

2 く溶性りん酸及び水溶性りん酸の分析法の適用範囲確認 (菌体りん酸肥料等)

— 単一試験室による妥当性確認 —

田村千晃¹ 青山恵介²

キーワード 菌体りん酸肥料, く溶性りん酸, 水溶性りん酸, 吸光光度法, ICP-OES 法, 脱色

1. はじめに

肥料の品質の確保等に関する法律施行規則の一部改正(令和 5 年 10 月施行)¹⁾により, 資源の有効活用を目的として, 下水汚泥や工場の廃水処理汚泥を原料とし, これまで汚泥肥料として区分されていた肥料のうち, その生産工程及び品質が管理され, 一定の成分量を保証できる場合に「菌体りん酸肥料」として登録を取得し, 他の化成肥料等と混合して使用可能になった. この改正に伴い, 菌体りん酸肥料は汚泥肥料と異なり, 事業者が分析結果を基に保証成分を定めることが可能となった.

しかし, これまで汚泥肥料で管理が必要な肥料の主成分は全て全量として定義されるもののみであり, くえん酸可溶性成分や水溶性成分など, 全量以外の主成分について肥料等試験法²⁾の適用確認が十分になされていなかった.

そこで, 本課題では検討時点で菌体りん酸肥料の流通が少なく, 入手が難しかったことから, 菌体りん酸肥料及び性質が近似している汚泥肥料を用い, りん酸分析法のうち, くえん酸可溶性りん酸(以下, 「C-P」という.)及び水溶性りん酸(以下, 「W-P」という.)のバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法について分析上の課題等を検討し, 菌体りん酸肥料等にも適用できるよう分析法の改良を行い, 単一試験室の妥当性確認を実施した. 加えて, 肥料等試験法に記載されている C-P 及び W-P の ICP 発光分光分析法について内標準を用いた方法についても検討を行ったので併せて報告する.

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

(1) 菌体りん酸肥料, 汚泥肥料及び化成肥料

肥料製造工場等で製造され市場に流通している肥料 16 点(菌体りん酸肥料 2 点, 汚泥肥料 10 点, 化成肥料 4 点)を使用した(Table 1). 水分量が多い肥料は, 肥料等試験法 2.3.1 に従い 65 °C で 5 時間以上の予備乾燥を行った. 肥料法試験法 2.3.3 に従い目開き 500 μm のふるいを通過するまで遠心型粉碎機で粉碎したものを分析用試料とした.

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

Table 1 List of selected fertilizers and abbreviations

Type of fertilizers	No.	Main materials		Abbreviation
Microbe phosphate fertilizer	1	Industrial sludge	—	MF-1
	2	Industrial sludge	—	MF-2
Sludge fertilizer	1	Industrial sludge	Animal and plant origin	SF-1
	2	Industrial sludge	Animal and plant origin	SF-2
	3	Sewage sludge	Plant origin	SF-3
	4	Sewage sludge	Animal and plant origin	SF-4
	5	Sewage sludge	Human waste sludge	SF-5
	6	Industrial sludge	Plant origin	SF-6
	7	Sewage sludge	—	SF-7
	8	Human waste sludge	—	SF-8
	9	Sewage sludge	—	SF-9
	10	Human waste sludge	Industrial sludge	SF-10
Chemical fertilizer	1	Single superphosphate ^{a)}	Ammonium phosphate ^{a)}	CF-1
	2	Ammonium phosphate ^{a)}	—	CF-2
	3	Ammonium phosphate ^{a)}	—	CF-3
	4	Single superphosphate ^{a)}	—	CF-4

a) Main material supplying phosphoric acid

(2) 調製肥料

真度の評価には、汚泥肥料と化成肥料を混合した調製肥料 20 点を用いた (Table 2)。精度の評価及び定量下限・検出下限の推定には、Table 1 中の試料のほか、菌体りん酸肥料 (MF-2) 及び化成肥料を模した試薬を混合した調製肥料を用いた (Table 3)。肥料及び試薬はすべて目開き 500 μm のふるいを通過するまで遠心型粉碎機で粉碎し、混合したものを分析用試料とした。

Table 2 Proportion of prepared fertilizers

Sample No.	Sludge fertilizer	Preparation ratio (%) ^{a)}	Chemical fertilizer	Preparation ratio (%) ^{a)}
1	SF-8	0	CF-1	100
2	SF-8	25	CF-1	75
3	SF-8	50	CF-1	50
4	SF-8	75	CF-1	25
5	SF-8	100	CF-1	0
6	SF-9	0	CF-3	100
7	SF-9	25	CF-3	75
8	SF-9	50	CF-3	50
9	SF-9	75	CF-3	25
10	SF-9	100	CF-3	0
11	SF-10	0	CF-2	100
12	SF-10	25	CF-2	75
13	SF-10	50	CF-2	50
14	SF-10	75	CF-2	25
15	SF-10	100	CF-2	0
16	SF-4	0	CF-4	100
17	SF-4	25	CF-4	75
18	SF-4	50	CF-4	50
19	SF-4	75	CF-4	25
20	SF-4	100	CF-4	0

a) Mass Fraction (%)

Table 3 Design of samples used to verification of precision, estimation of $LOQ^a)$ and $LOD^b)$

