める件, 平成 12 年 1 月 27 日, 農林水産省告示第 96 号, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1011 号(2021)
- 5) 農林水産省告示:特殊肥料の品質表示基準を定める件, 平成 12 年 8 月 31 日農林水産省告示第 1163 号, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1012 号(2021)
- 6) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律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, 最終改正令和 4 年 2 月 15 日, 農林水産省告示第 302 号(2022)
- 7) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC) :肥料等試験法 (2021)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikengo_2021.pdf >
- 8) 平原稔夫, 恵智正宏, 小林涼斗:く溶性マンガン及び水溶性マンガンの測定法の性能評価—室間共同試験成績一, 肥料研究報告, **13**, 102~111 (2020)
- 9) 宮野谷杏, 天野忠雄, 八木寿治:加里, 苦土, マンガンのフレイム原子吸光法の測定波長の追加, 肥料研究報告, **14**, 25~38(2021)
- 10) 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)
- 11) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2) , 331~343 (1995)
- 12) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

Performance Evaluation of Analysis Method for Citric Acid-soluble and Water-soluble Manganese using Frame Atomic Absorption Spectrometry (wavelength 403.1 nm) :

— Harmonized Collaborative Validation —

YAGI Toshiharu¹ and AMANO Tadao¹

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

We conducted a collaborative study to evaluate performance of analysis method for citric acid-soluble and water-soluble manganese in fertilizer using frame atomic absorption spectrometry (wavelength 403.1 nm). These components in fertilizer were extracted and analyzed by Testing Methods for Fertilizers 2021 test procedures, respectively. We sent 5 materials in one component to 10 collaborators 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 citric acid-soluble manganese were reported 0.395 % - 13.03 % as a mass fraction and 3.9 % - 5.1 %, respectively. Those of determination of water-soluble manganese were reported 0.189 % - 6.54 % as a mass fraction and 1.6 % - 5.5 %, respectively. These results indicated that each method has acceptable precision for determination of citric acid-soluble manganese or water-soluble manganese in these concentration ranges. In conclusion, those results demonstrated these methods were validated for citric acid-soluble and water-soluble manganese in fertilizer using frame atomic absorption spectrometry (wavelength 403.1 nm).

Key words manganese, flame atomic absorption spectrometer, harmonized collaborative validation, wavelength 403.1 nm

(Research Report of Fertilizer, **15**, 44-53, 2022)

5 HPLC を用いた肥料中の DMPP(硝酸化成抑制材)の分析法の性能評価

— 室間共同試験による妥当性確認 —

平田絵理香¹, 橋本良美², 大島舞弓²

キーワード DMPP(3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩), 高速液体クロマトグラフ, 共同試験

1. はじめに

窒素成分として施肥されたアンモニウム塩または土壌中でアンモニウムとなる尿素や有機質肥料は、微生物による硝化作用を受けることで亜硝酸を経て硝酸に酸化される。この硝酸イオンは土壌に吸着されないため、畑地土壌では降雨によって溶脱し、窒素成分が損失することが知られている¹⁾。そこで、微生物による硝化作用を抑えるために、肥料の製造時には硝酸化成抑制材が材料として添加されることがある。なお、硝酸化成抑制材を材料として添加した肥料は、肥料法告示²⁾によって保証票中に材料の種類、名称及び使用量の記載が義務づけられている。

硝酸化成抑制材の 1 つに 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(以下、「DMPP」という。)があり、令和 2 年度に船木³⁾が高速液体クロマトグラフを用いた分析法(以下、「本法」とする。)を開発し、単一試験室での妥当性確認(Single Laboratory Validation:SLV)を行った。その結果、本法の性能が評価され、肥料等試験法⁴⁾に DMPP の分析法として収載されている。今回、国際的に標準と認められる室間共同試験を実施し、妥当性確認(Harmonized Collaborative Validation:HCV)を行い、本法の性能を評価したので、その結果を報告する。

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料の選定及び調製

(1) 共同試験用試料の選定

DMPP を含む肥料の特徴として、一部の肥料において調製後即時又は経時的に DMPP 含有量が著しく減少することが、船木³⁾により報告されている。共同試験期間中に試料中の DMPP 量が減少すると各試験室における分析結果に影響を及ぼすため、DMPP の経時的な変化量が小さい肥料を共同試験用試料として選定する必要があり、まず候補試料中の DMPP 濃度とその経時変化を確認した。候補試料には、肥料生産工場等で製造され流通している DMPP が配合された肥料(以下、「流通肥料」とする。)及び DMPP 非配合肥料に DMPP 試薬を一定量添加して調製した肥料(以下、「調製試料」とする。)を用いた。

流通肥料の特徴は、着色材を含む DMPP を配合した尿素、DMPP の他に固結防止材及び着色材を添加した混合窒素肥料、DMPP を含む尿素を被覆した被覆窒素肥料並びに DMPP、粒状化促進材及び着色材を加えた無機の化成肥料 2 種類である。これらを目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉碎・混合した。流通肥料の DMPP 濃度とその経時変化を確認するため、1 回目の分析を行い、約 2 ヶ月以上経過してから 2 回目の分析を行った。結果は Table 1 のとおりであり、1 回目と 2 回目での分析値の比が 100 %に近かった尿素、混合窒素肥料、化成肥料 1 の 3 種類を共同試験用試料として選定した。

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)札幌センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

Table 1 Changes in DMPP concentration over time

Sample	Analytical value of DMPP		Ratio of analytical values ^{b)}	Days elapsed
	1st (%) ^{a)}	2nd (%) ^{a)}		
Urea	0.285	0.275	96	59
Mixed nitrogen fertilizer	0.171	0.172	101	71
Coated nitrogen fertilizer	0.151	0.131	87	56
Compound fertilizer 1	0.0770	0.0764	99	99
Compound fertilizer 2	0.0360	0.0327	91	99

a) Mass fraction

b) Ratio of analytical values = 2nd value/1st value × 100

候補となる調製試料は、有機質を含まない DMPP 非配合の配合肥料及び化成肥料を目開き 500 μm の網ふるいを通すまで粉碎・混合した後に、DMPP 試薬(東京化成工業、試薬純度 98.0 % (質量分率))を添加して作製した。使用した DMPP 非配合の配合肥料及び化成肥料の詳細は、銅の効果発現促進材を含む無機配合肥料、固結防止材及び粒状化促進材を混合し副産系の原料も使用した無機化成肥料 A、尿素や硫酸アンモニア等を原料とした化成肥料 B、アンモニア、りん酸及び硫酸を用いて製造したりん酸アンモニアと同等の化成肥料 C である。調製試料の添加濃度を決定するために、市場に流通している肥料の DMPP 含有量を調査した結果、最も少ないもので 0.034 % (質量分率)、最も多いもので 1.04 % (質量分率) だったことから、DMPP 試薬の添加濃度は 0.02 % (質量分率)、1.0 % (質量分率)、1.5 % (質量分率) とした。DMPP 試薬添加後の安定性を確認するために、作製後 1~2 ヶ月における経時変化の結果を Fig. 1-1, Fig. 1-2 及び Fig. 1-3 で示した。なお、図中の経過日数 0 日は作製時の添加濃度を示している。

DMPP の経時的な変化量が少ない組合せを選び、3 種類の調製試料を共同試験用試料として選定した結果、調製試料の原料として DMPP 0.02 % (質量分率) の作製には配合肥料を、1.0 % (質量分率) の作製には化成肥料 C、1.5 % (質量分率) の作製には化成肥料 A を用いることとした。ただし、一部の組合せでは調製後即時に DMPP 量が減少し、Fig. 1-3 では、化成肥料 A の DMPP 含有量は試薬添加時の 1.5 % (質量分率) から、1 回目の分析では 1.3 % (質量分率) まで減少した。しかし、その後の経時的な減少は見られなかったことから、化成肥料 A を用いて共同試験用試料を作製する際には調製後即時の減少量を考慮して、DMPP の添加濃度を 2.0 % (質量分率) に引き上げることとした。

なお、Fig. 1-3 の化成肥料 C について、7 日目の分析値が 0.9 % (質量分率) まで減少したが、20 日目の分析値で 1.3 % (質量分率) と増加していた。経過日数 20 日以降は 1.3 % (質量分率) で推移していたことから、分析値の増減は作製時の混合が不十分だったことが原因で生じたものと推測した。

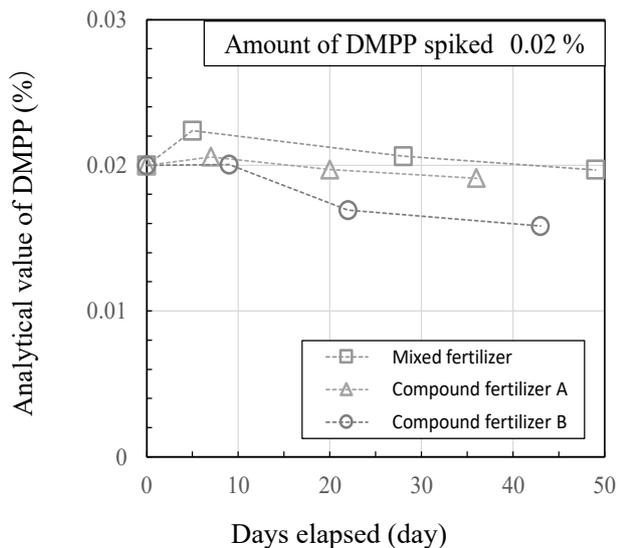


Fig. 1-1 Changes in DMPP concentration over time for prepared fertilizer spiked 0.1 % (mass fraction) (Day 0 is spiked concentration)

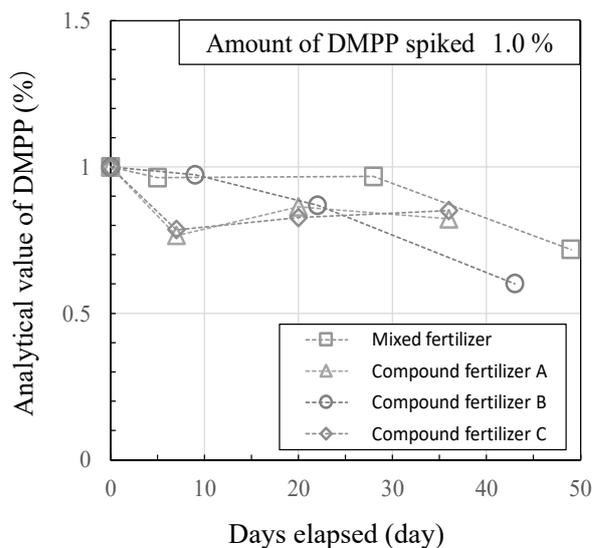


Fig. 1-2 Changes in DMPP concentration over time for prepared fertilizer spiked 1.0 % (mass fraction) (Day 0 is spiked concentration)

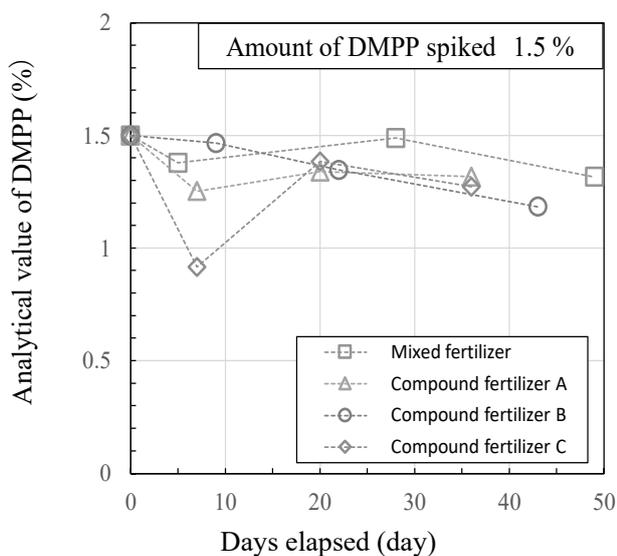


Fig. 1-3 Changes in DMPP concentration over time for prepared fertilizer spiked 1.5 % (mass fraction) (Day 0 is spiked concentration)

(2) 共同試験用試料の調製

(1)で選定した流通肥料3種類(尿素, 混合窒素肥料, 化成肥料1)及び調製試料3種類を用いて, 共同試験用試料とした. 流通肥料は目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉碎し, 均質となるようによく混合した. 調製試料は DMPP 非配合の配合肥料及び化成肥料を約 200 g ずつ用いて DMPP 試薬を試料中 0.02 % (質

量分率), 1.0 % (質量分率), 2.0 % (質量分率)となるように添加し, 目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉砕した. これら 6 種類の肥料を 1.9 g ずつアルミ袋に充填, 密封し, 各種類 44 個の試料を作製した.

作製した試料 264 個 (44 個 \times 6 種類) に乱数表を用いてランダムに番号を貼付し, 試料を識別した. これらの識別した 6 種類の試料から乱数表を用いてランダムに 10 個ずつ抜き取り, 60 個 (10 個 \times 6 種類) を均質性確認用試料とした. 次に, 6 種類の試料からランダムに 2 個ずつ抽出し, 一試験室に送付する共同試験用試料とし, 参加試験室数に必要な試料を準備した.

均質性確認用試料の均質性が確認された後に, 共同試験用試料を以下の共同試験参加試験室に配付した.

(共同試験参加試験室)

- ・ 一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所
- ・ 一般社団法人日本海事検定協会 理化学分析センター
- ・ コープエンジニアリング株式会社 新潟分析センター
- ・ ジーエルサイエンス株式会社 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
- ・ 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業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 神戸センター 肥料検査課
- ・ 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 肥飼料検査課
- ・ 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 肥飼料検査課
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター 本部 肥飼料安全検査部 肥料鑑定課

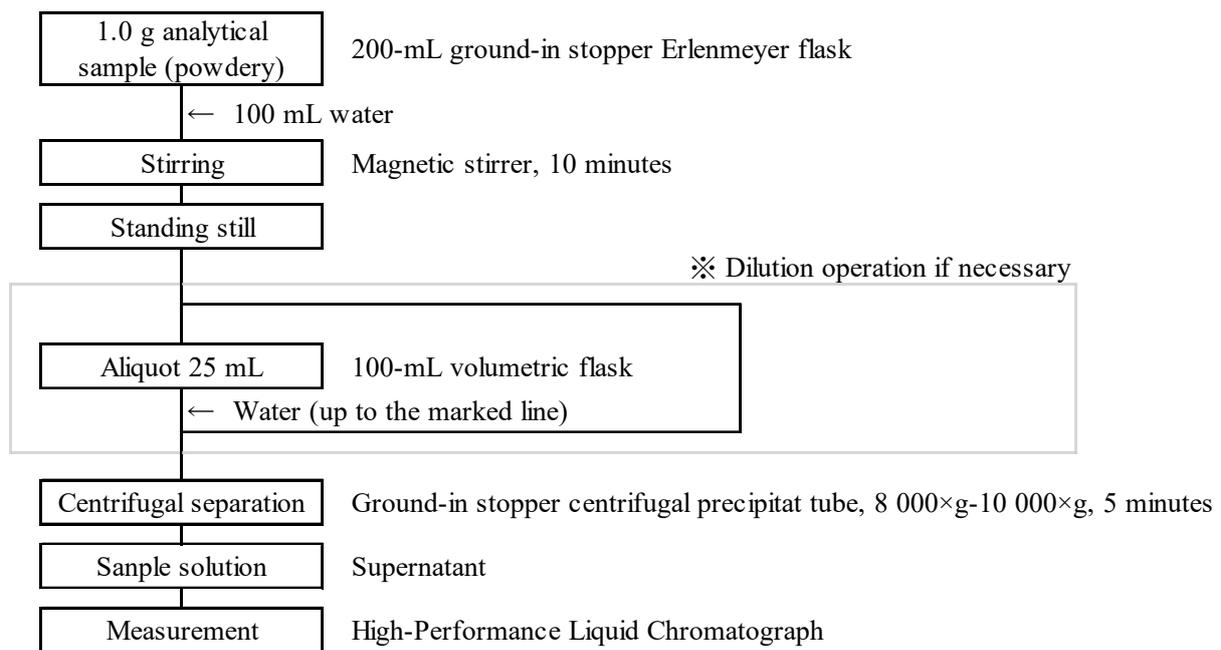
(敬称略, 50 音順)

2) 装置及び器具

各試験室に設置しているスターラー, 高速液体クロマトグラフを使用した. 分析に用いたカラムは各試験室が保有しているものを使用し, 所有していない試験室にはカラムを貸与した.

3) 試験方法

肥料等試験法⁴⁾ 7.7 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩 (DMPP) の 7.7.a 高速液体クロマトグラフ法を用いた. 参考のために, 共同試験で使用した操作のフローシートを Scheme 1 で示す.



Scheme 1 The flow sheet for determination of DMPP used in the test

4) 共同試験用試料の均質性確認

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル^{6), 7)}に従い, 1) で調製した均質性確認用試料 60 個について, 各試料につき 2 点併行で 3) に従って分析した. ただし, 各試料の含有量 1.9 g から 2 回分取するため, 共栓三角フラスコにはかり入れる量は 0.90 g とした.

5) 共同試験

参加した 12 試験室で使用した高速液体クロマトグラフの型式及びメーカー, 分析カラムの詳細は Table 2 のとおりである. 共同試験用試料及び標準液調製用の DMPP 試薬(純度 98 %以上, 東京化成工業株式会社)を各試験室に 2021 年 11 月 12 日から発送し, 実施期間は試料到着日から 2021 年 12 月 24 日まで(一部の試験室は 2022 年 1 月 14 日まで)とした. それぞれの試験室において 1) により配付した合計 12 試料を, 3) の Scheme 1 で示した分析方法に従って分析した.

Table 2 Condition of participating laboratories

Lab No ^{a)}	Model of High-Performance Liquid Chromatograph (HPLC)	HPLC Column		Condition	
		(Inner diameter × length, particle diameter)	Column temperature	Flow rate	Injection volume
A	GL7400 HPLC System, GL Sciences Inc.	InertSustain C18 4.6×150 mm, 5µm, GL Sciences Inc. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
B	Prominence i, Shimadzu Corporation.	Shodex Silica C18M 4D, SHOWA DENKO K.K. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
C	LC-20AD series, Shimadzu Corporation.	Mightysil RP-18 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
D	ChromNAV series, JASCO Corporation.	STR ODS-II, Shinwa Chemical Industries Ltd. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
E	DGU-20A3R, LC-20AD, SIL-20AC, CBM-20A, SPD-20A, CTO-20A, Shimadzu Corporation.	TSKgel ODS-80Ts QA, TOSOH Corporation (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
F	e2696*2489 UV/Vis, Waters	Discovery C18, Supelco ^{b)} (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
G	1260 Infinity, Agilent Technologies	Mightysil RP-18 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. ^{b)} (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
H	Prominence, Shimadzu Corporation.	Inertsil Ph, GL Sciences Inc. ^{b)} (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
I	LC-30AD, SIL-30AC, SPD-20A, CTO-20AC, DGU-20A3R, Shimadzu Corporation.	TSKgel ODS-100Z, TOSOH Corporation (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
J	LC-2030, Shimadzu Corporation.	Mightysil RP-18 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. ^{b)} (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
K	LC-20AD series, Shimadzu Corporation.	Mightysil RP-18GP 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
L	e2625, Waters	Mightysil RP-18 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL

a) Laboratory identification (random order)

b) Loaned by FAMIC, the organizer of the test

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性確認用試料 60 個を 2 点併行で分析した総平均値 (\bar{x}), 一元配置分散分析の統計量から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 Table 3 に示した. さらに, 肥料等試験法に示されている室間再現精度の目安 ($CRSD_R$) 及び (式 1) から算出した推定室間再現標準偏差 ($\hat{\sigma}_R$) を併せて Table 3 に示した.

均質性の判定は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル^{6),7)} の手順を参考に実施した. まず, 分析結果の等分散性を確認するために Cochran の検定を実施した. その結果, 6 種類全ての試料において等分散性が確認できたので, 一元配置分散分析を実施した. (式 2) を用いて併行精度を確認したところ, 化成肥料 1 が (式 2) を満たさなかったため, 全ての試料に対して, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル (1993) で示されている十分に均質の判定式 (式 3) を用いて均質性の判定を行った. その結果, 調製試料 2 を除く 5 種類の試料で判定式 (式 3) を満たしていた. 調製試料 2 の併行精度を確認すると, Table 4 のとおり, (式 2) で示す併行精度の評価を満たしており, 併行精度が十分に小さかった. そのため, 調製試料 2 は IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル (2006) で示されている十分に均質の条件を緩和した判定式 (式 4) を用いて均質性を判定した. その結果, 調製試料 2 は緩和の判定式 (式 4) を満たす結果となった.

十分に均質の判定式 (式 3) は併行標準偏差が小さい場合に, 判定条件が厳しすぎることもある⁸⁾. 調製試料 2 が (式 3) を満たさなかった理由として, 併行標準偏差が小さかったこと, 調製時の混合が不十分だったことが原因であると推測した.

以上より, 6 種類全ての試料が共同試験用試料として妥当な均質性を有することを確認した. なお, 参考として, (式 5) によって併行精度を含む試料間標準偏差 (s_{b+r}) を算出したところ, Table 3 のとおり, 全ての試料が $\hat{\sigma}_R$ と比較して十分に小さい値であった.

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

$$s_r < 0.5\sigma_p = 0.5\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 2)$$

$$s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 3)$$

$$s_{bb}^2 \leq F1(0.3\sigma_p)^2 + F2s_r^2 \quad \dots (式 4)$$

$$s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2} \quad \dots (式 5)$$

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$: 肥料等試験法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_{bb} : 試料間標準偏差

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_r : 併行標準偏差

s_{b+r} : 併行精度を含む試料間標準偏差

$F1, F2$: 均質性判定のためのパラメータ (試料数 10, 2 点併行の場合, $F1=1.88, F2=1.01$)

Table 3 Homogeneity test results

Sample	No. of Sample	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{e)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (%) ^{b)}	s_r ^{g)} (%) ^{b)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}	s_{b+r} ⁱ⁾ (%) ^{b)}
Prepared sample 1	10	1.66	8	0.133	0.031	0.040	0.065	0.066	0.072
Prepared sample 2	10	0.333	8	0.027	0.011	0.008	0.011	0.013	0.016
Urea	10	0.285	8	0.023	0 ^{j)}	0.007	0.002	0.011	0.002
Mixed nitrogen fertilizer	10	0.131	8	0.011	0.0027	0.0032	0.001	0.005	0.003
Compound fertilizer 1	10	0.0796	8	0.006	0 ^{j)}	0.0019	0.0038	0.0032	0.0038
Prepared sample 3	10	0.0187	8	0.0015	0.00042	0.00045	0.00070	0.00075	0.0008

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

b) Mass fraction

c) Criteria of precision for Reproducibility relative standard in Testing Methods for Fertilizers 2021

d) The estimated standard deviation of reproducibility calculated based on $CRSD_R$

e) Standard deviation of sample-to-sample

f) The value for the test : $s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R$

g) Repeatability standard deviation

h) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (s_r)

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

j) When the variance between groups < the variance within a group, s_{bb}^2 was considered as 0

Table 4 Homogeneity test result of Prepared sample 2

Sample	No. of sample	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (%) ^{b)}	s_r ^{e)} (%) ^{b)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{g)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}	s_{bb}^2 ^{g)}	critical value ⁱ⁾
Prepared sample 2	10	0.33	8	0.03	0.011	0.013	0.011	0.008	0.0001	0.0002

a) ~d) Refer to the footnote Table 3

e) Repeatability standard deviation

f) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (s_r)

g) Standard deviation of sample-to-sample

h) Parameters for the determination of homogeneity (determination of s_{bb})

i) The value for the test : $F1(0.3\hat{\sigma}_R)^2 + F2s_r^2$

$F1=1.88, F2=1.01$ (The number of samples (10), The number of repetition (2))

2) 共同試験結果及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験結果を Table 5 に示した。試験室 F の結果は、検量線用 DMPP 標準液を用事調製しなかったことにより検量線に不備があると考えられたため、以降の統計解析には用いないこととした。

試験室 F を外した 11 試験室の結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{9, 10)}に従って統計解析した。まず、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。結果、11 試験室のうち、調製試料 2 で 2 試験室、尿素で 1 試験室、化成肥料 1 で 2 試験室、調製試料 3 で 1 試験室の報告値が外れ値として判定された。

Table 5 Individual results of DMPP (% Mass fraction)

Lab ID ^{a)}	Prepared sample 1		Prepared sample 2		Urea	
	A	1.67	1.72	0.300	0.279	0.293
B	1.62	1.57	0.0867 ^{c)}	0.243 ^{c)}	0.273	0.256
C	1.60	1.61	0.250	0.233	0.278	0.278
D	1.60	1.63	0.270	0.283	0.276	0.276
E	1.64	1.68	0.283	0.284	0.291	0.282
F ^{b)}	2.71	2.17	0.392	0.417	0.411	0.403
G	1.60	1.53	0.205 ^{d)}	0.178 ^{d)}	0.357 ^{c)}	0.254 ^{c)}
H	1.65	1.68	0.281	0.301	0.279	0.291
I	1.64	1.63	0.281	0.274	0.287	0.285
J	1.57	1.63	0.280	0.257	0.286	0.284
K	1.65	1.70	0.288	0.279	0.288	0.288
L	1.65	1.65	0.284	0.281	0.283	0.288

Lab ID ^{a)}	Mixed nitrogen fertilizer		Compound fertilizer 1		Prepared sample 3	
	A	0.137	0.135	0.0825	0.0767	0.0199
B	0.138	0.130	0.0948	0.0968	0.0176	0.0183
C	0.126	0.122	0.300 ^{e)}	0.297 ^{e)}	0.0180	0.0182
D	0.127	0.127	0.0961	0.0882	0.0172	0.0178
E	0.131	0.129	0.0784	0.0786	0.0161	0.0173
F ^{b)}	0.236	0.265	0.206	0.205	0.0454	0.0393
G	0.123	0.133	0.0796	0.0716	0.0167	0.0198
H	0.129	0.128	0.304 ^{e)}	0.307 ^{e)}	0.0274 ^{c)}	0.0181 ^{c)}
I	0.131	0.130	0.0780	0.0822	0.0189	0.0181
J	0.131	0.133	0.0834	0.0836	0.0181	0.0191
K	0.128	0.133	0.0798	0.0823	0.0184	0.0184
L	0.127	0.138	0.0753	0.0777	0.0184	0.0204

a) Laboratory identification (random order)

b) Not Adopted the result for flaw of analytical procedure

c) Outlier of Cochran test

d) Outlier of Single Grubbs test

e) Outlier of Paired 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結果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 6 に示した.

6 種類の試料について統計解析をした結果, 本法による DMPP の平均値は 0.0184 % (質量分率) ~ 1.63 % (質量分率) であり, その併行標準偏差(s_r)は 0.001 % (質量分率) ~ 0.030 % (質量分率), 併行相対標準偏差(RSD_r)は 1.8 % ~ 5.1 % であった. また, 室間再現標準偏差(s_R)は 0.001 % (質量分率) ~ 0.045 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差(RSD_R)は 2.8 % ~ 8.9 % 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 附属書 A の妥当性確認の手順で示されている各濃度レベルにおける精度の目安とする値を満たしていたことから, 本法の精度は肥料等試験法の性能規準に適合していることを確認した.

Table 6 Statistical analysis of Collaborative study results

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$2*CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$2*CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Prepared sample 1	11 (0)	1.63	0.030	1.8	8	0.045	2.8	16
Prepared sample 2	9 (2)	0.277	0.010	3.8	8	0.017	6.0	16
Urea	10 (1)	0.283	0.005	1.9	8	0.009	3.1	16
Mixed nitrogen fertilizer	11 (0)	0.130	0.004	3.0	8	0.004	3.3	16
Compound fertilizer 1	9 (2)	0.0825	0.003	4.0	8	0.007	8.9	16
Prepared sample 3	10 (1)	0.0184	0.001	5.1	8	0.001	6.3	16

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

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

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Repeatability relative standard deviation

f) Tolerance limits of repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

g) Standard deviation of reproducibility

h) Reproducibility relative standard deviation

i) Tolerance limits of reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

4. まとめ

肥料等試験法に収載された 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩の分析法(以下,「本法」とする.)について, 国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認(Harmonized Collaborative Validation:HCV)の方法で性能を評価するために, 12 試験室で 6 種類(12 点)の試料を用いた共同試験を実施した.

検量線に不備のあった 1 試験室を除外し, 11 試験室の報告値から室間再現性の評価を行った結果, 平均値 0.0184 % (質量分率) ~ 1.63 % (質量分率) の範囲において, 室間再現相対標準偏差(RSD_R)は 2.8 % ~ 8.9 % であり, 肥料等試験法の附属書 A に示されている各濃度レベルにおける精度の目安とする値を満たした.

今回検討した試験法は, すでに単一試験室による妥当性確認(Single Laboratory Validation:SLV)がなされていることから, 本法は肥料等試験法における試験法分類 Type B(HCV 及び SLV)の結果が肥料等試験法 附

属書 A の要求事項を満たした試験法)に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力いただきました、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般社団法人日本海事検定協会理化学分析センター、コープエンジニアリング株式会社新潟分析センター、ジューエルサイエンス株式会社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、東ソー株式会社バイオサイエンス事業部カスタマーサポートセンターの各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 但野利秋, 尾和尚人, 木村真人, 越野正義, 三枝正彦, 長谷川功, 吉羽雅昭: 肥料の事典, 株式会社朝倉書店 (2006)
- 2) 農林水産省告示: 肥料の品質の確保等に関する法律施行規則第十一条の二第一項, 第二項, 第三項及び第四項の規定に基づき普通肥料の原料の種類等の保証票への記載に関する事項を定める件, 昭和 59 年 3 月 16 日, 農林水産省告示第 700 号, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1009 号 (2021)
- 3) 船木紀夫: HPLC を用いた肥料中の DMPP (硝酸化成抑制材) の分析法の開発, 肥料研究報告, **14**, 39~52 (2021)
- 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 (2021)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2021.pdf>
- 5) 船木紀夫: 肥料中の DMPP (硝酸化成抑制材) の安定性についての検証, 肥料研究報告, **14**, 210~220 (2021)
- 6) Thompson, Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **65** (9), 2123~2144 (1993)
- 7) 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)
- 8) 安井明美, 五十君静信, 後藤哲久, 丹野憲二, 湯川剛一郎: 最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 株式会社サイエンスフォーラム (2010)
- 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)

Performance Evaluation of Analysis method for 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in Fertilizers using HPLC : Harmonized Collaborative Validation

HIRATA Erika¹, HASHIMOTO Yoshimi² and OSHIMA Mayu²

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

² FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department

The performance of the determination of 3,4-dimethyl-1H-pyrazole phosphoric acid (DMPP) in fertilizer using high-performance liquid chromatography (HPLC) as described in the Fertilizer Test Method has confirmed in a single laboratory. To evaluate the performance of the DMPP analytical method using HPLC, we conducted a collaborative study based on an internationally harmonized protocol. Six samples with confirmed homogeneity were sent to 12 collaborators. Those samples were analyzed in blind and duplicate. We estimated the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) from analytical values reported by the 11 collaborators, excluding one failed laboratory. After identification of outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean value of DMPP was reported 0.0184 % -1.63 % for the mass fraction. Similarly, the RSD_R for the determination of DMPP was estimated 2.8 %-5.1 %. These results suggest that the accuracy of this method is suitable for the determination of DMPP in those concentration range. In conclusion, it demonstrated that the method for determination of DMPP was validated.

Key words DMPP, high-performance liquid chromatography (HPLC), harmonized collaborative validation

(Research Report of Fertilizer, **15**, 54-65, 2022)

6 LC-MS/MS を用いた肥料中の PFOS 及び PFOA の分析法の性能評価

— 室間共同試験による妥当性確認 —

沼寄佳奈子¹, 白井裕治¹

キーワード PFOS, PFOA, 汚泥, 液体クロマトグラフタンデム質量分析計, 共同試験

1. はじめに

ペルフルオロオクタンスルホン酸(以下、「PFOS」という。Fig. 1-1 はコーティング剤, 泡消火剤, 界面活性剤など¹⁾に, また, ペルフルオロオクタン酸(以下、「PFOA」という。Fig. 1-2 はふっ素樹脂の加工助剤, 塗料, 乳化剤など²⁾に使用されていた有機ふっ素化合物であり, 生分解をほとんど受けず環境中に長い間残存する^{3~5)}。PFOS は平成 22 年, PFOA は令和 3 年に化審法第 2 条第 2 項に示される第一種特定化学物質として指定されており, その製造・輸入・使用が制限されている^{6, 7)}。また, 令和 2 年に厚生労働省は水道水中の^{8, 9)}, 環境省は環境水中の¹⁰⁾PFOS 及び PFOA 含量の暫定基準値をともに 50 ng/L と設定した。下水処理場における流入水中の PFOS 及び PFOA はその工程において懸濁物や汚泥に移行することが報告^{11, 12)}されている。

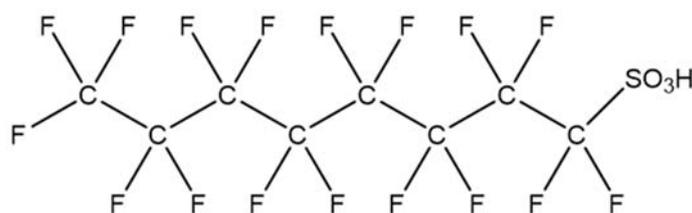


Fig. 1-1 Structural formula of PFOS

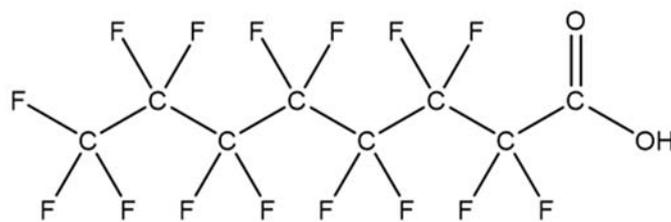


Fig. 1-2 Structural formula of PFOA

令和 2 年度に, 2 消安第 2033 号令和 2 年 7 月 31 日付け農林水産省消費・安全局農産安全管理課長より汚泥肥料中の PFOS 及び PFOA の含有量を把握するための実態調査に用いる分析法の開発を要請されたことを受け, PFOS 及び PFOA 分析法の開発及び単一試験室の妥当性を確認し, 肥料等試験法¹³⁾に記載された。

記載された液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた肥料中の PFOS 及び PFOA 分析法の性能評価のため, 国際的に標準と認められる室間共同試験を実施し, 妥当性確認(Harmonized Collaborative Validation:HCV)を行ったので, その概要を報告する。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2. 材料及び方法

1) 均質性確認用試料及び共同試験用試料の調製

一定量の PFOS・PFOA を含有する試料として、汚泥及び汚泥に動植物原料(食品残渣、木くず等)を加え、乾燥や発酵の処理を行ったものを 6 種類用意した。肥料等試験法¹⁴⁾によりそれぞれ 40 °C で約 70 時間乾燥した後、粉砕機(Retsch ZM 200)で 500 µm の網ふるいを通すまで粉砕し、均質となるようよく混合して調製した。試料は、ポリエチレン製袋に入れて輪ゴムで密閉し、直射日光を避け、常温で保存した。6 種類の試料について、ポリエチレン容器に約 3.8 g 充填して密封したものを各 50 個調製した。試料 300 個(50 個×6 種類)にランダムに番号を付し、試料を識別した。これらの識別した 6 種類の試料の中から、ランダムに 10 個ずつ抜き取り、均質性確認用試料とした。また、6 種類の肥料からランダムにそれぞれ 2 個ずつ抽出したものを共同試験用試料とし、以下の参加試験室に配付した。

(共同試験参加試験室)

- ・一般財団法人材料科学技術振興財団
- ・一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所
- ・一般財団法人三重県環境保全事業団
- ・株式会社環境測定サービス 筑波研究所
- ・株式会社島津製作所 グローバルアプリケーション開発センター
- ・株式会社静環検査センター
- ・公益財団法人ひょうご環境創造協会 兵庫県環境研究センター
- ・公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所
- ・ジーエルサイエンス株式会社 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 本部 肥飼料安全検査部 肥料鑑定課
- ・内藤環境管理株式会社
- ・日本環境科学株式会社
- ・三浦工業株式会社 三浦環境科学研究所

(50 音順)

2) 装置及び器具

各試験室の保有する LC-MS/MS, LC 用分離カラム, 化学天びん, 超音波発生器, 遠心分離機, 高速遠心分離機, マニホールド, 濃縮装置, 試験管ミキサーを使用した。

3) 分析方法

試料溶液及び検量線用混合標準液中の PFOS 及び PFOA について、直鎖体及びその直鎖体の含有量と分岐異性体の含有量を合計した量(以下、「含量」という)を、PFOS については $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOS を、PFOA については $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA を内標準物質として用いてそれぞれ算出することとした。

PFOS 及び PFOA の抽出、精製及び測定は肥料等試験法¹⁴⁾を用いた。なお、試料溶液の調製操作に用いる弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムは InertSep MA-2(充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 mL), Oasis WAX for PFAS Analysis(充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 cc)のいずれかによった。

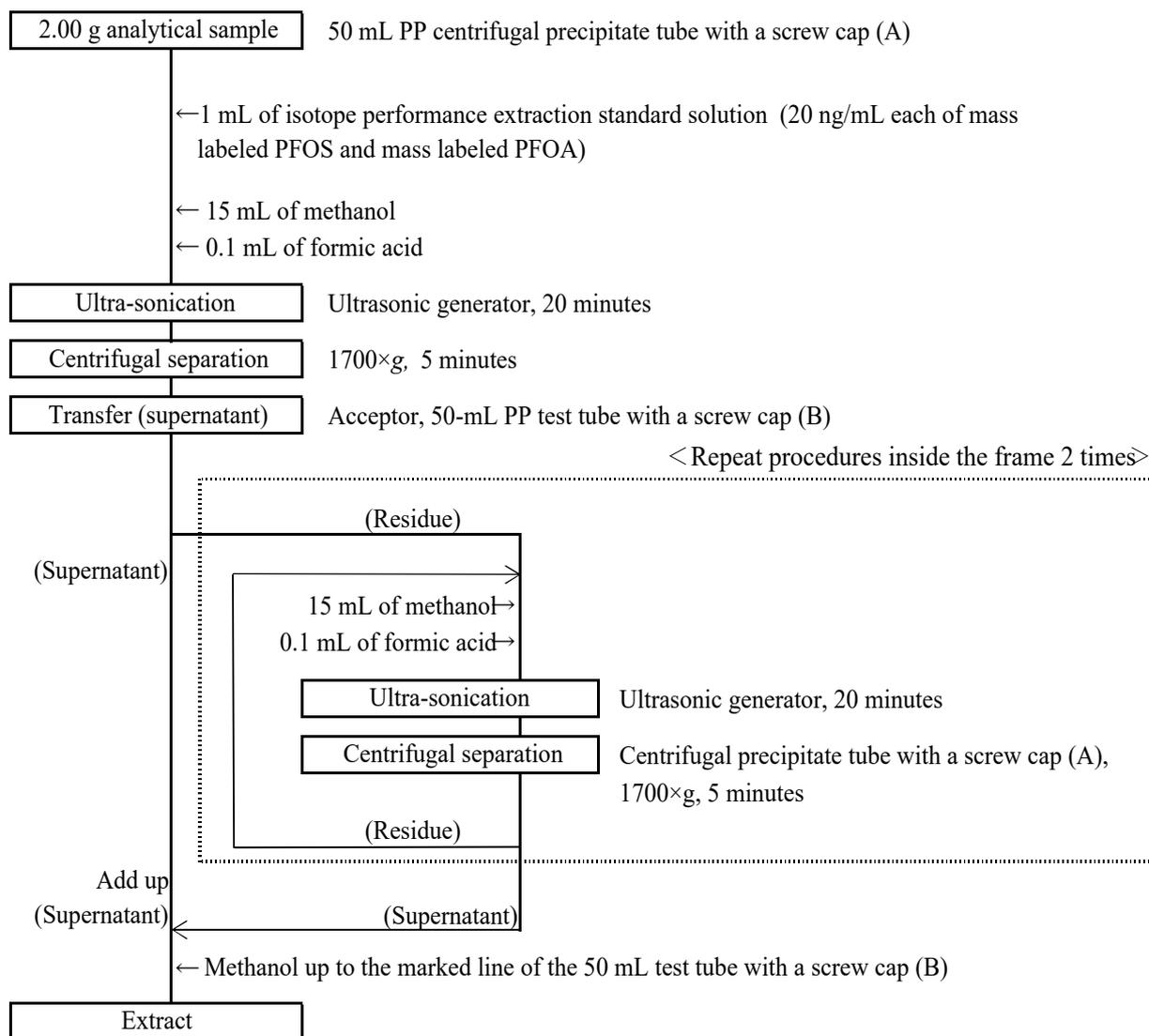
検量線用混合標準液は PFOS 及び PFOA の濃度が 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL 及び 50 ng/mL, また, 内標準物質として $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, $^{13}\text{C}_8$ -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA がそれぞれの標準液中濃度で 2 ng/mL ずつとなるように調製し, 参加試験室へ配付した.

測定操作における LC-MS/MS の LC システム及びパラメータの一例を Table 1-1 に示したが, 各試験室が保有しているカラムで PFOS 及び PFOA の直鎖体及び分岐異性体を分離して測定できるように, それぞれの試験室において各条件を設定した. また, 各試験室が保有している LC-MS/MS に合わせて Table 1-2 に記す項目以外の質量分析計のパラメータを設定した. なお, Table 1-3 に示したプレカーサーイオン及びプロダクトイオンは質量分析計の最適化を実施して微調整してもよいこととした.

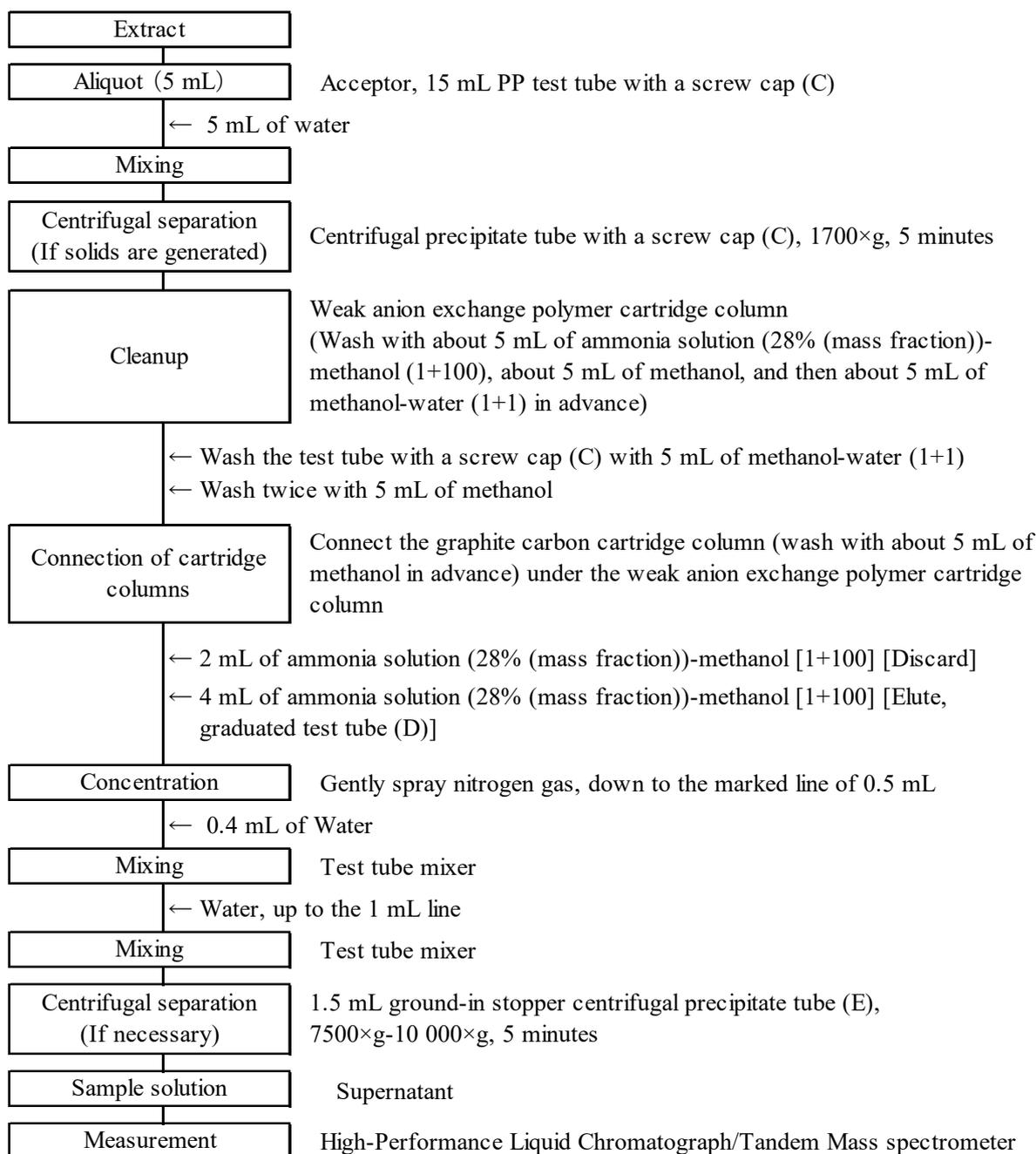
各イオンの選択反応検出 (MRM: Multiple Reaction Monitoring) クロマトグラムを記録し, それぞれのピーク面積を求めた. 各化合物とそれらの内標準物質の定量用イオンのピーク面積比を算出した. 各検量線用混合標準液の各成分とそれらの内標準物質の定量用イオンのピーク面積比の検量線を作成し, 試料溶液中の各成分の濃度を求め, 分析試料中の各成分の濃度を算出した. なお, PFOS 及び PFOA は塩としての濃度を算出した.

試料溶液中の濃度が 2 ng/mL 未満の場合は 0.1 ng/mL~2 ng/mL の濃度範囲の検量線を用い, 2 ng/mL 以上の場合は全濃度範囲の検量線を用いた.

参考のため, 分析法のフローシート (Scheme 1-1 及び Scheme 1-2), 検量線用混合標準液及び試料溶液の定量用プロダクトイオンの選択反応検出クロマトグラム例 (Fig. 2-1 及び Fig. 2-2) を示した.