Sample No.	Preparation ratio (%) ^{c)}					Design concentration of W-P ^{d,e)} (%) ^{c)}
	MF-2	Ammonium sulfate (NH ₄) ₂ SO ₄	Potassium dihydrogenphosphate KH ₂ PO ₄	Potassium sulfate K ₂ SO ₄	Sucrose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	
21	95.00	2.50	1.94	0.50	0.06	1.20
22	75.00	12.50	9.68	2.50	0.32	5.18

a) Estimated lower limit of quantification

b) Estimated lower limit of detection

c) Mass Fraction (%)

d) Water-soluble phosphoric acid

e) Calculation based on W-P concentration of MF-2 (0.20 %) and the theoretical value (51.90 %) of KH₂PO₄ (99.5 % as purity of reagent)

2) 試薬等

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水
- (2) バナジン(V)酸アンモニウム: JIS K 8747 特級試薬(関東化学)
- (3) セモリブデン酸六アンモニウム四水和物: JIS K 8905 特級試薬(林純薬・富士フイルム和光純薬(50 音順))
- (4) くえん酸一水和物: JIS K 8283 特級試薬(関東化学)
- (5) くえん酸溶液(2 %): (4)のくえん酸一水和物 20 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (6) 塩酸: 金属分析用(関東化学)
- (7) 塩酸: 精密分析用(富士フイルム和光純薬)
- (8) 塩酸(V_1+V_2): (7)の塩酸の体積 V_1 と水の体積 V_2 とを混合したもの
- (9) 硝酸: 金属分析用(関東化学)
- (10) 硝酸: JIS K 8541 特級試薬(HNO_3 60 % (質量分率), 関東化学・富士フイルム和光純薬(50 音順))
- (11) 硫酸アンモニウム: JIS K 8960 特級試薬(関東化学)
- (12) りん酸二水素カリウム: JIS K 9007 特級試薬(関東化学)
- (13) 硫酸カリウム: JIS K 8962 特級試薬(関東化学)
- (14) スクロース: JIS K 8383 特級試薬(関東化学)
- (15) 活性炭: ダルコ G-60 (富士フイルム和光純薬)
- (16) 活性炭: 活性炭素, 粉末(富士フイルム和光純薬)
- (17) アンモニア水: JIS K 8085 特級試薬(NH_3 28 % (質量分率), 富士フイルム和光純薬)
- (18) フェノールフタレイン: JIS K 8799 試薬特級(富士フイルム和光純薬)
- (19) りん標準液(P 1000 $\mu\text{g/mL}$): JCSS(富士フイルム和光純薬)
- (20) 金標準液(Au 1000 mg/L): JCSS(富士フイルム和光純薬)
- (21) 内標準用金標準液(Au 50 mg/L): (20)の金標準液 5 mL を 100 mL 全量フラスコにとり, 標線まで塩酸(1+23)を加えた。

3) 装置及び器具

- (1) 紫外可視分光光度計: 島津製作所 UV-1800
- (2) 超遠心粉碎機: Retsch ZM-200
- (3) ICP 発光分光分析装置: 島津製作所 ICPE-9820(縦横方向観測方式, マルチタイプ)
- (4) 上下転倒式回転振り混ぜ機: いすゞ製作所
- (5) 恒温上下転倒式回転振り混ぜ機: ADVANTEC THM062FB・ADVANTEC 特注品

4) 分析方法

方法は肥料等試験法に従った。C-P の分析は肥料等試験法 4.2.3.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法(以下,「吸光光度法」という。)又は 4.2.3.d ICP 発光分光分析法(以下,「ICP-OES 法」という。)に従い, W-P の分析は肥料等試験法 4.2.4.a 吸光光度法又は 4.2.4.d ICP-OES 法に従った。各方法のフロー図を下に示す(Scheme 1~ Scheme 3)。なお, ICP-OES 法の抽出操作のフロー図は, 吸光光度法と同じであるため省略した。また, ICP-OES 法では試料溶液の脱色操作は実施せずに定量した。

吸光光度法における試料溶液の脱色操作に用いる活性炭の空試験は, 100 mL 全量フラスコに活性

炭を加えた後の放置時間を同時に脱色した試料溶液の最長の放置時間とし、後は試料溶液と同様に発色及び測定操作を行い、活性炭由来のりんが定量値に影響しないことを確認した。

ICP-OES 法について、肥料等試験法の 4.2.3.d 及び 4.2.4.d に収載されている方法（以下、「絶対検量線法」という）に加え、目的成分と内標準の指示値の比で定量する方法（以下、「内標準法」という）で測定を行った。内標準法は、測定溶液及び内標準液をそれぞれ 9:1 の割合で ICP 発光分光分析装置に導入し、Table 4 の波長の指示値を測定した。ICP 発光分光分析装置の測定条件は Table 4 のとおり。絶対検量線法又は内標準法により作成した検量線から分析試料中のりん(P)濃度を求め、以下の式により試料中のりん酸(P_2O_5)濃度を算出して C-P 及び W-P を求めた。

$$\text{分析試料中のりん酸}(P_2O_5)\text{濃度}(\%(\text{質量分率})) = \text{分析試料中のりん}(P)\text{濃度}(\%(\text{質量分率})) \times 2.292$$