Scheme 1-1 Flow sheet for PFOS and PFOA in composted sludge (Extraction procedure)



Scheme 1-2 Flow sheet for organofluorine compounds in composted sludge
(Cleanup and measurement procedure)

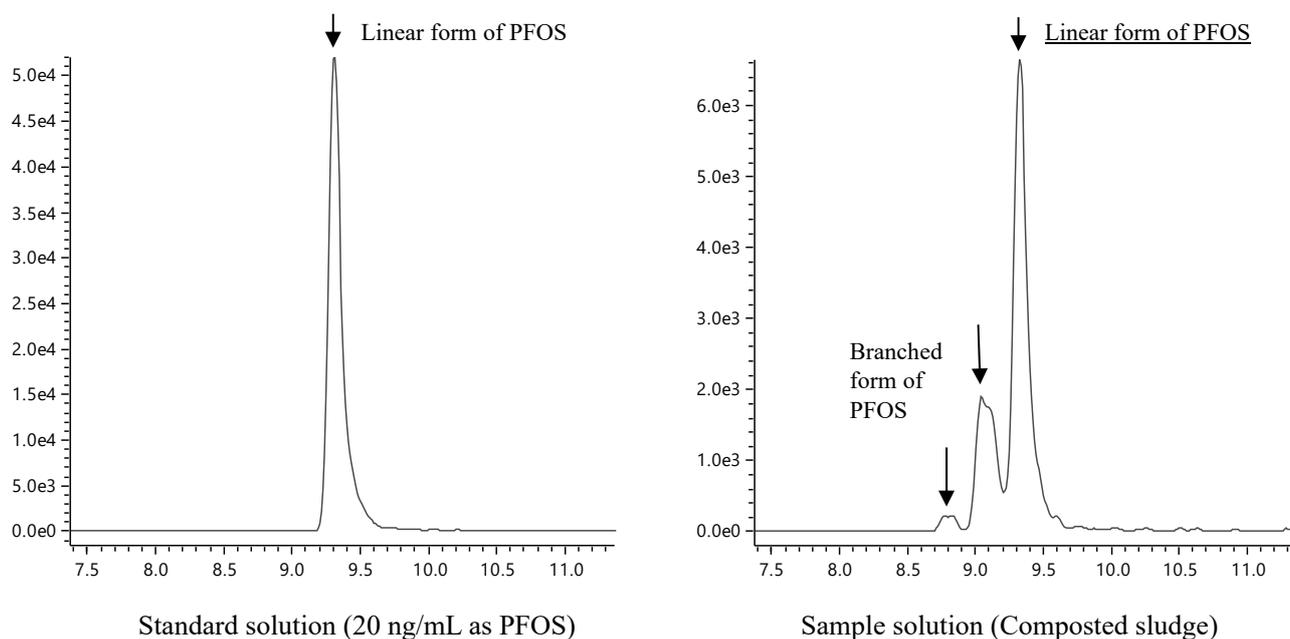


Fig. 2-1 MRM chromatogram of PFOS

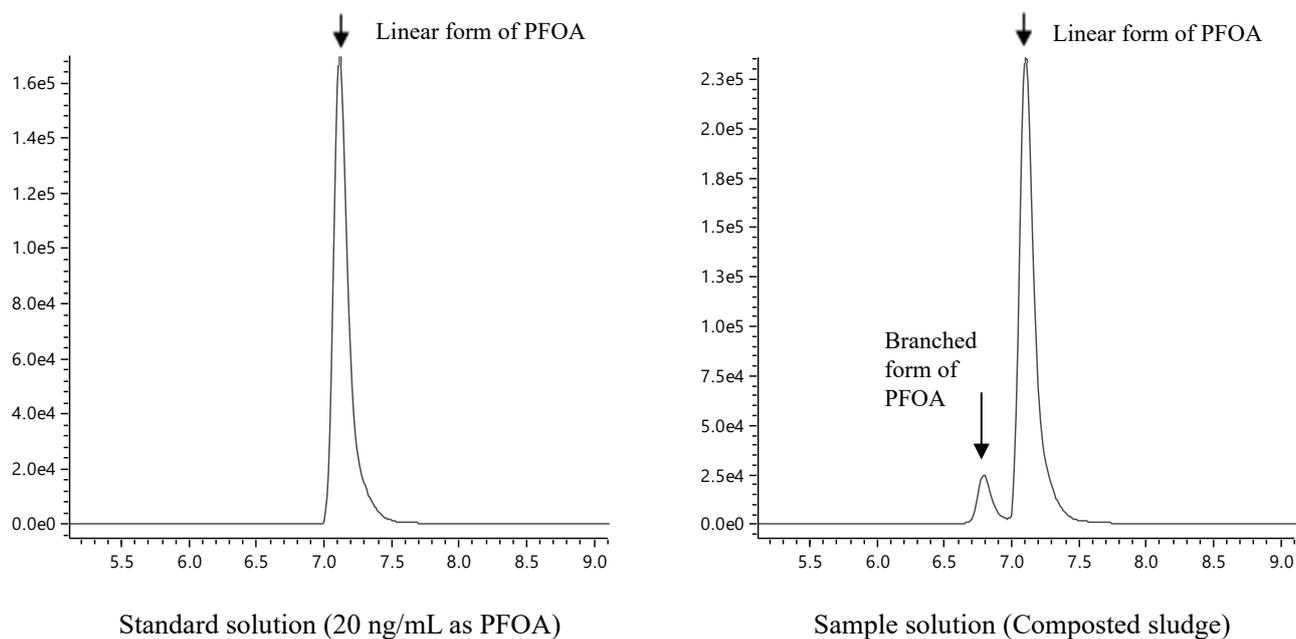


Fig. 2-2 MRM chromatogram of PFOA

Table 1-1 Example of parameter of LC system

Column: Silica gel column (chemically bonded with octadecyl group)			
(2 mm - 3 mm I.D. , 50 mm - 150 mm L, 1.6 μ m - 3.0 μ m)			
Flow rate: 0.2 mL/min - 0.5 mL/min			
Mobile phase: A: 10 mmol/L ammonium acetate solution B: Acetonitrile			
Gradient program	0 min - 1.5 min	A:60	B:40
	1.5 min - 10 min	A:60→0	B:40→100
	10 min - 12 min	A:0	B:100
	12 min - 12.2 min	A:0→60	B:100→40 (%)
Column temperature: 40 °C			
Injection volume: 5 μ L			

Table 1-2 Parameter of MS/MS

Ionization: Electrospray ionization (ESI)
Mode: Positive

Table 1-3 Monitor ion

Compound	MRM transition (m/z)		
	Precursor ion	Product ion (For determination)	Product ion (for validation)
PFOS	499	80	99
¹³ C ₄ -PFOS	503	80	99
¹³ C ₈ -PFOS	507	80	99
PFOA	413	169	369
¹³ C ₄ -PFOA	417	169	372
¹³ C ₈ -PFOA	421	172	376

4) 共同試験用試料の均質性確認

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル¹⁵⁾に従い、それぞれの共同試験用試料から 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 3) に従って分析した。なお、ねじ口遠心沈殿管にはかり入れる分析試料は 1.8 g とした。ただし、PFOS の算出は内標準物質に ¹³C₄-PFOS を用い、プロダクトイオン m/z 80 の直鎖体の面積により行った。PFOA の算出は内標準物質に ¹³C₄-PFOA を用い、プロダクトイオン m/z 169 の直鎖体の面積により行った。

5) 共同試験

試験に参加した 13 試験室と使用した機器及びカラムは Table 2, 使用した LC 条件は Table 3 のとおりであり、それぞれの試験室において送付した 12 試料について 3) に従い令和 3 年 10 月 12 日から 11 月末日まで分析することとした。

Table 2. Instruments used in the collaborative study

Labs ID ^{a)}	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)	guard column (i.d.×length)	delay column (i.d.×length)	cartridge column ^{b)} (sorbent weight, barrel size)
A	LC: LC-40D XS, Shimadzu MS/MS: LCMS-8045, Shimadzu	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 µm)	Inertsil ODS-SP HP, GL Science (3.0 mm×10 mm)	Delay column for PFAS, GL Science (3.0 mm×30 mm)	InertSep MA-2 (500 mg, 6 mL)
B	LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4000, AB SCIEX	InertSustain C18 HP, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 µm)	-	Delay column for PFAS, GL Science (3.0 mm×30 mm)	InertSep MA-2 (500 mg, 6 mL)
C	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: Triple Quad 6500+, AB SCIEX	InertSustain AQ-C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 µm)	-	-	InertSep MA-2 (500 mg, 6 mL)
D	LC: LC-40 X3, Shimadzu MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	Shim-pack Velox SP-C18, Shimadzu (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)	-	Shim-pack XR-ODS II, Shimadzu (2.0 mm×75 mm)	InertSep MA-2 (500 mg, 6 mL)
E	LC: 1260 Infinity, Agilent MS/MS: QTRAP 5500, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 µm)	-	-	InertSep MA-2 (500 mg, 6 mL)
F	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: TQD, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.7 µm)	-	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm)	InertSep MA-2 (500 mg, 6 mL)
G	LC: 1260 Infinity, Agilent MS/MS: 6460 Triple Quad LC/MS, Agilent	ZORBAX Eclipse Plus C18, Agilent (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)	-	ZORBAX Eclipse Plus C18, Agilent (2.1 mm×5 mm)	Waters Oasis WAX for PFAS Analysis (500 mg, 6 cc)
H	LC: Exion LC, AB SCIEX MS/MS: Triple Quad 4500, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Science (2.1 mm×150 mm, 3.0 µm)	InertSustain C18, GL Science (2.1 mm×10 mm)	InertSustain AQ-C18, GL Science (2.1 mm×100 mm)	Waters Oasis WAX for PFAS Analysis (500 mg, 6 cc)
I	LC: 1260 Infinity, Agilent MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 µm)	-	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent (4.6 mm×50 mm)	Waters Oasis WAX for PFAS Analysis (500 mg, 6 cc)
J	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQ .MS, Waters	Atlantis T3, Waters (2.1 mm×150 mm, 3.0 µm)	-	-	Waters Oasis WAX for PFAS Analysis (500 mg, 6 cc)
K	LC: Prominence UPLC, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	InertSustainSwift C18 HP, GL Science (2.1 mm×100 mm, 3.0 µm)	InertSustainSwift C18 cartridge column E, GL Science (3 mm×10 mm)	-	Waters Oasis WAX for PFAS Analysis (500 mg, 6 cc)
L	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQ MS, Waters	ACQUITY UPLC C18, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.7 µm)	-	ACQUITY UPLC C18, Waters (2.1 mm×100 mm)	Waters Oasis WAX for PFAS Analysis (500 mg, 6 cc)
M	LC: Nexera XR, Shimadzu MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	InertSustain C18 HP, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 µm)	TSKgel ODS-100V, TOSOH (2 mm×10 mm)	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent (4.6 mm×50 mm)	Waters Oasis WAX for PFAS Analysis (500 mg, 6 cc)

a) Laboratory identification (In no particular order)

b) Weak anion exchange polymer cartridge column used in cleanup operation

Table 3 Conditions of LC system used in the collaborative study

Labs ID ^{a)}	Mobile phase		Flow rate (mL/min)	Gradient program		Column temperature (°C)
	A	B		Time (min)	A:(%) B:(%)	
A	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	0.0 - 1.5 min	A: 60 B: 40	40
				1.5 min - 10.0 min	A: 60→0 B: 40→100	
				10.0 min - 12.0 min	A: 0 B: 100	
				12.0 min - 12.2 min	A: 0→60 B: 100→40	
				12.2 min - 20.0 min	A: 60 B: 40	
B	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	0.0 - 1.5 min	A: 60 B: 40	40
				1.5 min - 10.0 min	A: 60→0 B: 40→100	
				10.0 min - 12.0 min	A: 0 B: 100	
				12.0 min - 12.2 min	A: 0→60 B: 100→40	
				12.2 min - 20.0 min	A: 60 B: 40	
C	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	0.0 - 1.5 min	A: 60 B: 40	40
				1.5 min - 10.0 min	A: 60→0 B: 40→100	
				10.0 min - 12.0 min	A: 0 B: 100	
				12.0 min - 12.2 min	A: 0→60 B: 100→40	
				12.2 min - 18.0 min	A: 60 B: 40	
D	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	0.0 - 7.0 min	A: 70→35 B: 30→65	40
				7.0 min - 7.1 min	A: 35→5 B: 65→95	
			0.35	7.1 min - 7.5 min	A: 5 B: 95	
				7.5 min - 10.5 min	A: 5 B: 95	
				10.5 min - 10.6 min	A: 5→70 B: 95→30	
0.2	10.6 min - 15.0 min	A: 70 B: 30				
E	0.5 mmol/L ammonium acetate (0.1 % Formic acid contained)	Acetonitrile	0.2	0.0 - 13.0 min	A: 60→5 B: 40→95	40
				13.0 min - 18.0 min	A: 5 B: 95	
				18.0 min - 21.0 min	A: 5→60 B: 95→40	
				21.0 min - 25.0 min	A: 60 B: 40	
F	5 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.25	0.0 - 4.8 min	A: 70→5 B: 30→95	45
				4.8 min - 5.4 min	A: 5 B: 95	
				5.4 min - 5.5 min	A: 5→70 B: 95→30	
G	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	0.0 - 20.0 min	A: 70→10 B: 30→90	40
				20.0 min - 25.0 min	A: 10 B: 90	
				25.0 min - 25.1 min	A: 10→70 B: 90→30	
H	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.35	0.0 - 1.0 min	A: 75 B: 25	40
				1.0 min - 16.0 min	A: 75→2 B: 25→98	
				16.0 min - 20.0 min	A: 2 B: 98	
				20.0 min - 20.1 min	A: 2→75 B: 98→25	
				20.1 min - 22.5 min	A: 75 B: 25	
I	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	0.0 - 20.0 min	A: 75→0 B: 25→100	40
				20.0 min - 23.0 min	A: 0 B: 100	
				23.0 min - 23.1 min	A: 0→75 B: 100→25	
				23.1 min - 30.0 min	A: 75 B: 25	
J	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	0.0 - 20.0 min	A: 70→5 B: 30→95	40
				20.0 min - 23.0 min	A: 5 B: 95	
				23.0 min - 23.1 min	A: 5→70 B: 95→30	
				23.1 min - 25.0 min	A: 70 B: 30	
K	10 mmol/L ammonium formate (0.1 % Formic acid contained)	Methanol	0.3	0.0 - 3.0 min	A: 70 B: 30	40
				3.0 min - 10.0 min	A: 70→0 B: 30→100	
				10.0 min - 15.0 min	A: 0 B: 100	
				15.0 min	A: 0→70 B: 100→30	
				15.0 min - 20.1 min	A: 70 B: 30	
L	2 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.3	0.0 - 8.0 min	A: 99→5 B: 1→95	40
				8.0 min - 9.0 min	A: 5 B: 95	
				9.0 min - 9.1 min	A: 5→99 B: 95→1	
M	10 mmol/L ammonium acetate	Acetonitrile	0.2	0.0 - 1.5 min	A: 60 B: 40	40
				1.5 min - 10.0 min	A: 60→0 B: 40→100	
				10.0 min - 12.0 min	A: 0 B: 100	
				12.0 min - 12.2 min	A: 0→60 B: 100→40	
				12.2 min - 20.0 min	A: 60 B: 40	

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

6種類の試料を2点併行で分析した結果の総平均値(\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 Table 4-1 及び Table 4-2 に示した. さらに, 肥料等試験法¹⁴⁾ 附属書 A 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($\hat{\sigma}_R$)を同じく Table 4-1 及び Table 4-2 に示した.

均質性の判定は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル¹⁵⁾の手順を参考に実施した. まず, 分析結果の等分散性を確認するため, Cochran の検定を実施した. その結果, すべての試料において外れ値は認められなかったため, これらの結果について一元配置分散分析を実施し, 併行標準偏差(s_r)及び試料間標準偏差(s_{bb})を求め, (式 3)により併行標準偏差(s_r)を評価した. 次に, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル¹⁵⁾の十分に均質の判定式(式 2)を用いて均質性の判定を行った. その結果, すべての試料で判定式(式 2)を満たしていたことから, 共同試験用試料として妥当な均質性を有していることが確認された. また, (式 4)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, いずれの試料も推定室間再現標準偏差($\hat{\sigma}_R$)と比較して小さい値であった.

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

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

$$s_r < 0.5\sigma_p = 0.5\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 3)$$

$$s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2} \quad \dots (式 4)$$

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$: 肥料等試験法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

Table 4-1 Homogeneity test result of PFOS

Sample	No. of sample ^{a)}	\bar{x} ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)}	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)}	s_{bb} ^{e)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)}	s_r ^{g)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{h)}	s_{b+r} ⁱ⁾
	$p(q)$	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Composted sludge A	10(0)	12.5	22	2.7	0.4	0.8	0.5	1.4	0.6
Composted sludge B	10(0)	47.5	22	10.4	1.1	3.1	2.7	5.2	2.9
Composted sludge C	10(0)	5.88	22	1.29	0.09	0.39	0.46	0.65	0.47
Composted sludge D	10(0)	17.0	22	3.7	0.6	1.1	1.2	1.9	1.3
Composted sludge E	10(0)	3.42	22	0.75	0.21	0.23	0.29	0.38	0.36
Dried microbes F	10(0)	1.72	22	0.38	0.09	0.11	0.11	0.19	0.14

a) p =Number of samples after excluding outliers, (q)=Number of samples of outliers

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

c) Criteria of precision for Reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2021

d) The estimated standard deviation of reproducibility calculated based on $CRSD_R$

e) Standard deviation of sample-to-sample

f) The value for the test : $s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R$

g) Repeatability standard deviation

h) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (s_r)

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

Table 4-2 Homogeneity test result of PFOA

Sample	No. of sample ^{a)}	\bar{x} ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)}	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)}	s_{bb} ^{e)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)}	s_r ^{g)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{h)}	s_{b+r} ⁱ⁾
	$p(q)$	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Composted sludge A	10(0)	222	22	49	0	15	9	24	9
Composted sludge B	10(0)	116	22	26	0	8	4	13	4
Composted sludge C	10(0)	48.0	22	10.6	0.0	3.2	2.3	5.3	2.3
Composted sludge D	10(0)	16.9	22	3.7	0.0	1.1	0.4	1.9	0.4
Composted sludge E	10(0)	4.89	22	1.08	0.09	0.32	0.32	0.54	0.33
Dried microbes F	10(0)	1.07	22	0.24	0.02	0.07	0.06	0.12	0.06

Refer to the footnote Table 4-1

2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告されたそれぞれの共同試験成績を Table 5-1 及び Table 5-2 に示した。各系列の共同試験用試料の分析値を IUPAC の共同試験プロトコル^{16, 17)}に従って統計解析した。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、13 試験室から報告されたそれぞれの共同試験成績のうち、¹³C₄-PFOS を内標準物質として分析した PFOS 直鎖体で 2 試験室、¹³C₄-PFOS を内標準物質として分析した PFOS 含量で 2 試験室、¹³C₈-PFOS を内標準物質として分析した PFOS 直鎖体で 1 試験室、¹³C₈-PFOS を内標準物質として分析した PFOS 含量で 1 試験室、¹³C₄-PFOA を内標準物質として分析した PFOA 直鎖体で 2 試験室、¹³C₄-PFOA を内標準物質として分析した PFOA 含量で 2 試験室、¹³C₈-PFOA を内標準物質として分

析した PFOA 直鎖体で 2 試験室及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA を内標準物質として分析した PFOA 含量で 2 試験室が外れ値として判定された。

Table 5-1(1) Individual result of PFOS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

PFOS (Linear chain compound) / $^{13}\text{C}_4$ -PFOS												
Labs ID ^{a)}	Composted sludge A	Composted sludge B	Composted sludge C	Composted sludge D	Composted sludge E	Dried microbes F	Composted sludge A	Composted sludge B	Composted sludge C	Composted sludge D	Composted sludge E	Dried microbes F
A	14.7	13.1	47.0	46.8	5.66	5.04	17.1	16.4	3.34	3.44	1.62	1.63
B	11.4	12.1	51.6	48.7	5.58	5.39	14.4	17.7	3.41	3.65	1.56	1.61
C	13.5	13.7	51.0	51.3	5.30	4.99	19.7	18.1	4.10	4.33	1.77	1.80
D	13.1	14.3	56.1 ^{b)}	50.9 ^{b)}	5.96	5.50	19.0	18.0	4.15	4.84	1.83	1.70
E	12.6	12.2	48.9	48.3	4.71	4.90	16.0	16.7	3.58	3.66	1.44	1.42
F	12.5	11.9	51.5	51.4	5.29	4.74	16.0	14.8	3.81	3.62	1.52	1.33
G	11.2	11.7	42.9	43.6	4.68	4.78	14.0	14.7	3.07	3.20	1.40	1.45
H	12.7	13.0	47.0	47.4	4.45	4.20	17.5	16.1	4.12	3.75	1.80	2.25
I	14.2	13.1	50.0	49.2	5.30	5.02	18.7	18.5	4.19	4.08	2.15	1.68
J	12.5	10.7	48.8	49.1	5.44	4.75	15.7	16.4	2.88	3.64	1.10	1.35
K	14.9	15.4	55.0	55.3	6.78	7.02	23.0 ^{e)}	24.9 ^{e)}	4.79	6.18	1.51	1.27
L	11.3	11.8	48.5	48.0	3.96	3.99	14.4	13.8	2.12	2.86	1.22	1.24
M	13.1	12.9	48.8	50.9	5.50	5.56	16.9	16.9	4.06	4.23	1.31	1.67

a) Laboratory identification (In no particular order)
 b) Outlier of Cochran test
 c) Outlier of Single Grubbs test
 d) Outlier of Paired Grubbs test

PFOS (Linear chain compound + Branched chain isomer) / $^{13}\text{C}_4$ -PFOS												
Labs ID ^{a)}	Composted sludge A	Composted sludge B	Composted sludge C	Composted sludge D	Composted sludge E	Dried microbes F	Composted sludge A	Composted sludge B	Composted sludge C	Composted sludge D	Composted sludge E	Dried microbes F
A	17.6	16.4	57.9	57.0	7.49	7.02	23.0	23.0	4.11	4.13	2.19	2.06
B	14.8	15.7	63.5	60.2	7.40	7.63	21.7	26.0	4.37	4.64	2.75	2.64
C	18.1	18.5	66.9	67.7	8.03	7.80	35.6 ^{e)}	30.8 ^{e)}	5.23	5.58	2.50	2.56
D	16.5	18.2	68.4 ^{b)}	62.1 ^{b)}	8.05	7.49	27.8	25.9	5.31	6.18	2.40	2.33
E	15.4	14.8	61.4	60.8	8.54	8.08	23.4	24.5	4.64	4.76	2.22	2.13
F	15.5	15.0	62.4	61.2	7.24	6.26	22.3	21.0	4.88	4.56	2.15	1.77
G	14.2	14.6	52.0	53.4	6.50	6.67	20.2	21.1	3.86	3.96	1.95	2.04
H	15.6	16.0	56.3	56.3	6.05	5.62	23.7	21.8	5.13	4.63	2.80	3.50
I	17.1	16.0	59.6	57.6	6.95	6.65	24.9	25.1	4.98	4.98	2.85	2.33
J	15.8	13.6	59.7	61.6	7.45	6.56	22.7	23.5	3.76	4.32	1.72	1.87
K	14.9	15.4	55.0	55.3	6.78	7.02	23.0	24.9	6.72	6.85	1.88	1.70
L	14.5	15.3	63.2	62.3	6.68	6.20	21.7	20.9	3.16	3.80	1.32	1.33
M	16.6	16.3	60.4	62.4	7.63	7.87	24.4	24.5	5.26	5.33	2.32	2.44

Table 5-1(2) Individual result of PFOS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

PFOS (Linear chain compound) / $^{13}\text{C}_8$ -PFOS												
Labs ID ^{a)}	Composted sludge A		Composted sludge B		Composted sludge C		Composted sludge D		Composted sludge E		Dried microbes F	
A	14.3	12.5	49.2	46.6	5.68	4.65	17.4	18.2	3.37	3.56	1.59	1.69
B	12.1	12.3	49.3	49.5	5.70	5.50	15.1	18.0	3.45	3.60	1.52	1.63
C	13.6	13.4	51.9	50.9	5.61	4.97	18.4	19.0	4.21	4.45	1.76	1.84
D	13.7	14.0	55.4	53.7	6.19	6.06	18.9	18.9	4.34	4.52	2.05	1.76
E	13.5	13.1	48.8	49.5	5.19	5.32	17.3	17.2	3.63	3.61	1.47	1.38
F	12.8	12.9	51.6	52.1	5.28	4.82	17.2	16.1	3.66	3.69	1.57	1.35
G	11.0	11.7	43.3	42.0	4.43	4.62	14.8	14.9	3.13	3.16	1.40	1.45
H	12.1	11.9	48.6	46.7	4.49	4.55	17.8	16.5	4.16	3.83	1.79	2.35
I	12.4	12.0	52.7	51.3	5.75	5.32	17.4	17.4	4.09	4.53	1.95	1.68
J	13.6	12.0	45.8	48.3	4.72	4.55	16.6	15.4	3.50	4.02	1.18	1.36
K	13.2	14.2	55.4	55.0	6.24	7.30	21.0	21.9	4.61 ^{b)}	5.96 ^{b)}	1.42	1.77
L	11.4	11.1	42.7	44.6	4.20	5.23	13.7	14.8	2.76	3.33	1.33	1.26
M	14.4	12.8	49.4	50.7	5.09	5.19	18.7	18.4	4.32	4.81	1.51	1.79

PFOS (Linear chain compound + Branched chain isomer) / $^{13}\text{C}_8$ -PFOS												
Labs ID ^{a)}	Composted sludge A		Composted sludge B		Composted sludge C		Composted sludge D		Composted sludge E		Dried microbes F	
A	17.2	15.8	60.9	57.0	7.53	6.49	23.7	25.9	4.12	4.27	2.11	2.13
B	15.4	15.8	60.5	61.2	7.57	7.80	22.2	25.9	4.42	4.58	2.67	2.80
C	18.1	18.2	67.9	67.2	8.53	7.79	33.1 ^{c)}	32.1 ^{c)}	5.38	5.74	2.50	2.62
D	17.2	17.8	67.5	65.7	8.36	8.25	27.6	27.3	5.55	5.77	2.69	2.41
E	16.2	15.7	60.8	62.0	9.30	8.91	24.7	24.8	4.72	4.72	2.25	2.18
F	15.8	16.0	62.4	63.4	7.26	6.28	23.6	23.0	4.68	4.64	2.19	1.80
G	14.0	14.6	52.6	51.1	6.15	6.46	21.3	21.2	3.94	3.92	1.96	2.05
H	15.0	14.9	58.5	55.6	6.09	6.06	24.4	22.7	5.17	4.71	2.77	3.64
I	15.3	15.2	63.0	61.6	7.30	7.19	23.9	24.1	4.88	4.88	2.70	2.23
J	16.9	15.0	55.9	61.9	6.52	6.24	23.6	21.6	4.53	4.73	1.81	1.86
K	13.2	14.2	55.4	55.0	6.24	7.30	21.0	21.9	6.50	6.61	1.78	2.32
L	15.2	14.9	56.1	58.4	7.32	8.49	21.0	22.7	3.91	4.34	1.56	1.50
M	18.3	16.1	61.0	62.3	7.05	7.31	26.9	26.7	5.56	6.03	2.18	2.61

Table 5-2(1) Individual result of PFOA (µg/kg)

PFOA (Linear chain compound) / ¹³ C ₄ -PFOA		Individual result of PFOA (µg/kg)										
Labs ID ^{a)}	Composted sludge A	Composted sludge B	Composted sludge C	Composted sludge D	Composted sludge E	Dried microbes F						
A	254	259	149	138	52.9	54.1	18.8	18.1	5.14	4.71	1.05	1.09
B	221	225	128	131	50.9	51.7	18.6	18.3	5.77	6.12	3.64 ^{b)}	1.50 ^{b)}
C	221	213	127	140	57.9	61.0	22.5	21.6	6.38	6.46	1.26	1.31
D	279	265	158	148	57.3	61.2	20.6	21.3	6.54	6.41	1.47	1.30
E	241	228	130	135	50.2	53.3	19.7	19.3	5.76	6.70	1.41	1.27
F	224	229	133	129	56.7	52.3	18.6	19.3	6.02	5.99	1.30	1.30
G	214	219	121	126	50.3	49.6	17.0	15.8	4.50	5.04	0.92	0.91
H	262	261	144	141	52.0	48.8	19.3	18.7	6.14	6.11	1.03	1.34
I	257	222	153	142	52.0	53.9	17.7	17.5	6.50	6.07	1.10 ^{b)}	2.57 ^{b)}
J	251	251	145	146	53.5	53.2	18.9	18.6	5.14	5.74	1.06	1.12
K	222	213	150	147	52.6	50.5	15.3	16.7	5.66	6.17	0.64	0.85
L	212	202	123	128	45.8	51.8	17.2	18.0	5.42	5.71	0.98	0.97
M	287	259	145	153	55.3	57.0	22.7	22.0	7.29	7.68	1.16	1.39

a) Laboratory identification (In no particular order)

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Single Grubbs test

d) Outlier of Paired Grubbs test

PFOA (Linear chain compound + Branched chain isomer) / ¹³ C ₄ -PFOA		Individual result of PFOA (µg/kg)										
Labs ID ^{a)}	Composted sludge A	Composted sludge B	Composted sludge C	Composted sludge D	Composted sludge E	Dried microbes F						
A	268	274	166	153	54.5	54.7	19.7	18.9	5.40	4.87	1.15	1.16
B	232	237	140	146	51.5	52.4	19.4	19.0	5.77	6.31	3.64 ^{b)}	1.50 ^{b)}
C	238	229	145	160	58.2	61.6	23.5	22.4	6.53	6.69	1.38	1.31
D	286	272	168	157	57.5	61.4	21.0	21.7	6.61	6.47	1.47	1.30
E	253	241	146	152	50.9	53.8	20.6	20.2	6.02	7.12	2.12	2.20
F	235	242	148	146	56.7	52.3	19.1	19.9	6.13	6.14	1.40	1.30
G	225	230	135	141	50.8	50.0	17.8	16.5	4.66	5.22	1.06	0.99
H	273	271	158	154	52.1	49.2	20.1	19.4	6.33	6.30	1.03	1.46
I	267	231	165	156	52.0	53.9	18.3	18.1	6.50	6.22	1.25 ^{b)}	2.57 ^{b)}
J	260	262	152	152	53.5	53.4	19.4	19.2	5.24	5.93	1.37	1.22
K	222	213	150	147	52.6	50.5	15.3	16.7	5.66	6.17	0.64	0.85
L	219	209	131	138	45.8	51.9	17.6	18.3	5.45	5.77	1.01	1.00
M	299	271	160	168	55.6	57.2	23.4	22.8	7.40	7.91	1.23	1.45

Table 5-2(2) Individual result of PFOA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

PFOA (Linear chain compound) / $^{13}\text{C}_8\text{-PFOA}$												
Labs ID ^{a)}	Composted sludge A	Composted sludge B	Composted sludge C	Composted sludge D	Composted sludge E	Dried microbes F						
A	239	256	146	129	51.7	54.6	18.2	18.5	5.14	5.09	1.00	1.07
B	224	221	128	126	49.8	49.6	17.5	18.1	5.73	5.91	3.68 ^{b)}	1.53 ^{b)}
C	221	210	136	125	63.2	57.0	22.4	22.0	6.04	6.13	1.26	1.37
D	273	260	152	145	56.9	56.9	19.7	21.0	6.53	6.69	1.45	1.32
E	244	233	136	135	53.0	51.7	18.1	17.9	5.67	5.76	1.00	1.10
F	238	239	137	138	53.4	50.3	18.5	18.7	6.26	5.98	1.28	1.23
G	215	224	121	127	48.8	50.8	17.4	17.5	4.68	5.02	0.93	0.94
H	228	238	138	137	47.7	48.1	21.0	18.6	6.53	6.31	1.17	1.31
I	252	241	152	144	53.1	56.0	17.9	18.1	6.06	5.97	1.20 ^{b)}	2.43 ^{b)}
J	253	222	129	130	57.5	61.4	21.6	18.7	6.30	5.54	1.25	1.14
K	227	221	146	153	47.4	58.0	15.3	16.5	5.26	5.66	0.65	0.80
L	221	211	126	134	44.3	47.5	17.4	16.7	4.48	4.99	0.96	1.00
M	278	253	147	151	55.6	58.4	23.2	22.5	7.03	7.90	1.18	1.46

PFOA (Linear chain compound + Branched chain isomer) / $^{13}\text{C}_8\text{-PFOA}$												
Labs ID ^{a)}	Composted sludge A	Composted sludge B	Composted sludge C	Composted sludge D	Composted sludge E	Dried microbes F						
A	253	271	162	143	53.3	55.2	19.0	19.4	5.40	5.27	1.10	1.15
B	236	234	141	141	50.4	50.3	18.2	18.9	5.73	6.10	3.68 ^{b)}	1.53 ^{b)}
C	237	226	154	143	63.5	57.5	23.3	22.7	6.19	6.35	1.38	1.37
D	280	266	161	153	57.1	57.1	20.2	21.3	6.60	6.75	1.45	1.32
E	256	245	151	151	53.7	52.3	19.1	18.8	6.13	5.97	1.95	2.14
F	254	257	152	156	53.4	50.3	18.9	19.6	6.37	6.13	1.39	1.23
G	226	236	135	142	49.2	51.2	18.2	18.3	4.83	5.19	1.07	1.02
H	238	248	150	150	47.8	48.5	21.8	19.3	6.74	6.50	1.17	1.44
I	262	250	164	158	53.1	56.0	18.6	18.6	6.21	6.17	1.25 ^{b)}	2.43 ^{b)}
J	262	231	137	137	57.6	61.7	22.2	19.1	6.42	5.73	1.66	1.19
K	227	221	146	153	47.4	58.0	15.3	16.5	5.26	5.66	0.65	0.80
L	227	218	134	142	44.4	47.5	17.9	17.1	4.57	5.11	1.05	1.09
M	290	264	162	166	55.9	58.7	24.0	23.2	7.13	8.14	1.26	1.53

3) 併行精度及び室間再現精度

各化合物及び各分析方法について、外れ値を除外した試験結果より算出^{16, 17)}した平均値、併行標準偏差 (s_r)、併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び肥料等試験法¹⁴⁾ 附属書 A における併行相対標準偏差の目安 ($CRSD_r$) 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) 及び肥料等試験法附属書 A における室間再現相対標準偏差の目安 ($CRSD_R$) を Table 6-1 及び Table 6-2 に示した。

¹³C₄-PFOS を内標準物質として分析した PFOS 直鎖体の平均値は 1.56 µg/kg～49.2 µg/kg であり、その併行標準偏差は 0.17 µg/kg～0.9 µg/kg、併行相対標準偏差は 1.6 %～10.7 %、室間再現標準偏差は 0.28 µg/kg～2.9 µg/kg、室間再現相対標準偏差は 6.0 %～20.6 %であった。¹³C₄-PFOS を内標準物質として分析した PFOS 含量の平均値は 2.22 µg/kg～59.8 µg/kg であり、その併行標準偏差は 0.20 µg/kg～1.2 µg/kg、併行相対標準偏差は 1.8 %～9.0 %、室間再現標準偏差は 0.49 µg/kg～4.0 µg/kg、室間再現相対標準偏差は 6.7 %～22.1 %であった。¹³C₈-PFOS を内標準物質として分析した PFOS 直鎖体の平均値は 1.61 µg/kg～49.4 µg/kg であり、その併行標準偏差は 0.18 µg/kg～1.1 µg/kg、併行相対標準偏差は 2.2 %～10.9 %、室間再現標準偏差は 0.27 µg/kg～3.8 µg/kg、室間再現相対標準偏差は 7.7 %～16.7 %であった。¹³C₈-PFOS を内標準物質として分析した PFOS 含量の平均値は 2.28 µg/kg～60.2 µg/kg であり、その併行標準偏差は 0.19 µg/kg～1.7 µg/kg、併行相対標準偏差は 2.9 %～11.3 %、室間再現標準偏差は 0.47 µg/kg～4.5 µg/kg、室間再現相対標準偏差は 7.5 %～20.6 %であった。

¹³C₄-PFOA を内標準物質として分析した PFOA 直鎖体の平均値は 1.14 µg/kg～238 µg/kg であり、その併行標準偏差は 0.11 µg/kg～10 µg/kg、併行相対標準偏差は 2.8 %～9.3 %、室間再現標準偏差は 0.22 µg/kg～24 µg/kg、室間再現相対標準偏差は 6.8 %～18.9 %であった。¹³C₄-PFOA を内標準物質として分析した PFOA 含量の平均値は 1.28 µg/kg～248 µg/kg であり、その併行標準偏差は 0.13 µg/kg～10 µg/kg、併行相対標準偏差は 2.9 %～10.0 %、室間再現標準偏差は 0.36 µg/kg～25 µg/kg、室間再現相対標準偏差は 6.7 %～28.5 %であった。¹³C₈-PFOA を内標準物質として分析した PFOA 直鎖体の平均値は 1.13 µg/kg～236 µg/kg であり、その併行標準偏差は 0.09 µg/kg～10 µg/kg、併行相対標準偏差は 3.8 %～8.0 %、室間再現標準偏差は 0.21 µg/kg～19 µg/kg、室間再現相対標準偏差は 7.1 %～18.7 %であった。¹³C₈-PFOA を内標準物質として分析した PFOA 含量の平均値は 1.29 µg/kg～247 µg/kg であり、その併行標準偏差は 0.15 µg/kg～11 µg/kg、併行相対標準偏差は 3.7 %～11.4 %、室間再現標準偏差は 0.34 µg/kg～19 µg/kg、室間再現相対標準偏差は 6.4 %～26.6 %であった。

PFOS 及び PFOA の直鎖体及び含量それぞれについて 2 種類の内標準物質を使用したいずれの方法においても、併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は肥料等試験法附属書 A 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許容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 6-1 Statistical analysis of Collaborative study results for PFOS

Measuring compounds ^{a)}	Sample	Labs	Mean ^{c)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$2*CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$2*CRSD_R$ ⁱ⁾
		$p(q)$ ^{b)}	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	(%)
PFOS Linear chain compound / ¹³ C ₄ -PFOS	Composted sludge A	13(0)	12.8	0.6	4.9	22	1.2	9.5	44
	Composted sludge B	12(1)	49.2	0.8	1.6	22	2.9	6.0	44
	Composted sludge C	13(0)	5.17	0.26	5.0	22	0.73	14.2	44
	Composted sludge D	12(1)	16.6	0.9	5.5	22	1.7	10.2	44
	Composted sludge E	13(0)	3.81	0.39	10.1	22	0.78	20.6	44
	Dried microbes F	13(0)	1.56	0.17	10.7	22	0.28	17.7	44
PFOS Linear chain compound +Branched chain isomer / ¹³ C ₄ -PFOS	Composted sludge A	13(0)	15.9	0.7	4.5	22	1.3	8.1	44
	Composted sludge B	12(1)	59.8	1.1	1.8	22	4.0	6.7	44
	Composted sludge C	13(0)	7.14	0.35	5.0	22	0.74	10.3	44
	Composted sludge D	12(1)	23.4	1.2	5.1	22	1.9	8.2	44
	Composted sludge E	13(0)	4.81	0.28	5.9	22	0.90	18.6	44
	Dried microbes F	13(0)	2.22	0.20	9.0	22	0.49	22.1	44
PFOS Linear chain compound / ¹³ C ₈ -PFOS	Composted sludge A	13(0)	12.8	0.6	5.0	22	1.0	7.8	44
	Composted sludge B	13(0)	49.4	1.1	2.2	22	3.8	7.7	44
	Composted sludge C	13(0)	5.26	0.40	7.7	22	0.71	13.5	44
	Composted sludge D	13(0)	17.3	0.8	4.5	22	1.9	11.2	44
	Composted sludge E	12(1)	3.82	0.23	6.1	22	0.53	13.9	44
	Dried microbes F	13(0)	1.61	0.18	10.9	22	0.27	16.7	44
PFOS Linear chain compound +Branched chain isomer / ¹³ C ₈ -PFOS	Composted sludge A	13(0)	15.8	0.7	4.4	22	1.4	8.6	44
	Composted sludge B	13(0)	60.2	1.7	2.9	22	4.5	7.5	44
	Composted sludge C	13(0)	7.30	0.46	6.3	22	0.95	13.0	44
	Composted sludge D	12(1)	23.8	1.1	4.7	22	2.1	8.8	44
	Composted sludge E	13(0)	4.93	0.19	3.8	22	0.77	15.6	44
	Dried microbes F	13(0)	2.28	0.26	11.3	22	0.47	20.6	44

a) Target substances / internal standard substances

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

(n =The number of laboratories(p) \times The number of repetition(2))

c) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retain after outlier

d) Standard deviation of repeatability

e) Repeatability relative standard deviation

f) Criteria of repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

g) Standard deviation of reproducibility

h) Reproducibility relative standard deviation

i) Criteria of reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

Table 6-2 Statistical analysis of Collaborative study results for PFOA

Measuring compounds ^{a)}	Sample	Labs <i>p</i> (<i>q</i>) ^{b)}	Mean ^{e)}	<i>s</i> _r ^{d)}	<i>RSD</i> _r ^{e)}	2* <i>CRSD</i> _r ^{f)}	<i>s</i> _R ^{g)}	<i>RSD</i> _R ^{h)}	2* <i>CRSD</i> _R ⁱ⁾
			(μg/kg)	(μg/kg)	(%)	(%)	(μg/kg)	(%)	(%)
PFOA Linear chain compound / ¹³ C ₄ -PFOA	Composted sludge A	13(0)	238	10	4.3	22	24	9.9	44
	Composted sludge B	13(0)	139	5	3.7	22	11	7.6	44
	Composted sludge C	13(0)	53.3	2.1	3.9	22	3.6	6.8	44
	Composted sludge D	13(0)	18.9	0.5	2.8	22	2.0	10.4	44
	Composted sludge E	13(0)	5.97	0.31	5.2	22	0.74	12.3	44
	Dried microbes F	11(2)	1.14	0.11	9.3	22	0.22	18.9	44
PFOA Linear chain compound +Branched chain isomer / ¹³ C ₄ -PFOA	Composted sludge A	13(0)	248	10	4.2	22	25	9.9	44
	Composted sludge B	13(0)	151	6	3.8	22	10	6.7	44
	Composted sludge C	13(0)	53.6	2.1	3.9	22	3.7	6.8	44
	Composted sludge D	13(0)	19.6	0.6	2.9	22	2.1	10.8	44
	Composted sludge E	13(0)	6.11	0.36	5.8	22	0.75	12.3	44
	Dried microbes F	11(2)	1.28	0.13	10.0	22	0.36	28.5	44
PFOA Linear chain compound / ¹³ C ₈ -PFOA	Composted sludge A	13(0)	236	10	4.3	22	19	7.8	44
	Composted sludge B	13(0)	137	5	3.8	22	10	7.1	44
	Composted sludge C	13(0)	53.2	2.9	5.4	22	4.8	9.0	44
	Composted sludge D	13(0)	19.0	0.9	4.5	22	2.1	11.1	44
	Composted sludge E	13(0)	5.87	0.28	4.8	22	0.77	13.1	44
	Dried microbes F	11(2)	1.13	0.09	8.0	22	0.21	18.7	44
PFOA Linear chain compound +Branched chain isomer / ¹³ C ₈ -PFOA	Composted sludge A	13(0)	247	11	4.3	22	19	7.8	44
	Composted sludge B	13(0)	149	5	3.7	22	10	6.4	44
	Composted sludge C	13(0)	53.5	2.8	5.3	22	4.8	8.9	44
	Composted sludge D	13(0)	19.6	0.9	4.6	22	2.2	11.3	44
	Composted sludge E	13(0)	6.03	0.31	5.1	22	0.78	13.0	44
	Dried microbes F	11(2)	1.29	0.15	11.4	22	0.34	26.6	44

The foot note is shown in Table 6-1.

4. まとめ

LC-MS/MSを用いた肥料中のPFOS及びPFOAの分析法について、共同試験用試料6種類(汚泥及び汚泥に動植物原料(食品残渣、木くず等)を加え、乾燥や発酵の処理を行ったもの)を用いて13試験室による共同試験を実施し、LC-MS/MSを用いた汚泥肥料等中のPFOS及びPFOAの分析法について室間再現性の評価を行った。なお、共同試験用試料中のPFOS及びPFOA量は、直鎖体及び含量をそれぞれ算出し、PFOSについては¹³C₄-PFOS及び¹³C₈-PFOSを、PFOAについては¹³C₄-PFOA及び¹³C₈-PFOAを内標準物質として用いた。その結果、PFOS直鎖体については、平均値1.56 μg/kg~49.4 μg/kgの範囲において室間再現相対標準偏差(*RSD*_R)は6.0%~20.6%であった。PFOS含量については、平均値2.22 μg/kg~60.2 μg/kgの範囲において室間再現相対標準偏差(*RSD*_R)は6.7%~22.1%であった。PFOA直鎖体については、平均値1.13 μg/kg~238 μg/kgの範囲において室間再現相対標準偏差(*RSD*_R)は6.8%~18.9%であった。PFOA含量については、平均値1.28 μg/kg~248 μg/kgの範囲において、室間再現相対標準偏差(*RSD*_R)は6.4%~28.5%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¹⁴⁾附属書A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許容内であることから、PFOS及びPFOAの直鎖体及び含量それぞれについて2種類の内標準物質を使用した本法の精度は、いずれの方法においても肥料等試験法の性能評価標準の要求事項に適合していることが確認された。

今回検討した分析法はすでに単一試験室による試験法の妥当性確認(SLV)がされており、さらに今回の検

討で国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認(HCV)が評価されたことから、この分析法の性能は肥料等試験法における性能規準の Type B (SLV 及び HCV による評価)に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力いただきました、一般財団法人材料科学技術振興財団、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人三重県環境保全事業団、株式会社環境測定サービス 筑波研究所、株式会社島津製作所 グローバルアプリケーション開発センター、株式会社静環検査センター、公益財団法人ひょうご環境創造協会 兵庫県環境研究センター、公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所、ジーエルサイエンス株式会社 カスタマーサポートセンター、内藤環境管理株式会社、日本環境科学株式会社、三浦工業株式会社 三浦環境科学研究所の各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部：PFOS 含有廃棄物の処理に関する技術的留意事項，平成 23 年 3 月，p.1~2, p.23~39 (2011)
< <https://www.env.go.jp/recycle/misc/pfos/tptc.pdf> >
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構，経済産業省製造産業局化学物質管理課，厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課化学物質安全対策室：製品含有化学物質のリスク評価，ペルフルオロオクタン酸，令和元年 9 月，p.7~9 (2019)
< https://www.nite.go.jp/chem/risk/products_risk-PFOA_jp_full.pdf >
- 3) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 6 巻，[18]ペルフルオロオクタン酸及びその塩，平成 20 年 5 月 (2008)
< <https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/pdf/chpt1/1-2-2-18.pdf> >
- 4) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 6 巻，[19]ペルフルオロオクタンスルホン酸及びその塩，平成 20 年 5 月 (2008)
< <https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/pdf/chpt1/1-2-2-19.pdf> >
- 5) 一般財団法人化学物質評価研究機構：平成 27 年度化学物質安全対策(残留性有機汚染物質等に関する調査)報告書，【添付資料 1】PFOA とその塩及び PFOA 関連物質の残留性，生物蓄積性等に関する情報，平成 28 年 3 月 (2016)
< https://warp.da.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/11646345/www.meti.go.jp/meti_lib/report/2016fy/000052.pdf >
- 6) 経済産業省政令：化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律施行令の一部を改正する政令，令和 3 年 10 月 22 日，政令第百四十四号 (2021)
< https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/about/laws/kohu_seirei_r030421.pdf >
- 7) 経済産業省：第一種特定化学物質一覧
< https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/specified/class1specified_chemicals_list_20211022.pdf >
- 8) 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知：水質基準に関する省令の一部改正等について(施行通知)，令和 2 年 3 月 30 日，生食発 0330 第 1 号 (2020)

- < https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000160418_00005.html >
- 9) 厚生労働省健康局長通知:水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等について,平成15年10月10日,健発第1010004号,最終改正令和3年3月26日,生食発0326第8~11号(2021)
< https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000160418_00013.html >
- 10) 環境省水・大気環境局長通知:水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準等の施行について,令和2年5月28日,環水大水発第2005281号,環水大土発第2005282号(2020)
< <https://www.env.go.jp/press/files/jp/113982.pdf> >
- 11) 野添宗裕,藤井滋穂,田中周平,田中宏明,山下尚之:残留性有機フッ素化合物PFOS, PFOAの下水処理場における挙動調査,環境工学研究論文集, **43**, p.105-110(2006)
- 12) 広瀬知直,尾崎博明,谷口省吾,菅野悦治,中平亨:の下水処理過程におけるPFOSおよびPFOAの挙動について,土木学会第63回年次学術講演会要旨, p.3-4 (2008)
- 13) 白井裕治,沼寄佳奈子: LC-MS/MSを用いた汚泥肥料中のPFOS及びPFOAの分析,肥料研究報告, **14**, 123~140 (2021)
- 14) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2021)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2021.pdf >
- 15) 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)
- 16) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2) , 331~343 (1995)
- 17) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

**Performance Evaluation of Determination Method
for PFOS and PFOA in Fertilizers
by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)
: Harmonized Collaborative Validation**

NUMAZAKI Kanako¹ and SHIRAI Yuji¹

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

We conducted a collaborative study to evaluate performance of testing methods of PFOS and PFOA in fertilizer, using LC-MS/MS. PFOS and PFOA was extracted with methanol under acidic condition. The extract was purified with a weak anion exchange polymer cartridge column. We analyzed PFOS and PFOA by LC-MS/MS. We sent six samples, respectively, to 12 collaborators. They analyzed these samples as blind duplicates. The mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) for PFOS was 1.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - 60.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 6.0 % - 22.1 %, respectively. The mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) for PFOA was 1.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - 248 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 6.4% - 28.5 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of PFOS and PFOA in these concentration ranges. In conclusion, those results demonstrated the validity of these methods for PFOS and PFOA using LC-MS/MS.