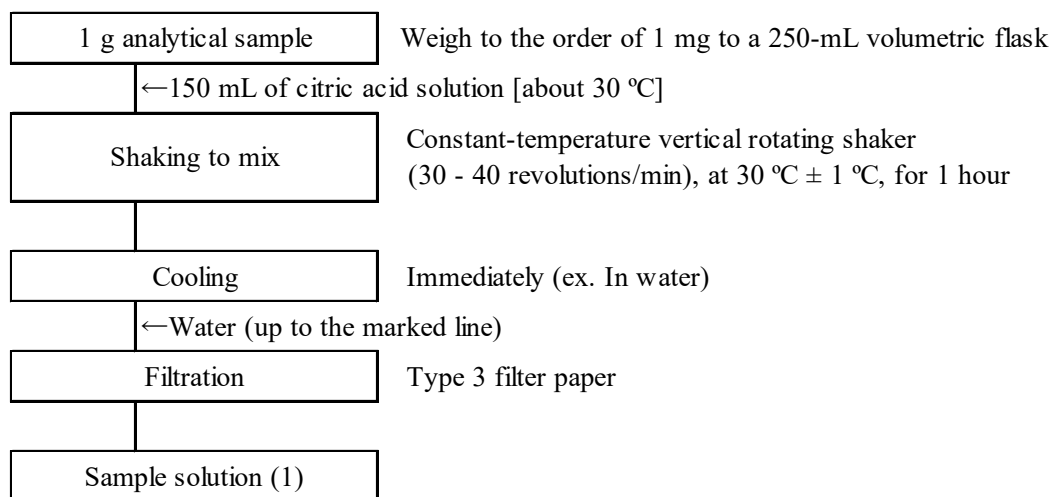
Note Short name used in the following schemes, tables and figures.

C-P: Citric acid-soluble phosphoric acid

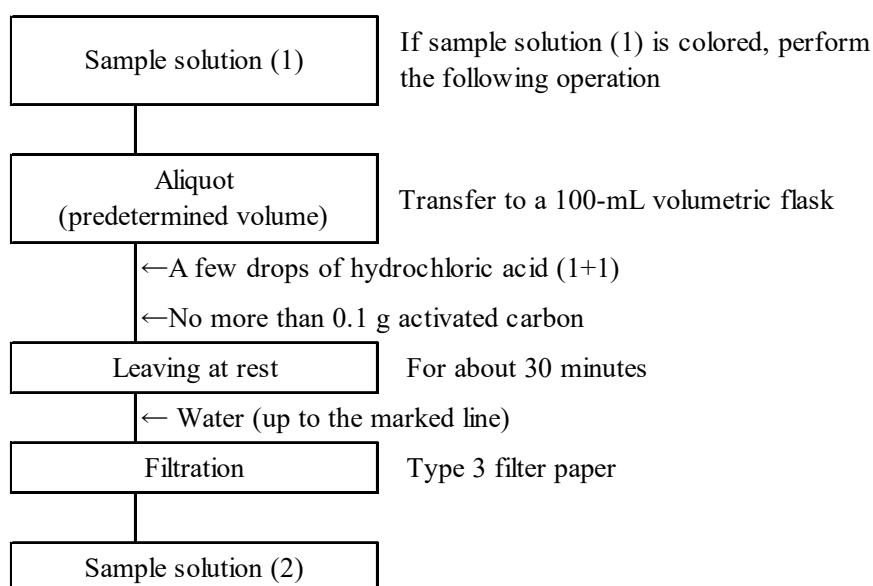
W-P: Water-soluble phosphoric acid

Absorptiometric analysis: Ammonium vanadomolybdate absorptiometric analysis

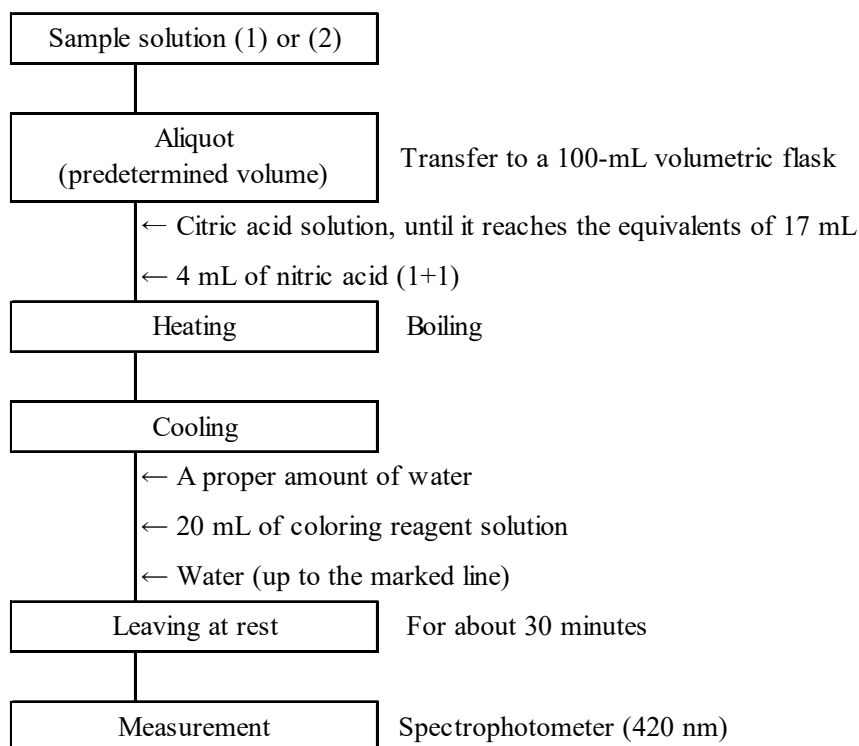
ICP-OES: ICP Optical Emission Spectrometry