Key words PFOS, PFOA, sludge, LC-MS/MS, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **15**, 66-86, 2022)

7 有機ふっ素化合物の分析

白井裕治¹, 沼寄佳奈子¹, 秋元里乃¹

キーワード 有機ふっ素化合物, PFOS, PFOA, 汚泥肥料, 液体クロマトグラフタンデム質量分析計

1. はじめに

有機ふっ素化合物(以下、「PFASs」という。また、個別の物質の名称は Table 1 に示す略号を用いる。)は、PFOS を含むペルフルオロアルキルスルホン酸(以下、「PFSAs」という。), PFOA を含むペルフルオロアルキルカルボン酸(以下、「PFCAs」という。)等の総称であり、消火剤、洗剤等を始めとし、多用途に用いられてきた。これらは結合が強固であり、環境中で分解され難く、生態蓄積することが報告されている。下水処理場における流入水中の PFOS 及び PFOA はその工程において懸濁物や汚泥に移行することが報告^{1~3)}されている。このことから、PFOS 及び PFOA の分析法を開発し、単一試験室の妥当性確認(以下、「SLV」という。)を実施した⁴⁾。SLV の検討に用いた肥料から直鎖体の PFOS 及び PFOA のみならず、分岐異性体の PFOS 及び PFOA が検出されたことから、共同試験による複数試験室の妥当性確認では、直鎖体の PFOS 及び PFOA の含有量のみならず、それらに分岐異性体の PFOS 及び PFOA の含有量を加えた合量(以下、「合量」という。)についても実施した⁵⁾。その結果、肥料等試験法⁶⁾の附属書 A の分析法の性能要件を満たしていることを確認した。

しかしながら、PFOS 及び PFOA 以外の PFASs のうち同様な用途で流通していた物質もあり⁷⁾、米国有害物質疾病登録局(ATSDR)の毒性プロファイル⁷⁾では、PFOS, PFOA, PFHxS, PFDA 及び PFUDa に発がん性があると示された。また、欧州では PFOS 及び PFOA の他に PFHxS, PFHxA, PFNA, PFDA, PFUDa, PFDaA, PFTrDA, PFTeDA 等について規制する動きがある^{8~10)}。

このことから、妥当性を確認した PFOS 及び PFOA の分析法(以下、「既報」という。)⁵⁾の試料溶液の調製操作を用いて PFASs のうち測定可能な成分を検討した。更に、適用可能であった PFASs の分析値並びに PFOS 及び PFOA の分岐鎖異性体を含む合量の分析値を取りまとめたのでその概要を報告する。

Table 1 List of PFASs included in the resent study

Component	Abbreviation	Carbon ^{a)}	Chemical formula
Perfluoroalkylsulfonic acids	PFASs		
Perfluorobutanesulfonic acid	PFBS	C4	CF ₃ (CF ₂) ₃ SO ₃ H
Perfluoropentanesulfonic acid	PFPeS	C5	CF ₃ (CF ₂) ₄ SO ₃ H
Perfluorohexanesulfonic acid	PFHxS	C6	CF ₃ (CF ₂) ₅ SO ₃ H
Perfluoroheptanesulfonic acid	PFHpS	C7	CF ₃ (CF ₂) ₆ SO ₃ H
Perfluorooctanesulfonic acid	PFOS	C8	CF ₃ (CF ₂) ₇ SO ₃ H
Perfluorononanesulfonic acid	PFNS	C9	CF ₃ (CF ₂) ₈ SO ₃ H
Perfluorodenesulfonic acid	PFDS	C10	CF ₃ (CF ₂) ₉ SO ₃ H
Perfluorododenesulfonic acid	PFDoS	C12	CF ₃ (CF ₂) ₁₁ SO ₃ H

a) Number of carbon

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

Table 1 continued

Component	Abbreviation	Carbon ^{a)}	Chemical formula
Perfluoroalkylcarboxylic acids	PFCAs		
Perfluorobutanoic acid	PFBA	C4	CF ₃ (CF ₂) ₂ COOH
Perfluoropentanoic acid	PFPeA	C5	CF ₃ (CF ₂) ₃ COOH
Perfluorohexanoic acid	PFHxA	C6	CF ₃ (CF ₂) ₄ COOH
Perfluoroheptanoic acid	PFHpA	C7	CF ₃ (CF ₂) ₅ COOH
Perfluorooctanoic acid	PFOA	C8	CF ₃ (CF ₂) ₆ COOH
Perfluorononanoic acid	PFNA	C9	CF ₃ (CF ₂) ₇ COOH
Perfluorodecanoic acid	PFDA	C10	CF ₃ (CF ₂) ₈ COOH
Perfluoroundecanoic acid	PFUDA	C11	CF ₃ (CF ₂) ₉ COOH
Perfluorododecanoic acid	PFDoA	C12	CF ₃ (CF ₂) ₁₀ COOH
Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA	C13	CF ₃ (CF ₂) ₁₁ COOH
Perfluorotetradecanoic acid	PFTeDA	C14	CF ₃ (CF ₂) ₁₂ COOH
Perfluorohexadecanoic acid	PFHxDA	C16	CF ₃ (CF ₂) ₁₄ COOH
Perfluorooctadecanoic acid	PFODA	C18	CF ₃ (CF ₂) ₁₆ COOH

a) Number of carbon

2. 材料及び方法

1) 試料の収集及び調製

汚泥肥料 86 点及び乾燥菌体肥料 10 点を試験品とし、それぞれ 40 °C で約 70 時間乾燥した後、それぞれ超遠心粉砕機 (Retsch ZM 200) で 500 μm のスクリーンを通過するまで粉砕し、混合して分析用試料を調製した。分析用試料は、ポリエチレン製袋に入れて輪ゴムで密閉し、直射日光を避け、常温で保存した。

2) 装置及び器具

- (1) 液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) : SHIMADZU LCMS-8045
 分離用カラム: GL-Sciences InertSustain C18 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm)
 ガードカラム: GL-Sciences Inertsil ODS-SP HP (内径 3.0 mm, 長さ 10 mm, 粒径 3 μm)
 ディレイカラム: GL-Sciences Delay Column for PFAS (内径 3.0 mm, 長さ 10 mm)
- (2) 超音波発生器: Yamato 8510
- (3) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (4) 超遠心分離機: AS ONE MCD-2000
- (5) 弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム: GL-Sciences InertSep MA-2 500 mg/6 mL, Waters Oasis WAX 6 cc (500 mg), Waters Oasis WAX for PFAS Analysis 6 cc (500 mg), phenomenex Strata-XL-AW 500 mg/6 mL
- (6) グラファイトカーボンカートリッジカラム: GL-Sciences InertSep Slim GC 400 mg
- (7) マニホールド: GL-Sciences, WATERS
- (8) 濃縮器具: GL-Sciences 窒素吹き付け分岐ユニット
- (9) 試験管ミキサー: AS ONE 試験管ミキサー TRIO TM-2N
- (10) 目盛り付き試験管: GL-Sciences GL-SPE 7 mL 濃縮管 (0.5 mL&1.0 mL 標線付き)
- (11) 標準液保存用ねじ口容器: Labcon 15 mL ポリプロピレン製遠沈管メタルフリータイプ

(12) LC用バイアル: WATERS ポリプロピレン製バイアル(300 μ L), セプタムレスポリエチレン製ねじ口キャップ

(13) ポリプロピレン製ねじ口試験管: GL-Sciences 50 mL DigiTUBEs, GL-Sciences 15 mL DigiTUBEs

(14) ポリプロピレン製共栓遠心沈殿管: トレフ 1.5 mL クリックキャップチューブ ナチュラル

(15) パスツールピペット: CORNING ほうけい酸ガラス製パスツールピペット(146 mm), CORNING ほうけい酸ガラス製パスツールピペット(229 mm)

3) 試薬

(1) 水: 超純水製造装置(MILLIPORE 製 Milli-Q Integral 5)を用いて精製した超純水(比抵抗値 18 M Ω cm 以上)を使用した. JIS K 0557 に規定する A4 の水

(2) メタノール: 残留農薬・PCB 試験用(5000 倍濃縮)(富士フィルム和光純薬)

(3) メタノール(器具洗浄用): JIS K 8891 特級試薬(富士フィルム和光純薬)

(4) アセトニトリル(溶離液用): LC-MS 用試薬(富士フィルム和光純薬)

(5) アンモニア水: JIS K 8085 特級試薬(濃度(NH₃)質量分率 28 %)(富士フィルム和光純薬)

(6) ぎ酸: JIS K 8264 特級試薬(濃度(HCOOH)質量分率 98 %以上)(関東化学)

(7) 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L): 高速液体クロマトグラフ用試薬.(富士フィルム和光純薬)

(8) 酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L): 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L)を水で 100 倍に希釈した.

(9) メタノール-水(1+1):(2)のメタノールの体積 1 と水の体積 1 とを混合した.

(10) アンモニア水-メタノール(1+100):(5)のアンモニア水の体積 1 と(2)のメタノールの体積 100 とを混合した.

(11) PFASs 標準液: PFAC-MXC (8 成分の PFASs 及び 13 成分の PFCAs 混合溶液, それらの成分及び濃度は Table 2 参照, 1.2 mL メタノール溶液)(WELLINGTON) 1 mL の PFAC-MXC を 10mL 全量フラスコに入れ, 標線までメタノールを加えて PFASs 標準溶液(200 ng/mL)を調製した.

(12) ¹³C₄-PFOS 内標準液: MPFOS (Sodium perfluoro-1-[1,2,3,4-¹³C₄]- octanesulfonate 1.2 mL)(WELLINGTON) 1 mL を 50 mL 全量フラスコにとり, 標線までメタノールを加えて ¹³C₄-PFOS 内標準液(1 μ g/mL)を調製した.

(13) ¹³C₈-PFOS 内標準液: M8PFOS (Sodium perfluoro-1-[¹³C₈]- octanesulfonate 1.2 mL)(WELLINGTON) 1 mL を 50 mL 全量フラスコにとり, 標線までメタノールを加えて ¹³C₈-PFOS 内標準液(1 μ g/mL)を調製した.

(14) ¹³C₄-PFOA 内標準液: MPFOA (Perfluoro-n-[1,2,3,4-¹³C₄]-octanoic acid 1.2 mL)(WELLINGTON) 1 mL を 50 mL 全量フラスコにとり, 標線までメタノールを加えて ¹³C₄-PFOA 内標準液(1 μ g/mL)を調製した.

(15) ¹³C₈-PFOA 内標準液: M8PFOA (Perfluoro-n-[¹³C₈]-octanoic acid 1.2 mL)(WELLINGTON) 1 mL を 50 mL 全量フラスコにとり, 標線までメタノールを加えて ¹³C₈-PFOA 内標準液(1 μ g/mL)を調製した.

(16) ¹³C-混合内標準液: ¹³C₄-PFOS 内標準液(1 μ g/mL) 10 mL, ¹³C₈-PFOS 内標準液(1 μ g/mL) 10 mL, ¹³C₄-PFOA 標準液(1 μ g/mL) 10 mL 及び ¹³C₈-PFOA 内標準液(1 μ g/mL) 10 mL を 50 mL 全量フラスコにとり混合し, 標線までメタノールを加えて ¹³C-混合内標準液(200 ng/mL)を調製した.

(17) 検量線用混合標準液(0.1 ng/mL~50 ng/mL): PFASs 標準液(200 ng/mL)を水で希釈して

PFASs 標準液 (100 ng/mL) を調製し, PFASs 標準液 (100 ng/mL) をメタノール-水 (1+1) で 10 倍及び 100 倍に希釈し, PFASs 標準液 (10 ng/mL) 及び (1 ng/mL) を調製した. ^{13}C -混合内標準液 (200 ng/mL) 2.5 mL を 25 mL 全量フラスコにとり, 標線までメタノール-水 (1+1) を加えて混合内標準液 (20 ng/mL) を調製した.

PFASs 標準液 (100 ng/mL) の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を 10 mL 全量フラスコに段階的にとり, ^{13}C -混合内標準液 (20 ng/mL) 1 mL をそれぞれ加え, 標線までメタノール-水 (1+1) を加えた. PFASs 標準液 (10 ng/mL) の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を 10 mL 全量フラスコに段階的にとり, ^{13}C -混合内標準液 (20 ng/mL) 1 mL を加え, 標線までメタノール-水 (1+1) をそれぞれ加えた. PFASs 標準液 (1 ng/mL) の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を 10 mL 全量フラスコに段階的にとり, ^{13}C -混合内標準液 (20 ng/mL) 1 mL をそれぞれ加え, 標線までメタノール-水 (1+1) を加えた.

(18) 分析試料添加用 ^{13}C -混合内標準液: ^{13}C -混合内標準液 (200 ng/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり, 標線までメタノールを加えて分析試料添加用 ^{13}C -混合内標準液 (20 ng/mL) を調製した. 分析試料添加用 ^{13}C -混合内標準液 (20 ng/mL) 5 mL を 50 mL 全量フラスコにとり, 標線までメタノールを加えて試験検討用 ^{13}C -混合内標準液 (2 ng/mL) を調製した.

(19) 試験検討用 PFASs 標準液: PFASs 標準液 (200 ng/mL) を 2 倍, 20 倍及び 100 倍にメタノールで希釈し, 試験検討用 PFASs 標準液 (100 ng/mL, 10 ng/mL 及び 2 ng/mL) を調製した. 試験検討用 PFASs 標準液 (100 ng/mL) 1 mL を 100 mL 全量フラスコにとり, 標線までメタノール-水 (1+1) を加えて試験検討用 PFASs 標準液 (1 ng/mL) を調製した (精製操作の検討用).

なお, 上記 (11) ~ (19) の標準液は, ねじ口試験管 (ポリプロピレン製) に移し入れ, 検討期間中 8 °C 以下で保管した.

Table 2 Components of PFASs standard solution and their concentrations

Abbreviation	PFASs			PFCAs	
	Concentration (ng/mL)		coefficient (Acid/Salt)	Concentration (ng/mL)	
	as salt	as acid		Abbreviation	as acid
PFBS	2000	1770	0.885	PFBA	2000
PFPeS	2000	1880	0.940	PFPeA	2000
PFHxS	2000	1900	0.950	PFHxA	2000
PFHpS	2000	1910	0.955	PFHpA	2000
PFOS	2000	1920	0.960	PFOA	2000
PFNS	2000	1920	0.960	PFNA	2000
PFDS	2000	1930	0.965	PFDA	2000
—	—	—	—	PFUdA	2000
PFDoS	2000	1940	0.970	PFDoA	2000
—	—	—	—	PFTriDA	2000
—	—	—	—	PFTeDA	2000
—	—	—	—	PFHxDA	2000
—	—	—	—	PFODA	2000

4) 分析操作

(1) 抽出

分析試料 2.00 g をはかりとって 50 mL ねじ口試験管(A)に入れ, 分析試料添加用 ^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL)1 mL を加えた. 更に, メタノール 15 mL 及びぎ酸 0.1 mL を加え, 超音波発生器を用いて 20 分間超音波処理し, 遠心力約 $1700\times g$ で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を 50 mL ねじ口試験管(B)に移した. さらに, この操作を 2 回繰返し, 上澄み液をねじ口試験管(B)に加えた. 50 mL ねじ口試験管(B)の目盛までメタノールを加え, 抽出液とした.

(2) クリーンアップ

弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムを予めアンモニア水-メタノール(1+100)約 5 mL, メタノール約 5 mL 及びメタノール-水(1+1)約 5 mL で順次洗浄した. また, グラファイトカーボンカートリッジカラムを予めメタノール約 5 mL で洗浄した.

抽出液 5 mL を 15 mL ねじ口試験管(C)にとり, 水 5 mL を加えて振り混ぜ(浮遊物又は沈降物がある場合は遠心力約 $1700\times g$ で約 5 分間遠心分離し), 弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに負荷し, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. ねじ口試験管(C)をメタノール-水(1+1)約 5 mL で洗浄し, 洗液を同じカラムに負荷し, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 更にメタノール約 5 mL を 2 回弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに加え, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. グラファイトカーボンカートリッジカラムを弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムの下に連結し, アンモニア水-メタノール(1+100)2 mL を加え, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 目盛付き試験管(D)をカートリッジカラムの下に置き, アンモニア水-メタノール(1+100)4 mL をカートリッジカラムに加えて PFOS, PFOA 及びそれらの内標準物質を溶出させた.

窒素ガスを溶出液に穏やかに吹き付け, 0.5 mL の目盛まで濃縮し, 水約 0.4 mL を加え, 試験管ミキサーで振り混ぜ, 更に 1 mL の目盛まで水を加え, 試験管ミキサーで振り混ぜ, 1.5 mL 共栓遠心沈殿管(E)に入れた. 遠心力 $8000\times g$ で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を試料溶液とした. 概要を Scheme 1-1 及び Scheme 1-2 に示した.

5) 測定

各検量線用混合標準液及び試料溶液を LC-MS/MS に注入し, Table 3-1 及び Table 3-2 の測定条件に従って各イオンの選択反応検出(MRM: Multiple Reaction Monitoring)クロマトグラムを記録し, それぞれのピーク面積を求めた. 各成分とそれらの内標準物質の定量用イオンのピーク面積比を算出した. 各検量線用混合標準液の各成分の濃度と求めたピーク面積比の重み付け($1/x^2$)検量線を作成し, 試料溶液中の各成分の濃度を求め, 分析試料中の各成分の濃度を算出した.

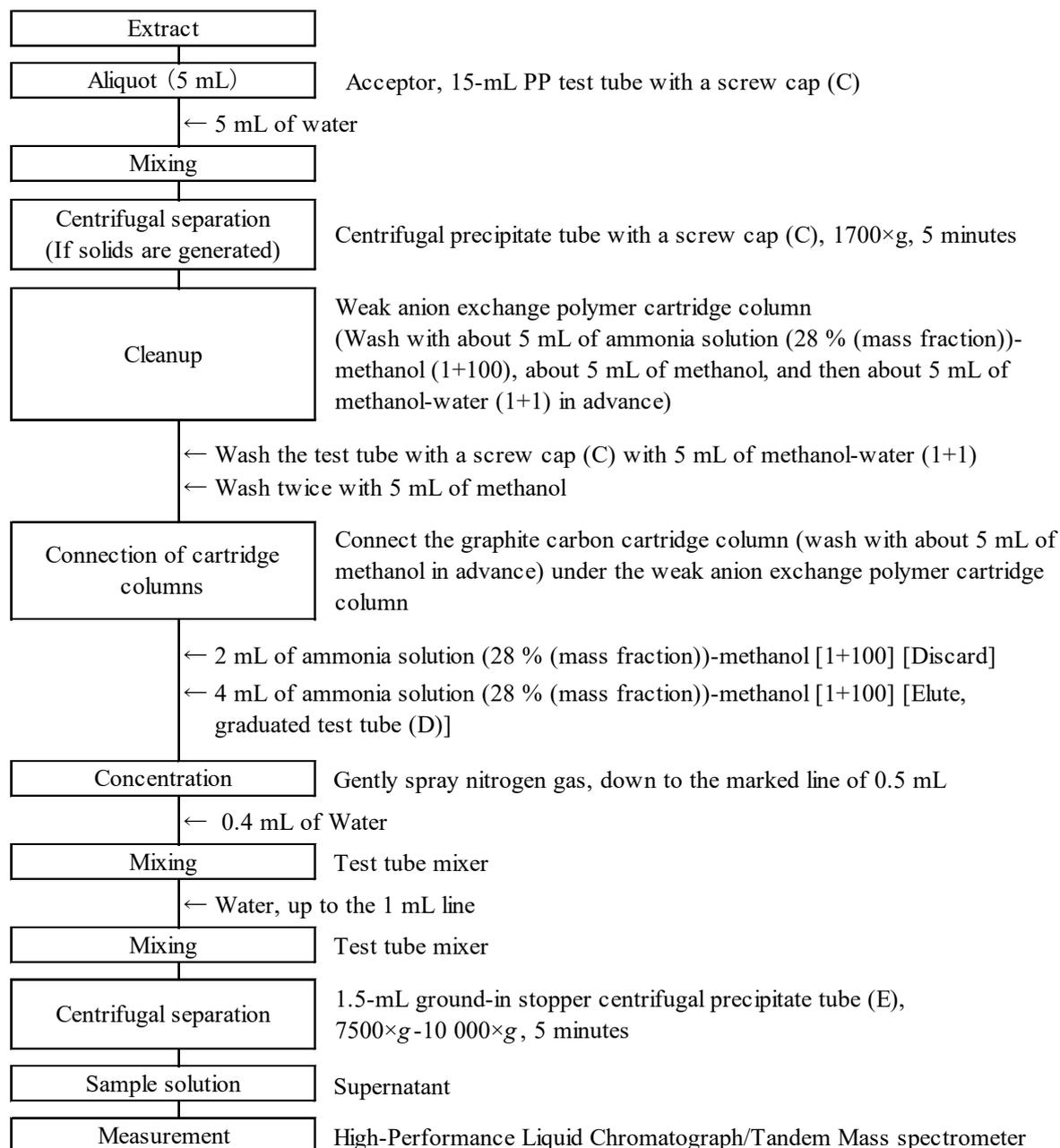
各検量線用混合標準液及び試料溶液の各成分とそれらの内標準物質の定量用イオンと確認用イオンのピーク面積比を算出して比較した.

Table 3-1 Operating conditions of LC-MS/MS

[HPLC conditions] SHIMADZU Nexera Series	
Delay column:	Delay Column for PFAS (3.0 mm I.D., 10 mm L)
Guard column:	Cartridge Guard Column E Inertsil (3.0 mm I.D., 10 mm L, 3 μm)
Analytical column:	InertSustain C18 (2.1 mm I.D., 150 mm L, 3 μm)
Mobile phase (A):	A: 10 mmol/L ammonium acetate solution B: Acetonitrile
Gradient program:	0 min (20 %B)→2.0 min (20 %B)→15 min (100 %B)→ 16 min (100 %B)→16.1 min (20 %B)→21 min (20 %B)
Flow rate:	0.3 mL/min
Column temperature:	40 °C
Injection volume:	5 μL
[MS conditions] SHIMADZU LCMS-8045	
Ionization:	Electrospray ionization (ESI)
Mode:	Positive
Probe voltage:	-1 kV
DL temperature:	200 °C
Heat block temperature:	300 °C
Interface temperature:	300 °C
Nebulizing gas flow:	3 L/min
Drying gas flow:	5 L/min
Heating gas flow:	15 L/min

Table 3-2 MRM parameters for detection of PFASs

Abbreviation	For determination			For validation		
	Precursor ion <i>m/z</i>	Product ion <i>m/z</i>	Collision energy (eV)	Precursor ion <i>m/z</i>	Product ion <i>m/z</i>	Collision energy (eV)
PFBS	298.9	80	33	298.9	99.0	28
PFPeS	348.9	80	44	348.9	98.9	33
PFHxS	399	80	44	399.0	99.0	35
PFHpS	448.9	80	51	448.9	98.9	38
PFOS	498.8	80	54	498.8	98.9	44
¹³ C ₄ -PFOS	502.8	80	52	502.8	98.9	45
¹³ C ₈ -PFOS	506.8	80	54	506.8	99.0	46
PFNS	548.9	80	55	548.9	99.0	46
PFDS	598.9	80	55	598.9	99.0	51
PFDoS	698.9	80	55	698.9	98.9	55
PFBA	212.9	169	10	—	—	—
PFPeA	262.9	219	8	—	—	—
PFHxA	312.9	269	8	312.9	119.0	19
PFHpA	362.9	319	9	363.0	169.0	16
PFOA	413	169	18	412.8	369.0	10
¹³ C ₄ -PFOA	416.9	169	18	416.8	372.0	10
¹³ C ₈ -PFOA	420.9	172	19	421.1	376.0	9



Scheme 1-2 Flow sheet for PFASs in sludge fertilizers (Cleanup and measurement procedures)

3. 結果及び考察

1) LC-MS/MS の測定条件の検討

PFASs の分離のために既報⁵⁾で検討した分離カラム等を用い、グラジエント等の LC 条件は使用した分離カラムのアプリケーション¹¹⁾を参考に設定し、また、MS/MS のイオン化法、イオン化モード等は既報の条件を用いた (Table 3-1) . ¹³C 標識及び非標識の PFOS 並びに PFOA は既報で最適化したモニターイオンを用いた. その他の成分のモニターイオンについては、LC-MS/MS (SHIMADZU LCMS-8050) のアプリケーション¹²⁾を参考に設定し、更に PFASs 標準液 (200 ng/mL) を用いて、それぞれの成分の最適化を実施して測定条件を Table 3-2 のとおり作成した.

検量線用混合標準液 (50 ng/mL) 及び試料溶液 (汚泥肥料) について 2. 4) (3) に従って測定して得ら

れたクロマトグラムを Fig. 1-1 及び Fig. 1-2 に示した. PFOS 及び PFOA の直鎖体のピークの保持時間は約 11.65 分及び約 9.82 分で, 試料溶液では PFOS 及び PFOA の分岐異性体のピークを分離できた.

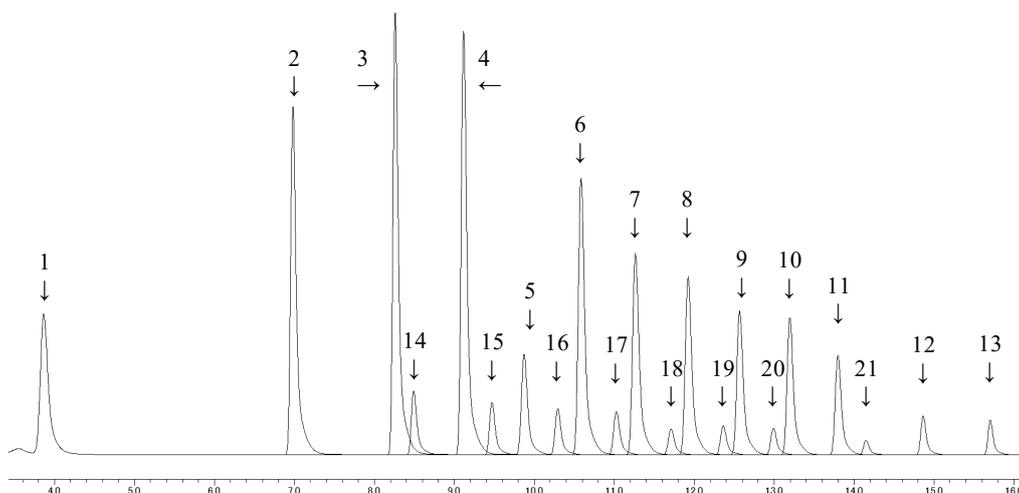


Fig 1-1 MRM chromatogram of PFASs in a mixed standard solution, with each PFAS at 50 ng/mL

Peak position (↓→←)

1. PFBA 2. PFPeA 3. PFHxA 4. PFHpA 5. PFOA 6. PFNA 7. PFDA 8. PFUdA
9. PFDaA 10. PFTrDA 11. PFTeDA 12. PFHxDA
13. PFODA 14. PFBS 15. PFPeS 16. PFHxS 17. PFHpS 18. PFOS 19. PFNS
20. PFDS 21. PFDoS

Condition of LC-MS/MS As shown in Table 3-1 and Table 3-2.

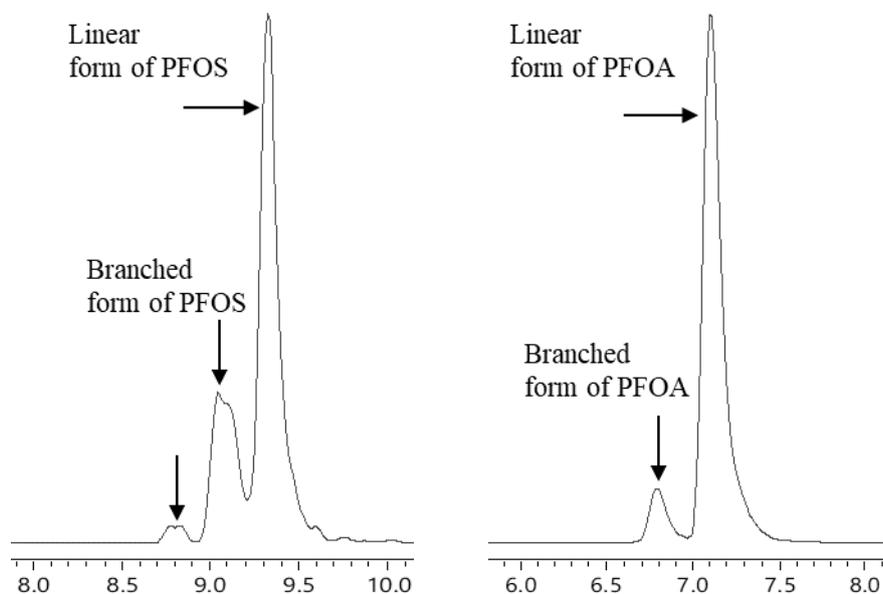


Fig 1-2 MRM chromatograms of PFOS and PFOA in a sample solution extracted Sludge fertilizer

Condition of LC-MS/MS As shown in Table 3-1 and Table 3-2.

各検量線用混合標準液(PFASsとして0.5 ng/mL~50 ng/mL含有, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, $^{13}\text{C}_8$ -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA

及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA として各 2 ng/mL 含有)について 2 回測定し, 8 成分の PFSA 是 $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 又は $^{13}\text{C}_8$ -PFOS に対するピーク面積比, また, 13 成分の PFCA 是 $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 又は $^{13}\text{C}_8$ -PFOA ピーク面積比をもとめ¹³⁾, 各 PFASs 濃度とそれら面積比の重み付け ($1/x^2$) 検量線を作成し, その回帰式の係数及び決定係数を Table 4 に示した. その結果, PFDoS, PFHxDA 及び PFODA を除く PFASs の 18 成分の検量線のパラメータは肥料等試験法 (2021)⁶⁾ 附属書 A に示されている基準を満たしていた. なお, 参考のため, PFOS 及び PFOA の濃度 - 内標準ピーク面積比の検量線を Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 に示し, それらの標準残差を Fig. 3-1 及び Fig. 3-2 に示した.

Table 4 Calibration Curve

Analytes		Isotope abbreviation ^{a)}	Linear equation ^{b)}		Confidence interval of a ^{c,d)}		Coefficient of determination ^{e)} r^2
Abbreviation	Range (ng/mL)		Inclination b	Intercept a	Lower limit	Upper limit	
PFBS	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	0.852	0.008	-0.018	0.033	0.997
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	0.949	0.001	-0.028	0.030	0.997
PFPeS	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	0.655	-0.005	-0.030	0.020	0.993
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	0.727	-0.008	-0.036	0.020	0.993
PFHxS	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	0.583	0.001	-0.023	0.026	0.991
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	0.647	0.000	-0.028	0.027	0.991
PFHpS	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	0.593	0.015	-0.009	0.039	0.994
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	0.659	0.014	-0.013	0.040	0.994
PFOS	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	0.425	-0.012	-0.018	0.006	0.998
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	0.454	-0.003	-0.019	0.013	0.994
PFNS	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	0.477	-0.008	-0.021	0.005	0.996
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	0.529	-0.010	-0.026	0.065	0.999
PFDS	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	0.422	0.009	-0.004	0.022	0.995
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	0.467	0.009	-0.002	0.015	0.999
PFDoS	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	0.229	-0.002	-0.021	0.016	0.969
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	0.254	-0.003	-0.023	0.017	0.970
PFBA	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	0.337	-0.003	-0.013	0.007	0.995
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOA	0.293	-0.004	-0.015	0.007	0.993
PFPeA	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	0.695	0.002	-0.015	0.019	0.997
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOA	0.603	-0.001	-0.017	0.016	0.996
PFHxA	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	0.844	0.007	-0.015	0.029	0.997
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOA	0.732	0.003	-0.022	0.028	0.994
PFHpA	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	0.860	0.013	-0.007	0.033	0.997
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOA	0.745	0.008	-0.003	0.019	0.999
PFOA	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	0.518	0.002	-0.009	0.013	0.998
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOA	0.450	0.000	-0.012	0.011	0.997
PFNA	0.1 - 50	$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	0.606	0.014	-0.005	0.033	0.995
		$^{13}\text{C}_8$ -PFOA	0.450	0.000	-0.012	0.011	0.997

a) Calibration standard solution containing 2 ng as each isotope performance PFOS and PFOA

b) Linear equation $y=bx+a$

c) Confidence interval 95%

d) Recommended criteria shown in Testing Methods for Fertilizers (2021) (lower limit $\leq 0 \leq$ upper limit)

e) Coefficient of determination usable as calibration curve shown in Testing Methods for Fertilizers (2021) ($r^2 \geq 0.99$)

f) Unable to create calibration curve

Table 4 continued

Analytes		Isotope abbreviation ^{a)}	Linear equation ^{b)}		Confidence interval of a ^{c,d)}		Coefficient of determination ^{e)} r^2
Abbreviation	Range (ng/mL)		Inclination b	Intercept a	Lower limit	Upper limit	
PFDA	0.1 - 50	¹³ C ₄ -PFOA	0.495	0.013	-0.004	0.031	0.994
		¹³ C ₈ -PFOA	0.524	0.009	0.000	0.017	0.999
PFUdA	0.1 - 50	¹³ C ₄ -PFOA	0.446	0.016	-0.007	0.038	0.990
		¹³ C ₈ -PFOA	0.390	0.011	-0.003	0.026	0.994
PFDoA	0.1 - 50	¹³ C ₄ -PFOA	0.406	0.014	-0.001	0.029	0.993
		¹³ C ₈ -PFOA	0.351	0.010	-0.002	0.018	0.997
PFTrDA	0.1 - 50	¹³ C ₄ -PFOA	0.300	0.007	-0.005	0.018	0.993
		¹³ C ₈ -PFOA	0.258	0.005	-0.002	0.011	0.997
PFTeDA	0.1 - 50	¹³ C ₄ -PFOA	0.228	-0.004	-0.014	0.007	0.990
		¹³ C ₈ -PFOA	0.197	-0.004	-0.011	0.003	0.994
PFHxDA	0.1 - 50	¹³ C ₄ -PFOA	— ^{f)}	—	—	—	—
		¹³ C ₈ -PFOA	—	—	—	—	—
PFODA	0.1 - 50	¹³ C ₄ -PFOA	—	—	—	—	—
		¹³ C ₈ -PFOA	—	—	—	—	—

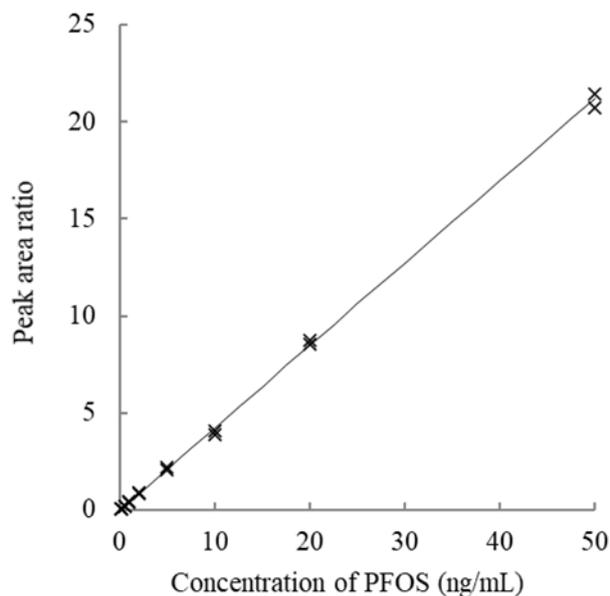


Fig. 2-1 PFOS calibration curve

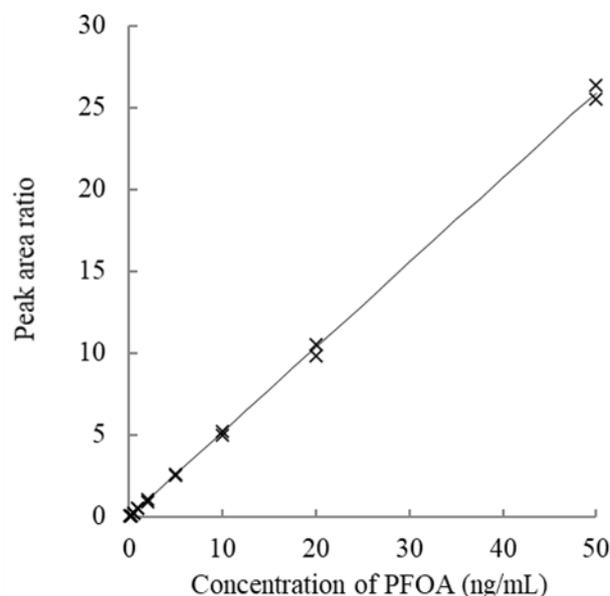


Fig. 2-2 PFOA calibration curve

×: Plot of peak area ratio of native to isotope performance analyte at each native analyte concentration (Concentration of isomer performance analytes: Each 2 ng/mL)

Solid line: Regression line

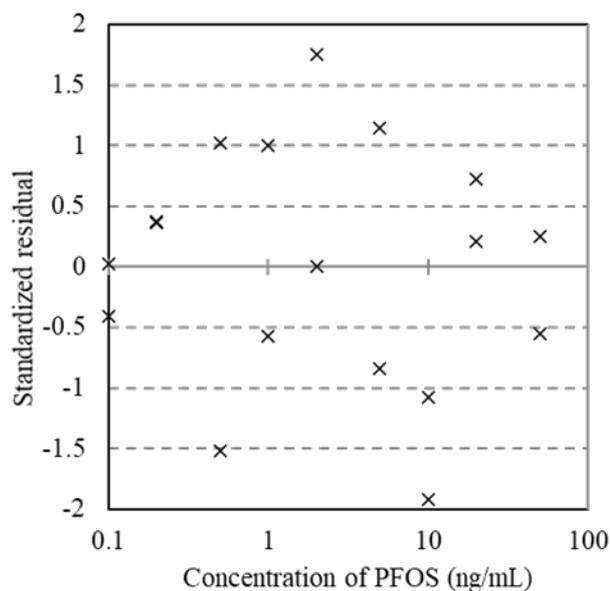


Fig.3-1 Evaluation of PFOS calibration curve

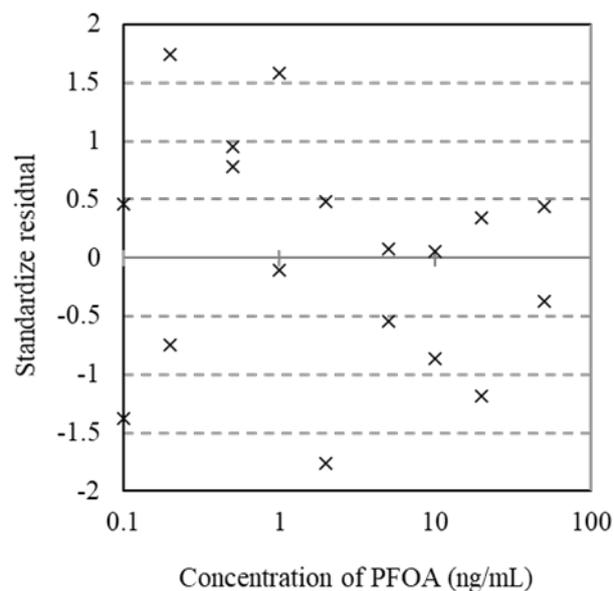


Fig.3-2 Evaluation of PFOA calibration curve

×: Plot of the standardized residual of peak area ratio at each native analyte concentration

2) 精製操作の検討

筆者らは、既報⁵⁾と同様に、ルアーデバイス型のグラファイトカーボンカートリッジカラム(InertSep Slim GC)を用いて、弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムの下に連結して使用し、PFOS 及び PFOA の溶出する画分について PFASs を測定した。

PFASs 濃度が各 1 ng/mL となるように調製したメタノール-水(1+1)溶液 10 mL を **2.4)** (2) クリーンアップの操作に用いる 4 種類の弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム(InertSep MA-2, Oasis WAX, Oasis WAX for PFAS Analysis, Strata-XL-AW) にそれぞれ負荷し、以下同様にメタノール-水(1+1) 及びメタノール 10 mL での洗浄操作をした。グラファイトカーボンカートリッジカラムを連結した後、溶出溶媒 1 mL を 8 回それぞれのカラムに加え、各流出液をそれぞれの濃縮管にとった。

各流出液に試験検討用 ¹³C-混合内標準液(2 ng/mL) 1 mL を加え、濃縮及び水による希釈をして試料液とし、18 成分の PFASs を測定した。その結果、Table 5 のとおり、各 PFASs は流出画分 0 mL~2 mL では溶出せず、流出画分 2 mL~6 mL で溶出した。PFTrDA 及び PFTeDA を除く 16 成分の PFASs の回収率は、72.3 %~119.7 %であった。PFTrDA 及び PFTeDA の回収率は 70 %未満であったので今後の検討からは外すこととした。

Table 5 Elution pattern of PFASs^{a)} from the cleanup column^{b)}

Abbreviation	The name of the cleanup column at the top ^{c)}	Elution amount of PFASs (ng)								Recovery (%)	
		Fraction volume (mL)									
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8		Total ^{d)}
PFBS	InertSep MA-2	— ^{e)}	—	—	7.4	1.4	—	—	—	8.8	88.0
	Oasis WAX	—	—	—	0.3	8.5	0.5	—	—	9.3	92.8
	Oasis WAX(P) ^{f)}	—	—	—	0.7	7.1	2.5	—	—	10.3	103.4
	Strata-XL-AW	—	—	1.8	7.0	0.2	—	—	—	9.0	89.9
PFPeS	InertSep MA-2	—	—	0.2	8.1	1.3	0.1	—	—	9.7	97.1
	Oasis WAX	—	—	0.5	8.9	0.5	—	—	—	10.0	100.0
	Oasis WAX(P)	—	—	0.9	8.4	1.9	0.1	—	—	11.4	114.2
	Strata-XL-AW	—	—	2.5	7.3	0.2	—	—	—	9.9	99.0
PFHxS	InertSep MA-2	—	—	0.3	8.5	1.1	—	—	—	9.9	99.0
	Oasis WAX	—	—	1.0	8.5	0.5	—	—	—	10.1	100.6
	Oasis WAX(P)	—	—	0.7	8.9	1.1	—	—	—	10.7	106.9
	Strata-XL-AW	—	—	2.7	6.7	0.1	—	—	—	9.6	95.8
PFHpS	InertSep MA-2	—	—	0.4	8.4	0.8	—	—	—	9.7	97.0
	Oasis WAX	—	—	1.7	7.9	—	—	—	—	9.6	96.0
	Oasis WAX(P)	—	—	0.5	8.3	0.8	—	—	—	9.6	96.3
	Strata-XL-AW	—	—	2.9	6.4	—	—	—	—	9.3	93.2
PFOS	InertSep MA-2	—	—	0.7	7.9	0.8	—	—	—	9.4	93.8
	Oasis WAX	—	—	2.4	7.0	0.1	—	—	—	9.6	95.6
	Oasis WAX(P)	—	—	0.7	8.3	0.4	—	—	—	9.3	93.3
	Strata-XL-AW	—	—	2.8	6.1	0.1	—	—	—	9.1	91.0
PFNS	InertSep MA-2	—	—	0.8	8.4	0.6	—	—	—	9.8	98.1
	Oasis WAX	—	—	3.0	6.0	0.1	—	—	—	9.1	91.0
	Oasis WAX(P)	—	—	1.0	7.7	0.5	—	—	—	9.2	91.8
	Strata-XL-AW	—	—	3.1	5.8	0.2	—	—	—	9.0	90.3
PFDS	InertSep MA-2	—	—	1.0	8.1	0.5	—	—	—	9.5	95.0
	Oasis WAX	—	—	3.1	5.8	—	—	—	—	8.9	88.8
	Oasis WAX(P)	—	—	1.2	7.2	0.4	—	—	—	8.8	88.0
	Strata-XL-AW	—	—	2.7	5.7	0.1	—	—	—	8.4	84.5
PFBA	InertSep MA-2	—	—	1.6	8.3	—	—	—	—	9.9	98.6
	Oasis WAX	—	—	3.0	7.9	—	—	—	—	10.9	109.1
	Oasis WAX(P)	—	—	1.4	8.9	1.6	—	—	—	12.0	119.7
	Strata-XL-AW	—	—	3.1	6.5	—	—	—	—	9.7	96.5
PFPeA	InertSep MA-2	—	—	2.3	6.7	—	—	—	—	9.0	89.9
	Oasis WAX	—	—	4.0	5.8	—	—	—	—	9.9	98.6
	Oasis WAX(P)	—	—	2.1	7.8	1.3	—	—	—	11.2	112.2
	Strata-XL-AW	—	—	3.5	5.5	—	—	—	—	8.9	89.4

a) Each PFASs was loaded with 20 ng.

b) Cleanup column with the graphite carbon cartridge column (InertSep Slim GC) connected under the anion exchange polymer cartridge column

c) The anion exchange polymer cartridge column

d) Total amount of PFASs eluted from 2 mL to 6 mL

e) Less than the lower limit (0.1 ng / mL) of calibration curve

f) Oasis WAX for PFASs Analysis

Table 5 Continued

Abbreviation	The name of the cleanup column at the top ^{c)}	Elution amount of PFASs (ng)								Recovery (%)	
		Fraction volume (mL)									
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8		Total ^{d)}
PFHxA	InertSep MA-2	—	—	3.3	5.8	—	—	—	—	9.1	91.1
	Oasis WAX	—	—	5.0	4.8	—	—	—	—	9.8	98.2
	Oasis WAX(P)	—	—	3.1	7.2	1.1	—	—	—	11.3	113.3
	Strata-XL-AW	—	—	3.9	4.9	—	—	—	—	8.8	88.2
PFHpA	InertSep MA-2	—	—	4.1	5.0	—	—	—	—	9.1	91.3
	Oasis WAX	—	—	6.0	4.0	—	—	—	—	10.0	99.7
	Oasis WAX(P)	—	—	3.7	6.5	0.5	—	—	—	10.7	107.1
	Strata-XL-AW	—	—	4.2	4.7	—	—	—	—	8.9	89.4
PFOA	InertSep MA-2	—	—	4.8	4.4	—	—	—	—	9.2	91.8
	Oasis WAX	—	—	6.4	3.5	—	—	—	—	9.9	99.1
	Oasis WAX(P)	—	—	4.2	5.3	—	—	—	—	9.5	94.9
	Strata-XL-AW	—	—	4.2	4.3	—	—	—	—	8.5	84.8
PFNA	InertSep MA-2	—	—	5.1	3.7	—	—	—	—	8.8	87.8
	Oasis WAX	—	—	6.6	2.8	—	—	—	—	9.4	94.5
	Oasis WAX(P)	—	—	4.2	4.5	—	—	—	—	8.7	87.0
	Strata-XL-AW	—	—	4.4	4.3	—	—	—	—	8.7	87.2
PFDA	InertSep MA-2	—	—	5.5	3.6	—	—	—	—	9.1	91.3
	Oasis WAX	—	—	6.9	2.6	—	—	—	—	9.6	95.5
	Oasis WAX(P)	—	—	4.6	4.2	—	—	—	—	8.9	88.5
	Strata-XL-AW	—	—	4.4	4.0	—	—	—	—	8.4	83.9
PFUdA	InertSep MA-2	—	—	5.4	3.3	—	—	—	—	8.8	87.6
	Oasis WAX	—	—	7.0	2.3	—	—	—	—	9.3	92.7
	Oasis WAX(P)	—	—	4.5	3.9	—	—	—	—	8.4	83.9
	Strata-XL-AW	—	—	4.3	3.8	—	—	—	—	8.1	81.0
PFDoA	InertSep MA-2	—	—	4.3	3.0	—	—	—	—	7.2	72.3
	Oasis WAX	—	—	5.7	1.9	—	—	—	—	7.6	75.9
	Oasis WAX(P)	—	—	4.0	3.3	—	—	—	—	7.4	73.7
	Strata-XL-AW	—	—	3.7	3.7	—	—	—	—	7.4	74.0
PFTrDA	InertSep MA-2	—	—	2.5	3.0	—	—	—	—	5.5	54.7
	Oasis WAX	—	—	3.7	1.8	—	—	—	—	5.5	54.8
	Oasis WAX(P)	—	—	3.2	3.1	—	—	—	—	6.3	63.4
	Strata-XL-AW	—	—	3.0	3.8	—	—	—	—	6.8	67.7
PFTeDA	InertSep MA-2	—	—	—	2.9	—	—	—	—	2.9	29.0
	Oasis WAX	—	—	0.7	2.1	—	—	—	—	2.8	28.1
	Oasis WAX(P)	—	—	0.9	2.8	—	—	—	—	3.7	37.3
	Strata-XL-AW	—	—	0.7	3.5	—	—	—	—	4.2	41.9

3) 添加回収試験による真度の評価及び定量下限等の推定

真度を評価するため、汚泥肥料にそれぞれ 1 µg/kg, 5 µg/kg 及び 50 µg/kg 相当量を添加した試料を用い、4 種類の弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムについて 3 点併行でそれぞれ添加回収試験を実施した結果を Table 6 に示した。

その結果、3.2) で満足する結果が得られた 16 成分の PFASs の平均回収率は、1 µg/kg～50 µg/kg の

範囲で 65.2 %~124.8 %であり、いずれも肥料等試験法(2021)⁶⁾に示されている真度の目標範囲以内であった。

Table 6 Result of recovery test

Analytes		InertSep MA-2		Oasis WAX		Oasis WAX (P) ^{a)}		Strata-XL-AW	
Abbreviation	Concentration ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mean ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ^{d)} (%)	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)
PFBS	50	47.5	95.1	50.6	101.1	49.2	98.5	48.3	96.6
	5	4.87	97.3	4.68	93.6	4.79	95.8	5.10	102.1
	1	0.74	73.6	0.84	84.0	0.91	91.0	0.86	86.1
PFPeS	50	47.3	94.5	54.6	109.2	53.3	106.6	51.5	103.0
	5	4.95	99.0	5.12	102.4	5.19	103.8	5.44	108.9
	1	0.73	72.7	0.66	66.3	0.89	89.3	0.86	86.2
PFHxS	50	49.6	99.1	53.6	107.1	52.5	105.0	49.9	99.9
	5	5.00	100.0	5.00	99.9	5.13	102.7	5.60	112.0
	1	1.00	99.9	0.77	77.0	0.88	88.0	0.66	65.9
PFHpS	50	51.4	102.9	53.4	106.7	52.9	105.9	51.5	103.0
	5	5.32	106.4	5.04	100.9	5.06	101.2	5.41	108.1
	1	0.87	86.6	0.73	72.5	0.63	63.3	0.76	76.5
PFOS	50	52.3	104.6	49.4	98.7	50.6	101.1	49.7	99.5
	5	5.43	108.6	4.91	98.3	4.85	97.0	4.93	98.6
	1	0.99	98.8	0.91	91.3	0.88	88.2	0.94	94.4
PFNS	50	48.4	96.8	35.1	70.2	38.0	76.0	39.7	79.5
	5	5.21	104.3	3.87	77.5	4.01	80.3	3.89	77.7
	1	0.89	88.9	0.90	90.5	0.92	91.6	0.91	91.2
PFDS	50	45.2	90.4	35.5	71.0	36.8	73.6	36.7	73.4
	5	4.90	98.0	3.36	67.2	4.05	80.9	3.24	64.7
	1	0.85	85.0	0.79	79.2	0.82	82.1	0.74	74.5
PFBA	50	53.5	107.0	50.5	101.0	50.9	101.8	50.9	101.7
	5	5.65	113.1	5.50	110.0	5.80	116.0	5.92	118.5
	1	1.04	103.5	1.16	115.5	1.01	100.5	0.89	89.1
PFPeA	50	50.7	101.4	48.0	96.0	48.4	96.7	47.9	95.8
	5	5.33	106.6	4.95	99.0	5.13	102.6	5.19	103.8
	1	1.16	116.0	1.18	118.2	1.24	123.9	1.25	124.8
PFHxA	50	49.4	98.8	48.5	97.0	49.0	97.9	48.6	97.1
	5	5.06	101.1	5.18	103.7	5.43	108.7	5.45	109.0
	1	1.04	103.6	0.94	93.5	0.97	97.4	0.97	97.4

a) Oasis WAX for PFASs Analysis

b) The concentration of PFASs spiked to the sample

c) Mean value ($n=3$)

d) Tolerance range of recovery rate shown in Testing Methods for Fertilizers (2021)

(70 %-120 % for 50 ng/mL of the analyte, 60 %-125 % for 5 ng/mL and 1 ng/mL of the analyte)

Table 6 Continued

Analytes		InertSep MA-2		Oasis WAX		Oasis WAX (P) ^{a)}		Strata-XL-AW	
Abbreviation	Concentration ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mean ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ^{d)} (%)	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)
PFHpA	50	48.8	97.5	48.6	97.1	48.6	97.3	48.6	97.3
	5	4.99	99.7	5.02	100.4	5.15	103.0	5.18	103.5
	1	1.06	106.4	1.01	101.5	1.05	104.9	0.98	98.2
PFOA	50	46.4	92.9	49.1	98.2	49.7	99.4	49.8	99.6
	5	5.30	106.0	5.31	106.3	5.22	104.5	5.18	103.7
	1	0.99	99.2	1.06	105.8	1.07	106.7	1.01	101.3
PFNA	50	49.2	98.3	44.1	88.1	45.6	91.2	46.4	92.8
	5	5.02	100.4	4.65	92.9	4.67	93.4	4.64	92.9
	1	1.09	109.1	1.10	109.6	1.13	112.9	0.98	97.9
PFDA	50	48.7	97.4	36.8	73.6	39.1	78.1	42.2	84.3
	5	4.98	99.6	3.74	74.7	3.97	79.3	3.71	74.2
	1	0.85	85.0	0.88	88.0	0.92	91.5	0.95	95.5
PFUdA	50	45.6	91.1	37.3	74.5	42.9	85.9	46.8	93.7
	5	4.88	97.5	3.50	70.1	3.98	79.7	3.64	72.9
	1	0.74	74.0	0.65	65.2	0.69	68.8	0.69	69.5
PFDoA	50	38.5	76.9	35.7	71.5	46.2	92.3	46.1	92.1
	5	4.45	89.0	3.12	62.4	3.46	69.1	3.19	63.8
	1	0.70	70.2	0.74	73.8	0.77	77.5	0.73	73.2

PFASs の検量線用の標準液の各最小濃度は 0.1 ng/mL であり、いずれのピークも SN 比 10 を超えていた。このことから、定量下限を推定するため、①汚泥肥料に PFASs 各 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加して 7 点併行で分析した併行試験の結果、②用いた検量線 (0.1 ng/mL~2 ng/mL) の残差及び③試料溶液の SN 比を基として、16 成分の PFASs についてそれぞれ肥料等試験法 (2021)⁶⁾ 附属書 A の手順に従って定量下限及び検出下限を Table 7 のとおり算出した。

その結果、PFASs の各定量下限は 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定され、また、上記①における 16 成分の PFASs の平均回収率は 72.6 % から 114.8 % であり、すべて肥料等試験法 (2021) に示されている精度の基準に適合していた。

Table 7 Result of estimation of the lower limit of quantification

Abbreviation	Replicate test ^{a)}						Calibration curve ^{a)}		SN ratio ^{a)}		Estimation of LOQ (μg/kg)
	Concentration ^{b)} (μg/kg)	Mean ^{c)} (μg/kg)	s_r ^{d)} (μg/kg)	Recovery (%)	LOQ ^{e)} (μg/kg)	LOD ^{f)} (μg/kg)	LOQ (μg/kg)	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)	LOD (μg/kg)	
PFBS	1	0.81	0.10	81.4	1	0.4	0.3	0.1	0.4	0.1	1
PFPeS	1	0.94	0.14	93.8	1	0.5	0.7	0.3	0.6	0.2	1
PFHxS	1	1.04	0.08	104.5	0.8	0.3	0.7	0.3	0.4	0.1	0.8
PFHpS	1	0.86	0.04	85.7	0.4	0.2	0.3	0.1	0.5	0.1	0.5
PFOS	1	0.98	0.05	98.4	0.5	0.2	0.5	0.2	0.3	0.1	0.5
PFNS	1	0.90	0.14	89.9	1	0.6	0.5	0.2	0.4	0.1	1
PFDS	1	0.85	0.14	85.2	1	0.5	0.9	0.4	0.4	0.1	1
PFBA	1	1.03	0.11	103.0	1	0.4	0.3	0.1	1	0.3	1
PFPeA	1	1.15	0.05	114.8	0.5	0.2	0.4	0.2	0.7	0.2	0.7
PFHxA	1	1.03	0.07	102.6	0.7	0.3	0.7	0.3	0.5	0.2	0.7
PFHpA	1	1.04	0.04	104.1	0.4	0.2	0.6	0.3	0.3	0.1	0.6
PFOA	1	0.98	0.04	98.0	0.4	0.1	0.5	0.2	0.1	0.04	0.5
PFNA	1	1.09	0.04	109.2	0.4	0.2	0.7	0.3	0.4	0.1	0.7
PFDA	1	0.97	0.10	97.4	1	0.4	1	0.5	0.2	0.06	1
PFUdA	1	0.95	0.11	94.9	1	0.4	1	0.5	0.2	0.05	1
PFDoA	1	0.73	0.08	72.6	0.8	0.3	1	0.6	0.2	0.05	1

a) The Procedure shown in Testing Methods for Fertilizers (2021)

b) The concentration of PFAS spiked the sample

c) Mean value ($n=7$)

d) Repeatability standard deviation

e) Lower limit of quantitation

f) Lower limit of detection

4) PFASs の分岐鎖異性体の分析

PFASs の定量において、直鎖体及び分岐鎖異性体を合わせた含量で評価することが求められている²⁾ことから、PFOS 及び PFOA の各含量について算出した。

PFASs の分岐鎖異性体 (PFHxS, PFOS, PFDS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA) のピークを持つクロマトグラムを Fig. 4 に示す。Benskin ら¹⁴⁾及び Jin ら¹⁵⁾によって報告されているように、これらの分岐鎖異性体ピークの保持時間は、直鎖体ピークの保持時間よりも短かった。

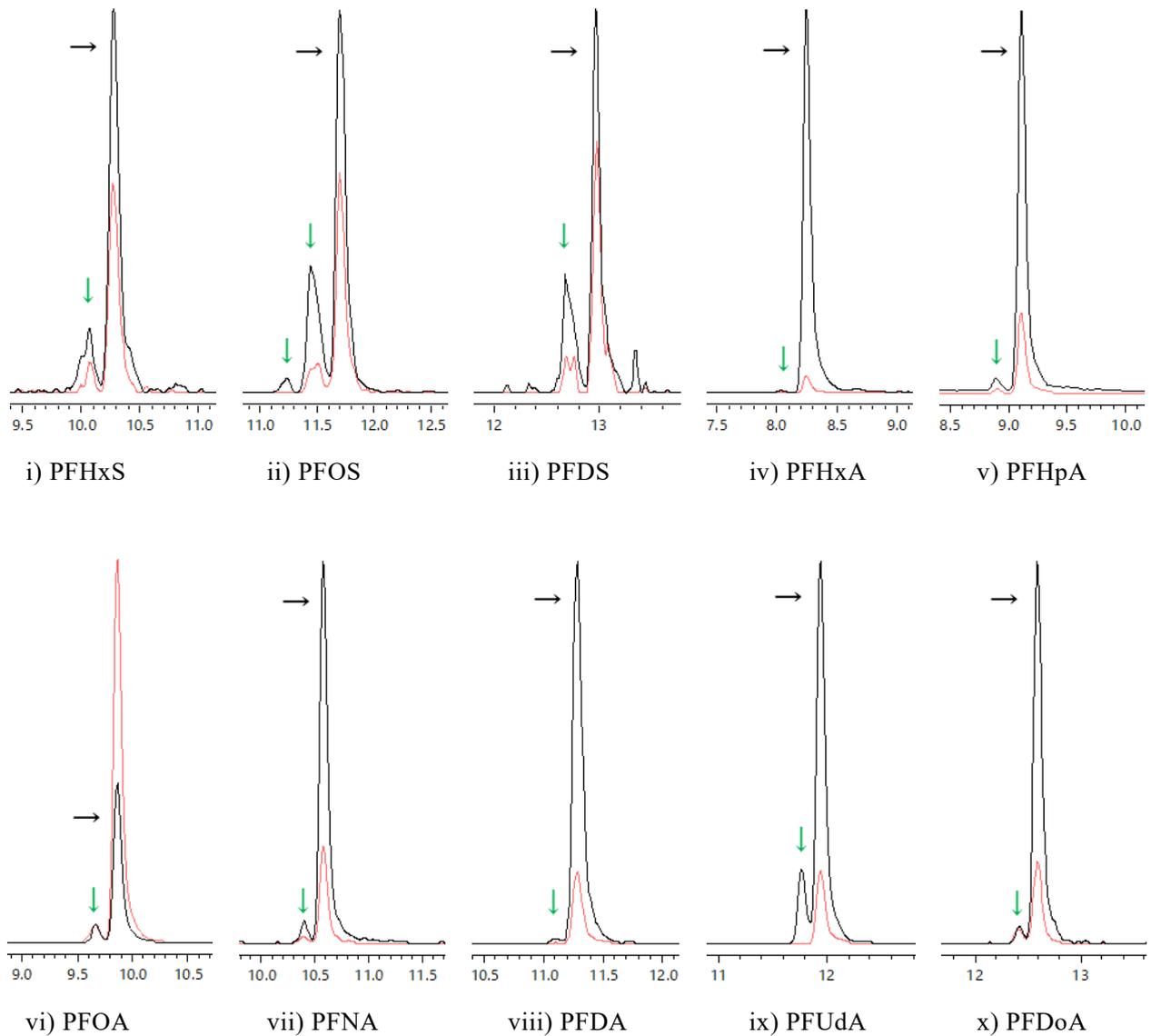


Fig. 4 Example of MRM chromatogram of sample solution in which branched isomers are detected

Black line drawing: MRM chromatogram with product ion for determination

Red line drawing: MRM chromatogram with product ion for validation

→: Linear form of PFAS

↓: Branched form of PFAS

Table 7 に示した定量下限未満の分析値は $0 \mu\text{g}/\text{kg}$ として PFOS 及び PFOA の各合量を定量し、各合量に対するその直鎖体の分析値の占める割合は 57%~96% (平均値 83%) 及び 85%~100% (平均値 97%) であり、中山ら¹⁶⁾ 及び Fang ら¹⁷⁾ の報告と同等であった。PFOS 及び PFOA の各合量に対するその直鎖体の分析値のプロットの回帰直線を求めたところ、傾きは 0.797~0.942 であり、それらの相関係数は共に 0.999 であり、強い相関を示した。

4. まとめ

21 成分の PFASs について既報の試料溶液の調製操作を実施したところ、(1)～(5)のとおり 16 成分の PFASs に適用して測定できることを確認した。

(1) グラジエントプログラムを変更することにより、既報で用いた分離カラムで 21 成分の PFASs 並びに PFOS 及び PFOA の分岐異性体を分離することができた。

(2) 21 成分含有する PFASs 標準液(各 0.1 ng/mL～50 ng/mL)を測定したところ、18 成分の PFASs について直線性のある検量線を作成できた。

(3) 既報の試料溶液の調製の精製操作を検討したところ、カートリッジカラムから PFOS 及び PFOA と同じ画分に 16 成分の PFASs が溶出した。

(4) 汚泥肥料を用いて添加回収試験により真度の確認を行った結果、16 成分の PFASs 各 1 µg/kg～50 µg/kg の濃度範囲で平均回収率 65.2 %～124.8 %であり、いずれも肥料等試験法附属書 A に示されている真度の目標範囲以内であった。

(5) 16 成分の PFASs の定量下限は試料中で 0.5 µg/kg～1 µg/kg 程度と推定された。

(6) クロマトグラムには、PFHxS, PFOS, PFDS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA の PFAS 分岐異性体ピークが現れた。PFOS と PFOA の分岐異性体を含む各含量に対する直鎖体の占める割合は 57 %～96 % (平均値 82 %) 及び 85 %～100 % (平均値 97 %) であり、中山らと Shuhong らの報告と同等であった。

文 献

- 1) Ewan Sinclair, Kurunthachalam Kannan: Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants, *Environmental Science & Technology*, **40** (5), 1408-1414 (2006)
- 2) Melissa M Schultz, Douglas F Barofsky, Jennifer A Field: Quantitative determination of fluorinated alkyl substances by large-volume-injection liquid chromatography tandem mass spectrometry-characterization of municipal wastewaters, *Environmental Science & Technology*, **40** (1), 289-295 (2006)
- 3) 野添宗裕, 藤井滋穂, 田中周平, 田中宏明, 山下尚之: 残留性有機フッ素化合物 PFOS, PFOA の下水処理場における挙動調査, *環境工学研究論文集*, **43**, p.105-110 (2006)
< https://www.jstage.jst.go.jp/article/proes1992/43/0/43_0_105/_pdf/-char/ja >
- 4) 白井裕治, 沼寄佳奈子: LC-MS/MSを用いた汚泥肥料中の PFOS 及び PFOA の分析, *肥料研究報告*, **14**, 123~140 (2021)
- 5) 沼寄佳奈子, 白井裕治: LC-MS/MS を用いた汚泥肥料中の PFOS 及び PFOA の分析(共同試験による妥当性確認), *肥料研究報告*, **15**, 66~86 (2022)
- 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 (2021)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2021.pdf >
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_fuzokusho_A.pdf >
- 7) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological profile for Perfluoroalkyls (2021).
< <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp200.pdf> >

- 8) THE EUROPEAN COMMISSION: Commission Regulation (EU) 2021/1297 of 4 August 2021 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council as regards perfluorocarboxylic acids containing 9 to 14 carbon atoms in the chain (C9-C14 PFCAs), their salts and C9-C14 PFCA-related substances (Text with EEA relevance), Official Journal of the European Union, L 282, 29~33 (2021)
< <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1297> >
- 9) European Chemicals Agency (ECHA): PFHxS, its salts and PFHxS-related substances, ANNEX XV RESTRICTION REPORT (2019)
< <https://echa.europa.eu/documents/10162/a22da803-0749-81d8-bc6d-ef551fc24e19> >
- 10) European Chemicals Agency (ECHA): Undecafluorohexanoic acid (PFHxA), its salts and related substances, ANNEX XV RESTRICTION REPORT (2019)
< <https://echa.europa.eu/documents/10162/c4e04484-c989-733d-33ed-0f023e2a200e> >
- 11) GL Sciences: 固相抽出ー液体クロマトグラフ質量分析計を用いた有機フッ素化合物 (PFAS) の分析, LC Technical Note, LT181
< <https://www.gls.co.jp/viewfile/?p=LT181> >
- 12) SHIMADZU Excellence in Science: Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) Specified in EPA M8327 using the LCMS-8050 Triple Quadrupole Mass Spectrometer, Application News, No. LCMS-106
< <https://www.ssi.shimadzu.com/sites/ssi.shimadzu.com/files/Products/literature/lcms/application-news-lcms-106.pdf> >
- 13) 三島聡子, 小沢憲司, 中山駿一, 菊池宏海: 相模湾漂着マイクロプラスチックの有機フッ素化合物の吸着実態と流入河川の影響, 環境化学, **30**, 66-81 (2020)
< https://www.jstage.jst.go.jp/article/jec/30/0/30_66/_pdf/-char/ja >
- 14) Jonathan P. Benskin, Amila O. De Silva, Jonathan W. Martin: Isomer Profiling of Perfluorinated Substances as a Tool for Source Tracking: A Review of Early Findings and Future Applications, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, **208**, 111-160 (2010)
- 15) Hangbiao Jin, Yifeng Zhang, Lingyan Zhu, Jonathan W. Martin: Isomer Profiles of Perfluoro-alkyl Substances in Water and Soil Surrounding a Chinese Fluorochemical Manufacturing Park, Environmental Science & Technology, **49** (8), 4946-4954 (2015)
- 16) NAKAYAMA F. Shoji, ISOBE Tomohiko, IWAI-SHIMADA Miyuki, KOBAYASHI Yayoi, NISHIYAMA Yukiko, TANIGUCHI Yu, SEKIYAMA Makiko, MICHIKAWA Takehiro, YAMAZAKI Shin, NITTA Hiroshi, ODA Masako, MITSUBUCHI Hiroshi, SANEFUMI Masafumi, OHGA Shouichi, MISE Nathan, IKEGAMI Akihiko, SUGA Reiko, SHIMONO Masayuki: Poly- and perfluoroalkyl substances in maternal serum: Method development and application in Pilot Study of the Japan Environment and Children's Study, Journal of Chromatography A, **1618**, 460933, 1-11 (2020)
- 17) Shuhong Fang, Xinwei Chen, Shuyan Zhao, Yifeng Zhang, Weiwei Jiang, Liping Yang, Lingyan Zhu: Trophic Magnification and Isomer Fractionation of Perfluoroalkyl Substances in the Food Web of Taihu Lake, China, Environmental Science & Technology, **48** (4), 2137-2182 (2014)

Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)

SHIRAI Yuji¹, NUMAZAKI Kanako¹ and AKIMOTO Satono¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fertilizer and Feed Inspection Department

We improved the PFOS and PFOA measurement methods to develop determination method of 16 PFASs in sludge fertilizers using liquid chromatograph/tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). After the analytical portion was added the isotope performance extraction standard solution (20 ng/mL each of mass labeled PFOS and mass labeled PFOA), PFASs were extracted with methanol containing a small amount of formic acid. The extract was purified with weak anion exchange polymer cartridge column and graphite carbon cartridge column. PFASs were measured by LC-MS/MS. As a result of 3 replicate analysis in sludge fertilizer sample prepared to contain with PFASs at 1 µg/kg, 5 µg/kg and 50 µg/kg, the mean recoveries ranged from 62.4 % to 124.8 %. Their lower limit of quantification (*LOQ*) ranged from 0.5 µg/kg to 1 µg/kg (analytical sample). The following PFASs branched isomer peaks appeared on the chromatogram of the sample solution, which were PFHxS, PFOS, PFDS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUDA and PFDoA. The proportions of the linear forms of PFOS and PFOA to the total amount including those of the branched form were the mean values of 83 % and 97 %, respectively.

Key words PFASs, PFOS, PFOA, sludge fertilizer, LC-MS/MS

(Research Report of Fertilizer, **15**, 87-107, 2022)

8 汚泥肥料の連用によるカドミウム等の土壌への

蓄積, 作物への吸収試験(継続)

—2020年冬作・2021年夏作—

浅尾直紀¹, 小林涼斗², 増井亮太², 村山和晃³, 阿部文浩²

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.仮に汚泥肥料中のカドミウム濃度が含有許容値に達しなくとも,長期の汚泥肥料の連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量及び作物体への吸収量を確認している.

1年目(2009年)夏作から12年目(2020年)夏作にかけては,汚泥肥料を施用した区及び施用していない区の2試験区を設け,ニンジン,ホウレンソウ,ホウレンソウ,チンゲンサイ,カブ,ホウレンソウ,以後ニンジン,ホウレンソウの繰返しの順で栽培し,土壌中のカドミウム濃度の変化及び作物体のカドミウム吸収量を確認した.その結果は既に肥料研究報告第4号³⁾~14号⁴⁾で報告しているが,引き続き,12年目(2020年)冬作及び13年目(2021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.

また,これまでの跡地土壌の全カドミウム濃度の結果から,土壌中へのカドミウムの蓄積が認められ,0.1 mol/L HCl-Cdについても年々増加しており,可給態のカドミウムも土壌中に増加していると考えられた.土壌中のカドミウムをより詳細に把握するため,1年目から13年目の土壌を水,酢酸アンモニウム溶液,エチレンジアミン四酢酸ナトリウム溶液(以後EDTA溶液)等を用いて抽出し,各々の溶液中のカドミウム濃度を測定したのでその結果を報告する.

2. 材料及び方法

(1) 肥料等

施肥する肥料は市販されているし尿汚泥肥料を使用した.成分分析結果はTable 1のとおり.標準区に施肥する肥料及び汚泥肥料施用区で補正肥料として特級試薬の尿素,リン酸二水素アンモニウム及

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)名古屋センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部 (現)農薬検査部

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 2 に示した)。この他、塩基バランスの改善のため苦土石灰(炭酸カルシウム肥料)を使用した。

Table 1 Properties of sludge fertilizer

Item	Unit	Content	Item	Unit	Content
Total nitrogen	% ^{a)}	5.5	Moisture	% ^{a)}	11.2
Total phosphoric acid ^{b)}	% ^{a)}	4.7	Total copper	mg/kg	329
Citric acid-soluble phosphoric acid ^{b)}	% ^{a)}	2.2	Total Zinc	mg/kg	1038
Total potassium ^{c)}	% ^{a)}	0.4	Carbon to nitrogen ratio	-	6.3
Total calcium ^{d)}	% ^{a)}	1.4	Total cadmium ^{e)}	mg/kg	2.8 ^{f)}
Organic carbon	% ^{a)}	36.0	Acid-solubility-cadmium ^{g)}	mg/kg	1.8

a) Mass fraction

b) Content as P₂O₅

c) Content as K₂O

d) Content as CaO

e) Content of cadmium dissolved with aqua regia

f) 3.2 mg/kg in the dry matter

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

Table 2 Properties of reagent

Item	Unit	Urea	Ammonium dihydrogen phosphate	Potassium chloride
Total nitrogen	% ^{a)}	46.1	12.0	—
Total phosphorus ^{b)}	% ^{a)}	—	61.0	—
Total potassium ^{c)}	% ^{a)}	—	—	63.1

a) Mass fraction

b) Content as P₂O₅

c) Content as K₂O

(2) 土壌の理化学性

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。土壌の種類は黒ボク土であり、土性は軽しょく土である。1年目夏作から13年目夏作までの収穫後の跡地土壌について、pH、電気伝導率(EC:Electrical Conductivity, 以下 EC と記す)、陽イオン交換容量(CEC:Cation Exchange Capacity, 以下 CEC と記す)、窒素全量(TN:Total Nitrogen, 以下 TN と記す)、炭素全量(TC:Total Carbon, 以下 TC と記す)、有効態りん酸、交換性加里、交換性石灰及び交換性苦土の測定結果を Fig.1 に示す。

pH は、土壌中の Cd 蓄積量に与える影響が大きいため、pH 6~pH 7 となるように、試験開始から3年目、5年目、6年目及び7年目に消石灰を用いて pH 調整を行った。6年目冬作から11年目夏作まで pH 6.4 程度で安定して推移していたが、11年目冬作、12年目夏作と pH 6.0 付近に下がったため、今回13年目夏作の播種前に苦土石灰を用いて pH 調整を実施し、6.2 付近まで回復した。

EC は、試験開始以降、0.1 mS/cm~0.2 mS/cm の範囲で上昇傾向を示していたことから、6年目の夏作以降、窒素肥料として使用していた硫酸アンモニウムを尿素に変更した結果、上昇傾向から転じて 0.1 前後で安定した推移を示している。

有効態りん酸は、地力増進基本指針において黒ボク土における有効態りん酸含有量の目標値が乾土 100 g

当たり 10 mg 以上 100 mg 以下と定められているのに対して、試験開始時から 10 mg 以下で推移していたことから、りん酸肥料の施肥量を調整したところ、8 年目冬作以降は 10 mg 以上で推移している。

11 年目夏作跡地土壌の理化学性を確認したところ、主要農作物施肥基準(埼玉県)⁶⁾に記された土壌管理目標値を参考として、土壌中の交換性塩基 3 成分(交換性加里, 交換性石灰, 交換性苦土)のうち、交換性苦土の成分が低い傾向が見られたため、12 年目夏作及び冬作播種前に硫酸マグネシウムを施肥することにより、交換性塩基のバランスの改善を図った。また、13 年目夏作播種前に pH 調整も兼ねて苦土石灰を選定し、不足している苦土成分を補填した。

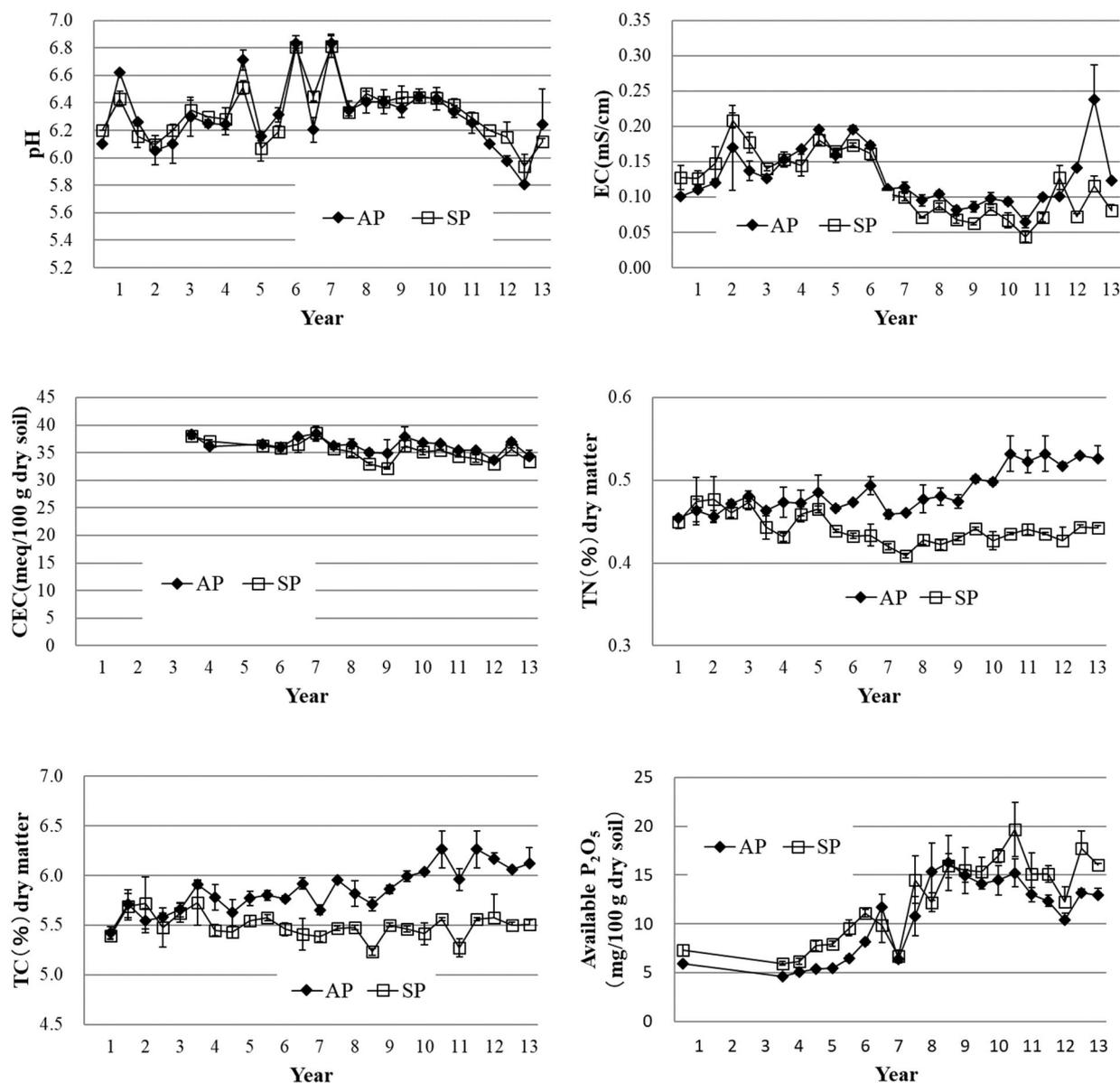


Fig.1 Transition of the characteristics of the soil

AP : Sludge fertilizer application plot

SP : Standard plot

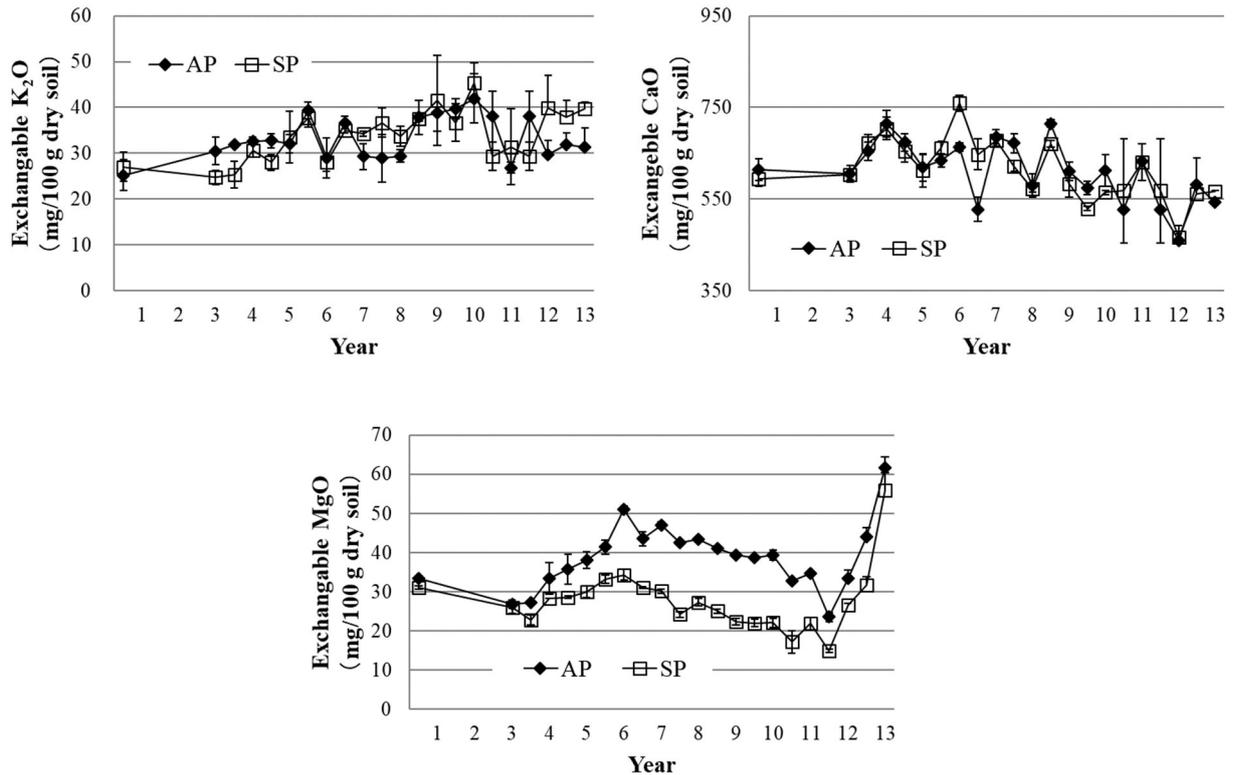


Fig.1 Continue

(3) 試験区の構成

試験区は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.

(4) 施肥設計

12年目冬作ホウレンソウ及び13年目夏作ニンジン⁹⁾の施肥設計をTable 3-1及びTable 3-2に示した. 施肥設計は, 主要農作物施肥基準(埼玉県)を参考に設計した.

汚泥肥料は, 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 kg/10 a~1000 kg/10 aとしている^{7~9)}自治体があり, 一般的に1作当たり500 kg/10 a程度施用されている¹⁰⁾. また, 高分子凝集材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⁾. これらから, 4年目夏作から11年目冬作までの試験において, 1作当たりの汚泥肥料の施用量を500 kg/10 aとした. しかしながら, 本試験の目的の一つである土壌への蓄積量を確認するには供試汚泥肥料中のカドミウム濃度が低いため, 本試験の12年目夏作以降における汚泥肥料の施用量は1作当たり750 kg/10 aとした. 汚泥肥料の窒素の無機化率は, 前作までの収量を考慮して決定しており, 12年目夏作以降, 冬作は無機化率20%, 夏作は無機化率40%として窒素の分量を算出し, 不足分については尿素を用いて補正した.

りん酸については, 地力増進基本指針¹²⁾における有効態りん酸の改善目標下限値(10 mg/100 g 乾土)を満たすように設計した. なお, 供試肥料である汚泥肥料は溶出率を考慮し, 含有する可溶性りん酸の値を設計に用い, 加里については, 主要農作物施肥基準のとおり設計した. なお, これまでの試験における施肥履歴をTable 4に示した.

Table 3-1 The fertilization amount (spinach in winter 12th)

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	MgO	Cd		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Cd
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>												
Sludge fertilizer	3000	164	142	12	—	0.0085	750	41	36	3	—	0.0021
Urea	93	43	—	—	—	—	23	11	—	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	35	4	21	—	—	—	9	1	5	—	—	—
Potassium chloride	94	—	—	60	—	—	24	—	—	15	—	—
Magnesium sulfate	100	—	—	—	33	—	25	—	—	—	8	—
Total		211	164	72	33	0.0085		53	41	18	8	0.0021
<Standard plot (SP)>												
Urea	136	63	—	—	—	—	34	16	—	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	144	17	88	—	—	—	36	4	22	—	—	—
Potassium chloride	114	—	—	72	—	—	29	—	—	18	—	—
Magnesium sulfate	100	—	—	—	33	—	25	—	—	—	8	—
Total		80	88	72	33	—		20	22	18	8	—

Table 3-2 The fertilization amount (carrot in summer 13th)

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	MgO	Cd		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Cd
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>												
Sludge fertilizer	3000	164	142	12	—	0.0085	750	41	36	3	—	0.0021
Urea	15	7	—	—	—	—	4	2	—	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	29	3	17	—	—	—	7	1	4	—	—	—
Potassium chloride	82	—	—	52	—	—	20	—	—	13	—	—
Magnesium lime (pH adjustment)	800	—	—	—	136	0.0008	200	—	—	—	34	0.0002
Total		174	160	64	136	0.0093		44	40	16	34	0.0023
<Standard plot (SP)>												
Urea	129	59	—	—	—	—	32	15	—	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	138	17	84	—	—	—	34	4	21	—	—	—
Potassium chloride	101	—	—	64	—	—	25	—	—	16	—	—
Magnesium lime (pH adjustment)	800	—	—	—	136	0.0008	200	—	—	—	34	0.0002
Total		76	84	64	136	0.0008		19	21	16	34	0.0002

Table 4 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)		
Crop			N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd	
1st	Summer	Sludge fertilizer	332	11	17	1	0.0012	—	—	—	—
	Summer	Ammonium sulfate	52	11	—	—	—	104	22	—	—
	Carrot	Potassium dihydrogen phosphate	3	—	2	1	—	36	19	12	—
		Potassium chloride	28	—	—	18	—	12	—	8	—
		Total		22	19	20	0.0012		22	19	20
1st	Winter	Sludge fertilizer	302	10	16	1	0.0011	—	—	—	—
	Winter	Ammonium sulfate	47	10	—	—	—	95	20	—	—
	Spinach	Potassium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	30	—	16	10
		Potassium chloride	27	—	—	17	—	12	—	—	8
		Total		20	16	18	0.0011		20	16	18
2nd	Summer	Sludge fertilizer	227	8	12	1	0.0008	—	—	—	—
	Summer	Ammonium sulfate	36	8	—	—	—	71	15	—	—
	Spinach	Potassium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	23	—	12	8
		Potassium chloride	15	—	—	9	—	3	—	—	2
		Total		15	12	10	0.0008		15	12	10
2nd	Winter	Sludge fertilizer	181	6	9	1	0.0007	—	—	—	—
	Winter	Ammonium sulfate	28	6	—	—	—	57	12	—	—
	Qing	Potassium dihydrogen phosphate	5	—	3	2	—	23	—	12	8
		Potassium chloride	15	—	—	10	—	6	—	—	4
		Total		12	12	12	0.0007		12	12	12
3rd	Summer	Sludge fertilizer	227	8	12	1	0.0008	—	—	—	—
	Summer	Ammonium sulfate	33	7	—	—	—	57	12	—	—
	Turnip	Potassium dihydrogen phosphate	6	1	3	—	—	24	3	15	—
		Potassium chloride	22	—	—	14	—	24	—	—	15
		Total		15	15	15	0.0008		15	15	15
3rd	Winter	Sludge fertilizer	483	16	25	2	0.0018	—	—	—	—
	Winter	Urea	22	10	—	—	—	43	20	—	—
	Spinach	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	0.0018		20	26	18
4th	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
	Summer	Ammonium sulfate	65	14	—	—	—	80	17	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	42	5	26	—
		Potassium chloride	29	—	—	18	—	32	—	—	20
		Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—
		Total		30	36	20	0.0018		22	36	20
4th	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
	Winter	Ammonium sulfate	71	15	—	—	—	71	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	42	5	26	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18
		Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—
		Total		32	36	18	0.0018		20	36	18
5th	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
	Summer	Ammonium sulfate	81	17	—	—	—	80	17	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	42	5	26	—
		Potassium chloride	29	—	—	18	—	32	—	—	20
		Fused magnesium phosphate	50	—	10	—	—	50	—	10	—
		Total		34	36	20	0.0018		22	36	20
5th	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
	Winter	Ammonium sulfate	87	18	—	—	—	71	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	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	0.0018		20	51	18
6th	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
	Summer	Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	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	0.0018		19	33	16
6th	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
	Winter	Urea	25	11	—	—	—	34	16	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphat	71	9	43	—	—	36	4	22	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total		37	70	18	0.0018		20	22	18

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)		
Crop			N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd	
7th	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	42	5	26	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16
		Slaked lime (pH adjustment)	196	—	—	—	—	—	—	—	—
		Total	27	26	16	0.0018	—	19	26	16	—
7th	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
		Urea	21	10	—	—	—	15	7	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphat	72	9	44	—	—	109	13	67	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total	35	70	18	0.0018	—	20	67	18	—
8th	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
		Urea	—	—	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphat	89	11	54	—	—	42	5	26	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16
		Total	27	80	16	0.0018	—	19	26	16	—
8th	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
		Urea	36	17	—	—	—	32	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	43	5	26	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total	33	26	18	0.0018	—	20	26	18	—
9th	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	43	5	26	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16
		Total	27	26	16	0.0018	—	19	26	16	—
9th	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
		Urea	36	17	—	—	—	32	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	43	5	26	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total	33	26	18	0.0018	—	20	26	18	—
10th	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	0.0018	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	43	5	26	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16
		Total	27	26	16	0.0018	—	19	26	16	—
10th	Winter	Sludge fertilizer	500	29	24	2	0.0014	—	—	—	—
		Urea	31	14	—	—	—	33	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	39	5	24	—
		Potassium chloride	25	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total	43	24	18	0.0014	—	20	24	18	—
11th	Summer	Sludge fertilizer	500	29	24	2	0.0014	—	—	—	—
		Urea	10	5	—	—	—	31	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	39	5	24	—
		Potassium chloride	22	—	—	14	—	25	—	—	16
		Total	33	24	16	0.0014	—	19	24	16	—
11th	Winter	Sludge fertilizer	500	29	24	2	0.0014	—	—	—	—
		Urea	31	14	—	—	—	33	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphat	—	—	—	—	—	39	5	24	—
		Potassium chloride	25	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total	43	24	18	0.0014	—	20	24	18	—
12th	Summer	Sludge fertilizer	750	41	36	3	0.0021	—	—	—	—
		Urea	6	3	—	—	—	34	16	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogen phosphat	—	—	—	—	—	27	3	17	—
		Potassium chloride	20	—	—	13	—	25	—	—	16
		Magneium sulfate	25	—	—	—	—	25	—	—	—
		Total	44	36	16	0.0021	—	19	17	16	—
12th	Winter	Sludge fertilizer	750	41	36	3	0.0021	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	34	16	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogen phosphat	9	1	5	—	—	36	4	22	—
		Potassium chloride	24	—	—	15	—	29	—	—	18
		Magneium sulfate	25	—	—	—	—	25	—	—	—
		Total	53	41	18	0.0021	—	20	22	18	—
13th	Summer	Sludge fertilizer	750	41	36	3	0.0021	—	—	—	—
		Urea	4	2	—	—	—	32	15	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogen phosphat	7	1	4	—	—	34	4	21	—
		Potassium chloride	20	—	—	13	—	25	—	—	16
		Magnesium lime (pH adjustment)	200	—	—	—	0.0002	200	—	—	0.0002
		Total	44	40	16	0.0023	—	19	21	16	0.0002

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)

(5) 栽培方法

栽培の概要は Table 5 のとおり. 施肥は, 各試験区の表層土約 12 kg を袋に採り, Table 3-1 及び Table 3-2 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. 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. その後, 耕耘機を用いて深さ約 15 cm まで耕耘した.

農薬は播種する前にヨトウガの幼虫等の害虫防除を目的としたダイアジノン粒剤を散布し, 深さ約 15 cm まで耕耘して表面を平らにならした後, 試験区内を 9 条(条間約 20 cm)間隔でシーダーテープ加工された種子を播種した.

Table 5 Cultivation summary

	Spinach	Carrot
Species	Mirage	Koigokoro
Fertilization	2020.10.15	2021.5.11
Pesticide application	11.26	6.11
Seeding	10.28	5.20
Thinning (first)	11.11	6.17
Thinning (scond)	11.26	7.6
Harvest	2021.3.11	9.7
Cultivation period	134 days	110 days

(6) 作物体の前処理

ハウレンソウの葉部(可食部)を収穫した後, 土壌を払い落とし, 作物体の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.

ニンジンについては根についた土壌を水道水で洗い落とし, セラミック製包丁を用いて葉部と根部(可食部)に切断し, それぞれの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, 葉部は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. 根部はセラミック製包丁を用いて細かく切断した後, 通風乾燥器にて 65 °C で一昼夜乾燥した.

乾燥した試料を目開き 500 µm のふるいを通すまで粉砕機(ZM200:Retsch ローター回転数 6000 rpm)で粉砕し分析用試料とした.

(7) 作物体のカドミウム分析

分析試料 0.5 g に硝酸 4 mL 及び過酸化水素水 1 mL を加えマイクロ波分解装置(ETHOS EASY:マイルストーンゼネラル株式会社)で分解¹³⁾したものを 50 mL に定容し, ICP 質量分析装置(iCAP RQ :Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した.

(8) 跡地土壌の分析

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

土壌中の全カドミウムは, 分析試料 0.5 g に, 硝酸約 5 mL, 過酸化水素水約 2 mL, 及びフッ化水素酸約 1

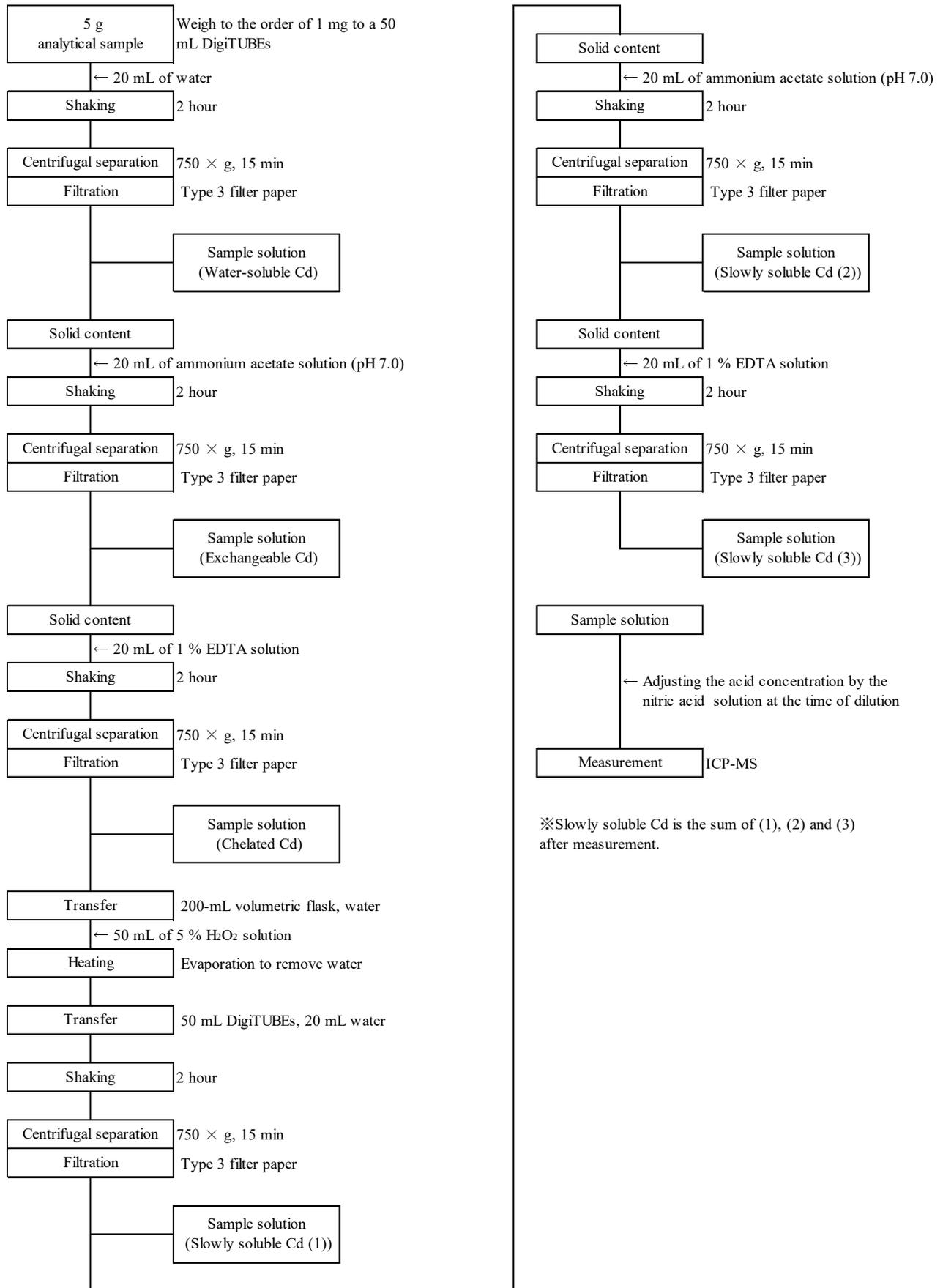
mL を加え、マイクロ波分解装置により分解した後、硝酸 1 mL、過塩素酸 1 mL を加え再度マイクロ波分解装置により分解し、試料溶液とした。測定は ICP 質量分析装置により行った。

塩酸可溶カドミウムは、土壌 10 g に対し 0.1 mol/L HCl 50 mL を加え、約 30 °C に保ちながら 1 時間振り混ぜて抽出した試料液について ICP 質量分析装置を用いて測定した¹⁵⁾。

(9) 跡地土壌の各種形態別カドミウム濃度分析

1年目から13年目の夏作跡地土壌(汚泥肥料施用区2区, 標準区2区)を上記2.(8) で示した方法で採取, 調製したものを分析用試料とした. 長井・山内ら¹⁶⁾が土壌中の形態別銅の分析に用いた方法を参考にし, Scheme 1に示したように改変し, 各種形態のカドミウムを抽出した. 改変点としては, 遠沈管の代わりに50 mL のDigiTUBEsを使用したこと及び湯煎による工程をホットプレートにより実施したことであり, いずれも比較による検討は行っていないが, 測定値への大きな影響はないと考えられる.

まず, 分析用試料 5 g を 50 mL の DigiTUBEs に採り, 水 20 mL を加えて 2 時間振り混ぜた後, 約 750×g で 15 分間遠心分離して上澄液を分離した. 分離した分析試料へ pH 7.0 酢酸アンモニウム溶液 20 mL を加えて同様の操作を行い, さらに 1 %EDTA 溶液 20 mL を加えて同様の操作を行った. 水, pH 7.0 酢酸アンモニウム溶液, 1 %EDTA 溶液により逐次抽出されたものをそれぞれ水溶性カドミウム, 置換態カドミウム, キレート態カドミウムとした. 1 %EDTA 溶液による抽出が終了した後に, 分析試料を少量の水で 200 mL 又は 300 mL のトルビーカーに移し, ホットプレート上で蒸発乾固させた. 乾固後に 5 %過酸化水素水 50 mL を加え, 発泡がなくなるまで土壌有機物の分解を行い蒸発乾固させた. その後, 分析試料を 50 mL の DigiTUBEs に移し, 上記同様の操作で水, pH 7.0 酢酸アンモニウム溶液, 1 %EDTA 溶液の順に抽出を繰り返した. 本試験では 5 %過酸化水素水による有機物分解後に抽出されるそれぞれのカドミウムを合算したものを有機態カドミウムとした. 土壌から抽出した溶液はろ紙 3 種でろ過し, ICP 質量分析装置を用いて測定した.