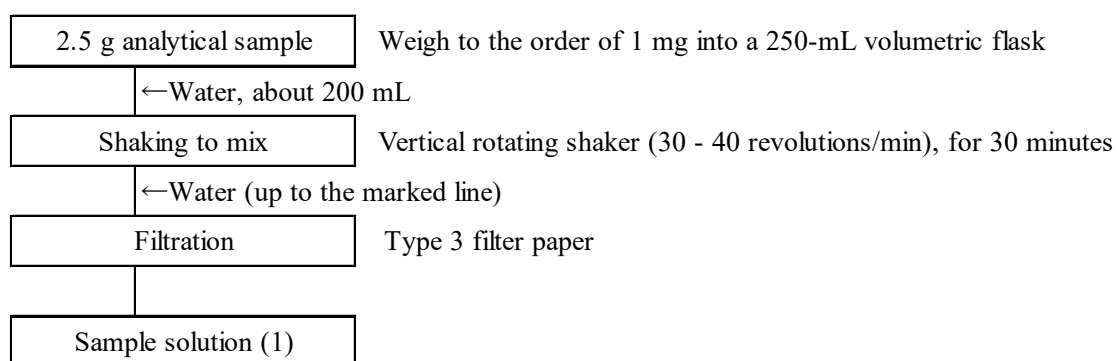
Scheme 1-1 Flow sheet for C-P in fertilizers by absorptiometric analysis and ICP-OES
(Extraction procedure)



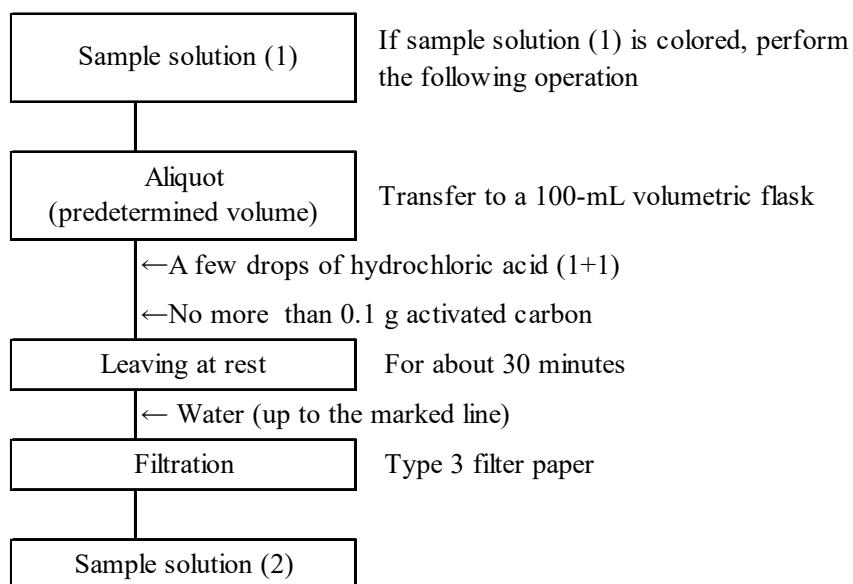
Scheme 1-2 Flow sheet for C-P in fertilizers by absorptiometric analysis
 (Decolorization procedure)



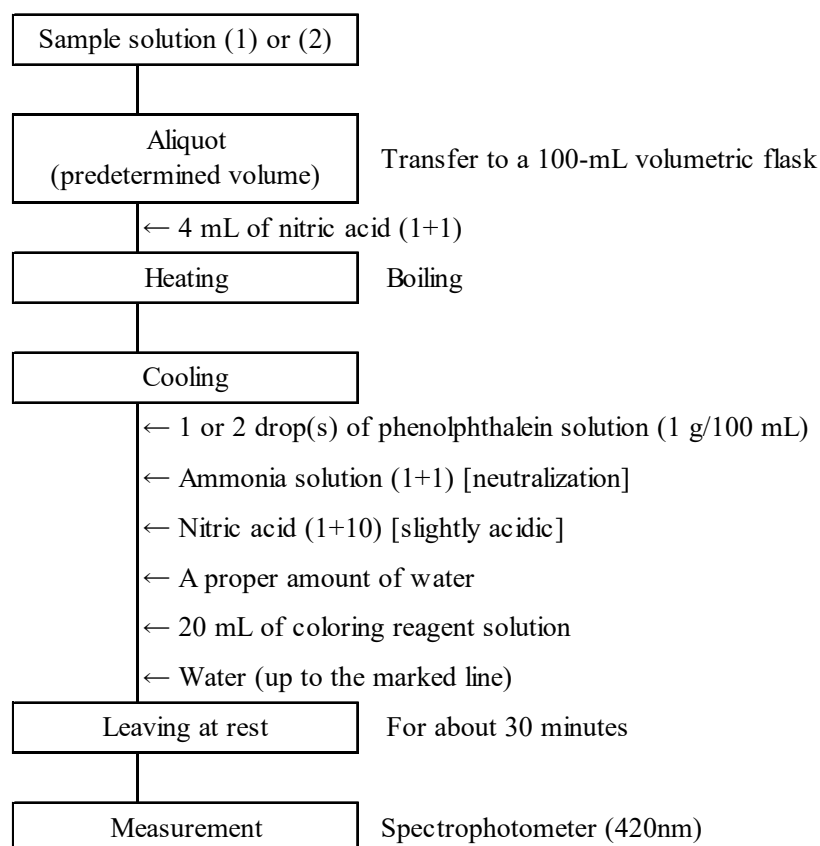
Scheme 1-3 Flow sheet for C-P in fertilizers by absorptiometric analysis
 (Coloring and measurement procedure)



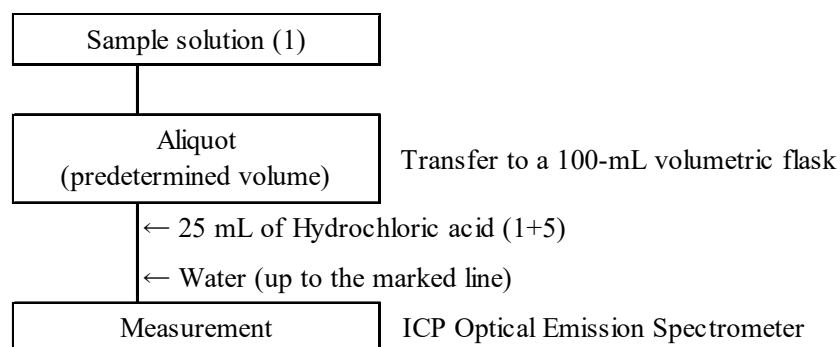
Scheme 2-1 Flow sheet for W-P in fertilizers by absorptiometric analysis and ICP-OES
(Extraction procedure)



Scheme 2-2 Flow sheet of W-P by absorptiometric analysis
(Decolorization procedure)



Scheme 2-3 Flow sheet for W-P in fertilizers by absorptiometric analysis
 (Coloring and measurement procedure)



Scheme 3 Flow sheet for C-P and W-P in fertilizers by ICP-OES
 (Measurement procedure)

Table 4 Measuring condition of ICP-OES

Wavelength ^{a)} (nm)	P 178.287 (I) ^{a)} Au 242.795 (I) ^{a)}
High frequency output (kW)	1.2
Plasma gas (L/min)	14
Auxiliary gas (L/min)	1.2
Carrier gas (L/min)	0.7
Observation direction	Axial and Radial
Observation height	Low position

a) I: Atomic beam

5) 検討内容

(1) 脱色方法・放置時間の検討

吸光光度法において試料溶液に着色がある場合は正の妨害を受けることがあるため、真値に近づけるためには脱色の必要がある。着色が定量に影響を及ぼす場合は、活性炭を用いて脱色する操作が肥料等試験法に記載されている。しかし、一部の汚泥肥料で抽出した試料溶液の着色が濃く、0.5 時間程度の放置時間では脱色が不十分な試料が確認された。0.5 時間の放置時間で脱色が不十分な試料溶液については、放置時間を一昼夜に延長すると、脱色が進み、透明に近づくことが確認された。

そこで、脱色に必要な放置時間を検討した。今回検討中の試料で最も着色の濃かった汚泥肥料 SF-2 の試料溶液 25 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、肥料等試験法により、塩酸(1+1)数滴を加えて酸性とし、活性炭 0.1 g を加えた後、放置時間のみ変更し、0 時間、0.5 時間、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間及び 20 時間とした。各脱色処理試料溶液をその後の試験操作によって発色、測定した。

各放置時間の脱色処理試料溶液の測定値について、同じ試料溶液(脱色前)を使用し、肥料等試験法に記載されている妥当性が確認された分析法である ICP-OES 法(絶対検量線法、横方向)^{3, 4)}での測定値と比較した。

(2) 真度の評価

妥当性が確認されている ICP-OES 法(絶対検量線法、横方向)と吸光光度法について、Table 2 に示した調製肥料 20 点の分析を実施し、各試料の 2 方法の分析値の相関図を作成した。回帰直線の傾き(*b*)、切片(*a*)及び相関係数(*r*)を算出し、更に予測区間を求めた。

(3) 併行精度及び中間精度の評価

菌体りん酸肥料等における吸光光度法の併行精度及び中間精度を評価するため、C-P については菌体りん酸肥料 MF-2 及び汚泥肥料 SF-5 を、W-P については調製肥料 No.21, No.22 及び汚泥肥料 SF-4 を、各試料 2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った。

(4) 定量下限及び検出下限の推定

菌体りん酸肥料の公定規格では、C-P, W-P を保証成分とする場合、最小量として 1 % (質量分率) 以上と定められていることから、定量下限が 1 % (質量分率) 以下であることを確認する必要がある、それを基準に定量下

限及び検出下限の推定を行った。C-P は菌体りん酸肥料 MF-2 を、W-P は調製肥料 No.21 を、各 7 点併行で分析した。肥料等試験法附属書 A⁵⁾の手順に従い、得られた分析値の併行標準偏差に 10 を乗じて定量下限を、 $2 \times t(n-1, 0.05)$ を乗じて検出下限を算出した。