Scheme 1 Cadmium analysis method in soil by sequential extraction

3. 結果及び考察

1) 冬作ホウレンソウ

(1) 作物体の収量, カドミウム濃度

12年目冬作ホウレンソウの結果を Table 6 に示した。

収量は、汚泥肥料施用区で 17.5 kg、標準区で 17.9 kg であり、標準区に対する汚泥肥料施用区の収量指数は 98 であった。1年目から12年目の冬作の収量の推移は Fig.2 に示したが、12年目の収量は例年並みであった。

ホウレンソウ現物中のカドミウム濃度は、汚泥肥料施用区で 0.090 mg/kg、標準区で 0.045 mg/kg であった。1年目から12年目のホウレンソウ現物中のカドミウム濃度の推移は Fig.3-1 に示すとおり Codex 基準値¹⁷⁾(0.2 mg/kg) に対して低い濃度で推移していた。

また、ホウレンソウ乾物中のカドミウム濃度について各区を比較したところ、汚泥肥料施用区で 0.81 mg/kg、標準区で 0.39 mg/kg であり、汚泥肥料施用区が有意に高い結果であった ($p=4.3 \times 10^{-7}$)。

汚泥肥料の連用によるホウレンソウ乾物中のカドミウム濃度の推移を Fig.3-2 に示した。汚泥肥料施用区における12年目の乾物中カドミウム濃度は試験開始以降最も高い値となった。

Table 6 Yield of spinach (edible portion) and Cadmium concentration (winter 12th)

	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Average	Yield index ^{a)}	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>								
Fresh weight	kg	18.0		17.1		17.5	98	-
Cadmium concentration (fresh matter)	mg/kg	0.095	0.094	0.085	0.087	0.090		-
Cadmium concentration (dry matter)	mg/kg	0.86	0.85	0.75	0.77	0.81		Significance ^{b)}
<Standard plot (SP)>								
Fresh weight	kg	18.0		17.8		17.9		-
Cadmium concentration (fresh matter)	mg/kg	0.048	0.050	0.041	0.041	0.045		-
Cadmium concentration (dry matter)	mg/kg	0.42	0.44	0.35	0.35	0.39		-

a) Yield of Standard plot was indexed as 100

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

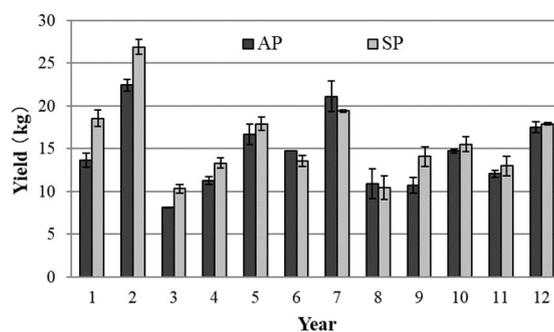


Fig.2 The yield of the spinach in winter (Note: 2nd year (qinggengcai))

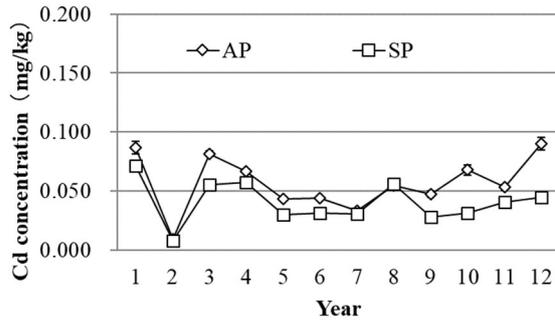


Fig.3-1 Cd concentration (content in the fresh matter) in spinach (Note: 2nd year (qinggengcai))

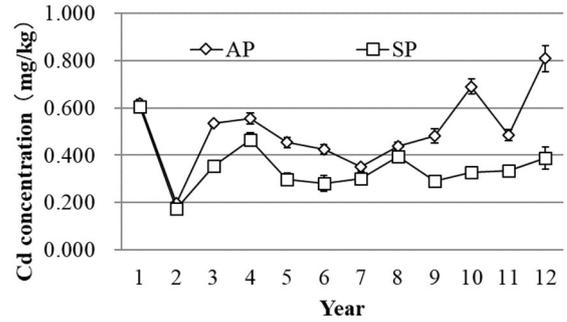


Fig.3-2 Cd concentration (content in the dry matter) in spinach (Note: 2nd year (qinggengcai))

(2) 跡地土壌のカドミウム

12 年目冬作ホウレンソウ跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd, pH(H₂O) 及び EC を分析した結果を Table 7 に示した。0.1 mol/L HCl-Cd は, 汚泥肥料施用区は 0.25 mg/kg, 標準区は 0.15 mg/kg であり, 汚泥肥料施用区で有意に高かった ($p=2.3 \times 10^{-7}$)。

Table 7 Characteristics of cultivated soil (winter 12th)

	Unit	Test prot-1		Test prot-2		Average	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
0.1 mol/L HCl-Cd ^{a)}	mg/kg	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	Significance ^{d)}
pH (H ₂ O) ^{b)}		5.9		5.7			
EC ^{c)}	mS/cm	0.20		0.28			
<Standard plot(SP)>							
0.1 mol/L HCl-Cd	mg/kg	0.15	0.15	0.15	0.14	0.15	
pH (H ₂ O)		5.9		6.0			
EC	mS/cm	0.13		0.10			

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) 夏作ニンジン

(1) 作物体の収量, カドミウム濃度

13 年目夏作ニンジンの結果を Table 8 に示す。

収量は, 汚泥肥料施用区で 6.7 kg (根部 3.6 kg, 葉部 3.1 kg), 標準区で 6.2 kg (根部 4.1 kg, 葉部 2.2 kg) であり, 収量指数は 108 (根部 90, 葉部 144) であった。

1 年目から 13 年目における夏作の収量の推移を Fig.4-1 (葉部), Fig.4-2 (根部) に示した。13 年目のニンジン栽培期間は天候不順で雨が降り続き, 高気温の日が続いた。その影響から試験区で黒葉枯病と思われる症状が発生し, 葉が黄化した後, 枯死した。そのため, 根部の生長も止まり早めに収穫せざるを得ず, 例年に比べ汚泥肥料施用区, 標準区の両区において収量は低かった。

ニンジン現物中のカドミウム濃度は, 汚泥肥料施用区で根部 0.050 mg/kg, 葉部 0.060 mg/kg であり, 標準区で根部 0.030 mg/kg, 葉部 0.040 mg/kg であった。

根菜類の Codex 基準値¹⁷⁾ (0.1 mg/kg) は可食部の根部について定められている。ニンジン現物中のカドミウ

ム濃度は Fig.5-1 に示したが、根部のカドミウム濃度は Codex 基準値に対し、低い濃度で推移していた。

ニンジン乾物中のカドミウム濃度について各区を比較したところ、汚泥肥料施用区で根部 0.35 mg/kg, 葉部 0.38 mg/kg, 標準区で根部 0.20 mg/kg, 葉部 0.23 mg/kg であり、根部 ($p=3.2 \times 10^{-4}$), 葉部 ($p=1.2 \times 10^{-5}$) の両部位で汚泥肥料区が有意に高い結果であった。

汚泥肥料の連用によるニンジン乾物中のカドミウム濃度の推移は Fig.5-2 に示した。

Table 8 Yield of carrot and Cadmium concentration (summer 13th)

	Part	Unit	Test plot-1	Test plot-2	Average	Yield index ^{a)}	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
Fresh weight	Root	kg	3.8	3.5	3.6	90	-
	Leaf	kg	3.4	2.9	3.1	144	-
	Total	kg	7.2	6.3	6.7	108	-
Cadmium concentration (fresh matter)	Root	mg/kg	0.053	0.046	0.050	0.050	-
	Leaf	mg/kg	0.056	0.057	0.062	0.066	-
Cadmium concentration (dry matter)	Root	mg/kg	0.38	0.33	0.35	0.35	Significance ^{b)}
	Leaf	mg/kg	0.38	0.39	0.36	0.38	Significance ^{b)}
<Standard plot (SP)>							
Fresh weight	Root	kg	4.2	3.9	4.1		
	Leaf	kg	2.3	2.1	2.2		
	Total	kg	6.5	6.0	6.2		
Cadmium concentration (fresh matter)	Root	mg/kg	0.029	0.030	0.030	0.030	
	Leaf	mg/kg	0.041	0.042	0.040	0.040	
Cadmium concentration (dry matter)	Root	mg/kg	0.19	0.20	0.20	0.20	
	Leaf	mg/kg	0.24	0.25	0.22	0.23	

a) Yield of Standard plot was indexed as 100

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

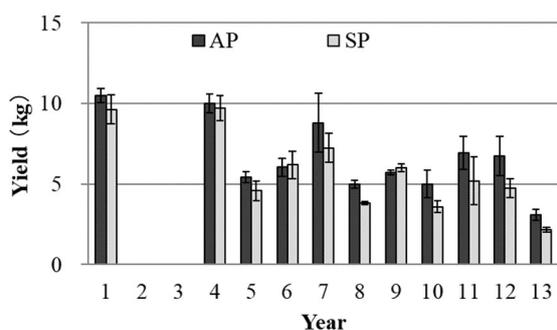


Fig.4-1 The yield of the carrot (leaf) in summer
(Note: 2nd year (spinach), 3rd year (trunip))

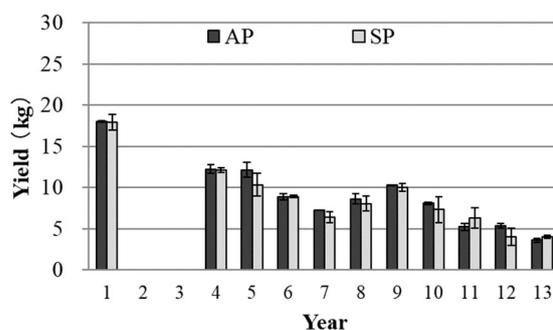


Fig.4-2 The yield of the carrot (root) in summer
(Note: 2nd year (spinach), 3rd year (trunip))

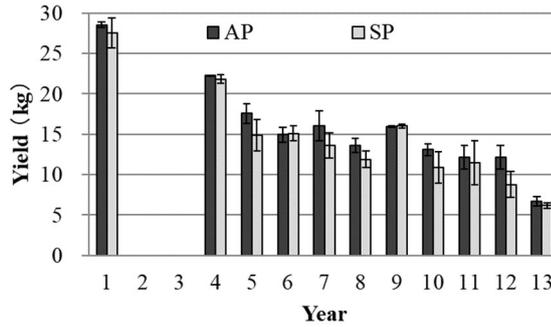


Fig.4-3 The yield of the carrot (total) in summer
(Note: 2nd year (spinach), 3rd year (trunip))

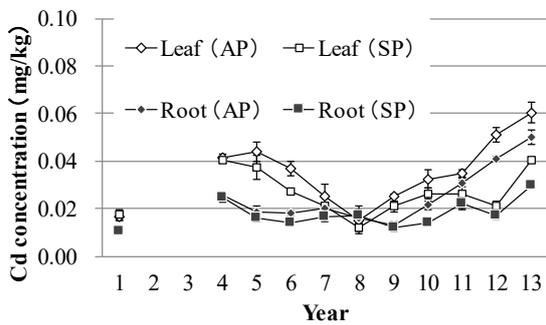


Fig.5-1 Cd concentration (content in the fresh matter) in carrot (Note: 2nd year (spinach), 3rd year (trunip))

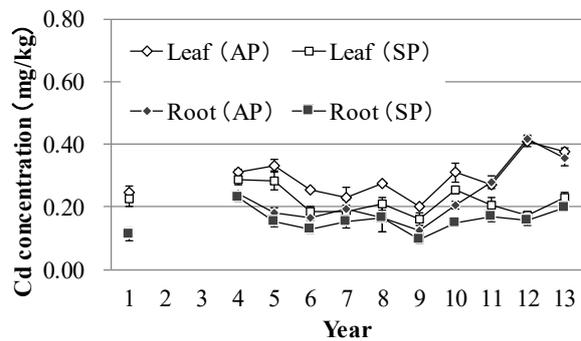


Fig.5-2 Cd concentration (content in the dry matter) in carrot (Note: 2nd year (spinach), 3rd year (trunip))

(2) 跡地土壌のカドミウム

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 9 に示した.

全カドミウム濃度は, 汚泥肥料施用区は 0.63 mg/kg, 標準区は 0.44 mg/kg で, 汚泥肥料施用区が有意に高かった ($p=1.3 \times 10^{-4}$).

0.1 mol/L HCl-Cd は, 汚泥肥料施用区は 0.27 mg/kg, 標準区は 0.15 mg/kg であり, 汚泥肥料施用区が有意に高かった ($p=1.1 \times 10^{-6}$).

Table 9 Characteristics of cultivated soil (summer 13th)

	Unit	Test prot-1		Test prot-2		Average	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.65	0.61	0.64	0.61	0.63	Significance ^{e)}
0.1 mol/L HCl-Cd ^{b)}	mg/kg	0.27	0.27	0.27	0.26	0.27	Significance ^{e)}
pH (H ₂ O) ^{c)}		6.4		6.1			
EC ^{d)}	mS/cm	0.12		0.13			
<Standard plot (SP)>							
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.43	0.43	0.44	0.46	0.44	
0.1 mol/L HCl-Cd ^{b)}	mg/kg	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	
pH (H ₂ O) ^{c)}		6.1		6.1			
EC ^{d)}	mS/cm	0.09		0.07			

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))

3) 跡地土壌中のカドミウムの推移

(1) 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 10 に示した。また、0.1 mol/L HCl-Cd 濃度の推移とともに Fig.6-1 (汚泥肥料施用区) 及び Fig.6-2 (標準区) 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、1 年目夏作からの経過月 (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 10)。13 年目夏作跡地までの汚泥肥料施用区は上昇傾向 ($p=3.8 \times 10^{-5}$) が認められ, 標準区は下降傾向 ($p=2.0 \times 10^{-4}$) 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 1 年目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ことを示している。

Table 10 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)	<i>p</i> -value of single regression analysis ^{d)}	
						AP ^{b)}	SP ^{c)}
1st	Summer	Carrot	0.51	0.48	Significance ^{e)}	—	—
2nd	Summer	Spinach	0.52	0.49	Significance ^{e)}	—	—
3rd	Summer	Turnip	0.51	0.48	Significance ^{e)}	—	—
4th	Summer	Carrot	0.52	0.46	Significance ^{e)}	—	—
5th	Summer	Carrot	0.53	0.46	Significance ^{e)}	—	—
6th	Summer	Carrot	0.57	0.47	Significance ^{e)}	<i>p</i> < 0.05 ^{f)}	0.16
7th	Summer	Carrot	0.57	0.46	Significance ^{e)}	<i>p</i> < 0.01 ^{g)}	0.06
8th	Summer	Carrot	0.54	0.45	Significance ^{e)}	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
9th	Summer	Carrot	0.61	0.46	Significance ^{e)}	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
10th	Summer	Carrot	0.58	0.41	Significance ^{e)}	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01
11th	Summer	Carrot	0.58	0.42	Significance ^{e)}	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01
12th	Summer	Carrot	0.58	0.42	Significance ^{e)}	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01
13th	Summer	Carrot	0.63	0.44	Significance ^{e)}	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01

a) Content in the drying soil

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

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

e) It was significantly different for processing examination section

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

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

g) It show that regression is significant in *p* < 0.01 (1 % of both sides levels of significance)

h) Standard deviations (*n*=4 (2×2) (repetition × number of samples)) of the concentration in the AP and the SP were 0.00 mg/kg - 0.03 mg/kg

(2) 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 11 に示した。また、全カドミウム濃度の推移とともに Fig.6-1 (汚泥肥料施用区), Fig.6-2 (標準区) 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 11)。13 年目夏作跡地までの汚泥肥料施用区の回帰は有意となり, 上昇傾向が認められた(*p*=2.1×10⁻⁴)。10 年目夏作までの各採取時期時点における汚泥肥料施用区の回帰は有意でなく一定で推移している傾向であったが, 10 年目冬作以降上昇に転じた。

一方, 標準区では, 13 年目夏作跡地までの汚泥肥料施用区の回帰は有意となり, 減少傾向が認められた(*p*=8.1×10⁻³)。減少傾向は 3 年目冬作以降継続している。

Table 11 Changes in the 0.1 mol/L HCl-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)	<i>p</i> -value of single regression analysis ^{d)}	
						AP ^{b)}	SP ^{c)}
—	Start	—	0.19	0.20	N.S. ^{e)}	—	—
1st	Summer	Carrot	0.21	0.21	N.S. ^{e)}	—	—
1st	Winter	Spinach	0.20	0.18	Pending ^{f)}	—	—
2nd	Summer	Spinach	0.19	0.17	Pending ^{f)}	—	—
2nd	Winter	Qing geng cai	0.18	0.18	N.S. ^{e)}	—	—
3rd	Summer	Turnip	0.19	0.18	Pending ^{e)}	—	—
3rd	Winter	Spinach	0.20	0.17	Significance ^{g)}	0.63	< 0.05
4th	Summer	Carrot	0.19	0.15	Significance ^{g)}	0.41	< 0.01
4th	Winter	Spinach	0.21	0.17	Significance ^{g)}	0.98	< 0.01
5th	Summer	Carrot	0.20	0.16	Significance ^{g)}	0.89	< 0.01
5th	Winter	Spinach	0.22	0.16	Significance ^{g)}	0.34	< 0.01
6th	Summer	Carrot	0.20	0.15	Significance ^{g)}	0.30	< 0.01
6th	Winter	Spinach	0.21	0.15	Pending ^{f)}	0.17	< 0.01
7th	Summer	Carrot	0.15	0.11	Significance ^{g)}	0.80	< 0.01
7th	Winter	Spinach	0.16	0.11	Pending ^{f)}	0.29	< 0.01
8th	Summer	Carrot	0.19	0.12	Pending ^{f)}	0.30	< 0.01
8th	Winter	Spinach	0.17	0.11	Significance ^{g)}	0.16	< 0.01
9th	Summer	Carrot	0.21	0.14	Significance ^{g)}	0.45	< 0.01
9th	Winter	Spinach	0.27	0.17	Significance ^{g)}	0.51	< 0.01
10th	Summer	Carrot	0.27	0.17	Significance ^{g)}	0.15	< 0.01
10th	Winter	Spinach	0.27	0.16	Significance ^{g)}	< 0.05	< 0.01
11th	Summer	Carrot	0.25	0.15	Significance ^{g)}	< 0.05	< 0.01
11th	Winter	Spinach	0.26	0.17	Significance ^{g)}	< 0.01	< 0.01
12th	Summer	Carrot	0.26	0.16	Significance ^{g)}	< 0.01	< 0.01
12th	Winter	Spinach	0.25	0.15	Significance ^{g)}	< 0.01	< 0.01
13th	Summer	Carrot	0.27	0.15	Significance ^{g)}	< 0.01	< 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) N.S. was not significantly different for processing examination section

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

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

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

g) Significance was significantly different for processing examination section

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

h) Standard deviations ($n=4(2 \times 2)$ (repetition \times number of samples)) of the concentration in the AP and the SP were 0.00 mg/kg - 0.02 mg/kg

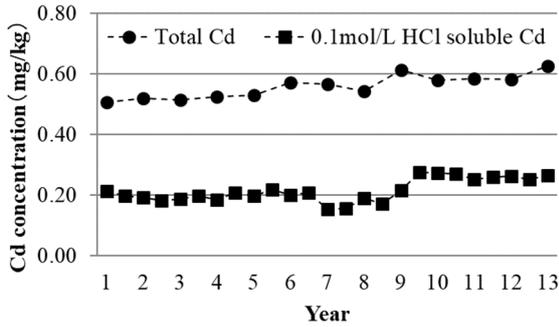


Fig.6-1 Cd concentration of cultivated soil
(AP: Sludge-fertilizer-application plot)

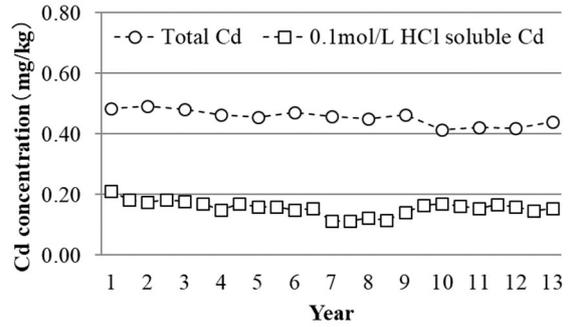


Fig.6-2 Cd concentration of cultivated soil
(SP: Standard plot)

(3) カドミウムの負荷量, 持ち出し量及び蓄積量

1 年目夏作～13 年目年夏作の試験において, 施肥した汚泥肥料由来のカドミウム投入量である負荷量, 作物を栽培したことによるカドミウムの持ち出し量, 土壌への蓄積量及び乾土中のカドミウム蓄積濃度を Table 12, Fig.7 に示した. 試験区へのカドミウムの負荷量は, 汚泥肥料中のカドミウム含有量に試験区(4 m²)への施用量を乗じて算出した. 作物によるカドミウムの持ち出し量は, 試験区における収穫した作物のカドミウム吸収量のこと, 作物の収量に作物中のカドミウム濃度を乗じて算出した. 土壌へのカドミウム蓄積量は, 汚泥肥料によるカドミウムの負荷量と作物によるカドミウムの持ち出し量の差により算出した. 土壌へのカドミウムの蓄積濃度は, カドミウムの蓄積量に試験区当たりの土壌量(作土の深さ 15 cm, 土壌の仮比重 0.7 とし, 試験区(4 m²)当たりの土壌量を 420 kg とした)で除して算出した.

汚泥肥料施用区では, 各試験において, カドミウム負荷量と比較して持ち出し量が少ないことから土壌のカドミウム収支がプラスとなるため, 汚泥肥料の連用によるカドミウム負荷量の増加に伴って土壌蓄積するカドミウムが高まる傾向であることが考えられる. 実測値においても跡地土壌の全カドミウム濃度の増加傾向が認められている. 過去 25 作の試験における汚泥肥料施用区のカドミウム負荷量は 163.6 mg/試験区(40.9 g/10a), カドミウム蓄積濃度(カドミウム蓄積量と試験区土壌量から算出した理論上の土壌中カドミウムの上昇濃度)は 0.355 mg/kg となった.

Table 12 Changes in the quantity of cadmium load by fertilizer, quantity of peculating due to the crops body, and quantity of cadmium accumulation to the soil from the 1st year to the 13th year

Year	Season	Test Crops	Sludge-fertilizer-application plot (AP)				Standard plot (SP)			
			Quantity of cadmium ^{a)}			Concentration of cadmium accumulation ^{e)}	Quantity of cadmium ^{a)}			Concentration of cadmium accumulation ^{e)}
			Load ^{b)}	Removal ^{c)}	Accumulation ^{d)}		Load ^{b)}	Removal ^{c)}	Accumulation ^{d)}	
(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/kg)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/kg)			
1st	Summer	Carrot	4.84	0.39	4.45	0.011	0	0.36	-0.36	-0.001
1st	Winter	Spinach	4.40	1.18	3.22	0.008	0	1.34	-1.34	-0.003
2nd	Summer	Spinach	3.30	0.72	2.58	0.006	0	0.96	-0.96	-0.002
2nd	Winter	Qing geng cai	2.64	0.21	2.43	0.006	0	0.21	-0.21	-0.0005
3rd	Summer	Turnip	3.30	0.17	3.13	0.007	0	0.20	-0.20	-0.0005
3rd	Winter	Spinach	7.04	0.66	6.37	0.015	0	0.56	-0.56	-0.001
4th	Summer	Carrot	7.28	0.73	6.55	0.016	0	0.68	-0.68	-0.002
4th	Winter	Spinach	7.28	0.75	6.53	0.016	0	0.75	-0.75	-0.002
5th	Summer	Carrot	7.28	0.46	6.82	0.016	0	0.34	-0.34	-0.001
5th	Winter	Spinach	7.28	0.73	6.55	0.016	0	0.53	-0.53	-0.001
6th	Summer	Carrot	7.28	0.38	6.90	0.016	0	0.29	-0.29	-0.001
6th	Winter	Spinach	7.28	0.65	6.63	0.016	0	0.42	-0.42	-0.001
7th	Summer	Carrot	7.28	0.36	6.92	0.016	0	0.26	-0.26	-0.001
7th	Winter	Spinach	7.28	0.71	6.57	0.016	0	0.59	-0.59	-0.001
8th	Summer	Carrot	7.28	0.21	7.07	0.017	0	0.18	-0.18	-0.0004
8th	Winter	Spinach	7.28	0.60	6.68	0.016	0	0.57	-0.57	-0.001
9th	Summer	Carrot	7.28	0.28	7.00	0.017	0	0.24	-0.24	-0.001
9th	Winter	Spinach	7.28	0.51	6.77	0.016	0	0.38	-0.38	-0.001
10th	Summer	Carrot	7.28	0.33	6.95	0.017	0	0.20	-0.20	-0.0005
10th	Winter	Spinach	5.68	1.00	4.68	0.011	0	0.51	-0.51	-0.001
11th	Summer	Carrot	5.68	0.40	5.28	0.013	0	0.28	-0.28	-0.001
11th	Winter	Spinach	5.68	0.64	5.04	0.012	0	0.51	-0.51	-0.001
12th	Summer	Carrot	8.53	0.57	7.97	0.019	0	0.17	-0.17	-0.0004
12th	Winter	Spinach	8.53	1.58	6.96	0.017	0	0.81	-0.81	-0.002
13th	Summer	Carrot	9.30	0.37	8.93	0.021	0.76	0.21	0.56	0.0013
Total			163.57	14.60	148.98	0.355	0.76	11.56	-10.79	-0.026

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 (420 kg)

跡地土壤の全カドミウム濃度について、1年目夏作跡地からの実測値と理論値の推移を Table 13 及び Fig.7 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、1年目夏作跡地土壤の実測値を起点として、Table 12 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。

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

Year	Season	Test Crops	Actual measurement		Theoretical value	
			AP ^{b)} (mg/kg)	SP ^{c)} (mg/kg)	AP ^{b) d)} (mg/kg)	SP ^{c) e)} (mg/kg)
1st	Summer	Carrot	0.51	0.48	0.51	0.48
2nd	Summer	Spinach	0.52	0.49	0.52	0.47
3rd	Summer	Turnip	0.51	0.48	0.53	0.47
4th	Summer	Carrot	0.52	0.46	0.56	0.47
5th	Summer	Carrot	0.53	0.46	0.60	0.47
6th	Summer	Carrot	0.57	0.47	0.63	0.46
7th	Summer	Carrot	0.57	0.46	0.66	0.46
8th	Summer	Carrot	0.54	0.45	0.69	0.46
9th	Summer	Carrot	0.61	0.46	0.73	0.46
10th	Summer	Carrot	0.58	0.41	0.76	0.46
11th	Summer	Carrot	0.58	0.42	0.78	0.46
12th	Summer	Carrot	0.58	0.42	0.81	0.45
13th	Summer	Carrot	0.63	0.44	0.85	0.45

a) Total-Cd concentration in the drying soil

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

d) This value is the theoretical total-cadmium concentration of soil when assuming that there was accumulation of the whole quantity cadmium derived from fertilizer to the surface soil of the test plots in a starting point in summer 2009

e) This value is the theoretical total-cadmium concentration of soil when assuming that there was not accumulation of cadmium derived from fertilizer to the surface soil of the test plots in a starting point in summer 2009

f) Standard deviations ($n = 4$ (2×2)) (repetition \times number of samples)) of the actual measurement in the AP and the SP were 0.00 mg/kg - 0.03 mg/kg

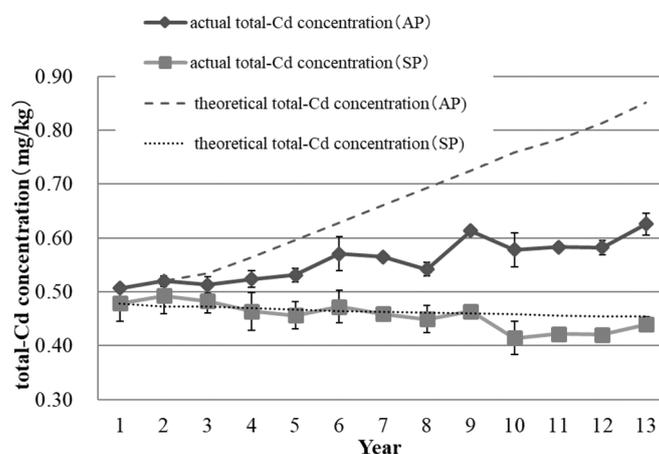


Fig.7 Changes in the actual total-Cd concentration and the theoretical total-Cd concentration of soil after harvest

(4) 形態別カドミウム濃度

1年目～13年目の試験において採取し、保管していた夏作跡地土壌を逐次抽出法により形態別に抽出し、測定した結果を Table 14 に示した。水溶性 Cd は全ての測定値が定量下限未満(0.007 mg/L)となったため表中にも記載しないこととした。

標準区は全ての形態において変動が少なく、特筆すべき点はなかった。

汚泥肥料施用区の形態別 Cd 濃度を全量カドミウム濃度、0.1 mol/L HCl-Cd とともに Fig. 8 に示した。汚泥肥料施用区では横軸に経過月数をとり、各々の形態の濃度について 13 年目までの結果を単回帰分析したところ、置換態 Cd、キレート態 Cd の形態において増加傾向を示し、有機態 Cd は増加傾向を示さなかった。一方、各形態 Cd 測定値含量に対する各形態 Cd 測定値の割合を Fig. 9 に示したが、年ごとに変動はあるものの Cd を負荷していない 1 年目と最も Cd が蓄積している 13 年目において変化は少なかった。

また、置換態 Cd は 0.1 mol/L HCl-Cd と高い相関(相関係数 0.83)を示し、キレート態 Cd は全量 Cd 濃度と高い相関(相関係数 0.82)を示した。また 0.1 mol/L HCl-Cd が置換態 Cd より高いことから、0.1 mol/L HCl は置換態 Cd をほぼ抽出し、キレート態 Cd の一部を抽出していると考えられた。

Table 14 The cadmium concentration^{a)} for each form of cultivated soil

Year	Season	Test Crops	AP			SP		
			Exchangeable (mg/kg)	EDTA soluble (mg/kg)	Slowly soluble (mg/kg)	Exchangeable (mg/kg)	EDTA soluble (mg/kg)	Slowly soluble (mg/kg)
1st	Summer	Carrot	0.02	0.13	0.14	0.01	0.12	0.14
2nd	Summer	Spinach	0.02	0.17	0.18	0.02	0.14	0.16
3rd	Summer	Turnip	0.02	0.15	0.12	0.02	0.14	0.12
4th	Summer	Carrot	0.02	0.16	0.15	0.01	0.13	0.13
5th	Summer	Carrot	0.02	0.17	0.14	0.01	0.14	0.12
6th	Summer	Carrot	0.02	0.18	0.20	0.01	0.14	0.18
7th	Summer	Carrot	0.02	0.18	0.14	0.01	0.13	0.12
8th	Summer	Carrot	0.02	0.20	0.18	0.01	0.14	0.14
9th	Summer	Carrot	0.02	0.22	0.17	0.01	0.13	0.12
10th	Summer	Carrot	0.03	0.22	0.15	0.01	0.13	0.12
11th	Summer	Carrot	0.03	0.20	0.17	0.01	0.12	0.13
12th	Summer	Carrot	0.02	0.17	0.17	0.01	0.12	0.13
13th	Summer	Carrot	0.03	0.21	0.21	0.01	0.13	0.15

a) Cadmium concentration in the drying soil

b) Standard deviations ($n = 4$ (2×2) (repetition \times number of samples)) were 0.00 mg/kg - 0.02 mg/kg

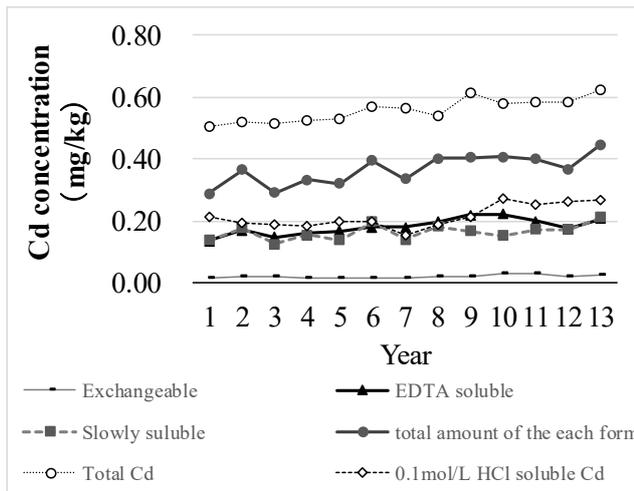


Fig.8 The cadmium concentration for each form of cultivated soil in summer in AP

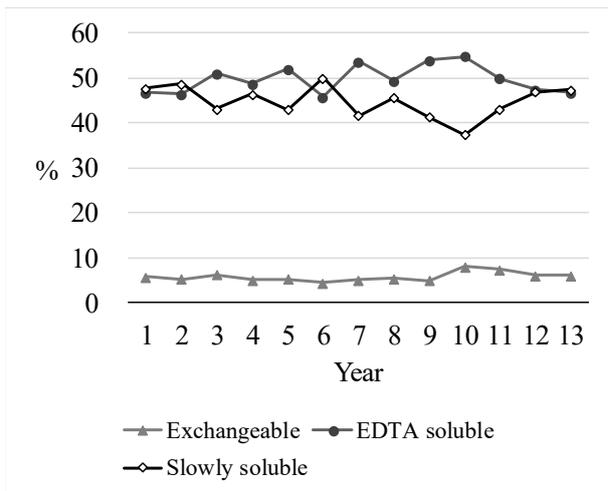


Fig.9 Ratio of each form of cadmium to the total amount of each form of cadmium measured in AP

また, どの形態の Cd が作物体に吸収されやすいか確認するため, 各形態の Cd 濃度に対する作物体中の Cd 濃度の関係を Fig.10 に示した. 図中では施用区, 標準区の別が分かるよう図示したが, 土壌中と作物体中の Cd 濃度の関係を示すことから, 相関係数は試験区を区別せず求めた. なお, ホウレンソウは冬作であるが, 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度以外の形態については夏作跡地を使用しているため, 半年後の土壌との相関を示した.

各々の相関を相関係数で示すと, 置換態(Exchangeable)はニンジン根:0.5756, ニンジン葉:0.5796, ホウレンソウ:0.5664 と作物体全てと相関が認められた. キレート態(EDTA soluble)はニンジン根:0.4168, ニンジン葉:0.4609, ホウレンソウ:0.3827 とニンジン根, 葉について相関を示した. 有機態(Slowly soluble)はニンジン根:0.4567, ニンジン葉:0.3976, ホウレンソウ:0.3080 とニンジン根のみに相関を示した. 0.1 mol/LHCl-Cd はニンジン根:0.6255, ニンジン葉:0.6706, ホウレンソウ:0.6196 と作物体全てにおいて他の形態と比較し高い相関が認められた. これらの結果から 0.1 mol/LHCl-Cd で土壌中の可給態 Cd 濃度を推察可能であると考えられた.

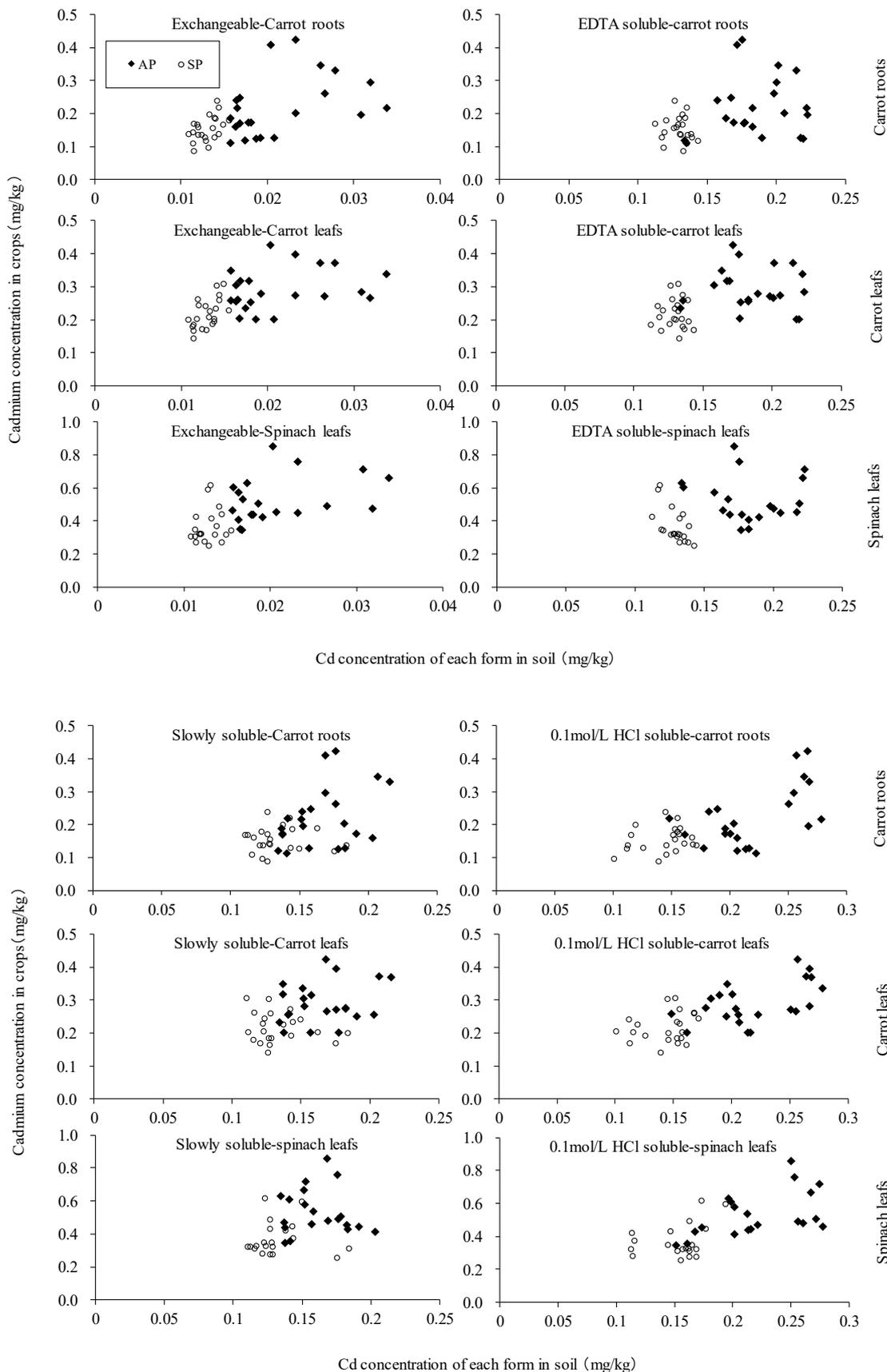


Fig.10 Correlation between the cadmium concentration of each form in soil and the cadmium concentration in crops

5. まとめ

肥料の有効性及び安全の確保に必要な課題に関する調査研究として，汚泥肥料の連用施用試験を2009年より行っており，汚泥肥料施用区及び汚泥肥料無施用の標準区の2試験区に，12年目冬作としてホウレンソウを，13年目夏作としてニンジン栽培し，土壌中のカドミウム濃度の変化及び作物体中のカドミウム濃度を確認した．12年目冬作ホウレンソウ現物中のカドミウム濃度は，汚泥肥料区で0.090 mg/kg，標準区で0.045 mg/kgであり，Codex基準値(0.2 mg/kg)に対して低い結果であった．また，ホウレンソウ乾物中のカドミウム濃度は汚泥肥料施用区が標準区に対して有意に高く，汚泥肥料施用区における12年目の乾物中カドミウム濃度は試験開始以降最も高い値となった．

ニンジン現物中のカドミウム濃度は，汚泥肥料施用区で葉部0.060 mg/kg，根部0.050 mg/kg，標準区で葉部0.030 mg/kg，根部0.040 mg/kgであった．可食部である根部のカドミウム濃度はCodex基準値(0.1 mg/kg)に対して低い結果であった．

また，ニンジン乾物中のカドミウム濃度について各区を比較したところ，葉部及び根部の両部位で汚泥肥料施用区が有意に高い結果であった．13年目夏作ニンジンの跡地土壌の全カドミウム濃度は汚泥肥料施用区が標準区に比べて有意に高かった．

1年目から13年目の跡地土壌中の全カドミウム濃度及び0.1 mol/L HCl-Cd濃度の推移を解析したところ，汚泥肥料施用区の全カドミウム濃度は増加傾向を示しており，汚泥肥料に含有するカドミウムが土壌に蓄積していることが示された．一方で，汚泥肥料施用区の0.1 mol/L HCl-Cdについては10年目夏作までは一定に推移する傾向が示されていたが，10年目冬作以降は増加傾向を示している．汚泥肥料に含有するカドミウムは土壌中においては有機物等と結合¹⁸⁾することにより不溶化していると考えられているが，跡地土壌中のカドミウム量が増え，有機物と結合可能な量を超過したことにより，0.1 mol/L HClに溶解する形態のカドミウム量も増加したと考えられた．

標準区の全カドミウム濃度は減少傾向であり，0.1 mol/L HCl-Cdについても減少傾向を示した．標準区の全カドミウムは施肥によるカドミウムの供給がないため減少し，また，作物体が0.1 mol/L HCl-Cdを持ち出すため，土壌中の0.1 mol/L HCl-Cdも減少すると考えられた．

試験で施肥した汚泥肥料由来のカドミウム投入量である負荷量及び作物を栽培したことによるカドミウムの持ち出し量から，土壌に蓄積されているはずのカドミウムの量を算出したところ，標準区は実測値と理論値がほぼ一致して推移していた．一方，汚泥肥料施用区は，理論値と比較して実測値の方が低い傾向で推移していた．これは，後藤ら¹⁹⁾や過去の調査結果²⁰⁾から，土壌中のカドミウムの水平方向への移行が認められたことから耕耘により一部のカドミウムが作土に留まらないことによるものと考えられた．

これまでの汚泥肥料の試験区への連用の結果，収穫された作物のCd濃度及び土壌へのCdの蓄積について当分は問題ないと考えられる．しかしながら，跡地土壌中の全カドミウム濃度が増加しており，土壌に添加したカドミウムの形態変化の可能性があることから，当該事項を確認するため，1年目から13年目の夏作跡地土壌を逐次抽出し，水溶性，置換態，キレート態，有機態の各形態のカドミウム濃度を測定した．

汚泥肥料施用区において各々の形態の濃度を経過月数に対し13年目までの結果を単回帰分析したところ，置換態Cd，キレート態Cdは上昇傾向を示したが，有機態Cdは上昇傾向を示さなかった．

しかしながら，抽出した各形態のCd含量に対するそれぞれの形態Cdの割合は年ごとに変化はあるものの，1年目と13年目においてほぼ変動していなかった．このことから，土壌の状態で含有するカドミウムの形態が変化することはあるが，土壌へのカドミウムの蓄積量の増加とカドミウムの形態変化に一定の関係性は認められな

いと考えられた。

また、作物への可給性との関連について各形態のカドミウム濃度と作物体中のカドミウム濃度との相関を確認した結果、0.1 mol/LHCl-Cd がニンジン根:0.6255, ニンジン葉:0.6706, ホウレンソウ:0.6196 と作物体全てにおいて他の形態と比較し高い相関が認められ、0.1 mol/LHCl-Cd で土壤中の可給態 Cd 濃度を推察可能であると考えられた。

作物や土壌への影響について明確な傾向が把握されたとは言えず、今後もモニタリングしていく必要がある。

文 献

- 1) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律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,最終改正令和4年2月15日,農林水産省告示第302号(2022)
- 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) 浅尾直紀,村山和晃,松尾信吾,小塚健志,阿部文浩:汚泥肥料の連用によるカドミウム等の土壌への蓄積,作物への吸収試験(継続)ー2019年冬作・2020年夏作ー,肥料研究報告,14,141~161,(2021)
- 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(2021)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2021.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) 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> >
- 8) 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> >
- 9) 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> >
- 10) 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 >
- 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) マイルストーンゼネラル株式会社:マイクロ波分解装置取扱説明書,セグメント高圧ローター SK-15ET 標準アプリケーションレポート
- 14) 財団法人日本土壌協会:土壌,水質及び植物体分析法,東京(2001)
- 15) 農林省省令:農用地土壌汚染対策地域の指定要件に係るカドミウムの量の検定の方法を定める省令,昭

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

- 16) 長井武雄, 山内益夫: 鳥取県八頭郡河原町における梨葉黄化症の発生原因とその対策に関する研究(第 2 報), 鳥取大学農学部研究報告, 27, 42-48(1975)
- 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) 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, 49, (2011)
- 19) 後藤茂子, 林浩昭, 山岸順子, 米山忠克, 茅野充男: 下水汚泥コンポストの長期連用に伴う重金属の土壌への蓄積と水平方向への移行, 日本土壌肥料学雑誌, 73(4), 391~396, (2002)
- 20) 阿部進, 鈴木時也, 田中雄大, 阿部文浩, 橋本良美, 廣井利明, 加島信一: カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における汚泥肥料連用の影響(継続) - 2014 年冬作・2015 年夏作 -, 肥料研究報告, 8, 77~108, (2016)

Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued Report)
- Winter 2020 and Summer 2021 -

ASAO Naoki¹, KOBAYASHI Ryoto², MASUI Ryota²,
MURAYAMA Kazuaki³ and ABE Fumihiko²

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

² FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department

³ FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department, (Now) Agricultural Chemicals Inspection Station

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 2020 and carrot in summer 2021. 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 750 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 based on 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 summer 2012. The concentration of total-Cd in the soil (from summer 2009 to summer 2021) showed significant increasing trend in the AP. The concentrations of cadmium in each crop harvested (from summer 2009 to summer 2021) 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.

In addition, the accumulation of cadmium in the soil was observed from the results of the total cadmium concentration in the former soil, and the amount of 0.1 mol/L HCl-Cd is increasing year by year, and the available cadmium is also in the soil. It was thought to be increasing. In order to understand the cadmium in the soil in more detail, the soil from the 1st to the 13th year was extracted using water, ammonium acetate solution, EDTA solution, etc., and the cadmium concentration in each solution was measured.

Key words sludge fertilizer, continuous application, cadmium

(Research Report of Fertilizer, **15**, 108-134, 2022)

9 2021年度 全国共通試料を用いた肥料の

外部精度管理試験成績の解析

大島舞弓¹, 白澤優子², 恵智正宏³, 天野忠雄⁴,
神川孝文⁵, 田中雄大⁶, 秋元里乃¹, 引地典雄⁷

キーワード 外部精度管理, 高度化成肥料, 有機入り化成肥料, ISO/IEC 17043, zスコア

1. はじめに

市場のグローバル化が進む中, 適合性評価に係る手続きが国際貿易の障害となることが無いように, WTO/TBT 協定では国際規格を用いることが義務づけられており, 我が国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)¹⁾を踏まえた分析結果の信頼性確保が重要視されている. ISO/IEC 17025 の要求事項には, 外部精度管理として定期的に技能試験に参加することが求められており, 試験所は技能試験に参加することで, 分析結果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, 肥料検査機関等の試験所においても, 分析結果の妥当性維持や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⁾による内部品質管理が日常的になりつつあり, 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分析結果の妥当性確認は不可欠となっている.