(5) ICP-OES 法の定量方法及び観測方向の検討

肥料等試験法に記載されている C-P 及び W-P の ICP-OES 法は絶対検量線法が採用されているが、2022 年に検討されたりん酸全量⁶⁾及び可溶性りん酸⁷⁾の ICP-OES 法では様々な干渉を補正する目的で内標準法が採用されている。従って、C-P 及び W-P についても内標準法を用いた定量方法を検討した。内標準の選定について、りん酸全量及び可溶性りん酸の ICP-OES 法では Be が用いられているが、Be の毒性を考慮し、本検討では Au を用いた。加えて、軸方向又は横方向から測定を行い、観測方向の影響を確認した。

(a) 検量線の直線性

P の濃度が 0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L 及び 100 mg/L の検量線用標準液を測定した。内標準法の測定については 2.4) のとおり。絶対検量線法は P の濃度に対する P の指示値、内標準法は P の濃度に対する指示値の比 (P/Au) による検量線を作成した。

(b) 真度の評価

Table 2 の調製肥料 20 点を用いて、絶対検量線法(横方向)の分析値と、定量方法又は観測方向を変えた測定条件の各試料の分析値の相関図を作成し、2.5)(2)と同じ手順で真度を評価した。

3. 結果及び考察

1) 脱色方法・放置時間の検討

吸光光度法で菌体りん酸肥料及び汚泥肥料の W-P を分析したところ、試料溶液の脱色操作の放置時間を 0.5 時間として実施しただけでは、着色が残る試料があった。

そのうち汚泥肥料 SF-2 について ICP-OES 法と、活性炭投入後の放置時間を変更した吸光光度法の分析値を比較した結果を Table 5 に示す。ICP-OES 法での分析値を 100 % とし、吸光光度法の放置時間ごとの割合を求めた。その結果、W-P は放置時間が 5 時間までは ICP-OES 法の分析値よりも吸光光度法の分析値が高く、放置時間が 20 時間で吸光光度法と ICP-OES 法の分析値がほぼ同じとなった。C-P では放置時間 0 時間、0.5 時間の吸光光度法と ICP-OES 法との分析値に差はほとんどなく、着色の影響は少ないと考えられた。W-P 分析は C-P 分析に比べて試料溶液量に対する試料重量の割合が大きいため着色が濃く、放置時間が 5 時間未満の場合は脱色が不十分な試料もあると考えられた。

W-P について、菌体りん酸肥料及び汚泥肥料計 8 点を用いて、ICP-OES 法及び脱色 20 時間の吸光光度法で分析を行った (Table 6)。2 方法の分析値について、*t*-検定 (一対の標本による平均の検定、有意水準 5 %) を実施した結果、有意差は認められなかった ($t(8)=-0.40, p=0.70$)。従って、吸光光度法を汚泥肥料及び菌体りん酸肥料に適用する際、試料溶液の脱色に活性炭を使用する場合の放置時間は、0.5 時間で脱色が不十分な場合は 20 時間とすることとした。

Table 5 Measurement value by extension contact time using activated carbon with sample solution

Decolorization time (hours)	Absorptiometric analysis (A)								ICP-OES (B)
	0	0.5	1	2	3	4	5	20	
C-P (%) ^{a)}	2.42	2.38	2.39	2.38	2.40	2.39	2.38	2.35	2.28
(A)/(B) (%) ^{b)}	106	104	105	104	105	105	104	103	100
W-P (%) ^{a)}	0.72	0.63	0.63	0.60	0.61	0.60	0.60	0.54	0.53
(A)/(B) (%) ^{b)}	135	119	118	114	116	113	113	103	100

a) Mass Fraction

b) The percentage of absorptiometric analysis measurement value when the ICP-OES measurement value is set to 100

Table 6 Comparison between measurement value of absorptiometric analysis (with or without decolorization) and ICP-OES with W-P sample solution

Sample	Absorptiometric analysis (%) ^{a)}		ICP-OES (%) ^{a)}
	Without	With	
	decolourization	decolourization ^{b)}	
SF-1	0.59	0.40	0.38
SF-2	1.55	0.63	0.58
SF-3	2.14	1.85	1.81
SF-4	1.01	0.42	0.38
SF-6	-	1.39	1.43
SF-7	0.57	0.45	0.47
MF-1	1.75	0.18	0.24
MF-2	0.27	0.22	0.31

a) Mass Fraction

b) Decolourization time: 20 hours

2) 真度の評価

C-P 及び W-P において, x 軸に ICP-OES 法(絶対検量線法, 横方向)の分析値を, y 軸に吸光光度法の分析値をプロットした相関図及び回帰直線を Figure 1 に示した. また, 回帰直線の傾き及び切片の 95 %信頼区間と相関係数を Table 7 に示した. その結果, 肥料等試験法附属書 A の真度評価の推奨条件(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, 相関係数が 0.99 以上であること)を満たし, 2 方法間で有意差のない分析値が得られた.