しかし, 肥料を基材とした技能試験を開催している第三者機関が国内外にないため, 肥料分野の試験所においては, 地域ごとに肥料品質保全協議会主催により会員に対して共通試料による手合わせ分析を実施していた. この共通試料による手合わせ分析を全国統一し, 2006 年度より全国肥料品質保全協議会会員の試験所を中心に, 共通の試料を用いた共同試験を実施し, 試験所間比較の結果を用いて外部精度管理を行っている. 2021 年度は高度化成肥料及び有機入り化成肥料を用い, 試料調製及び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

高度化成肥料は, 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

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

⁵ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

⁶ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

⁷ 公益財団法人日本肥糧検定協会

保管した。その後、試料をよく混合し、のし餅状に広げて短冊状に 9 等分し、1~9 の区分番号を付して容器に移した。この中から表 1 の混合操作表の組合せに従い 4 区分を抽出し、よく混合したのち 4 等分して元の容器に戻した。この操作を 7 回繰り返した後、1~9 の各区分の容器から一定量ずつ採取し、よく混合した後、1 袋当たり約 200 g 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。

有機入り化成肥料も同様に調製を行い、表 2 の混合操作表の組合せに従い混合した。

表1 高度化成肥料の混合操作表

混合回数	I	II	III	IV	V	VI	VII
区分番号	3	9	7	5	7	3	8
	6	1	1	8	6	8	2
	2	5	8	3	9	4	5
	4	7	2	4	1	6	6

表2 有機入り化成肥料の混合操作表

混合回数	I	II	III	IV	V	VI	VII
区分番号	1	2	6	4	5	9	8
	7	6	8	9	7	2	4
	3	9	4	3	1	6	7
	8	5	1	5	2	4	3

2) 均質性確認

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁴⁾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。高度化成肥料については水溶性りん酸(W-P₂O₅)及び水溶性加里(W-K₂O)、有機入り化成肥料については窒素全量(T-N)及び水溶性加里(W-K₂O)を各均質性確認用試料につき 2 点併行で分析した。

3) 配付及び実施期間

試料番号を付した試料、実施要領及び分析成績報告書様式を 2021 年 6 月 25 日から参加試験室に配付し、実施期間は試料到着日から 2021 年 8 月 20 日まで、報告期限は 2021 年 8 月 27 日までとした。2021 年度においては、高度化成肥料は 121 試験室、有機入り化成肥料は 124 試験室が参加した。

3. 共同試験の試験項目及び試験方法

1) 試験項目

高度化成肥料については、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)の 4 項目を試験項目とした。また、有機入り化成肥料については、窒素全量(T-N)、アンモニア性窒素(A-N)、水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)、ひ素(As)、カドミウム(Cd)及び鉛(Pb)の 7 項目を試験項目とした。

2) 試験方法

参加試験室に対して肥料等試験法(2020)⁵⁾を例示し、その試験方法は表3のとおりである。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。

表3 試験方法

試験項目	試験項目 番号 ¹⁾	試験法の概要	
		試料液調製方法	測定方法
(高度化成肥料)			
く溶性りん酸(C-P ₂ O ₅)	4.2.3.a	くえん酸抽出	バナドモリブデン酸アンモニウム 吸光光度法
く溶性苦土(C-MgO)	4.6.3.a	くえん酸抽出	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	くえん酸抽出	アゾメチンH法
(有機入り化成肥料)			
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.a	蒸留	中和滴定法
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 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/フレイム 光度法
	5.2.a	硫酸-硝酸-過塩素酸分解	水素化物発生原子吸光法
ひ素(As)	5.2.b	硫酸-硝酸-過塩素酸分解	ジエチルジチオカルバミド酸銀 吸光光度法
	5.3.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

1) 肥料等試験法の試験項目番号。

4. 統計解析方法及び試験結果の評価方法

1) 報告された試験結果の評価

(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、第1四分位数及び第3四分位数を求め、(a)式により四分位数範囲(IQR)を算出した。

$$IQR = \text{第3四分位数} - \text{第1四分位数} \quad \dots (a)$$

正規四分位数範囲(NIQR)を(b)式により算出した。正規分布の場合、NIQRと標準偏差は一致する。

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

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

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

(2) z スコアによる評価

データの解析手法として、ISO/IEC 17043 (JIS Q 17043)³⁾を用い、各試験室の試験結果の 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) 試験結果全体を評価する統計量

各成分の報告された試験結果全体を評価するため、次の統計量を求めた。

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

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

- (6) 全データの標準偏差 (s)。
- (7) 正規四分位数範囲 ($NIQR$) を (b) 式により算出した。正規分布の場合、 $NIQR$ と s は一致する。
- (8) ロバスト法から求めた相対標準偏差を RSD_{rob} とし、(e) 式により算出した。

$$RSD_{rob} = NIQR / \text{Median} \times 100 \quad \dots (e)$$

- (9) 肥料等試験法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、 $CRSD_R$ の値の 2 倍まで許容している。この精度の目安は、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 点併行で分析した分析結果の総平均値 (\bar{x}) 及びその結果についての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 4 に示した。更に、肥料等試験法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 4 に示した。

均質性の判定は、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁴⁾の手順を参考に実施した。まず、分析結果の等分散性を確認するため、分析結果について 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、これらの分析結果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、共同試験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、 $\hat{\sigma}_R$ と比較していずれの成分も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⁵⁾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 4 均質性確認の結果

肥料の種類	分析成分	試料数	\bar{x} a) (%) ^{b)}	$CRSD_R$ c) (%)	$\hat{\sigma}_R$ d) (%) ^{b)}	s_{bb} e) (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ f) (%) ^{b)}	s_r g) (%) ^{b)}	s_{b+r} h) (%) ^{b)}
高度化成肥料	W-P ₂ O ₅	10	12.33	3	0.37	0 ⁱ⁾	0.11	0.08	0.08
	W-K ₂ O	10	13.37	3	0.40	0 ⁱ⁾	0.12	0.09	0.09
有機入り化成肥料	T-N	10	9.44	4	0.38	0 ⁱ⁾	0.11	0.07	0.07
	W-K ₂ O	10	9.00	4	0.36	0 ⁱ⁾	0.11	0.17	0.17

a) 総平均定量値(試料数×2点併行分析)

b) 質量分率

c) 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

d) 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

e) 試料間標準偏差

f) 均質性の判定(s_{bb} の評価)のためのパラメータ

g) 併行標準偏差

h) 併行精度を含む試料間標準偏差

i) グループ間分散 < グループ内分散のため、 $s_{bb}=0$

2) 試験結果の解析

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 5 に示した。各試験項目の試験結果で「満足 ($|z| \leq 2$)」との評価を受けた試験室の割合は、有機入り化成肥料中のカドミウム及び鉛が 92 %と最も高く、高度化成肥料中のく溶性りん酸が 81 %と最も低い割合を示した。また、「不満足 ($|z| \geq 3$)」と評価を受けた試験室の割合は、高度化成肥料のく溶性りん酸が 17 %と最も高い結果であった。昨年度は、「満足」と評価された試験室の割合が 79 %～93 %、「不満足」と評価された試験室の割合が 2 %～13 %であった。

4.2) (3)～(9)で求めた統計量を表 6 に示した。多くの試験項目で全体の平均値はメディアンとほぼ一致したが、外れ値の影響を受け、一部の試験項目で平均値とメディアンの差が認められた。また、全体の標準偏差 s は、すべての試験項目で $NIQR$ と比較して大きな値を示した。 RSD_{rob} と各試験項目の濃度レベルにおける $CRSD_R$ 及び $CRSD_R$ の 2 倍の値との関係を図 1 に示した。鉛についてのみ $CRSD_R$ を超えたが、肥料等試験法で精度として許容されている範囲内であった。その他の試験項目はいずれも、 RSD_{rob} は $CRSD_R$ の範囲内であった。

また、本年度 8 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 7 に示した。

表5 zスコアによる試験結果の評価

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 (%)
(高度化成肥料)							
C-P ₂ O ₅	116	94	81	2	2	20	17
C-MgO	119	103	87	6	5	10	8
C-MnO	111	92	83	9	8	10	9
C-B ₂ O ₃	98	84	86	6	6	8	8
(有機入り化成肥料)							
T-N	118	104	88	4	3	10	8
A-N	110	96	87	4	4	10	9
W-P ₂ O ₅	117	101	86	8	7	8	7
W-K ₂ O	118	102	86	7	6	9	8
As	36	30	83	3	8	3	8
Cd	52	48	92	1	2	3	6
Pb	36	33	92	2	6	1	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6 共同試験結果の統計量

試験項目	試験室数	Mean ^{a)} (%) ⁱ⁾	Median ^{b)} (%) ⁱ⁾	$U_{95\%}$ ^{c)} (%) ⁱ⁾	s ^{d)} (%) ⁱ⁾	$NIQR$ ^{e)} (%) ⁱ⁾	RSD_{rob} ^{f)} (%)	$CRSD_R$ ^{g)} (%)	$2 \times CRSD_R$ ^{h)} (%)
(高度化成肥料)									
C-P ₂ O ₅	116	17.16	17.39	0.041	1.0	0.22	1.3	3	6
C-MgO	119	3.67	3.69	0.020	0.33	0.11	3.0	4	8
C-MnO	111	0.452	0.457	0.004	0.05	0.02	4.1	6	12
C-B ₂ O ₃	98	0.224	0.226	0.002	0.02	0.01	5.2	6	12
(有機入り化成肥料)									
T-N	118	9.43	9.47	0.017	0.27	0.09	1.0	4	8
A-N	110	9.04	9.07	0.020	0.19	0.10	1.1	4	8
W-P ₂ O ₅	117	5.94	5.93	0.016	0.42	0.09	1.5	4	8
W-K ₂ O	118	8.84	8.82	0.038	0.61	0.21	2.3	4	8
As	36	5.40	5.49	0.15	0.78	0.44	8.0	16	32
Cd	52	2.14	2.12	0.041	0.19	0.15	7.0	16	32
Pb	36	14.35	14.49	0.69	2.5	2.1	14.2	11	22

- a) 全体の平均値(報告桁数)
- b) 全体の中央値(報告桁数)
- 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($NIQR$ /メディアンを%表示したもの)
- 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) 質量分率

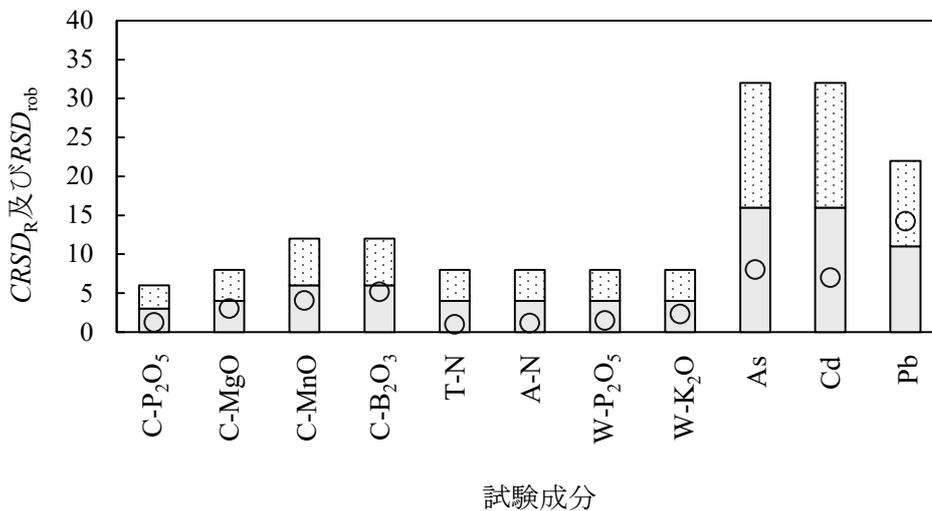


図1 各試験結果の $CRSD_R$ と RSD_{rob} の関係
 □ $2 \times CRSD-R$ □ $CRSD-R$ ○ $RSD-rob$

表7 試験方法別の共同試験結果の統計量

試験項目	試験方法	報告試験室数	Median ^{a)} (%) ^{d)}	NIQR ^{b)} (%) ^{d)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	2×CRSD _R ^{e)} (%)
(高度化成肥料)							
C-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム法	111	17.41	0.14	0.78	3	6
C-MgO	フレイム原子吸光法	107	3.69	0.11	2.9	4	8
	ICP-OES法	9	3.68	0.10	2.7	4	8
C-MnO	フレイム原子吸光法	101	0.458	0.02	3.4	6	12
	ICP-OES法	9	0.452	0.02	3.3	6	12
C-B ₂ O ₃	アゾメチンH法	85	0.226	0.01	4.8	6	12
	ICP-OES法	13	0.229	0.01	6.1	6	12
(有機入り化成肥料)							
T-N	燃焼法	22	9.48	0.10	1.0	4	8
	ケルダール法	96	9.47	0.09	0.94	4	8
A-N	蒸留法	108	9.08	0.09	1.0	4	8
W-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム法	113	5.93	0.09	1.5	4	8
W-K ₂ O	フレイム原子吸光法	91	8.82	0.17	2.0	4	8
	フレイム光度法	23	8.82	0.20	2.2	4	8
As	水素化物発生原子吸光法	17	5.75	0.53	9.3	16	32
	ジエチルジチオカルバミド酸銀吸光光度法	12	5.38	0.11	2.0	16	32
Cd	フレイム原子吸光法	44	2.11	0.10	4.9	16	32
Pb	フレイム原子吸光法	27	14.59	1.4	9.4	11	22

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) 試験結果の傾向

同一の試験室において報告された異なる試験結果のうち、同一試料・同様の抽出方法で異なる成分(高度化成肥料中の C-P₂O₅と C-MgO 等)、異なる抽出方法で同一の成分(高度化成肥料中の C-P₂O₅と有機入り化成肥料中の W-P₂O₅)の z スコアの関係を図 2-1～図 2-8 に示した。

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抽出方法又は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。図で示した、いずれの成分においても系統的な偏りは認められず、測定において単発的に偏りが生じている試験室があった。なお、極端に外れたデータを表示すると、大多数のプロットの傾向を視認できなくなるため、表示範囲を z スコア 20 以内としたが、それを超えるデータにおいても系統的な偏りは認められなかった。

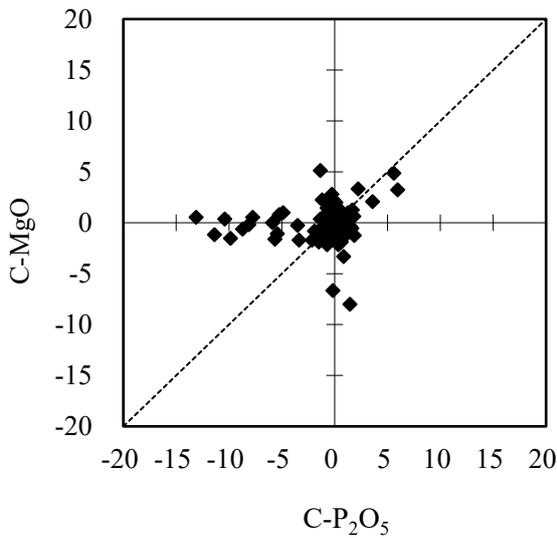


図2-1 高度化成肥料中のC-P₂O₅—C-MgOのzスコアの関係

◆ 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)

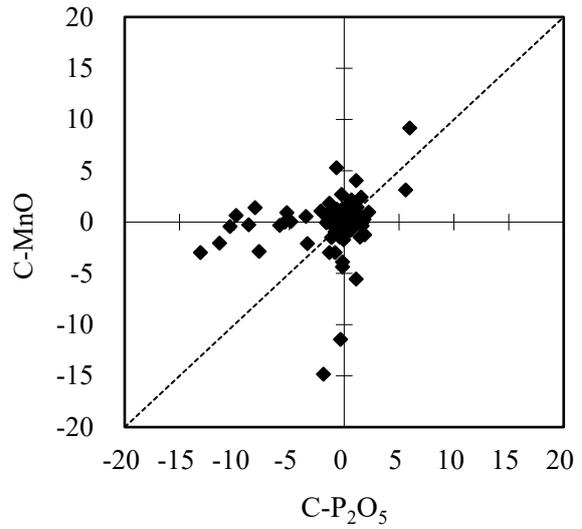


図2-2 高度化成肥料中のC-P₂O₅—C-MnOのzスコアの関係

◆ 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)

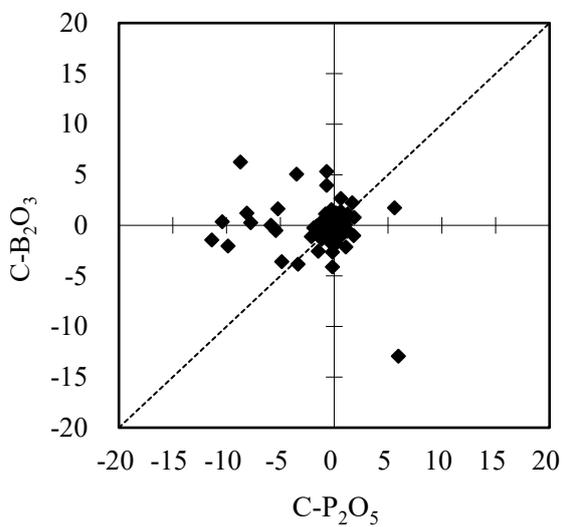


図2-3 高度化成肥料中のC-P₂O₅—C-B₂O₃のzスコアの関係

◆ 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)

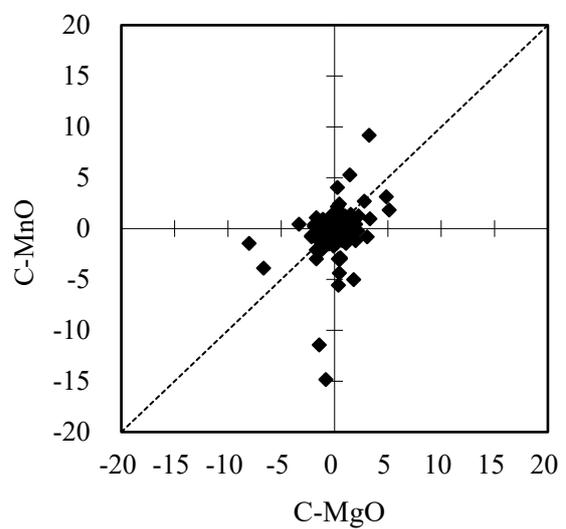


図2-4 高度化成肥料中のC-MgO—C-MnOのzスコアの関係

◆ 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)

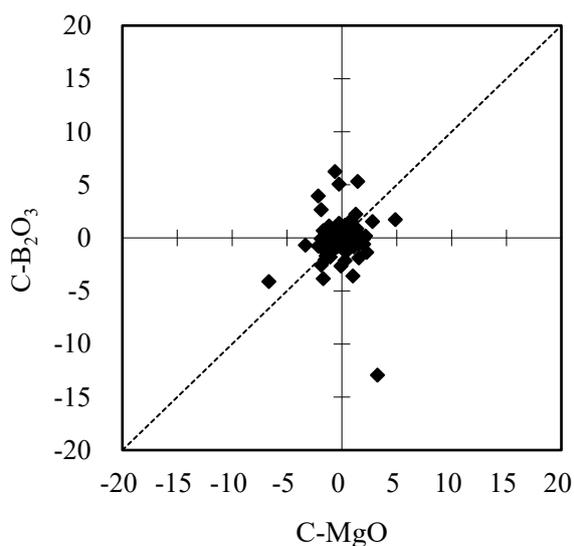


図2-5 高度化成肥料中のC-MgO—C-B₂O₃のzスコアの関係

◆ 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)

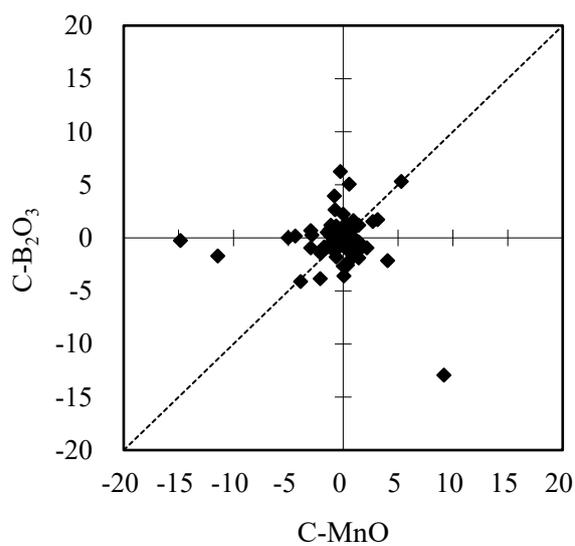


図2-6 高度化成肥料中のC-MnO—C-B₂O₃のzスコアの関係

◆ 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)

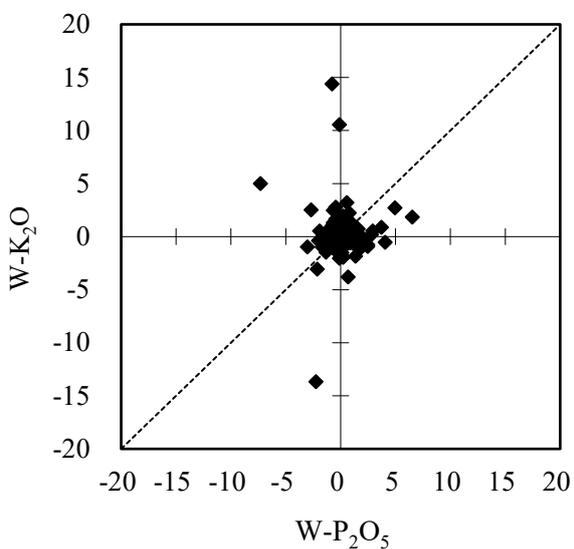


図2-7 有機入り化成肥料中のW-P₂O₅—W-K₂Oのzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット
 ----- 線形 (zスコアが同じ値を示す直線)

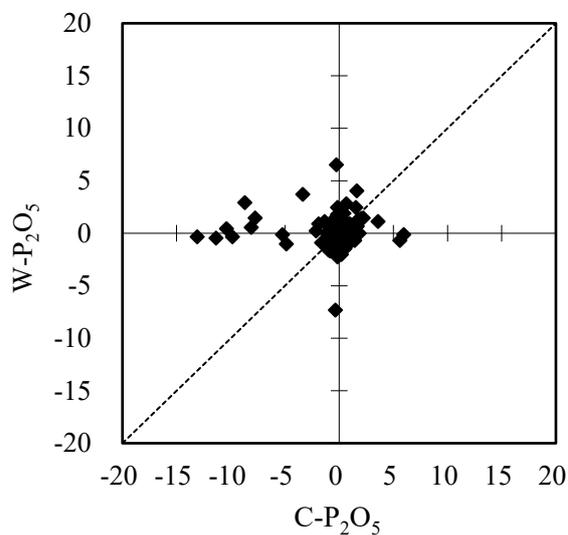


図2-8 高度化成肥料中のC-P₂O₅—有機入り化成肥料中のW-P₂O₅のzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット
 ----- 線形 (zスコアが同じ値を示す直線)

4) 試験項目別の試験結果の評価

(1) 高度化成肥料中のく溶性りん酸(C-P₂O₅)

116 試験室が参加し 111 試験室がバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法, 5 試験室が ICP-OES 法を用いた. 報告された分析結果のメディアンは 17.39 % (質量分率), *NIQR* は 0.22 % (質量分率), 平均値は 17.16 % (質量分率) であった. 94 試験室は「満足」であり, 20 試験室が「不満足」な結果であった. 「不満足」の評価のうち, 19 試験室がバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法, 1 試験室が ICP-OES 法であった.

「不満足」な結果となった試験室は低値に偏りが見られたが, 抽出の際に使用するくえん酸溶液の温度が低いと適切に抽出されていない可能性があるため, くえん酸溶液を添加する際に溶液が 30 °C に加温されていること, 抽出機器として使用する振り混ぜ機, 若しくは恒温水槽内が予め 30 °C になっていることを確認する必要がある.

また, 測定時には, 試料溶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すると良い.

(2) 高度化成肥料中のく溶性苦土(C-MgO)

119 試験室が参加し, 107 試験室がフレイム原子吸光法, 9 試験室が ICP-OES 法, 3 試験室が EDTA 法を用いた. フレイム原子吸光法及び ICP-OES 法について, 分析結果の平均値の差による検定 (*t*-検定) を行ったところ, 有意水準 5 % で有意な差は認められなかった. 報告された分析結果のメディアンは 3.69 % (質量分率), *NIQR* は 0.11 % (質量分率), 平均値は 3.67 % (質量分率) であった. 103 試験室は「満足」であり, 10 試験室が「不満足」な結果であった. 「不満足」の評価のうち, 8 試験室がフレイム原子吸光法, 1 試験室が ICP-OES 法, 1 試験室が EDTA 法であった.

検量線法での測定では直線性に留意し, 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し直すことが望ましい. また, 定量には試料溶液の噴霧効率が影響するため, 測定時には試料溶液及び標準液の温度, 酸組成及び酸濃度を同一とするよう注意する必要がある.

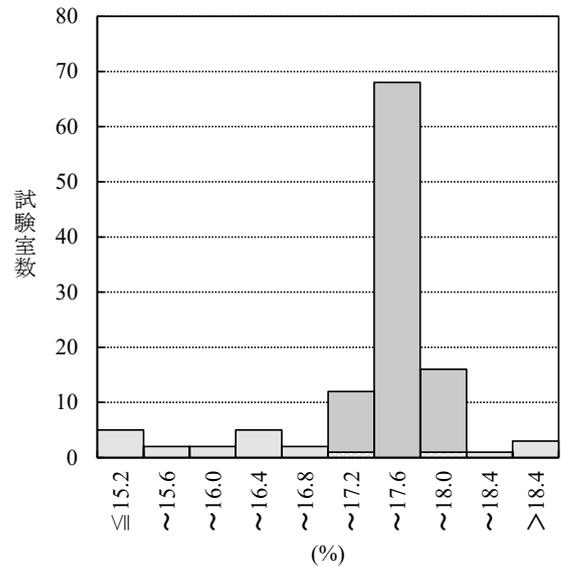


図3-1 高度化成肥料中のく溶性りん酸の分析成績

□満足 □疑わしい □不満足

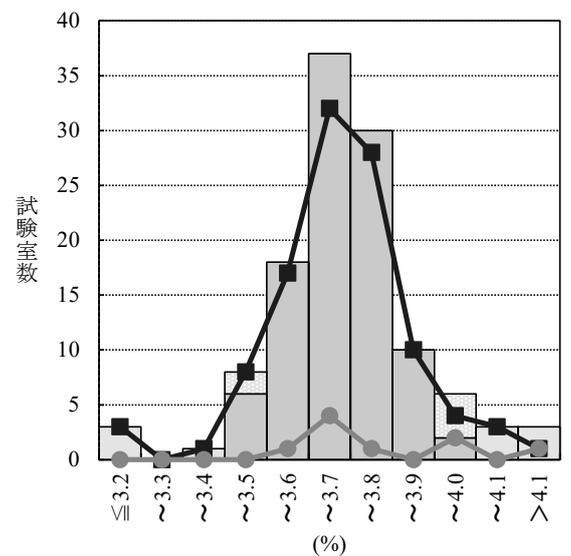


図3-2 高度化成肥料中のく溶性苦土の分析成績

□満足 □疑わしい
 □不満足 ■フレイム原子吸光法
 ●ICP-OES法

(3) 高度化成肥料中のく溶性マンガ(C-MnO)

111 試験室が参加し, 101 試験室がフレイム原子吸光法, 9 試験室が ICP-OES 法, 1 試験室が過ヨウ素酸カリウム法を用いた. フレイム原子吸光法及び ICP-OES 法について, 分析結果の平均値の差による検定 (*t*-検定) を行ったところ, 有意水準 5 % で有意な差は認められなかった. 報告された分析結果のメディアンは 0.457 % (質量分率), *NIQR* は 0.02 % (質量分率), 平均値は 0.452 % (質量分率) であった. 92 試験室は「満足」であり, 10 試験室が「不満足」な結果であった. 「不満足」の評価のうち, 9 試験室がフレイム原子吸光法, 1 試験室が ICP-OES 法であった.

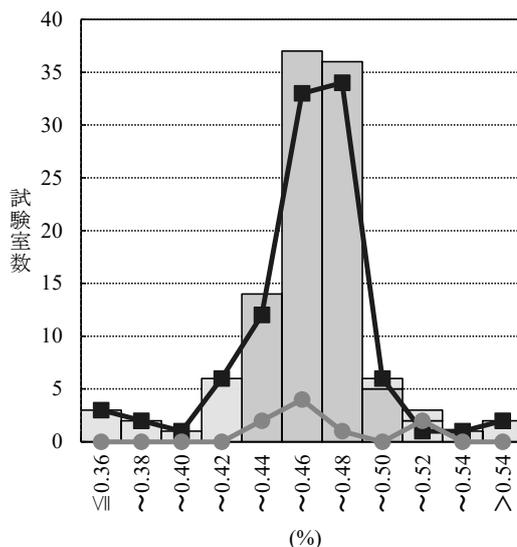


図3-3 高度化成肥料中のく溶性マンガンの分析成績

満足 不満足 疑わしい フレイム原子吸光法 ICP-OES

(4) 高度化成肥料中のく溶性ほう素(C-B₂O₃)

98 試験室が参加し, 85 試験室がアゾメチン H 法, 13 試験室が ICP-OES 法を用いた. 2 方法について平均値の差による検定 (*t*-検定) を行ったところ, 有意水準 5 % で有意な差は認められなかった. 報告された分析結果のメディアンは 0.226 % (質量分率), *NIQR* は 0.01 % (質量分率), 平均値は 0.224 % (質量分率) であった. 84 試験室が「満足」であり, 8 試験室が「不満足」な結果であった. 「不満足」の評価のうち, 7 試験室がアゾメチン H 法, 1 試験室が ICP-OES 法であった.

また, アゾメチン H 法で試験した試験室のうち 16 試験室は吸光度補正の作業を実施し, 69 試験室は吸光度補正の作業を実施しなかったが, 吸光度補正の有無について平均値の差による検定 (*t*-検定) を行ったところ, 有意水準 5 % で有意な差は認められなかった. 今回の試料についてはほとんど着色していなかったため, 補正の有無の影響は現れなかった.

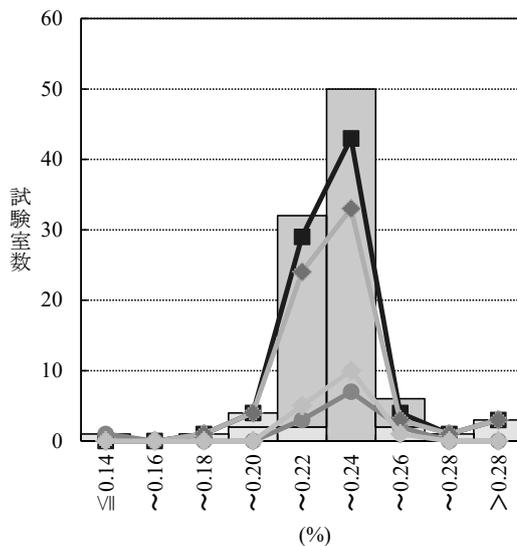


図3-4 高度化成肥料中のく溶性ほう素の分析成績

満足 不満足 疑わしい アゾメチンH法 ICP-OES 補正あり 補正なし

(5) 有機入り化成肥料中の窒素全量(T-N)

118 試験室が参加し、96 試験室がケルダール法、22 試験室が燃焼法であった。2 方法について平均値の差による検定(t -検定)を行ったところ、有意水準 5 % で有意な差は認められなかった。報告された分析結果のメディアンは 9.47 % (質量分率)、 $NIQR$ は 0.09 % (質量分率)、平均値は 9.43 % (質量分率)であった。104 試験室が「満足」であり、10 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」のうちケルダール法が 7 試験室、燃焼法が 3 試験室であった。

ケルダール法の注意点として、高濃度の硫酸液に水酸化ナトリウム溶液を添加する際、アンモニア性窒素の流出が早いため、水酸化ナトリウム溶液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、経路の詰まり・抜け等が無い使用前に装置を確認すること、また、滴定液のファクター算出等に留意されたい。

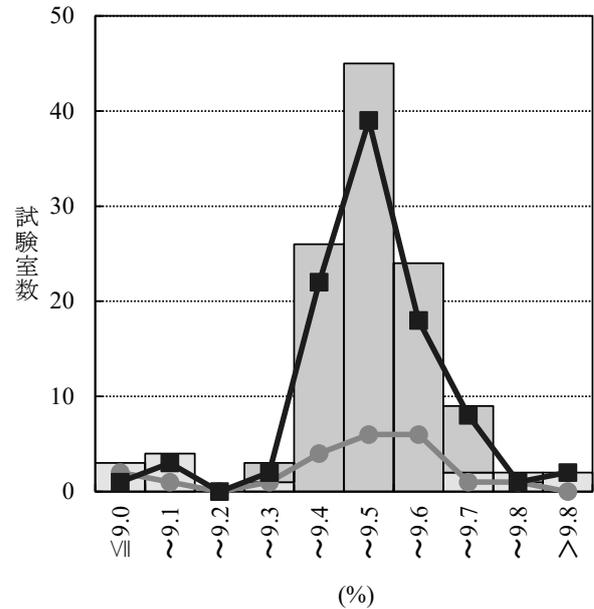


図3-5 有機入り化成肥料中の窒素全量の分析成績

■ 満足 □ 疑わしい
□ 不満足 ● 燃焼法
■ ケルダール

(6) 有機入り化成肥料中のアンモニア性窒素(A-N)

110 試験室が参加し、108 試験室が蒸留法、1 試験室が通気法、1 試験室がホルムアルデヒド法を用いた。報告された分析結果のメディアンは 9.07 % (質量分率)、 $NIQR$ は 0.10 % (質量分率)、平均値は 9.04 % (質量分率)であった。96 試験室が「満足」であり、10 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」な結果となった試験室は全て蒸留法での実施だった。

蒸留法における注意点として、蒸留操作で加えるアルカリに水酸化ナトリウムを使用すると、尿素や有機物を含む試料はこれらが分解して高値となる場合があるので、水酸化ナトリウムの代わりに酸化マグネシウムを使うと良い。

蒸留時に加える酸化マグネシウムは試験室中の二酸化炭素を吸着していき、終点が不鮮明になることがあるので、蒸留終了後、留出液を 1~2 分間煮沸し、冷却後滴定するか、あらかじめ酸化マグネシウムをばい焼(800 °C, 2 時間程度)させてから使用すると良い。

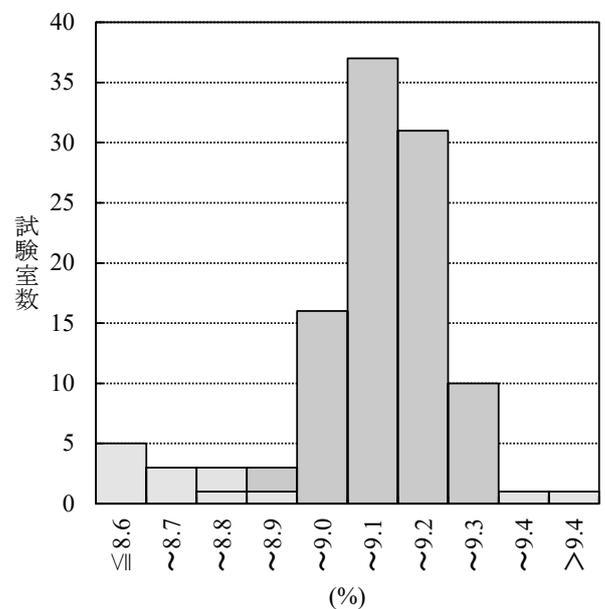


図3-6 有機入り化成肥料中のアンモニア性窒素の分析成績

■ 満足 □ 疑わしい □ 不満足

(7) 有機入り化成肥料中の水溶性りん酸(W-P₂O₅)

117 試験室が参加し, 113 試験室はバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法, 4 試験室が ICP-OES 法を用いた. 報告された分析結果のメディアンは 5.93% (質量分率), NIQR は 0.09% (質量分率), 平均値は 5.94% (質量分率) であった. 101 試験室が「満足」であり, 8 試験室が「不満足」な結果であった. 「不満足」な結果となった試験室はバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法が 7 試験室, ICP-OES 法が 1 試験室であった.

また, バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法で試験した試験室のうち 28 試験室は脱色の作業を実施し, 85 試験室は脱色の作業を実施しなかったが, 脱色の有無について平均値の差による検定 (*t*-検定) を行ったところ, 有意水準 5% で有意な差は認められなかった.

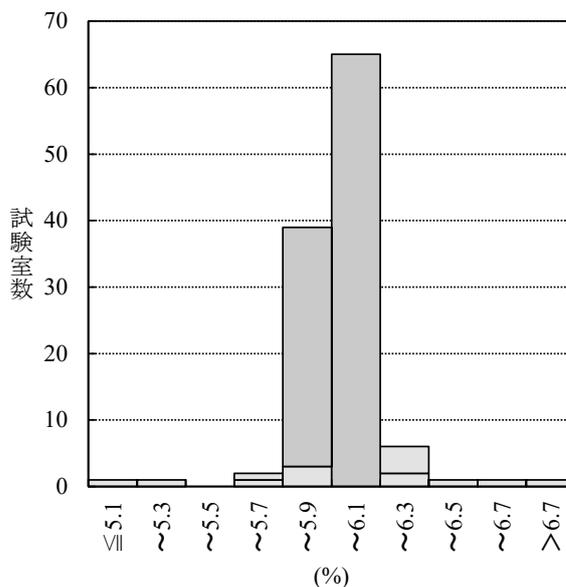


図3-7 有機入り化成肥料中の水溶性りん酸の分析成績

□満足 □疑わしい □不満足

(8) 有機入り化成肥料中の水溶性加里(W-K₂O)

118 試験室が参加し, 91 試験室がフレイム原子吸光法, 23 試験室がフレイム光度法, 4 試験室が ICP-OES 法を用いた. フレイム原子吸光法及びフレイム光度法について, 分析結果の平均値の差による検定 (*t*-検定) を行ったところ, 有意水準 5% で有意な差は認められなかった. 報告された分析結果のメディアンは 8.82% (質量分率), NIQR は 0.21% (質量分率), 平均値は 8.84% (質量分率) であった. 102 試験室が「満足」であり, 9 試験室が「不満足」な結果であった. 「不満足」の試験室は 8 試験室がフレイム原子吸光法, 1 試験室が ICP-OES 法であった.

フレイム原子吸光法で測定する際は, 前述のく溶性苦土と同様の点に留意する必要がある.

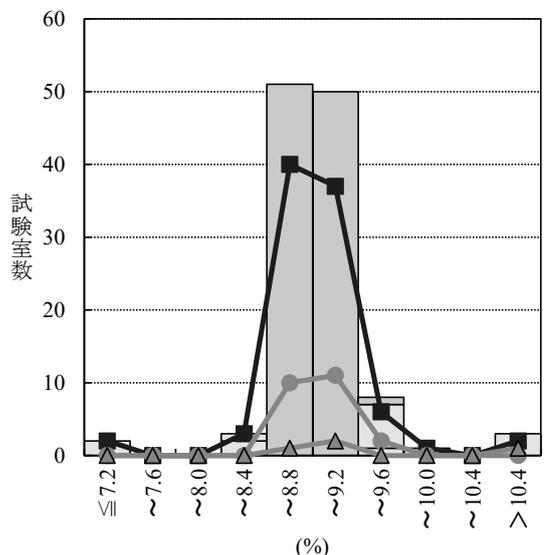


図3-8 有機入り化成肥料中の水溶性加里の分析成績

□満足 □疑わしい □不満足
 ■フレイム原子吸光法 ●フレイム光度法 ▲ICP-OES

(9) 有機入り化成肥料中のひ素(As)

36 試験室が参加し、17 試験室が水素化物発生原子吸光法、12 試験室がジエチルジチオカルバミド酸銀吸光光度法、5 試験室が ICP-OES 法、2 試験室が ICP-MS 法を用いた。水素化物発生原子吸光法及びジエチルジチオカルバミド酸銀吸光光度法の 2 方法について平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ、有意水準 5 % で有意差は認められなかった。報告された分析結果のメディアンは 5.49 mg/kg、NIQR は 0.44 mg/kg、平均値は 5.40 mg/kg であった。30 試験室が「満足」であり、3 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」の試験室は 1 試験室が水素化物発生原子吸光法、2 試験室がジエチルジチオカルバミド酸銀吸光光度法であった。

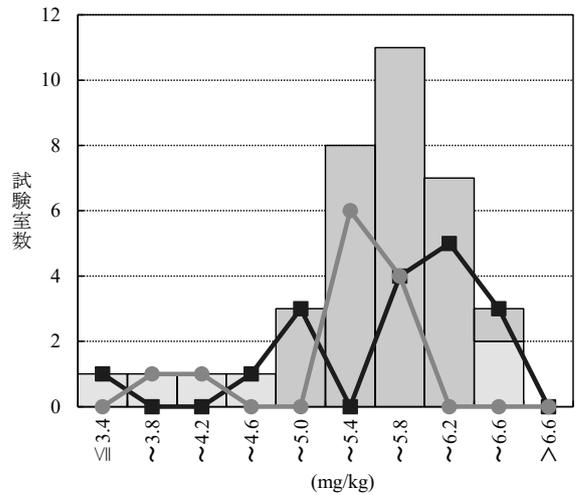


図3-9 有機入り化成肥料中のひ素の分析成績

満足
 不満足
 疑わしい
 水素化物発生原子吸光法
 ジエチルジチオカルバミド酸銀吸光光度法

(10) 有機入り化成肥料中のカドミウム(Cd)

52 試験室が参加し、44 試験室がフレイム原子吸光法、6 試験室が ICP-OES 法、2 試験室が ICP-MS 法を用いた。報告された分析結果のメディアンは 2.12 mg/kg、NIQR は 0.15 mg/kg、平均値は 2.14 mg/kg であった。48 試験室が「満足」であり、3 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」な結果となった試験室は全てフレイム原子吸光法での実施だった。

フレイム原子吸光法で測定する際の注意点は、高度化成肥料におけるく溶性苦土と同様である。そのほか、試料中のカドミウム含有量が少ない場合は、検量線の濃度範囲や機器の安定性の影響を受けやすい。また、ICP-OES 法は測定元素の性質、測定条件及び機器差が結果に影響しやすい。

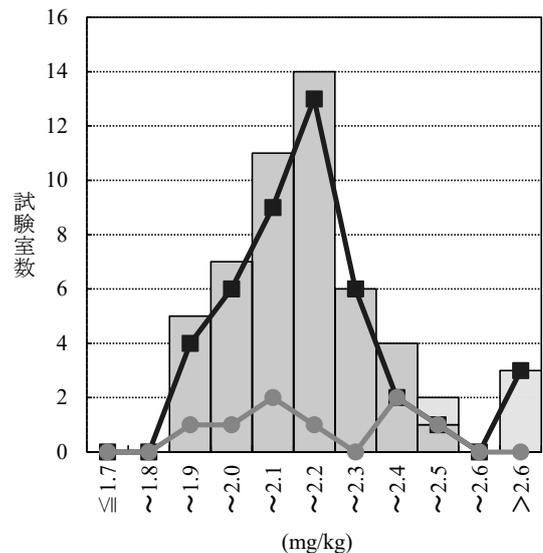


図3-10 有機入り化成肥料中のカドミウムの分析成績

不満足
 満足
 疑わしい
 フレイム原子吸光法
 ICP-OES法, ICP-MS法

(11) 有機入り化成肥料中の鉛(Pb)

36 試験室が参加し、27 試験室がフレイム原子吸光法、7 試験室が ICP-OES 法、2 試験室が ICP-MS 法を用いた。報告された分析結果のメディアンは 14.49 mg/kg、NIQR は 2.06 mg/kg、平均値は 14.35 mg/kg であった。33 試験室が「満足」であり、1 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」な結果となった試験室は ICP-OES 法での実施だった。

ICP-OES 法を用いた試験室はそれほど多くなかったが、参考までにフレイム原子吸光法及び ICP-OES 法の 2 方法について平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ、有意水準 5 % で有意差が認められ、ICP-OES 法の分析結果が有意に低かった。

分析値が低くなる要因として非スペクトル干渉の影響が考えられる。干渉を抑制する対策として、マトリックスマッチング法や標準添加法の適用、また内標準法を採用している場合は適切な内標準元素の選択が有効である。

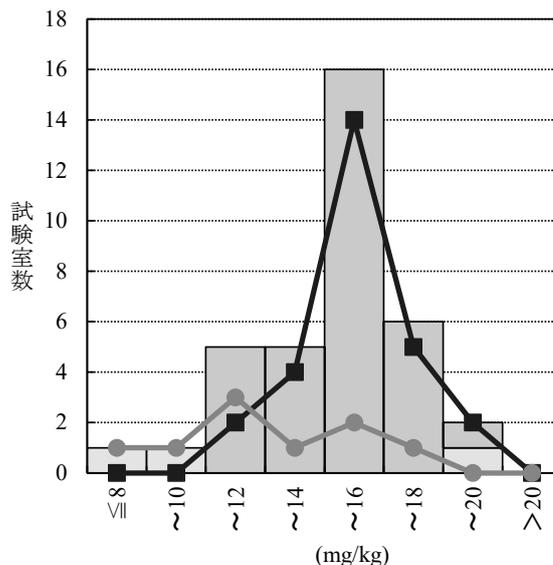


図3-11 有機入り化成肥料中の鉛の分析成績

■ 満足
 □ 疑わしい
 □ 不満足
 ■ フレイム原子吸光法
 ● ICP-OES法, ICP-MS法

5) 分析法の比較

昨年度、試験項目ごとの統計解析結果の要望があったことから、8 試験室以上が採用した分析法ごとのメディアン、メディアン信頼区間等について、表 8 に取りまとめた。

いずれの成分においても、分析法間によるメディアン及びその 95 % 信頼区間に大きな差はなかった。

表8 各試験方法の統計解析結果 ($|z| \geq 3$ を除く)

試験項目	試験方法	報告試験室数	試験方法採用試験室内訳	$ z \geq 3$ を除く試験室数	平均値 (%, mg/kg) ^{a)}	メディアン (%, mg/kg) ^{a)}	メディアンの 95%信頼区間	NIQR (%, mg/kg) ^{a)}	RSD _{rob} ^{b)} (%)
(高度化成肥料)									
C-P ₂ O ₅	1: バナドモリブデン酸アンモニウム法	116	111	92	17.41	17.41	17.38 ~ 17.44	0.14	0.8
C-MgO	1: フレーム原子吸光法	119	107	99	3.68	3.69	3.67 ~ 3.71	0.11	2.9
	2: ICP-OES法		9	8	3.73	3.68	3.61 ~ 3.75	0.10	2.7
C-MnO	1: フレーム原子吸光法	111	101	92	0.455	0.458	0.455 ~ 0.461	0.02	3.4
	2: ICP-OES法		9	8	0.458	0.452	0.441 ~ 0.462	0.02	3.3
C-B ₂ O ₃	1: アゾメチンH法	98	85	78	0.224	0.226	0.224 ~ 0.228	0.01	4.8
	2: ICP-OES法		13	12	0.229	0.229	0.220 ~ 0.237	0.01	6.1
(有機入り化成肥料)									
T-N	1: 燃焼法	118	22	19	9.48	9.48	9.44 ~ 9.52	0.10	1.0
	2: ケルダール法		96	89	9.47	9.47	9.45 ~ 9.49	0.09	0.9
A-N	1: 蒸留法	110	108	98	9.08	9.08	9.06 ~ 9.10	0.09	1.0
W-P ₂ O ₅	1: バナドモリブデン酸アンモニウム法	117	113	106	5.94	5.93	5.91 ~ 5.95	0.09	1.5
W-K ₂ O	1: フレーム原子吸光法	118	91	83	8.82	8.82	8.78 ~ 8.86	0.17	2.0
	2: フレーム光度法		23	23	8.86	8.82	8.74 ~ 8.90	0.20	2.2
As	1: 水素化物発生原子吸光法	36	17	16	5.67	5.75	5.48 ~ 6.02	0.53	9.3
	2: ジエチルベンジチオカルバミド酸銀吸光光度法		12	10	5.36	5.38	5.31 ~ 5.44	0.11	2.0
Cd	1: フレーム原子吸光法	52	44	41	2.11	2.11	2.08 ~ 2.14	0.10	4.9
Pb	1: フレーム原子吸光法	36	27	27	14.98	14.59	14.06 ~ 15.12	1.38	9.4

a) ひ素、カドミウム及び鉛はmg/kg, それら以外は%(質量分率)を示す

b) RSD_{rob}はNIQR/メディアンを%表示したもの(ロバスト法による相対標準偏差)

6) 肥料等試験法の公定法化に係るアンケート調査

2020年4月の告示改正⁶⁾により、「肥料等試験法」が肥料の公定規格への適合を判断するための試験法として定められたことから、今回の共通試料による分析に参加いただいた品質保全協議会会員及び都道府県分析室に対して、肥料等試験法の公定法化にかかるアンケートを行い、掲載されている分析法において操作がわかりにくい点、今後の改正にあたり追加してほしい分析法の要望等を伺った。各試験室より挙げられた内容については以下のとおりであった。

〈アンケート概要〉

(1) 分析法において操作がわかりにくい点

- 滴定の際、「うすい紅色になるまで」等の終点の色の判断がわかりにくい
- 数滴及び適量の水を入れる等、曖昧な表記がある
- 適用範囲について、概要に記載されているものと備考に記載されているものがある
- 少時加熱や分解するまで加熱等と記載されている箇所は具体的な時間を記載して欲しい

(2) 今後、追加して欲しい分析法の要望

● 肥料分析法に記載されていた試験法の追加

具体的には EDTA 法（高濃度試料分析のため）、チタンの過酸化水素法や原子吸光法が挙げられた。

● 既存の試験法について改良

具体的にはケルダール分解の加熱時間の短縮や、異なる元素であっても灰化处理の際の温度を統一して欲しいなどが挙げられた。また、ホルムアルデヒド法の抽出方法として垂直往復振とう機の追加、可溶性りん酸の分析方法の簡素化、粒度の分析法について機械を使用した方法の追加、アルカリ分（エチレンジアミン四酢酸塩法）で使用されるシアン化カリウムについて、毒性の低い試薬に変更して欲しいという要望があった。

● 新たなカテゴリーの追加

苛酷試験方法の追加、高額な分析機器を導入せずに測定できる代替法の検討、より短時間で結果が出せる分析法の検討、インドフェノール法を窒素の分析法として追加して欲しいなどが挙げられた。

(3) その他の要望

● 肥料等試験法の詳解（冊子）出版

● 滴定法の終点について、色見本（写真など）の作成

● 新人・若手向けに FAMIC 主催の分析研修会を実施

● ICP-OES 法を实际使用して感じたメリット、デメリットの情報提供

● 肥料の生産・分析業務が繁忙期のため、手合わせ分析の時期を 10 月以降にずらして欲しい

● 供試試料容器について、チャック付き袋は試料がチャック部分に挟まり、密閉しての保管が難しいため、ボトル等の容器に変更して欲しい

6. まとめ

2021 年度外部精度管理のための共同試験は、高度化成肥料 4 項目に 121 試験室、有機入り化成肥料 7 項目に 124 試験室が参加した。

項目ごとの試験結果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 81%~92%、「不満足 ($|z| \geq 3$)」と評価された試験室の割合は 3%~17% であった。複数の試験法による報告で、8 試験室以上が採用した方法間について、不満足であった報告値を棄却した後に平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ、すべての項目において有意水準 5% で差は認められなかった。

今年度は昨年度と同様に ICP-OES 法による報告が一定数あり、各元素の分析において、フレーム原子吸光法またはアズメチン H 法と ICP-OES 法において平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ、いずれの項目においても有意水準 5% で差は認められなかった。ICP-OES 法での試験室数が 8 試験室に満たなかった鉛については、参考までにフレーム原子吸光法との 2 方法について平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ、有意水準 5% で有意差が認められ、ICP-OES 法の分析結果が有意に低かった。ICP-OES 法を使用する場合には、非スペクトル干渉等を抑制する対策が必要である。

昨年に引き続き各参加試験室から「肥料等試験法」についての意見・要望等を伺ったところ、分析方法の追加や改良等の要望が多く挙げられたことから、今後もこのような共同試験を活用し、要望を的確に取り入れていくことが必須と考えられた。

また、分析を行う上で管理試料を用いた測定値の妥当性確認が重要となるが、肥料の成分は多岐にわたるため、FAMIC で調製している肥料認証標準物質により全ての成分を網羅することは困難な状況である。そのため、今回使用した共同試験用試料の残量を分析実施時の内部品質管理試料として活用することが望ましい。

謝 辞

この共同試験を実施するにあたり、片倉コープアグリ株式会社八戸工場には試料の準備、調製及び均質性確認試験等で多大なご協力を賜りました。関係者各位に深く謝意を表します。

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) 独立行政法人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, 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)
- 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 (2021)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2021.pdf>
- 6) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律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, 最終改正令和4年3月17日, 農林水産省告示第302号(2022)

Result of Proficiency Testing for Determination of Major Components and Harmful Elements in Ground Fertilizers Conducted in Fiscal Year 2021

OSHIMA Mayu¹, SHIRASAWA Yuko², ECHI Masahiro³, AMANO Tadao⁴,
KAMIKAWA Takafumi⁵, TANAKA Yudai⁶, AKIMOTO Satono¹ and HIKICHI Norio⁷

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fertilizer and Feed Inspection Department

² FAMIC, Sapporo Regional Center

³ FAMIC, Sendai Regional Center

⁴ FAMIC, Nagoya Regional Center

⁵ FAMIC, Kobe Regional Center

⁶ FAMIC, Fukuoka Regional Center

⁷ Japan Fertilizer and Feed Inspection Association

A proficiency testing of analytical laboratories was conducted in fiscal year 2021, using reference materials of high-analysis compound fertilizer and organic chemical compound fertilizer based on ISO/IEC 17043, “Conformity assessment—General requirements for proficiency testing”. Citric acid-soluble phosphorus (C-P₂O₅), citric acid-soluble magnesium (C-MgO), citric acid-soluble manganese (C-MnO) and citric acid-soluble boron (C-B₂O₃), were analyzed using a high-analysis compound fertilizer sample. Total nitrogen (T-N), ammonium nitrogen (A-N), water-soluble phosphorus (W-P₂O₅), water-soluble potassium (W-K₂O), arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) were analyzed using an organic chemical compound fertilizer sample. Two homogenized samples were sent to the participants. From the 121 participants which received a high-analysis compound fertilizer sample, 98-119 results were returned for each element. From the 124 participants which received an ordinary compound fertilizer sample, 36-118 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 81 %-92 % and the results from the satisfactory participants were almost normally distributed.

Key words proficiency testing, high-analysis compound fertilizer, organic chemical compound fertilizer, ISO/IEC 17043, *z* score

(Research Report of Fertilizer, **15**, 135-154, 2022)

10 肥料認証標準物質の開発

—FAMIC-C(汚泥肥料)の調製—

松尾信吾¹, 八木啓二¹, 田中雄大¹,
吉村英美¹, 秋元里乃²

キーワード 認証標準物質, 汚泥肥料, 主要な成分, 有害成分, ISO Guide 31,
ISO Guide 35, 共同試験

1. はじめに

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, これらの分析結果の質の保証が求められている. 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, 分析結果の質の保証のため, 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客観性を担保している. 近年, 国際的な適合性評価の動きが進む中, わが国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q17025)²⁾の要求事項を参考にした結果の信頼性確保が重要視されている.

そこで, ISO/IEC 17025 (JIS Q17025)で推奨される「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」に資するため, 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・配付している. その際, 国際的に必要とされる事項を満たすため, 認証標準物質の調製は ISO 17034 (JIS Q 17034)³⁾の「5 技術及び生産に関する要求事項」を参考とし, 結果の解析は ISO Guide 35 (JIS Q 0035)⁴⁾, 認証書による値付け及びラベルの作成は ISO Guide 31 (JIS Q 0031)⁵⁾を参考としている.

2021 年度は新たに肥料認証標準物質 C (FAMIC-C-21)を調製し, その主成分及び有害成分について 14 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

基材となる肥料は, 関東近県で発生するし尿汚泥, 工業汚泥, 下水汚泥及び動植物原料(食品残さ)を原料として肥料製造工場で製造された市販の汚泥肥料を選定した.

なお, 基材となる肥料は, 汚泥肥料の公定規格に定める含有を許される有害成分(ヒ素, カドミウム, 水銀, ニッケル, クロム, 鉛)の最大量に対して, 約 1/10 以上含まれていることを予め確認のうえ選定した.

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2) 肥料認証標準物質候補の調製

基材となる肥料は購入後、定温乾燥機で 65 °C、5 時間以上乾燥し、放冷後、超遠心粉碎機で目開き 500 μm のふるいを通すまで粉碎した。粉碎後は、均質となるよう十分混合し、褐色ガラス瓶に約 150 g ずつ小分け後密封し、成分の長期安定化をはかるため、 γ 線照射滅菌を行い、「肥料認証標準物質候補 C」として試料を調製した。

3) 分析成分

肥料の品質の確保等に関する法律により汚泥肥料の保証票に記載が定められている主成分(窒素全量(T-N)、りん酸全量(T-P₂O₅)、加里全量(T-K₂O)、石灰全量(T-CaO)、銅全量(T-Cu)、亜鉛全量(T-Zn))及び「炭素窒素比」の算出に必要な有機炭素(O-C)並びに汚泥肥料の公定規格で許容基準が定められている有害成分(砒素(As)、カドミウム(Cd)、水銀(Hg)、ニッケル(Ni)、クロム(Cr)、鉛(Pb))に水分を加えた計 14 項目を分析成分とした。

4) 分析法

各分析成分の分析法は、肥料等試験法⁶⁾により実施した。なお、分析成分及び分析法を表 1 に示す。

表1 肥料認証標準物質候補Cの分析成分及び分析法

成分	項目番号 ^{a)}	分析法の概要	
		試料溶液調製方法等	測定法
水分 (H ₂ O)	3.1.a	—	乾燥器による乾燥減量法 ^{b)}
	3.1.b	—	水分計による乾燥減量法 ^{c)}
窒素全量 (T-N)	4.1.1.b	—	燃焼法
	4.1.1.a	ケルダール硫酸分解—蒸留	中和滴定
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	4.2.1.a	ケルダール硫酸分解	バナドモリブデン酸アンモニウム 吸光光度法
		灰化-塩酸煮沸 灰化-王水分解	
加里全量 (K ₂ O)	4.3.1.a	灰化-塩酸煮沸	フレイム原子吸光法又は フレイム光度法
		灰化-王水分解	
石灰全量 (T-CaO)	4.5.1.a	灰化-塩酸煮沸	フレイム原子吸光法
		灰化-王水分解	
有機炭素 (O-C)	4.11.1.a	二クロム酸酸化	酸化還元滴定
	4.11.1.b	—	燃焼法
銅全量 (T-Cu)	4.10.1.a	灰化-塩酸煮沸	フレイム原子吸光法
	4.10.1.b	灰化-王水分解	
亜鉛全量 (T-Zn)	4.9.1.a	灰化-塩酸煮沸	フレイム原子吸光法
	4.9.1.b	灰化-王水分解	
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
	5.2.b		ジエチルジチオカルバミド酸銀吸光光度法
カドミウム (Cd)	5.3.a	灰化-王水分解	フレイム原子吸光法
	5.3.b		ICP発光分光分析法
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	灰化-王水分解	フレイム原子吸光法
	5.4.b		ICP発光分光分析法
クロム (Cr)	5.5.a	灰化-王水分解	フレイム原子吸光法
	5.5.d		ICP発光分光分析法
鉛 (Pb)	5.6.a	灰化-王水分解	フレイム原子吸光法
	5.6.b		ICP発光分光分析法

a) 肥料等試験法(2021)の試験項目番号

b) 100 °C±2 °C, 5時間

c) 100 °Cにて恒量になるまで乾燥(質量減少量1 mg/90秒又は140秒)

5) 均質性確認

IUPAC の技能試験プロトコル⁷⁾の均質性試験に従い、肥料認証標準物質候補C(320本)から乱数によりランダムに10本を抜き取って均質性確認用の試料とし、各試料について2点併行で分析を行った。また、分析する試料の順番についても乱数によりランダムに分析した。

6) 共同試験

過去、肥料認証標準物質Cの認証値設定の共同試験に参加した試験室及び現在配付中のFAMIC-C-18を内部品質管理として使用している試験室のうち、共同試験の参加に同意が得られた8試験室とFAMIC 6試験室の計14試験室により、令和3年10月1日から11月30日の期間で共同試験を実施した。共同試験の試料は、調製した肥料認証標準物質候補Cから乱数によりランダムに2本を配付し、それぞれについて日を変えて3点併行で分析を実施した。各試験室からは、有効数字4桁目を四捨五入して有効数字3桁目までを報告値

として提出した.

・共同試験参加試験室(五十音順)

一般財団法人 日本食品分析センター

株式会社環境研究センター

株式会社住化分析センター

株式会社那須環境技術センター

株式会社北陸環境科学研究所

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

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

長崎県農林技術開発センター

3. 結果及び考察

1) 均質性確認

均質性確認用の試料について、全成分を 2 点併行で分析した平均値及びその分析値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. さらに, 肥料等試験法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.

均質性の確認は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの手順を参考に実施した. まず, 等分散性を確認するため, Cochran 検定を実施した. その結果, すべての成分において外れ値は認められなかったため, これらの分析値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の判定式(式 2)を用いて均質性の確認を行った. その結果, 全ての成分において判定式(式 2)を満たしていたことから, 準備した試料が共同試験用試料として妥当な均質性を有していることを確認した. 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 均質性確認結果

成分	試料数	平均値 ^{a)} (%) ^{b)}	CRSD _R ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{e)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (%) ^{b)}	s_r ^{g)} (%) ^{b)}	s_{b+r} ^{h)} (%) ^{b)}
水分(H ₂ O)	10	13.1	3	0.394	0.105	0.118	0.13	0.16
窒素全量(T-N) ⁱ⁾	10	3.91	4	0.156	0.011	0.047	0.02	0.02
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	10	5.28	4	0.211	0.005	0.063	0.01	0.01
加里全量(T-K ₂ O)	10	0.564	6	0.034	0 ^{j)}	0.010	0.010	0.010
石灰全量(T-CaO)	10	4.08	4	0.163	0.047	0.049	0.03	0.06
有機炭素(O-C)	10	26.9	2.5	0.671	0 ^{j)}	0.201	0.4	0.4

成分	試料数	平均値 ^{a)} (mg/kg)	CRSD _R ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (mg/kg)	s_{bb} ^{e)} (mg/kg)	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (mg/kg)	s_r ^{g)} (mg/kg)	s_{b+r} ^{h)} (mg/kg)
銅全量(T-Cu)	10	460	8	36.8	2.039	11.0	3	4
亜鉛全量(T-Zn)	10	1350	6	81.0	0.756	24.3	7	7
砒素(As)	10	7.95	16	1.273	0 ^{j)}	0.382	0.14	0.14
カドミウム(Cd)	10	1.95	16	0.312	0 ^{j)}	0.094	0.03	0.03
水銀(Hg)	10	0.646	22	0.142	0.017	0.043	0.038	0.042
ニッケル(Ni)	10	27.4	11	3.013	0.173	0.904	0.1	0.2
クロム(Cr)	10	33.5	11	3.684	0.551	1.105	0.42	0.7
鉛(Pb)	10	22.9	11	2.518	0.148	0.755	0.26	0.3

a) 総平均値(試料数×2点併行分析)

b) 質量分率

c) 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

d) 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

e) 試料間標準偏差

f) 均質性の判定(s_{bb} の評価)のためのパラメータ

g) 併行標準偏差

h) 併行精度を含む試料間標準偏差

i) ケルダール法

j) グループ間分散 < グループ内分散のため、 $s_{bb}^2=0$

2) 共同試験結果

各試験室から報告された共同試験の報告値を表 3-1 から 3-3 に示した。

水分において、乾燥器による乾燥減量法と水分計による乾燥減量法の報告値について方法間比較を行った。F検定により等分散でないことを確認したので、分散が等しくないと仮定した t-検定を行ったところ有意差が認められた。また同様に、窒素全量において、ケルダール法と燃焼法の報告値について方法間比較を行ったところ、F検定により等分散でないことを確認した。窒素全量についても分散が等しくないと仮定した t-検定を行ったところ有意差が認められた。よって、水分及び窒素全量については、方法別に統計解析を行うこととした。

なお、各成分の報告値については ISO 5725-2 (JIS Z 8402-2)⁸⁾を参考に統計解析することとし、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。なお、各検定での棄却数は参加試験室の合計 2/9⁹⁾までとした。

表 3-1 共同試験結果

試験室 ^{a)}	水分(乾燥器) (%) ^{b)}						水分(水分計) (%) ^{b)}					
A	-	-	-	-	-	-	12.9	12.6	13.0	13.1	13.2	13.3
B	11.2	11.2	11.0	11.8	11.4	11.5	-	-	-	-	-	-
C	12.1	12.1	12.1	12.2	12.2	12.2	-	-	-	-	-	-
D	11.7	11.6	11.5	9.7	9.8	9.7	c)	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	13.2	13.1	13.2	13.1	13.2	13.2
F	-	-	-	-	-	-	13.3	13.1	13.4	13.4	13.1	13.2
G	11.9	11.7	11.9	12.0	11.8	12.0	-	-	-	-	-	-
H	11.9	11.9	11.9	12.0	12.0	12.0	-	-	-	-	-	-
I	11.2	11.2	11.2	11.5	11.8	11.8	-	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-	-	12.9	12.9	12.9	13.3	13.3	13.4
K	12.1	11.7	12.0	11.6	11.5	11.5	-	-	-	-	-	-
L	-	-	-	-	-	-	13.3	13.4	13.1	13.2	13.2	13.2
M	12.4	12.5	12.5	12.4	12.6	12.5	-	-	-	-	-	-
N	12.9	12.9	12.9	12.6	12.6	12.7	13.0	13.1	13.1	13.2	13.2	13.2

試験室 ^{a)}	窒素全量(ケルダール法) (%) ^{b)}						窒素全量(燃焼法) (%) ^{b)}						
A	4.04	4.02	4.02	4.01	4.04	4.04	4.09	4.11	4.13	4.09	4.11	4.12	
B	3.69	3.69	3.48	3.48	3.41	3.83	-	-	-	-	-	-	
C	-	-	-	-	-	-	4.42	4.41	4.44	4.17	4.28	4.31	c)
D	-	-	-	-	-	-	4.09	4.10	4.09	4.10	4.10	4.10	
E	3.81	3.77	3.79	3.82	3.84	3.82	4.10	4.08	4.09	4.09	4.08	4.08	
F	3.99	3.96	4.07	3.89	3.99	4.00	4.14	4.13	4.11	4.04	4.08	4.08	
G	-	-	-	-	-	-	4.12	4.12	4.10	4.14	4.10	4.11	
H	3.66	3.67	3.68	3.70	3.69	3.68	-	-	-	-	-	-	
I	-	-	-	-	-	-	4.13	4.13	4.15	4.13	4.15	4.14	
J	3.81	3.84	3.62	3.94	3.91	4.06	-	-	-	-	-	-	
K	-	-	-	-	-	-	4.09	4.11	4.10	4.04	4.07	4.08	
L	3.80	3.79	3.87	3.63	3.70	3.46	4.12	4.11	4.11	4.12	4.12	4.12	
M	3.71	3.69	3.70	3.66	3.69	3.66	4.13	4.14	4.13	4.12	4.12	4.11	
N	3.84	3.86	3.77	3.91	3.86	3.90	-	-	-	-	-	-	

試験室 ^{a)}	りん酸全量 (%) ^{b)}						加里全量 (%) ^{b)}						
A	5.37	5.36	5.37	5.34	5.34	5.34	0.491	0.485	0.499	0.506	0.501	0.497	
B	5.19	5.21	5.23	5.24	5.30	5.38	0.578	0.585	0.580	0.558	0.566	0.545	
C	5.28	5.20	5.21	5.18	5.11	5.18	0.542	0.544	0.542	0.547	0.559	0.549	
D	5.25	5.33	5.27	5.21	5.20	5.15	-	-	-	-	-	-	
E	5.38	5.38	5.41	5.35	5.38	5.37	0.525	0.529	0.529	0.533	0.527	0.534	
F	5.38	5.37	5.37	5.32	5.33	5.32	0.530	0.528	0.537	0.532	0.525	0.553	
G	5.31	5.34	5.29	5.36	5.36	5.34	0.504	0.513	0.518	0.522	0.536	0.536	
H	5.24	5.21	5.25	5.19	5.21	5.23	0.546	0.545	0.546	0.551	0.547	0.547	
I	5.24	5.24	5.25	5.28	5.29	5.29	0.521	0.528	0.511	0.528	0.520	0.534	
J	5.55	5.25	5.35	5.28	5.34	5.29	c)	0.522	0.513	0.519	0.488	0.484	0.489
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L	5.20	5.34	5.32	5.41	5.38	5.31	0.532	0.552	0.543	0.518	0.521	0.542	
M	5.18	5.30	5.25	5.32	5.29	5.25	0.482	0.491	0.502	0.513	0.497	0.502	
N	5.31	5.29	5.28	5.33	5.36	5.35	0.549	0.551	0.558	0.577	0.580	0.578	

a) 共同試験に参加した試験室の記号(順不同)

b) 質量分率

c) Cochran検定による外れ値

d) Single Grubbs検定による外れ値

e) Paired Grubbs検定による外れ値

表 3-2 共同試験結果

試験室 ^{a)}	石灰全量 (%) ^{b)}						有機炭素 (%) ^{b)}					
A	3.71	3.81	3.82	4.09	4.08	4.06 ^{e)}	27.2	27.1	27.0	26.9	26.8	27.0
B	4.36	4.33	4.37	4.11	4.24	4.15	27.5	28.1	27.7	28.3	28.5	28.0
C	3.60	3.45	3.55	3.69	3.68	3.43 ^{e)}	26.2	26.6	26.4	26.8	26.7	26.6
D	-	-	-	-	-	-	23.9	24.0	24.1	25.0	25.3	25.1 ^{c)}
E	4.07	4.05	4.10	4.10	4.10	4.11	26.7	26.8	26.8	26.8	26.4	26.8
F	4.09	4.14	4.07	4.03	4.05	4.03	26.8	26.9	26.7	26.8	26.9	27.2
G	4.16	4.06	4.09	4.23	4.11	4.18	-	-	-	-	-	-
H	4.01	4.01	4.03	4.07	4.03	4.04	-	-	-	-	-	-
I	4.30	4.33	4.32	4.36	4.34	4.32	27.2	27.1	27.1	27.0	27.0	27.0
J	4.23	4.20	4.21	4.27	4.21	4.25	27.0	27.4	27.2	26.5	27.2	27.1
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	3.94	4.04	3.99	3.32	3.38	3.38 ^{e)}	27.1	26.9	27.3	26.9	27.0	27.0
M	4.06	4.04	4.15	4.04	4.01	4.03	26.8	26.7	27.0	26.9	26.9	27.1
N	4.13	4.15	4.15	4.39	4.40	4.30	27.2	26.7	26.8	27.2	27.2	27.5

試験室 ^{a)}	銅全量 (mg/kg)						亜鉛全量 (mg/kg)					
A	388	390	390	422	425	426 ^{e)}	1260	1260	1260	1350	1350	1340
B	466	464	460	423	418	411 ^{e)}	1350	1390	1370	1260	1240	1280
C	424	419	419	415	415	415	1360	1360	1360	1300	1290	1290
D	468	470	472	463	469	471	1430	1510	1520	1310	1320	1340 ^{c)}
E	445	448	449	450	447	447	1330	1330	1330	1390	1380	1390
F	458	456	457	447	447	452	1330	1320	1320	1450	1490	1470 ^{c)}
G	416	413	422	445	447	445	1330	1330	1340	1360	1340	1350
H	439	434	441	449	452	446	1330	1400	1380	1380	1380	1380
I	461	466	469	450	453	458	1340	1330	1330	1330	1330	1320
J	448	444	454	436	441	436	1360	1360	1360	1310	1330	1330
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	452	452	451	432	433	432	1320	1330	1330	1330	1330	1330
M	423	471	451	452	446	449	1130	1140	1160	1110	990	1030 ^{d)}
N	455	459	462	462	463	464	1350	1350	1350	1343	1330	1331

試験室 ^{a)}	ひ素 (mg/kg)						カドミウム (mg/kg)					
A	9.70	9.50	9.09	8.92	9.76	9.31	1.99	1.99	1.99	1.98	1.99	1.99
B	7.10	7.51	7.37	7.51	7.40	7.40	2.06	2.05	2.04	1.96	1.96	1.94
C	6.95	6.74	6.65	6.64	6.69	6.69	1.85	1.84	1.88	1.81	1.81	1.81 ^{e)}
D	-	-	-	-	-	-	1.64	1.68	1.66	1.58	1.62	1.58 ^{e)}
E	7.72	7.50	7.65	8.36	8.26	8.10	1.96	1.98	1.97	1.91	1.97	1.96
F	6.74	6.88	7.21	7.51	7.60	7.69	2.01	1.99	2.01	2.01	1.98	1.96
G	7.77	8.01	8.23	7.72	7.97	7.48	1.99	1.98	1.99	2.00	1.99	2.00
H	-	-	-	-	-	-	1.94	1.89	1.88	1.85	1.86	1.86
I	5.80	5.81	5.64	6.13	6.48	6.36	1.93	1.91	1.93	1.85	1.83	1.82
J	8.10	8.23	8.23	7.96	7.89	8.01	1.94	1.91	1.89	1.91	1.90	1.90
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	6.46	6.72	6.52	7.16	7.14	7.23	1.99	1.99	1.99	2.00	2.00	2.02
M	5.60	5.37	4.70	6.09	5.95	5.45	2.01	2.04	1.97	1.91	1.91	1.94
N	7.60	7.28	7.72	7.67	7.73	7.65	1.98	1.99	2.00	1.93	1.88	1.82

脚注は表3-1を参照

表 3-3 共同試験結果

試験室 ^{a)}	水銀 (mg/kg)						ニッケル (mg/kg)					
A	0.639	0.670	0.633	0.652	0.652	0.647	29.7	30.6	29.6	28.1	28.5	28.2
B	0.600	0.618	0.576	0.597	0.598	0.575	29.7	29.7	29.8	32.3	30.6	30.8
C	0.594	0.607	0.591	0.609	0.606	0.590	22.9	22.2	22.1	21.8	21.7	21.7
D	0.617	0.490	0.546	0.586	0.609	0.613	22.8	22.6	24.0	20.9	20.6	20.5
E	0.631	0.645	0.666	0.678	0.645	0.587	29.1	32.6	29.9	28.6	28.6	28.8
F	0.651	0.647	0.697	0.676	0.673	0.696	28.6	28.8	28.8	29.3	29.0	29.1
G	0.583	0.583	0.576	0.593	0.597	0.603	28.5	28.8	29.3	29.0	28.8	29.0
H	0.254	0.444	0.543	0.540	0.413	0.338 ^{c)}	29.3	28.9	28.9	28.1	28.0	28.3
I	0.582	0.592	0.620	0.518	0.545	0.567	27.2	26.9	27.0	28.1	27.9	28.7
J	0.631	0.674	0.667	0.514	0.610	0.620	27.7	26.9	27.2	28.9	28.9	29.0
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	0.691	0.644	0.697	0.671	0.675	0.663	28.8	28.3	28.7	29.3	29.0	29.3
M	0.527	0.532	0.559	0.583	0.582	0.557	24.3	25.7	23.3	23.1	24.2	23.9
N	0.572	0.637	0.574	0.619	0.651	0.664	28.1	28.2	28.2	27.9	28.2	27.3

試験室 ^{a)}	クロム (mg/kg)						鉛 (mg/kg)					
A	30.5	30.5	30.5	32.9	33.2	32.5	24.1	23.9	23.7	23.7	24.1	24.1
B	31.6	31.6	31.6	32.2	30.3	30.2	22.5	21.8	21.3	21.9	21.3	22.0
C	26.1	25.9	26.2	26.2	26.3	25.8	22.0	21.7	21.5	21.1	21.6	20.7
D	36.6	36.8	37.8	34.5	33.4	33.1	15.5	16.2	15.7	15.3	16.0	15.1 ^{d)}
E	32.6	38.2	33.0	32.6	32.5	32.7	22.1	22.5	22.1	22.3	22.2	22.2
F	32.2	30.0	32.2	31.4	30.7	29.5	24.7	24.3	24.3	24.1	24.3	24.3
G	30.0	30.5	30.9	31.9	30.5	33.1	23.5	23.2	23.3	22.8	22.6	23.0
H	31.6	31.6	31.4	30.3	30.6	31.2	24.9	24.5	24.8	24.2	24.2	24.4
I	30.4	29.6	29.3	30.9	31.0	30.9	23.0	22.9	23.2	22.5	22.2	22.5
J	30.2	29.7	29.7	31.2	31.9	30.9	22.1	21.6	21.6	20.6	20.7	20.6
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	31.9	31.9	31.9	32.0	31.8	31.5	22.4	22.6	22.1	22.7	22.5	22.5
M	30.0	27.5	24.6	24.0	27.8	29.7	24.3	24.7	24.3	22.1	22.1	23.2 ^{c)}
N	31.1	31.0	30.1	32.7	33.0	32.9	23.4	23.4	23.6	23.6	24.5	24.0

脚注は表3-1を参照

3) 共同試験結果の評価

外れ値を除外した共同試験の報告値に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許容範囲 ($2*CRSD_R$) 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) は全ての成分について肥料等試験法における室間再現相対標準偏差の許容範囲 ($2*CRSD_R$) 内であった.

表 4 共同試験結果の統計解析

成分	試験室数 ^{a)}	平均値 ^{b)}	s_W ^{c)}	s_R ^{d)}	RSD_R ^{e)}	$2*CRSD_R$ ^{f)}
	(p (q)) ^{g)}	(%) ^{h)}	(%) ^{h)}	(%) ^{h)}	(%)	(%)
水分(H ₂ O) 乾燥器	8 (1)	12.0	0.19	0.51	4.3	6
水分(H ₂ O) 水分計	6 (0)	13.2	0.16	0.17	1.3	6
窒素全量(T-N) 燃焼法	9 (1)	4.11	0.02	0.02	0.6	8
窒素全量(T-N) ケルダール法	9 (0)	3.8	0.09	0.17	4.4	8
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	12 (1)	5.29	0.04	0.07	1.4	8
加里全量(T-K ₂ O)	12 (0)	0.531	0.01	0.03	4.9	12
石灰全量(T-CaO)	9 (3)	4.16	0.07	0.12	3.0	8
有機炭素(O-C)	10 (1)	27.0	0.2	0.4	1.6	5

成分	試験室数 ^{a)}	平均値 ^{b)}	s_W ^{c)}	s_R ^{d)}	RSD_R ^{e)}	$2*CRSD_R$ ^{f)}
	(p (q)) ^{g)}	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
銅全量(T-Cu)	11 (2)	447	8.6	16.2	3.6	16
亜鉛全量(T-Zn)	10 (3)	1336	31.4	35.3	2.6	12
砒素(As)	11 (0)	7.33	0.31	1.08	14.8	32
カドミウム(Cd)	11 (2)	1.95	0.04	0.06	3.0	32
水銀(Hg)	12 (1)	0.614	0.03	0.048	7.9	44
ニッケル(Ni)	13 (0)	27.4	0.9	2.9	10.7	22
クロム(Cr)	13 (0)	31.0	1.3	2.7	8.6	22
鉛(Pb)	11 (2)	22.9	0.4	1.2	5.3	22

a) 解析に用いた試験室数

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
標準偏差の許容範囲(目安の2倍)g) p :有効な試験室数 q :外れ値を報告した試験室数

h) 質量分率

4) 認証値及び不確かさ

ISO Guide 31 (JIS Q 0031)において肥料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 (JIS Q 0033)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 (JIS Z 8404-1)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($p=6\sim 13$)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の桁に丸めた。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。

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

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

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

水分については、乾燥器による乾燥減量法(12.0%)と水分計による乾燥減量法(13.2%)の異なる二つの分析法で有意差が認められたため方法別に統計解析を行ったが、認証値の算出に必要な試験室数が不足していたことから、参考情報(表6)として提供することとした。

また、窒素全量についても異なる二つの分析法で有意差が認められたため、方法別に統計解析を行い、ケルダール法と燃焼法の方法別に認証値及び拡張不確かさを算出することとした。

ケルダール法による分析において硝酸塩を含有する試料は、その中の窒素は定量されず、更に他の形態の窒素も損失するため低値となることが従来から知られている¹²⁾。一方、燃焼法による分析においては、ケルダール法より窒素全量の分析値が高くなる傾向が確認されており、燃焼法により硝酸性窒素も含めた全窒素を定量することが確認されている¹³⁾。そこで、窒素全量の有意差が認められた原因を検討するため、試料中の硝酸性窒素量について肥料等試験法4.1.3.cフェノール硫酸法により分析を行ったところ、ケルダール法の共同試験結果(T-N 3.80%)と燃焼法の共同試験結果(T-N 4.11%)の差と同程度の硝酸性窒素(N-N 0.36%)の含有が確認された。この試料中の硝酸性窒素量は単一試験室による分析結果であることから、参考情報(表7)として提供することとした。

全ての成分において、室間再現相対標準偏差(RSD_R)が肥料等試験法における室間再現相対標準偏差の許容値($2*CRSD_R$)以下であったことから、水分を除く13成分について認証することとした(表5)。また、認証値は肥料等試験法における定量下限の桁に丸めて¹⁴⁾表示することとした。

表 5 認証書に記載する項目

認証する項目			参考データ		
成分	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)} (p (q)) ^{f)}
窒素全量(T-N) 燃焼法	4.11	0.02	0.02	0.02	9 (1)
窒素全量(T-N) ケルダール法	3.8	0.1	0.09	0.17	9 (0)
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	5.29	0.04	0.04	0.07	12 (1)
加里全量(T-K ₂ O)	0.53	0.02	0.01	0.03	12 (0)
石灰全量(T-CaO)	4.16	0.08	0.07	0.12	9 (3)
有機炭素(O-C)	27.0	0.20	0.2	0.44	10 (1)

認証する項目			参考データ		
成分	認証値 (mg/kg)	拡張不確かさ ^{a)} (mg/kg)	s_w ^{b)} (mg/kg)	s_R ^{c)} (mg/kg)	試験室数 ^{d)} (p (q)) ^{f)}
銅全量(T-Cu)	447	8	9	16	11 (2)
亜鉛全量(T-Zn)	1340	14	31	35	10 (3)
ヒ素(As)	7.3	0.6	0.3	1.1	11 (0)
カドミウム(Cd)	2.0	0.1	0.04	0.06	11 (2)
水銀(Hg)	0.61	0.02	0.03	0.05	12 (1)
ニッケル(Ni)	27	2	1	3	13 (0)
クロム(Cr)	31	2	1	3	13 (0)
鉛(Pb)	23	1	0.4	1	11 (2)

a) 包含係数($k=2$)

b) 室内標準偏差

c) 室間再現標準偏差

d) 解析に用いた試験室数

e) 質量分率

f) p : 有効な試験室数 q : 外れ値を報告した試験室数

表 6 認証書に参考情報として掲載する項目

成分	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)} (p (q)) ^{f)}
水分(H ₂ O) 乾燥器	12.0	0.4	0.2	0.5	8 (1)
水分(H ₂ O) 水分計	13.2	0.1	0.2	0.2	6 (0)

脚注は表5を参照

表 7 共同試験用試料中の硝酸性窒素

成分	平均値 ^{a)} (%) ^{c)}	s ^{b)} (%) ^{c)}
硝酸性窒素(N-N) ^{d)}	0.36	0.002

a) $n=3$

b) 標準偏差

c) 質量分率

d) フェノール硫酸法

5) 有効期限

以前に配付していた汚泥発酵肥料を基材とした FAMIC-C-12-2 は、長期安定性の評価のための試験結果¹⁵⁾を踏まえ、認証値の再値付け(水銀(Hg)及び鉛(Pb))から 4 年半後までの安定性を確認していた。これを踏まえ、認証標準物質候補 C の有効期限は、4 年半後の 2026 年 6 月末に設定することとした。

なお、ISO Guide 35 (JIS Q 0035)では、認証標準物質の保管期間中にモニタリングを実施することが望まれていることから、水分を含めた全成分について認証値設定後からおよそ半年に1度の割合で継続的にモニタリング¹⁶⁾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ている。

4. まとめ

本年度は肥料認証標準物質として汚泥肥料 C を調製し、その認証値の設定のための共同試験を行い、ISO Guide 35 (JIS Q 0035)を参考に解析し、ISO Guide 31 (JIS Q 0031)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、令和4年2月18日に肥料等技術検討会肥料認証標準物質調製部会の審議を受け、2022年4月1日より肥料認証標準物質 FAMILIC-C-21として販売を開始している。

肥料についての認証標準物質は、国内には他に作製している例がない。また、国外で利用されている肥料認証標準物質はわが国の特有の肥料成分及びその分析の方法が網羅されておらず、輸入規制等により入手が困難である。このような観点から、肥料認証標準物質が肥料分析の品質保証に貢献している。

謝 辞

この共同試験を実施するにあたり、一般財団法人日本食品分析センター、株式会社環境研究センター、株式会社住化分析センター、株式会社那須環境技術センター、株式会社北陸環境科学研究所、公益財団法人日本肥糧検定協会本部及び関西支部、並びに長崎県農林技術開発センターより多大なご協力を賜りました。関係者各位に深く謝意を表します。

文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料認証標準物質の配布申請手続き
<<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 17034 (2016): “General requirements for the competence of reference material producers” (JIS Q 17034: 2018, 「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/bunseki/sub9_shiken2021.html>
- 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 (2017): “Measurement uncertainty-Part 1: Guidance for the use of repeatability reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation” (JIS Z 8404-1 :2018, 「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) 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)
- 13) 長谷川美来, 津田美穂, 小林正和, 八木潤, 中山清貴:ケルダール法と改良デュマ法による全窒素分定量についての比較, 関税中央分析所報, 第 56 号, 31～36
- 14) 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」)
- 15) 井上直, 青山恵介, 川口伸司, 船木紀夫, 秋元里乃:2020 年度 肥料認証標準物質の開発－高度化成肥料 FAMIC-A-17, 普通化成肥料 FAMIC-B-14, 汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18 の長期安定性評価－, 肥料研究報告, **14**, 186～209 (2021)
- 16) 神川孝文, 青山恵介, 川口伸司, 岩本直樹, 秋元里乃:2021 年度 肥料認証標準物質の開発－高度化成肥料 FAMIC-A-17, 普通化成肥料 FAMIC-B-14, 汚泥発酵肥料 FAMIC-C-18-2 の長期安定性評価－, 肥料研究報告, **15**, 169～189 (2022)

**Preparation of Certified Reference Material (CRM) for Determination of Major
Components, Organic Carbon and Harmful Components:
Sludge Fermented Fertilizer (FAMIC-C-21)**

MATSUO Shingo¹, YAGI Keiji¹, TANAKA Yudai¹,
YOSHIMURA Hidemi¹ and AKIMOTO Satono²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fukuoka Regional Center

² FAMIC, Fertilizer Inspection Department

Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) has developed a certified reference material (CRM): sludge fermented fertilizer (FAMIC-C-21), for analysis of major components, organic carbon and harmful components. FAMIC-C-21 was certified for the contents of total nitrogen (T-N), total phosphoric acid(T-P₂O₅), total potassium (T-K₂O), total copper(T-Cu), total zinc(T-Zn), total lime(T-CaO), organic carbon(O-C), arsenic(As), cadmium(Cd), mercury(Hg), nickel(Ni), chromium(Cr) and lead(Pb). In addition, it is stated as a reference value that 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. Fourteen laboratories participated in this study, 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. Since significant differences were observed between the analysis methods in terms of the moisture content (H₂O) and the content of total nitrogen (T-N), the reference value and the certified value were set for each analysis method.

The CRMs were expected to be useful for the quality assurance and the quality control in the analysis of major components, organic carbon and harmful components in sludge fermented fertilizer.

Key words certified reference material (CRM), sludge fermented fertilizer, major component, harmful component, ISO Guide 31, ISO Guide 35, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **15**, 155-168, 2022)

11 2021年度 肥料認証標準物質の開発

—高度化成肥料 FAMIC-A-17, 普通化成肥料 FAMIC-B-14,
汚泥発酵肥料 FAMIC-C-18-2 の長期安定性評価—

神川孝文¹, 青山恵介¹, 川口伸司¹,
岩本直樹¹, 秋元里乃²

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、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及び有害成分の分析は不可欠であり、その分析結果について、妥当性を確認した分析法による実施及び品質管理による信頼性の保証(品質保証)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、分析結果の品質保証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。近年国際的に、試験所の試験実施能力評価の見直しが進む中、わが国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)²⁾の要求事項を参考にした分析結果の妥当性の確保及び品質保証が重要視されている。その具体的手順の一つとして「認証標準物質又は品質管理用物質の使用」があげられている。

そのような情勢の中、FAMIC では、肥料認証標準物質 A(高度化成肥料 FAMIC-A-17)、同 B(普通化成肥料 FAMIC-B-14)及び同 C(汚泥発酵肥料 FAMIC-C-18-2)(以下、それぞれ「FAMIC-A-17」「FAMIC-B-14」「FAMIC-C-18-2」という。)を調製^{3~8)}、配付しており(表 1)、これらの調製については国際的に必要とされる事項を満たすために ISO 17034 (JIS Q 17034)⁹⁾の「7 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 (JIS Q 0035)¹⁰⁾を参考に解析を行った上で ISO Guide 31 (JIS Q 0031)¹¹⁾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。2021年度は、FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 の在庫試料を用い、認証成分について、認証値設定時からの長期の安定性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) 計画

ISO Guide 35 (JIS Q 0035)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、有効期限の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。

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肥飼料安全検査部

- a) 分析用試料・・・FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 の認証書の【保存に関する注意事項】に記載された, 常温(20℃±10℃), 直射日光及び高温多湿を避けて保存された在庫から, それぞれボトルに付された番号と乱数表を使ってランダムに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(表3A, 表3B及び表3Cを参照).
- d) 試験時期・・・認証値設定時の共同試験での神戸センターの分析結果を1回目としたモニタリング分析の実施回数として, FAMIC-A-17は8回目及び9回目, FAMIC-B-14は14回目及び15回目, FAMIC-C-18-2は6回目及び7回目. 具体的な時期並びに認証値設定後の経過月数については表2参照のこと.
- e) 試験室・・・FAMIC 神戸センター.
- f) 安定性の評価・・・認証値設定直後(0ヶ月経過)から, 定期的な経過月数ごとに2点併行でモニタリング分析を行い, その平均値の推移について ISO Guide 35(JIS Q 0035) 付属書 B.5 を参考に解析した.

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-17	高度化成肥料	りん酸アンモニア, 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, 熔成微量元素複合肥料	窒素全量, アンモニア性窒素, く溶性りん酸, く溶性加里, く溶性苦土, く溶性マンガン, く溶性ほう素, 水溶性ほう素, 尿素性窒素(全9成分)	2023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)	2023年 6月末
FAMIC-C-18-2	汚泥発酵肥料	し尿汚泥	窒素全量, りん酸全量, 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, ニッケル, クロム, 鉛(全12成分)	2023年 6月末

(2) モニタリングの実施

表2 モニタリング実施時期

標準物質名	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目
FAMIC-A-17	2017年 7~9月	2018年 4~5月	10~11月	2019年 4~5月	10~11月	2020年 6~7月	10~11月	2021年 5~6月	10~12月
経過月	0ヶ月	9ヶ月	15ヶ月	21ヶ月	27ヶ月	35ヶ月	39ヶ月	46ヶ月	51ヶ月
FAMIC-B-14	2014年 12~1月	2015年 4~5月	10~11月	2016年 4~5月	10~11月	2017年 4~5月	10~11月	2018年 4~5月	10~11月
経過月	0ヶ月	4ヶ月	10ヶ月	16ヶ月	22ヶ月	28ヶ月	34ヶ月	40ヶ月	46ヶ月
FAMIC-C-18-2	2018年 11~12月	2019年 4~5月	10~11月	2020年 6~7月	10~11月	2021年 5~6月	10~12月	-	-
経過月	0ヶ月	5ヶ月	11ヶ月	19ヶ月	23ヶ月	30ヶ月	35ヶ月	-	-

表2(続き)

標準物質名	10回目	11回目	12回目	13回目	14回目	15回目	16回目
FAMIC-A-17	-	-	-	-	-	-	-
経過月	-	-	-	-	-	-	-
FAMIC-B-14	2019年 4~5月	10~11月	2020年 6~7月	10~11月	2021年 5~6月	10~12月	-
経過月	52ヶ月	58ヶ月	66ヶ月	70ヶ月	77ヶ月	82ヶ月	-
FAMIC-C-18-2	-	-	-	-	-	-	-
経過月	-	-	-	-	-	-	-

表2の各分析時とも未開封のFAMIC-A-17, FAMIC-B-14及びFAMIC-C-18-2各1瓶を用いて、成分毎に2点併行分析を行った。

分析値の桁数は、FAMIC-A-17及びFAMIC-B-14については、有害成分(As, Cd, Hg, Ni, Pb), く溶性マンガ(C-MnO), く溶性ほう素(C-B₂O₃)及び水溶性ほう素(W-B₂O₃)の分析値は有効数字3桁, それ以外の成分は、小数第2位までに丸めた。FAMIC-C-18-2については、銅全量(T-Cu)及び亜鉛全量(T-Zn)の分析値は整数, それ以外の成分について有効数字3桁とした。また、認証値と同様に水分補正しない濃度(有姿濃度)とした。

表3A FAMIC-A-17の分析成分及び分析法

成分	項目 番号 ¹⁾	分析法の概要		備考
		試料液調製方法	測定法	
窒素全量(T-N)	4.1.1.a	ケルダール分解-蒸留	中和滴定法	
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	
く溶性加里(C-K ₂ O)	4.3.2.a	くえん酸(20 mg/mL)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)	4.6.3.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	補正なし
水溶性ほう素(W-B ₂ O ₃)	4.8.2.a	水抽出	アゾメチンH発色/ 吸光光度法	補正なし
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	

1) 肥料等試験法の項目番号

表3B FAMIC-B-14の分析成分及び分析法

成分	項目 番号 ¹⁾	分析法の概要		備考
		試料液調製方法	測定法	
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3Aを参照

表3C FAMIC-C-18-2の分析成分及び分析法

成分	項目 番号 ¹⁾	分析法の概要		備考
		試料液調製方法	測定法	
窒素全量(T-N)	4.1.1.a	ケルダール分解-蒸留	中和滴定法	
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	4.2.1.a	ケルダール硫酸分解	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	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	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.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
亜鉛全量(T-Zn)	4.9.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
ひ素(As)	5.2.a	硫酸-硝酸-過塩素酸分解	水素化物発生原子吸光法	
カドミウム(Cd)	5.3.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
水銀(Hg)	5.1.a	硝酸-過塩素酸分解	還元気化原子吸光法	
ニッケル(Ni)	5.4.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
クロム(Cr)	5.5.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
鉛(Pb)	5.6.a	王水分解	フレイム原子吸光法	

脚注は表3Aを参照

3. 結果

1) 安定性のモニタリング

(1) モニタリング結果

FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 の成分のモニタリングの結果を表 4A～表 4C に示した。ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025) では、5.9 試験・校正結果の品質の保証に認証標準物質を用いての試験所の日常の内部品質管理が推奨されているため、FAMIC では、肥料認証標準物質を用いて併行分析を行い、認証値設定時の分析結果により算出した単一試験室内で取得される分析値のばらつきに推定される範囲に基づき設定された警戒限界及び処置限界を用いて品質管理を行っている。FAMIC-A-17 のモニタリング開始から 51 ヶ月後、FAMIC-B-14 のモニタリング開始から 82 ヶ月後、及び FAMIC-C-18-2 のモニタリング開始から 35 ヶ月後までに実施した各経過月数及び各成分の 2 点併行分析の結果の平均値を図 1A～図 1C に示し、更に警戒限界及び処置限界を描いた。なお警戒限界及び処置限界については、各肥料認証標準物質の認証書の【不確かさの算出】を参考に認証値設定の際の共同試験に参加した試験室数 (n) 並びに認証値 (μ)、室内標準偏差 (s_W) 及び室間再現標準偏差 (s_R) を用いて (a) 式、(b) 式及び (c) 式により求めた。その結果、FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 のモニタリングにおいて今回得られた各成分の分析値の平均値は、いずれも警戒限界の範囲内であった。

$$\text{警戒限界及び処置限界の算出に用いた標準偏差}(\sigma) = \sqrt{(s_R^2 - s_W^2) + \frac{s_W^2}{n}} \quad \dots (a)$$

$$\text{平均値に対する警戒限界} = \mu \pm 2\sigma \quad \dots (b)$$

$$\text{平均値に対する処置限界} = \mu \pm 3\sigma \quad \dots (c)$$

n : 共同試験における参加試験室数

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4A FAMIC-A-17の安定性モニタリング分析結果

(質量分率 %)

経過月数	窒素全量 (T-N)		平均値	アンモニア性窒素 (A-N)		平均値	く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)		平均値	く溶性加里 (C-K ₂ O)		平均値
0	13.92	14.03	13.98	11.62	11.64	11.63	13.20	13.32	13.26	13.76	13.91	13.84
9	13.99	14.03	14.01	11.70	11.74	11.72	13.39	13.44	13.42	13.38	14.32	13.85
15	14.01	14.02	14.01	11.94	12.11	12.03	13.24	13.36	13.30	13.95	13.99	13.97
21	13.98	14.00	13.99	11.59	11.61	11.60	13.19	13.22	13.20	13.63	13.70	13.67
27	13.99	14.00	14.00	11.72	11.82	11.77	13.32	13.47	13.40	13.55	13.57	13.56
35	14.00	13.94	13.97	11.99	12.03	12.01	13.17	13.30	13.23	13.70	13.75	13.73
39	13.98	13.99	13.98	12.03	11.75	11.89	13.36	13.28	13.32	14.17	14.34	14.26
46	13.96	13.97	13.97	11.70	12.02	11.86	13.19	13.21	13.20	13.81	13.66	13.74
51	13.99	13.98	13.98	11.72	11.72	11.72	13.20	13.19	13.20	13.95	13.94	13.95

表4A (続き)

(質量分率%)

経過月数	＜溶性苦土 (C-MgO)		＜溶性マンガン (C-MnO)		＜溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)		水溶性ほう素 (W-B ₂ O ₃)		尿素性窒素 (U-N)						
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値					
0	3.44	3.47	3.46	0.298	0.318	0.308	0.568	0.583	0.575	0.444	0.462	0.453	2.14	2.24	2.19
9	3.42	3.44	3.43	0.289	0.303	0.296	0.561	0.567	0.564	0.452	0.464	0.458	2.28	2.31	2.30
15	3.52	3.54	3.53	0.309	0.318	0.313	0.561	0.578	0.569	0.445	0.453	0.449	2.29	2.33	2.31
21	3.41	3.49	3.45	0.294	0.311	0.302	0.527	0.572	0.549	0.460	0.470	0.465	2.12	2.35	2.23
27	3.52	3.54	3.53	0.311	0.319	0.315	0.555	0.563	0.559	0.446	0.452	0.449	2.35	2.36	2.35
35	3.47	3.50	3.48	0.304	0.309	0.306	0.569	0.549	0.559	0.427	0.444	0.436	2.48	2.48	2.48
39	3.50	3.61	3.56	0.319	0.319	0.319	0.575	0.575	0.575	0.447	0.443	0.445	2.33	2.36	2.35
46	3.54	3.47	3.51	0.317	0.320	0.319	0.554	0.556	0.555	0.460	0.450	0.455	2.22	2.21	2.21
51	3.49	3.48	3.49	0.314	0.322	0.318	0.545	0.550	0.548	0.460	0.450	0.455	2.24	2.26	2.25

表4B FAMIC-B-14の安定性モニタリング分析結果

(質量分率%)

経過月数	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)					
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値				
0	7.94	8.09	8.02	9.13	9.14	9.13	6.66	6.74	6.70	8.18	8.23	8.20
4	7.98	7.98	7.98	9.18	9.23	9.20	6.77	6.79	6.78	8.15	8.16	8.16
10	7.96	8.01	7.98	9.12	9.13	9.12	6.65	6.67	6.66	8.28	8.29	8.29
16	8.01	8.05	8.03	9.19	9.26	9.23	6.65	6.66	6.66	8.23	8.27	8.25
22	8.02	8.06	8.04	9.25	9.33	9.29	6.72	6.77	6.75	8.17	8.47	8.32
28	7.98	8.00	7.99	9.10	9.13	9.12	6.69	6.71	6.70	8.17	8.28	8.23
34	7.93	8.03	7.98	9.10	9.11	9.11	6.69	6.73	6.71	8.27	8.54	8.41
40	7.89	8.02	7.96	9.21	9.23	9.22	6.66	6.67	6.67	8.07	8.30	8.18
46	7.93	7.95	7.94	9.27	9.28	9.27	6.74	6.76	6.75	8.17	8.18	8.17
52	7.93	8.01	7.97	9.17	9.26	9.22	6.77	6.78	6.77	8.35	8.44	8.39
58	7.96	8.01	7.99	9.25	9.26	9.25	6.82	6.82	6.82	8.07	8.19	8.13
66	8.08	8.03	8.06	9.19	9.17	9.18	6.71	6.76	6.74	8.15	8.20	8.18
70	8.13	8.12	8.13	9.15	9.15	9.15	6.66	6.66	6.66	8.21	8.19	8.20
77	7.96	7.95	7.96	9.19	9.18	9.19	6.72	6.78	6.75	8.25	8.23	8.24
82	8.09	8.06	8.08	9.11	9.10	9.10	6.78	6.80	6.79	8.13	8.19	8.16