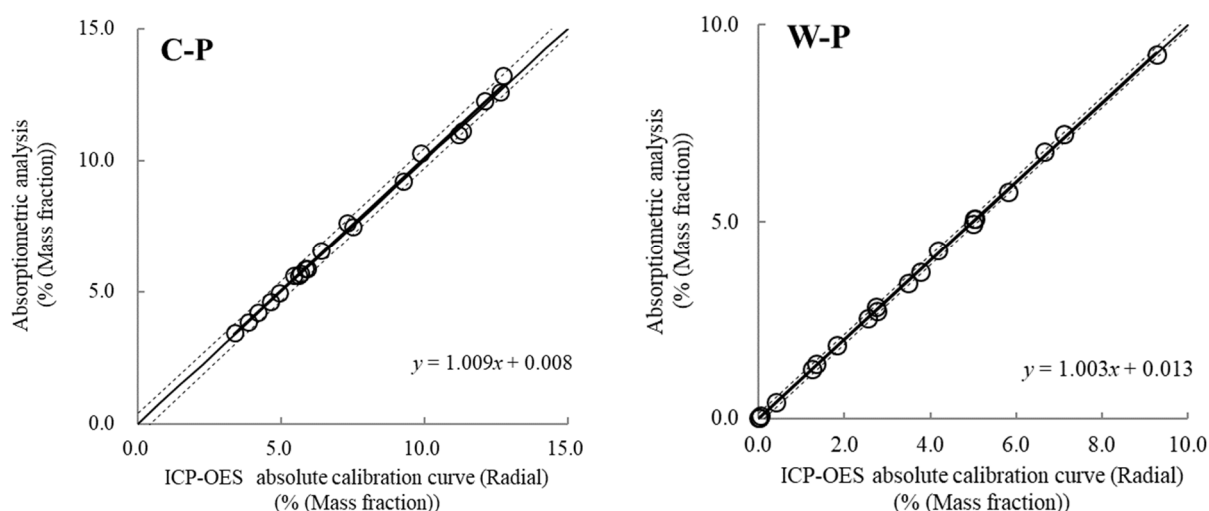


Figure 1 Comparison of measurement value of W-P and C-P by absorptiometric analysis and by ICP-OES
 Bold line: regression line, Dashed line: 95% confidence interval of regression line, thin line: $y=x$

Table 7 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line of
 measurement value between absorptiometric analysis and ICP-OES

Component	95 % confidence interval						Correlation coefficient (r)
	Inclination (b)			Intercept (a)			
C-P	0.982	–	1.035	-0.207	–	0.224	0.999
W-P	0.993	–	1.013	-0.030	–	0.056	1.000

3) 併行精度及び中間精度の評価

吸光光度法で各試料を2点併行で日を変えて5回分析を行った結果を Table 8 に示した. また, その結果を基に一元配置分散分析を行って推定された併行精度及び中間精度を Table 9 に示した. いずれの成分及び試料においても, 肥料等試験法附属書 A に示されている精度の許容範囲内であった.

Table 8 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation
 (% (mass fraction))

Component	Sample (Abbreviation or sample No.)	Test day				
		1	2	3	4	5
C-P	Microbe phosphate fertilizer (MF-2)	1.90	1.94	1.98	1.83	1.94
		1.95	1.93	1.98	1.84	1.87
	Sludge fertilizer (SF-5)	8.28	8.31	8.52	8.09	8.05
		8.28	8.32	8.51	8.02	8.05
W-P	Prepared fertilizer (No.21)	1.13	1.18	1.22	1.19	1.20
		1.14	1.19	1.18	1.17	1.18
	Prepared fertilizer (No.22)	4.95	5.18	4.91	4.99	5.26
		4.95	5.20	4.84	4.99	5.27
	Sludge fertilizer (SF-4)	0.28	0.26	0.30	0.29	0.30
		0.25	0.27	0.30	0.29	0.31

Table 9 Statistical analysis of repetition of the test results for estimating precision

Component	Sample (Abbreviation or sample No.)	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
			s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$2 \times CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%) ^{b)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$2 \times CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)
C-P	Microbe phosphate fertilizer (MF-2)	1.92	0.03	1.4	4	0.06	2.9	7
	Sludge fertilizer (SF-5)	8.24	0.02	0.3	4	0.20	2.4	7
W-P	Prepared fertilizer (No.21)	1.18	0.02	1.4	4	0.03	2.3	7
	Prepared fertilizer (No.22)	5.05	0.02	0.5	4	0.17	3.3	7
	Sludge fertilizer (SF-4)	0.29	0.01	3.7	6	0.02	7.2	9

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

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability (repeatability relative standard deviation)
shown in Testing Methods for Fertilizers 2024

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate precision (intermediate relative standard deviation)
shown in Testing Methods for Fertilizers 2024

4) 定量下限等の推定

吸光光度法で推定された定量下限及び検出下限の結果を Table 10 に示す. C-P の定量下限は 0.3 % (質量分率) 程度, 検出下限は 0.09 % (質量分率) 程度, W-P の定量下限は 0.1 % (質量分率) 程度, 検出下限は 0.04 % (質量分率) 程度と推定された. 菌体りん酸肥料の C-P 及び W-P の保証可能な最小値は 1.0 % であり, 肥料等試験法附属書 A において主成分の定量下限は公定規格上の含有すべき最小量の 1/5 以下を推奨している. この推奨値を C-P は上回ったが, W-P は満たしていた.