表4B (続き)

(mg/kg)

経過月数	砒素 (As)		カドミウム (Cd)		ニッケル (Ni)				
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値			
0	3.01	3.23	3.12	3.92	4.11	4.01	36.7	38.3	37.49
4	2.96	3.07	3.02	4.26	4.27	4.26	37.7	37.7	37.70
10	2.93	2.96	2.94	4.15	4.19	4.17	36.9	37.8	37.37
16	2.88	2.97	2.93	4.17	4.19	4.18	36.9	37.1	37.00
22	2.91	2.98	2.94	3.95	3.99	3.97	38.1	39.0	38.55
28	3.01	3.08	3.05	3.70	3.78	3.74	36.3	36.6	36.44
34	3.06	3.10	3.08	4.43	4.44	4.43	38.3	39.1	38.74
40	2.94	2.99	2.96	4.29	4.38	4.34	37.2	37.2	37.20
46	2.94	2.98	2.96	4.04	4.14	4.09	37.4	38.1	37.75
52	2.85	2.90	2.88	4.34	4.37	4.35	37.2	38.7	37.91
58	2.82	2.96	2.89	4.35	4.48	4.42	36.0	36.5	36.26
66	2.96	2.93	2.94	4.22	4.30	4.26	39.0	39.0	39.01
70	3.19	3.34	3.27	4.44	4.40	4.42	36.6	36.7	36.66
77	2.88	2.88	2.88	4.23	4.22	4.23	38.4	38.3	38.35
82	2.95	3.03	2.99	4.38	4.40	4.39	37.6	37.6	37.62

表4C FAMIC-C-18-2の安定性モニタリング分析結果

(質量分率%)

経過月数	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)		
	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値
0	4.70	4.71	4.70	4.61	4.67	4.64	0.107	0.118	0.113	1.62	1.68	1.65	36.6	36.7	36.7
5	4.78	4.79	4.79	4.60	4.60	4.60	0.117	0.120	0.119	1.61	1.65	1.63	37.6	37.8	37.7
11	4.81	4.85	4.83	4.60	4.65	4.62	0.117	0.118	0.118	1.68	1.68	1.68	37.8	38.0	37.9
19	4.82	4.84	4.83	4.43	4.72	4.57	0.116	0.116	0.116	1.62	1.65	1.63	38.0	37.8	37.9
23	4.84	4.80	4.82	4.49	4.40	4.44	0.111	0.111	0.111	1.64	1.69	1.67	37.8	37.8	37.8
30	4.40	4.80	4.60	4.54	4.61	4.58	0.117	0.114	0.116	1.71	1.73	1.72	37.8	37.7	37.8
35	4.82	4.81	4.82	4.67	4.68	4.67	0.118	0.112	0.115	1.74	1.73	1.74	37.9	37.6	37.8

表4C (続き)

(mg/kg)

経過月数	銅全量 (T-Cu)			亜鉛全量 (T-Zn)			砒素 (As)			カドミウム (Cd)		
	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値
0	919	922	920	1,547	1,553	1550	12.0	13.7	12.8	1.80	1.93	1.87
5	911	913	912	1,533	1,537	1535	14.0	14.3	14.2	1.86	1.93	1.89
11	951	954	952	1,547	1,547	1547	13.3	13.9	13.6	1.81	1.83	1.82
19	874	882	878	1,512	1,516	1514	13.6	13.9	13.7	1.85	1.85	1.85
23	926	920	923	1,561	1,557	1559	14.7	13.7	14.2	1.88	1.82	1.85
30	869	904	887	1,536	1,534	1535	14.4	14.8	14.6	1.83	1.82	1.83
35	920	925	923	1,579	1,556	1568	14.0	14.0	14.0	1.82	1.81	1.82

表4C (続き)

(mg/kg)

経過月数	水銀 (Hg)			ニッケル (Ni)			クロム (Cr)			鉛 (Pb)		
	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値	測定値	測定値	平均値
0	0.905	1.012	0.959	24.2	26.2	25.2	42.4	46.5	44.5	23.0	24.8	23.9
5	0.862	1.049	0.955	24.8	25.6	25.2	49.3	51.3	50.3	24.8	25.3	25.1
11	0.878	1.005	0.941	24.9	25.4	25.1	44.0	44.2	44.1	24.3	24.8	24.5
19	0.933	0.866	0.900	25.2	25.4	25.3	43.9	44.4	44.2	23.3	23.2	23.3
23	1.254	0.940	1.097	24.7	25.2	24.9	43.7	46.0	44.8	26.4	27.1	26.8
30	0.893	0.767	0.830	28.8	23.7	26.3	45.3	40.8	43.1	24.7	23.3	24.0
35	0.957	1.026	0.992	24.4	24.1	24.2	44.9	43.1	44.0	25.7	25.1	25.4

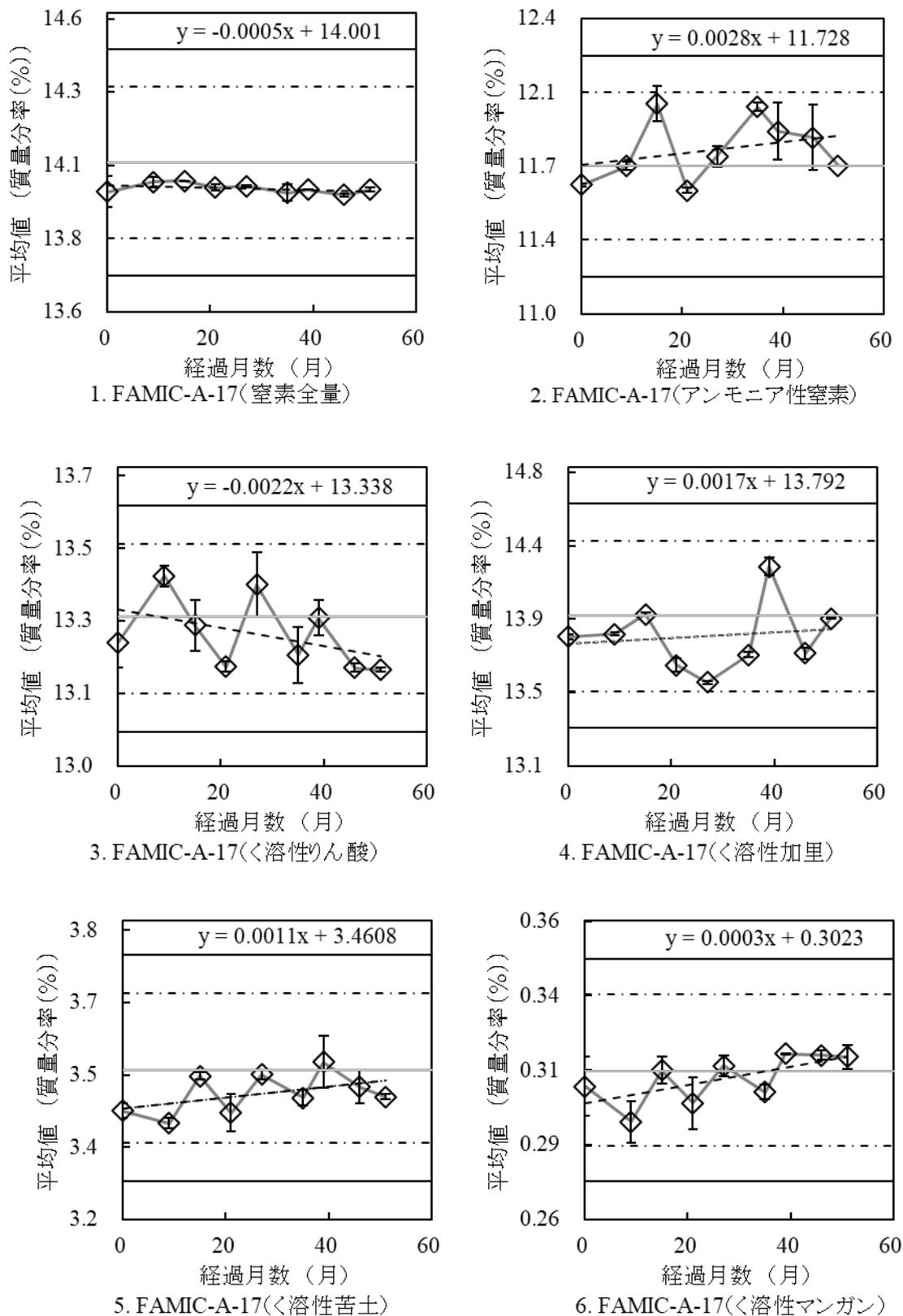


図 1A FAMIC-A-17 のモニタリング分析結果

◇: 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

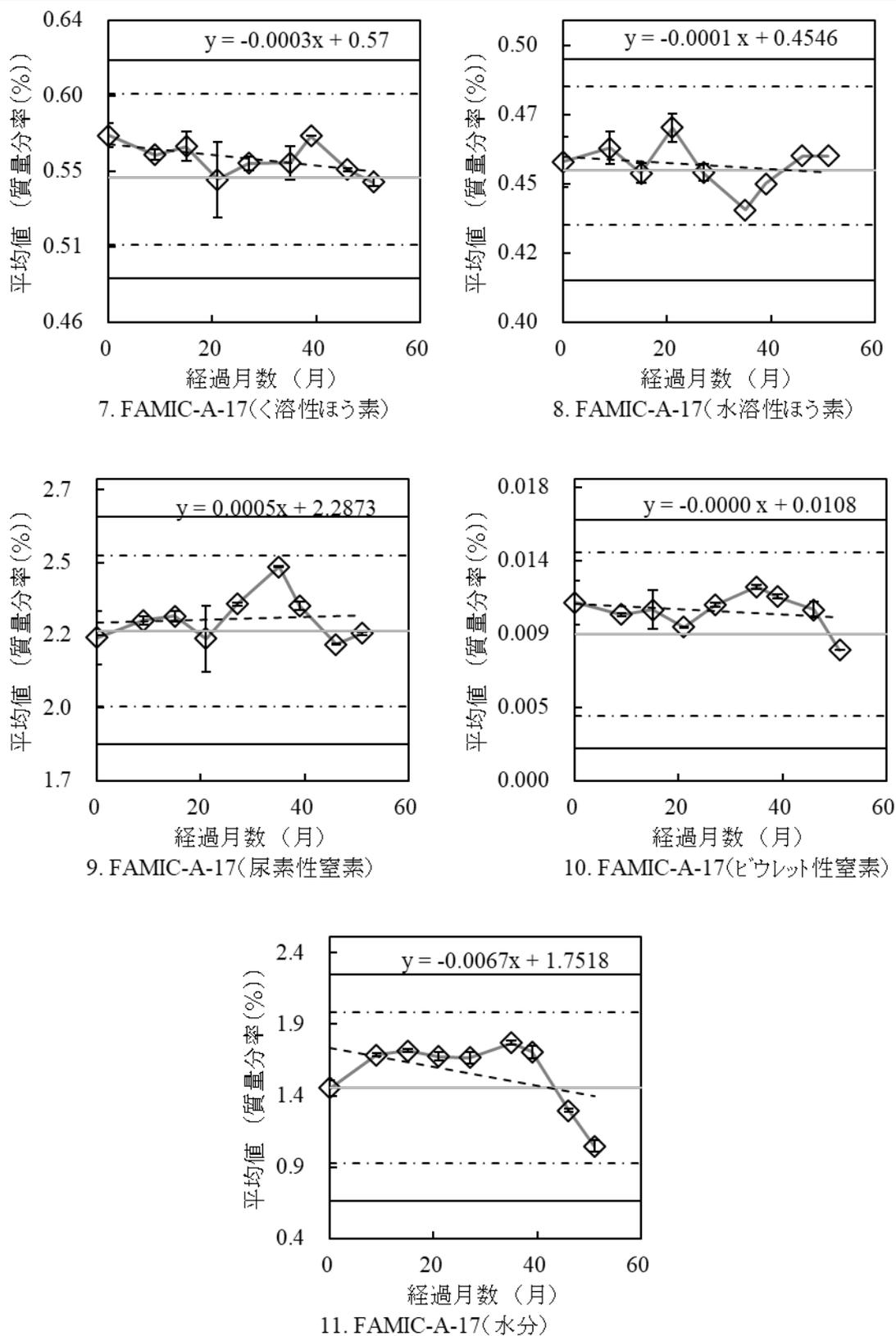


図 1A (続き)

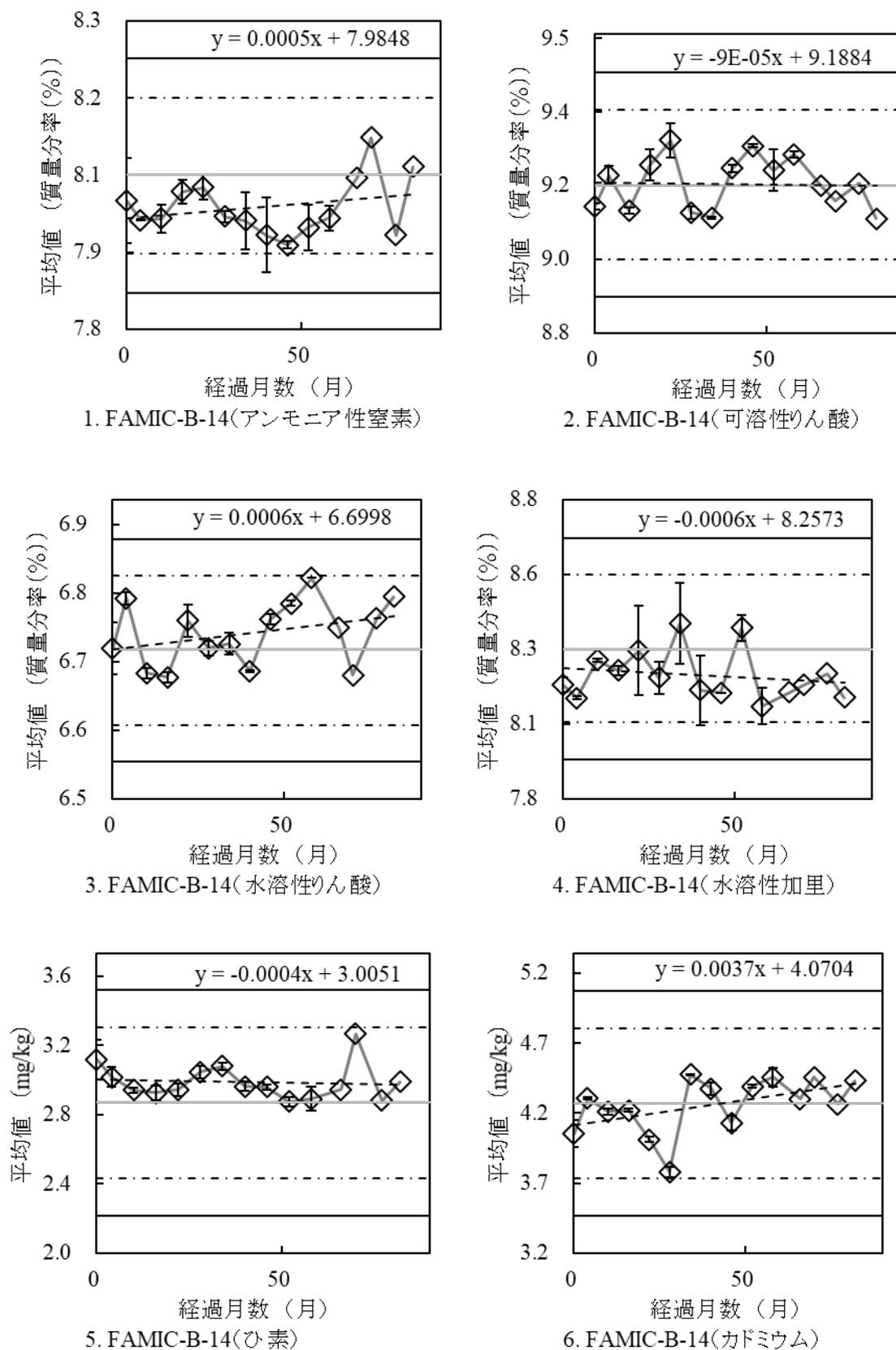
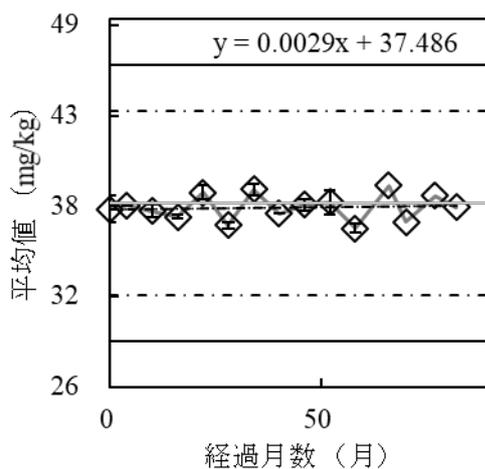
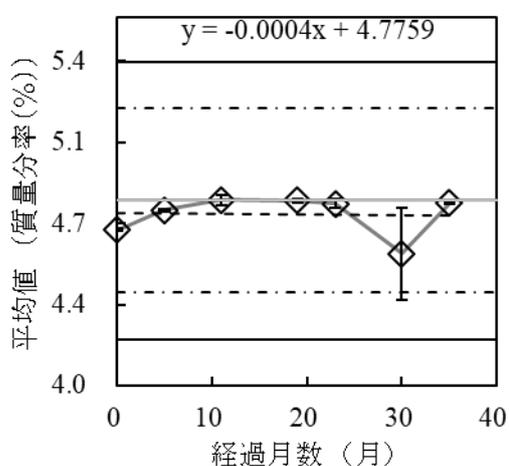


図 1B FAMIC-B-14 のモニタリング分析結果
(脚注は図 1A 参照)

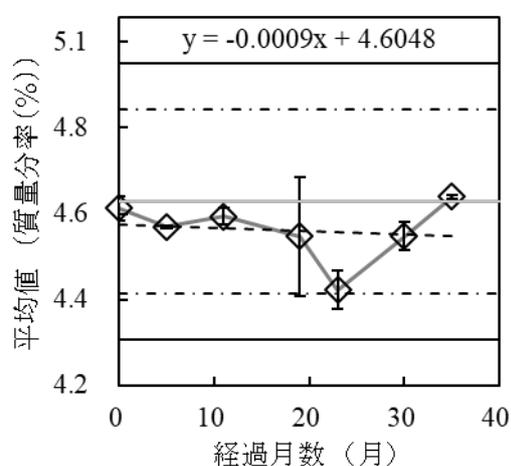


7. FAMIC-B-14(ニッケル)

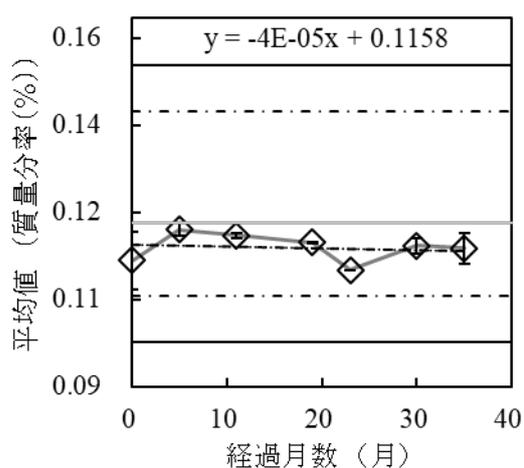
図 1B (続き)



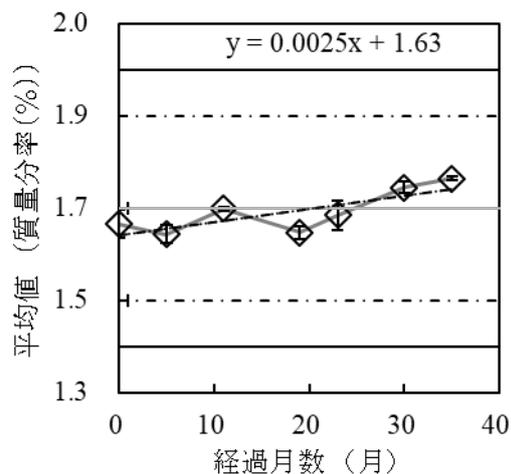
1. FAMIC-C-18-2(窒素全量)



2. FAMIC-C-18-2(りん酸全量)



3. FAMIC-C-18-2(加里全量)



4. FAMIC-C-18-2(石灰全量)

図 1C FAMIC-C-18-2 のモニタリング分析結果
(脚注は図 1A 参照)

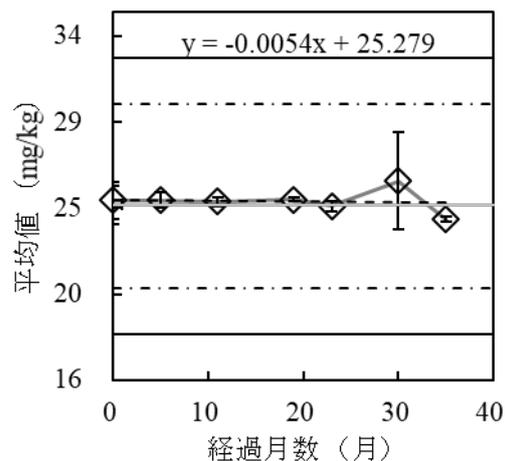
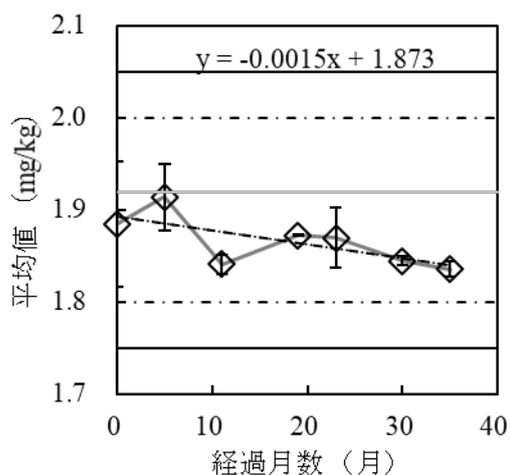
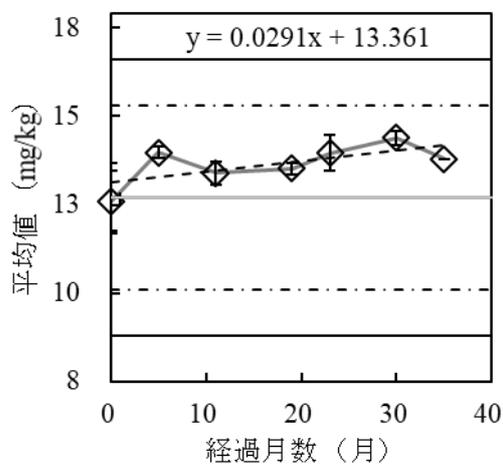
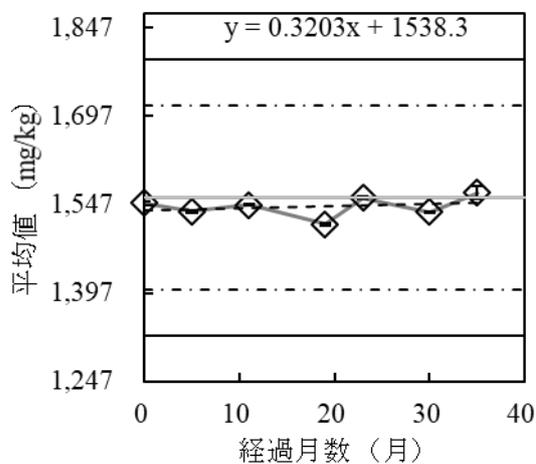
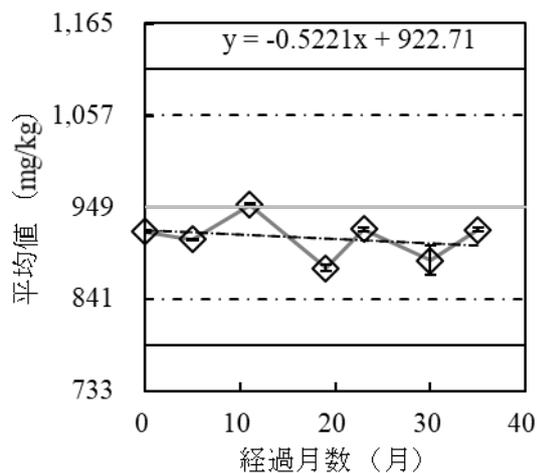
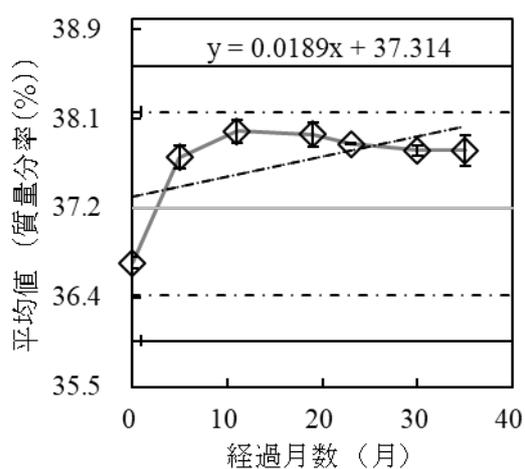


図 1C (続き)

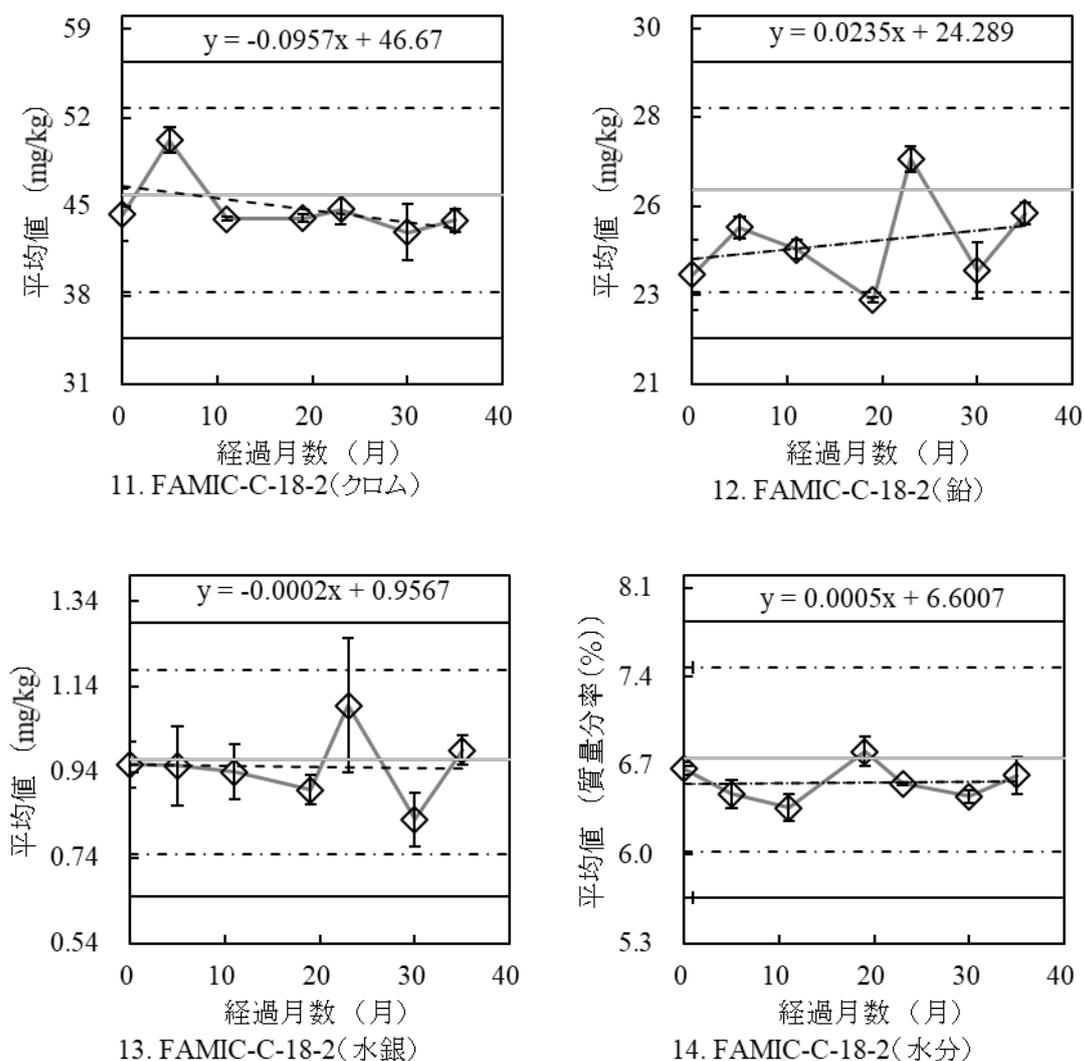


図 1C (続き)

2) 肥料認証標準物質の長期安定性評価

FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 のモニタリング実施開始時から現在までの経過月数, 各回の分析値の平均値及びモニタリング分析の評価結果について含有量が%(質量分率)のものを表 5-1 に, mg/kg のものを表 5-2 に示した. 安定性の評価は, 経過月数の平均値と各回の測定の平均値を用いて ISO Guide 35 (JIS Q 0035) を参考に次の手順で行った. まず, (d)式及び(e)式より, 経過月数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, FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2(石灰全量を除く)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 FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 の認証成分は, モニタリング実施開始時から 4 年 3 ヶ月, 6 年 10 ヶ月, 2 年 11 ヶ月間安定であると判断した.

なお, FAMIC-C-18-2 の石灰全量については, 図 1C 4.において認証値周辺での変動であり, 十分に警戒限界の範囲内であることから, 次年度以降引き続き注視する.

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

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

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

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

判定基準: $|b_1| < s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$ \dots 有意でない(安定)
 $|b_1| \geq s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$ \dots 有意である(不安定)

T : モニタリング実施回数(A-17(9回), B-14(15回), C-18-2(7回))

x_i : 調製後初回のモニタリング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 の分析結果の総平均値

b_1 : 回帰直線の傾き

b_0 : 回帰直線の切片

s : 予測の標準誤差(推定残差($y_i - \hat{y}_i$))の標準偏差)

\hat{y}_i : x_i に対する y_i の予測値

s_{b_1} : 回帰直線の傾きの標準誤差

$t_{0.95, T-2}$: t 値(両側有意水準 $\alpha = 0.05$, 自由度 $T - 2$)

表5-1 標準物質の安定性のモニタリング^{a)}分析の評価結果

成分	\bar{x} ^{b)} (mon.)	\bar{y} ^{c)} (%) ^{j)}	回帰分析結果			s_{b_1} ^{g)} ($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 基準 ^{h)} ($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 ⁱ⁾
			b_1 ^{d)}	b_0 ^{e)}	s ^{f)}			
			($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	(%) ^{j)}	(%) ^{j)}			
(FAMIC-A-17)								
窒素全量 (T-N)	27.0	13.99	-0.0005	14.00	0.015	0.0003	0.0007	○
アンモニア性窒素 (A-N)	27.0	11.80	0.0028	11.728	0.156	0.0032	0.0075	○
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	27.0	13.28	-0.0022	13.338	0.080	0.0016	0.0039	○
く溶性加里 (C-K ₂ O)	27.0	13.84	0.0017	13.792	0.216	0.0044	0.0105	○
く溶性苦土 (C-MgO)	27.0	3.492	0.0011	3.461	0.040	0.0008	0.0019	○
く溶性マンガン (C-MnO)	27.0	0.311	0.0003	0.302	0.006	0.0001	0.0003	○
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	27.0	0.561	-0.0003	0.570	0.009	0.0002	0.0004	○
水溶性ほう素 (W-B ₂ O ₃)	27.0	0.452	-0.0001	0.455	0.009	0.0002	0.0004	○
尿素性窒素 (U-N)	27.0	2.302	0.0005	2.287	0.089	0.0018	0.0043	○
(FAMIC-B-14)								
アンモニア性窒素 (A-N)	40.3	8.01	0.0005	7.98	0.05	0.0005	0.0011	○
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	40.3	9.18	-0.0001	9.19	0.06	0.0006	0.0014	○
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	40.3	6.73	0.0006	6.70	0.05	0.0005	0.0011	○
水溶性加里 (W-K ₂ O)	40.3	8.23	-0.0006	8.26	0.09	0.0008	0.0018	○
(FAMIC-C-18-2)								
窒素全量 (T-N)	17.6	4.77	-0.0004	4.78	0.10	0.0030	0.0077	○
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	17.6	4.59	-0.0009	4.60	0.08	0.0025	0.0065	○
加里全量 (T-K ₂ O)	17.6	0.12	0.0000	0.12	0.003	0.0001	0.0002	○
石灰全量 (T-CaO)	17.6	1.67	0.0025	1.63	0.03	0.0009	0.0023	×
有機炭素 (O-C)	17.6	37.65	0.0189	37.31	0.39	0.0124	0.0319	○

- a) FAMIC-A-17は調製後のモニタリング実施日から起算して51ヶ月後までモニタリング
 FAMIC-B-14は調製後のモニタリング実施日から起算して82ヶ月後までモニタリング
 FAMIC-C-18-2は調製後のモニタリング実施日から起算して35ヶ月後までモニタリング
- b) 調製後初回のモニタリング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) FAMIC-A-17の分析結果の総平均値(データ数 = モニタリング実施回数(7) × 併行分析数(2))
 FAMIC-B-14の分析結果の総平均値(データ数 = モニタリング実施回数(13) × 併行分析数(2))
 FAMIC-C-18-2の分析結果の総平均値(データ数 = モニタリング実施回数(5) × 併行分析数(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5-2 標準物質の安定性のモニタリング^{a)}分析の評価結果

成分	\bar{x} ^{b)} (mon.)	\bar{y} ^{c)} (mg/kg)	回帰分析結果			s_{b_1} ^{g)} $\left(\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}\right)$	判定	
			b_1 ^{d)} $\left(\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}\right)$	b_0 ^{e)} (mg/kg)	s ^{f)} (mg/kg)		基準 ^{h)}	判定 ⁱ⁾
							$\left(\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}\right)$	$\left(\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}\right)$
(FAMIC-B-14)								
ひ素 (As)	40.3	2.99	-0.0004	3.01	0.11	0.0011	0.0023	○
カドミウム(Cd)	40.3	4.22	0.0037	4.07	0.18	0.0018	0.0038	○
ニッケル(Ni)	40.3	37.6	0.0029	37.5	0.85	0.0085	0.0183	○
(FAMIC-C-18-2)								
銅全量 (T-Cu)	17.6	914	-0.5221	923	26.33	0.8328	2.1408	○
亜鉛全量(T-Zn)	17.6	1544	0.3203	1538	18.87	0.5969	1.5344	○
ひ素 (As)	17.6	13.9	0.0291	13.4	0.47	0.0147	0.0378	○
カドミウム(Cd)	17.6	1.85	-0.0015	1.87	0.02	0.0007	0.0018	○
水銀 (Hg)	17.6	0.95	-0.0002	0.96	0.090	0.0028	0.0073	○
ニッケル(Ni)	17.6	25.2	-0.0054	25.3	0.64	0.0204	0.0524	○
クロム(Cr)	17.6	45.0	-0.0957	46.7	2.28	0.0720	0.1852	○
鉛 (Pb)	17.6	24.7	0.0235	24.3	1.23	0.0388	0.0997	○

脚注は表5-1を参照

3) 肥料認証標準物質の有効期限設定の妥当性

FAMIC において調製した肥料認証標準物質は、認証値設定のための共同試験から約4年6ヶ月前後の有効期限を初期設定しているが、在庫数を考慮し、安定性を確認した上で適宜有効期限の延長の手続きを行っており、FAMIC-A-13 においてはモニタリング実施開始時から4年7ヶ月間、FAMIC-C-12-2 では6年8ヶ月間の安定性を確認している。また、上述のモニタリングによる長期安定性評価の結果、2021年12月時点でFAMIC-B-14は6年10ヶ月間安定であると判断されたことから、各肥料認証標準物質について、配付開始時において約4年6ヶ月程度の有効期限を設定することは妥当であると考えられた。

4) 肥料認証標準物質の有効期限についての推定

FAMIC 内の事務処理の都合上、有効期限はこれまで「○年6月末」と設定している。このことから、有効期限の延長について、6月を基準とし、各標準物質について、不確かさの推測値を算出し、有効期限についての推定を行った。推定方法はISO Guide 35(JIS Q 0035)を参考にし、認証値設定から数年後6月末までの月数が経過した時点での長期安定性による不確かさを(h)式により算出し、警戒限界の不確かさ(値付けのための共同試験の結果より算出した内部品質管理のための標準偏差(σ)の2倍)と比較することで有効期限の推定を行った(表6A~6C)。その結果、FAMIC-A-17については、2026年6月末にく溶性加里の不確かさの推定値が警戒限界の不確かさ(2σ)を超え、FAMIC-B-14については、2035年6月末に水溶性りん酸の不確かさの推定値が警戒限界の不確かさ(2σ)を超え、FAMIC-C-18-2については、2024年6月末に鉛の不確かさの推定値が警戒限界の不確かさ(2σ)を超えることが予測された。よって、FAMIC-B-14 に関しては有効期限を2034年まで延長可能であると推測された。

$$u_{\text{its}} = s_{b_1} m_{\text{expir}} \dots (h)$$

m_{expir} : モニタリング実施開始時からの月数

u_{Its} : 長期安定性による不確かさの推測値

表6A :FAMIC-A-17の不確かさの推測値

成分	$s_{\text{bl}}^{\text{a)}$	$u_{\text{Its}}^{\text{b)}$			$2\sigma^{\text{c)}$
		95ヶ月後 (2025年6月末)	107ヶ月後 (2026年6月末)	119ヶ月後 (2027年6月末)	
窒素全量 (T-N) ^{d)}	0.000	0.030	0.034	0.037	0.266
アンモニア性窒素 (A-N) ^{d)}	0.003	0.303	0.342	0.380	0.362
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅) ^{d)}	0.002	0.155	0.175	0.195	0.176
く溶性加里 (C-K ₂ O) ^{d)}	0.004	0.421	0.474	0.527	0.448
く溶性苦土 (C-MgO) ^{d)}	0.001	0.078	0.087	0.097	0.158
く溶性マンガン (C-MnO) ^{d)}	0.000	0.013	0.014	0.016	0.025
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃) ^{d)}	0.000	0.018	0.020	0.023	0.045
水溶性ほう素 (W-B ₂ O ₃) ^{d)}	0.000	0.017	0.019	0.021	0.024
尿素性窒素 (U-N) ^{d)}	0.002	0.173	0.194	0.216	0.259

a) 1ヶ月あたりの変動誤差

b) 経過月後の不確かさの推測値

c) 警戒限界の不確かさ

d) %(質量分率)

表6B :FAMIC-B-14の不確かさの推測値

成分	$s_{\text{bl}}^{\text{a)}$	$u_{\text{Its}}^{\text{b)}$			$2\sigma^{\text{c)}$
		222ヶ月後 (2033年6月末)	234ヶ月後 (2034年6月末)	246ヶ月後 (2035年6月末)	
アンモニア性窒素 (A-N) ^{d)}	0.001	0.114	0.120	0.127	0.137
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅) ^{d)}	0.001	0.140	0.147	0.155	0.173
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅) ^{d)}	0.001	0.111	0.117	0.123	0.120
水溶性加里 (W-K ₂ O) ^{d)}	0.001	0.188	0.198	0.209	0.247
ひ素 (As) ^{e)}	0.001	0.238	0.251	0.264	0.433
カドミウム (Cd) ^{e)}	0.002	0.392	0.413	0.435	0.534
ニッケル (Ni) ^{e)}	0.008	1.880	1.981	2.083	5.899

a) 1ヶ月あたりの変動誤差

b) 経過月後の不確かさの推測値

c) 警戒限界の不確かさ

d) %(質量分率)

e) mg/kg

表6C :FAMIC-C18-2の不確かさの推測値

成分	$s_{bl}^{a)}$	$u_{lts}^{b)}$			$2\sigma^{c)}$
		55ヶ月後 (2023年6月末)	67ヶ月後 (2024年6月末)	79ヶ月後 (2025年6月末)	
窒素全量 (T-N) ^{d)}	0.003	0.165	0.201	0.237	0.40
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅) ^{d)}	0.003	0.139	0.169	0.200	0.23
加里全量 (T-K ₂ O) ^{d)}	0.000	0.005	0.006	0.007	0.02
石灰全量 (T-CaO) ^{d)}	0.001	0.049	0.059	0.070	0.17
有機炭素 (O-C) ^{d)}	0.012	0.684	0.833	0.982	0.87
銅全量 (T-Cu) ^{e)}	0.833	45.804	55.798	65.791	108.36
亜鉛全量 (T-Zn) ^{e)}	0.597	32.829	39.992	47.154	156.03
砒素 (As) ^{e)}	0.015	0.809	0.986	1.162	2.60
カドミウム (Cd) ^{e)}	0.001	0.038	0.046	0.054	0.10
水銀 (Hg) ^{e)}	0.003	0.156	0.190	0.224	0.21
ニッケル (Ni) ^{e)}	0.020	1.120	1.365	1.609	4.81
クロム (Cr) ^{e)}	0.072	3.962	4.826	5.690	7.26
鉛 (Pb) ^{e)}	0.039	2.133	2.598	3.064	2.28

脚注は表6Bを参照

回帰直線の傾きの標準誤差(1ヶ月あたりの変動誤差: s_{b1})は、安定性が確認されている前提条件下では、時間経過とともに減少する。昨年度 FAMIC-C-18-2 の鉛について同様に推定を行った際には、不確かさ推定値が警戒限界の不確かさを超えると予測されたのは 2021 年 6 月末であったが、安定条件下であることから、今回の推定では 2024 年 6 月末となった。この FAMIC-C-18-2 の鉛については、現在設定している有効期限の 1 年後に不確かさの推定値が警戒限界の不確かさを超えてしまうが、これは現時点の s_{b1} を用いているためであり、今後のモニタリングとともに不確かさの推定値の増加程度は小さくなり、警戒限界の不確かさを超えると予測される期限は延びていくと考えられる。また、**3.2)**において回帰直線の傾きの変動が有意であると判定された FAMIC-C-18-2 の石灰全量についても、その不確かさの推定値は、2025 年 6 月末時点でも警戒限界の不確かさを超えないと予測され、安定性に問題はないと考えられた。

なお、現在取り扱っている 3 種類の肥料認証標準物質の有効期限については、いずれも 2023 年 6 月末日としているが、調製した肥料認証標準物質を有効に活用する観点から、在庫数を考慮して 2022 年度に有効期限の延長手続きを行うこととしている。

また、FAMIC-C-18-2 については、分析値のばらつきが大きいことから、水銀についての認証値を参考値としており、新規に汚泥肥料を基材とする肥料認証標準物質を調製している¹³⁾。

4. まとめ

肥料認証標準物質 FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 のモニタリングによる長期安定性を確認した結果、FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 の各成分における分析結果の平均値は、いずれの成分も認証値設定時の共同試験において得られた不確かさから算出された警戒限界(単一試験室で取得される分析値のばらつきに対し推定された範囲)内であった。また、分析結果を ISO Guide 35 (JIS Q 0035)を参考に統計解析し、回帰直線の傾きの変動から安定性を評価したところ、FAMIC-A-17, FAMIC-B-14 及び FAMIC-C-18-2 についてモニタリング実施開始時から、各々 4 年 3 ヶ月間、6 年 10 ヶ月間、2 年 11 ヶ月間の認証成分

(FAMIC-C-18-2 の石灰全量を除く)の安定性が確認された。

また、有効期限の妥当性を確認するため、不確かさの推定値を算出したところ、各成分において現在設定している有効期限内に不確かさの推定値が警戒限界の不確かさを超過しないことを確認した。FAMIC-C-18-2 の石灰全量については、前述の安定性評価において回帰直線の傾きの変動が有意であると判定されたが、この不確かさの推定においては2025年6月末時点でも警戒限界の不確かさを超過しないことから、現段階で有効期限の見直しは必要ないと判断した。

ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)では、分析法の妥当性確認において、標準物質を用いて真度及び精度の評価が推奨される方法の一つに挙げられている。また、日常の分析結果の妥当性の確保において、結果として得られるデータは、実行可能な場合に、統計的手法を用いて集積された分析結果を解析し、評価することが推奨されている。このことから、認証成分の長期安定性を確認している肥料認証標準物質の利用促進が肥料分析の品質保証に貢献するところは大きく、利用者の分析結果の信頼性の向上に寄与するものと考えられる。

文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) : 肥料認証標準物質の配布申請手続き
<<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, 白井裕治, 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, 白井裕治: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, 白井裕治: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) 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: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—, 肥料研究報告, **11**, 159~172 (2018)
- 8) 清水昭, 坂井田里子, 加藤まどか, 大島舞弓, 中村信仁, 秋元里乃, 白井裕治:2018 年度 肥料認証標準物質の開発—汚泥発酵肥料 FAMIC-C-18 の調製—, 肥料研究報告, **12**, 160~174 (2019)
- 9) ISO 17034 (2016): “General requirements for the competence of reference material producers” ((JIS Q 17034:2018, 「標準物質生産者の能力に関する一般要求事項」)
- 10) 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」)
- 11) 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」)
- 12) 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 (2020)

http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2020.pdf

- 13) 松尾信吾, 八木啓二, 田中雄大, 吉村英美, 秋元里乃: 肥料認証標準物質の開発 — 汚泥発酵肥料 FAMILC-C-21 の新規調製 —, 肥料研究報告, **15**, 155~168 (2022)

Long-term Stability Evaluation of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-17), Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-14) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-18-2)

KAMIKAWA Takafumi¹, AOYAMA Keisuke¹, KAWAGUCHI Shinji¹,
IWAMOTO Naoki¹ and AKIMOTO Satono²

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

² FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department

FAMIC has performed long-term stability examinations to confirm shelf life of fertilizer certified reference materials (CRMs), high-analysis compound fertilizer (FAMIC-A-17), ordinary compound fertilizer (FAMIC-B-14) and composted sludge fertilizer (FAMIC-C-18-2) for analysis of major components and harmful elements. We have given certified values 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) for FAMIC-A-17, 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) for FAMIC-B-14, 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), nickel (Ni), chromium (Cr), and lead (Pb) for FAMIC-C-18-2. We evaluated the monitoring long-term stability by a statistical analysis of the results of 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-17: 3 years 10 months after preparation, FAMIC-B-14: 6 years 5 months after preparation, FAMIC-C-18-2: 2 year 6 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, 15, 169-189, 2022)

肥料研究報告編集委員

委員長 功刀 豊

副委員長 嶋崎 洋子

秋元 里乃

水野 和俊

杉村 靖

舟津 正人

阿部 文浩

日比野 洋

顯谷 久典

山西 正将

肥料研究報告 第 15 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

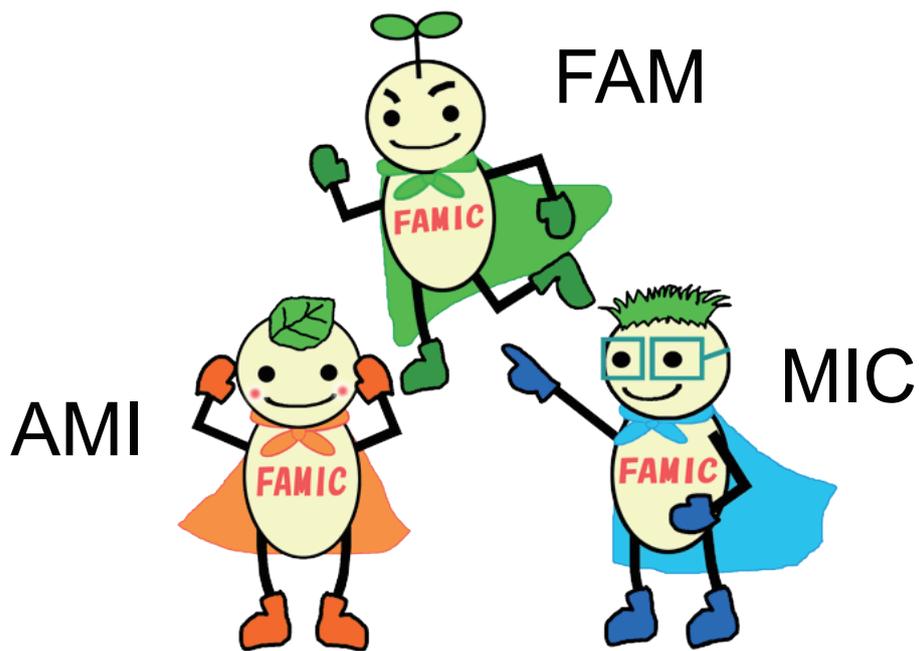
TEL 050-3797-1856

FAX 048-601-1179

<http://www.famic.go.jp/>

令和 4 年 10 月

編集 肥料研究報告編集委員会



リサイクル適性 (A)

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。