Table 10 Estimation of LOQ and LOD values (% (Mass fraction))

Component	Sample (Abbreviation or sample No.)	Mean ^{a)}	Standard deviation	LOQ ^{b)}	LOD ^{c)}
C-P	Microbe phosphate fertilizer (MF-2)	1.93	0.02	0.3	0.09
W-P	Prepared fertilizer (No.21)	1.13	0.01	0.1	0.04

a) Mean value ($n=7$)

b) Estimated lower limit of quantification (Standard deviation×10)

c) Estimated lower limit of detection (Standard deviation×2× $t(n-1, 0.05)$)

5) ICP-OES の定量方法及び観測方法の検討

(1) 検量線の直線性

作成した検量線を Figure 2 に示す.今回検討したいずれの定量方法及び観測方向でも, 決定係数(r^2)は 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. なお, 絶対検量線法(横方向)の直線性は青山による報告⁸⁾で示されている.

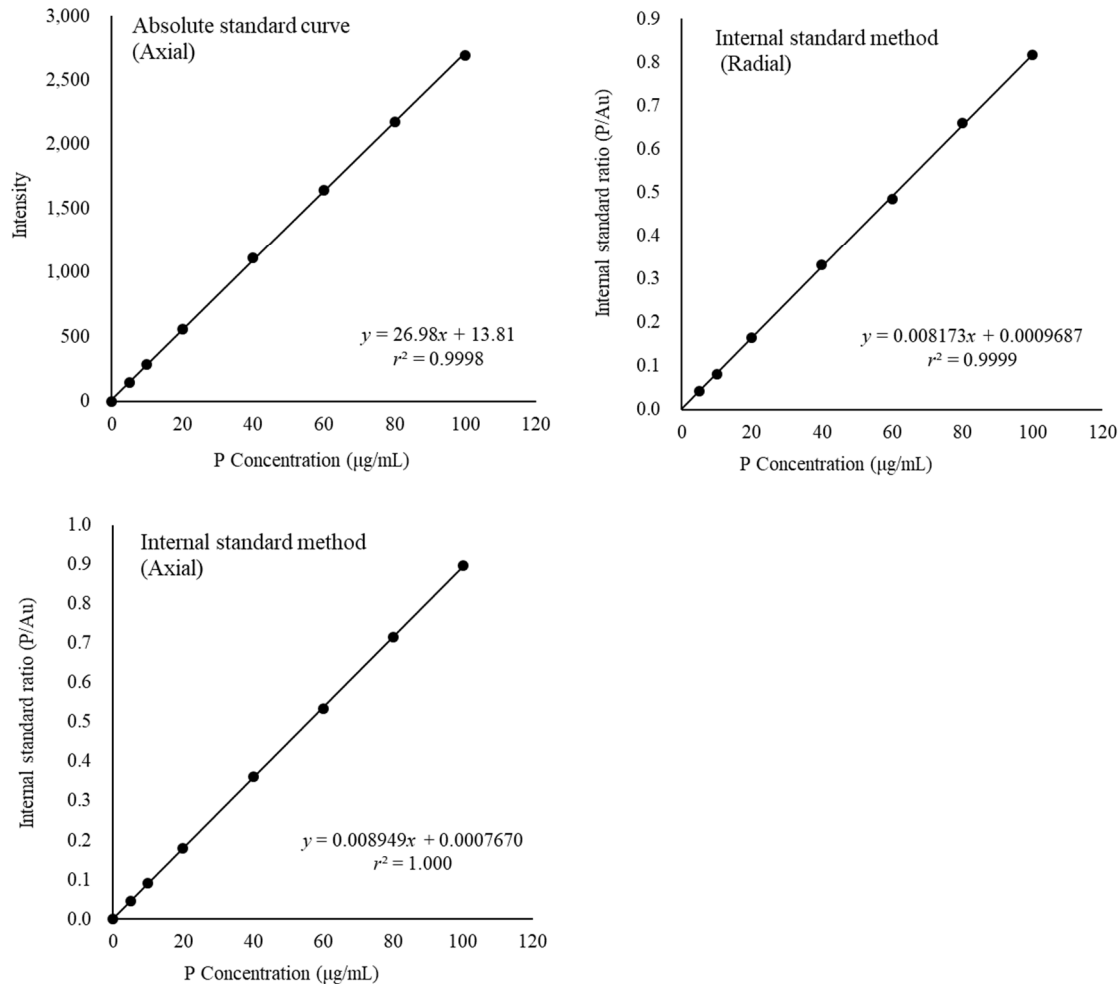


Figure 2 P Calibration curve by ICP-OES depending on the combination of quantitation method and observation direction

(2) 真度の評価

C-P 及び W-P について, x 軸に絶対検量線法(横方向)の分析値を, y 軸に絶対検量線法(軸方向), 内標準法(横方向)又は内標準法(軸方向)による分析値をプロットした相関図及び回帰直線を Figure 3 に示した. また, 回帰直線の傾き及び切片の 95 %信頼区間と相関係数を Table 11 に示した. 肥料等試験法附属書 A の手順において, 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, 相関係数が 0.99 以上であることを推奨している. 絶対検量線法(横方向)の分析値と比較して, C-P は絶対検量線法(軸方向)及び内標準法(横方向)の分析値, W-P は絶対検量線法(軸方向)の分析値との回帰直線について, 傾きの 95 %信頼区間に 1 が含まれていなかったが, その他の条件は満たしていた.

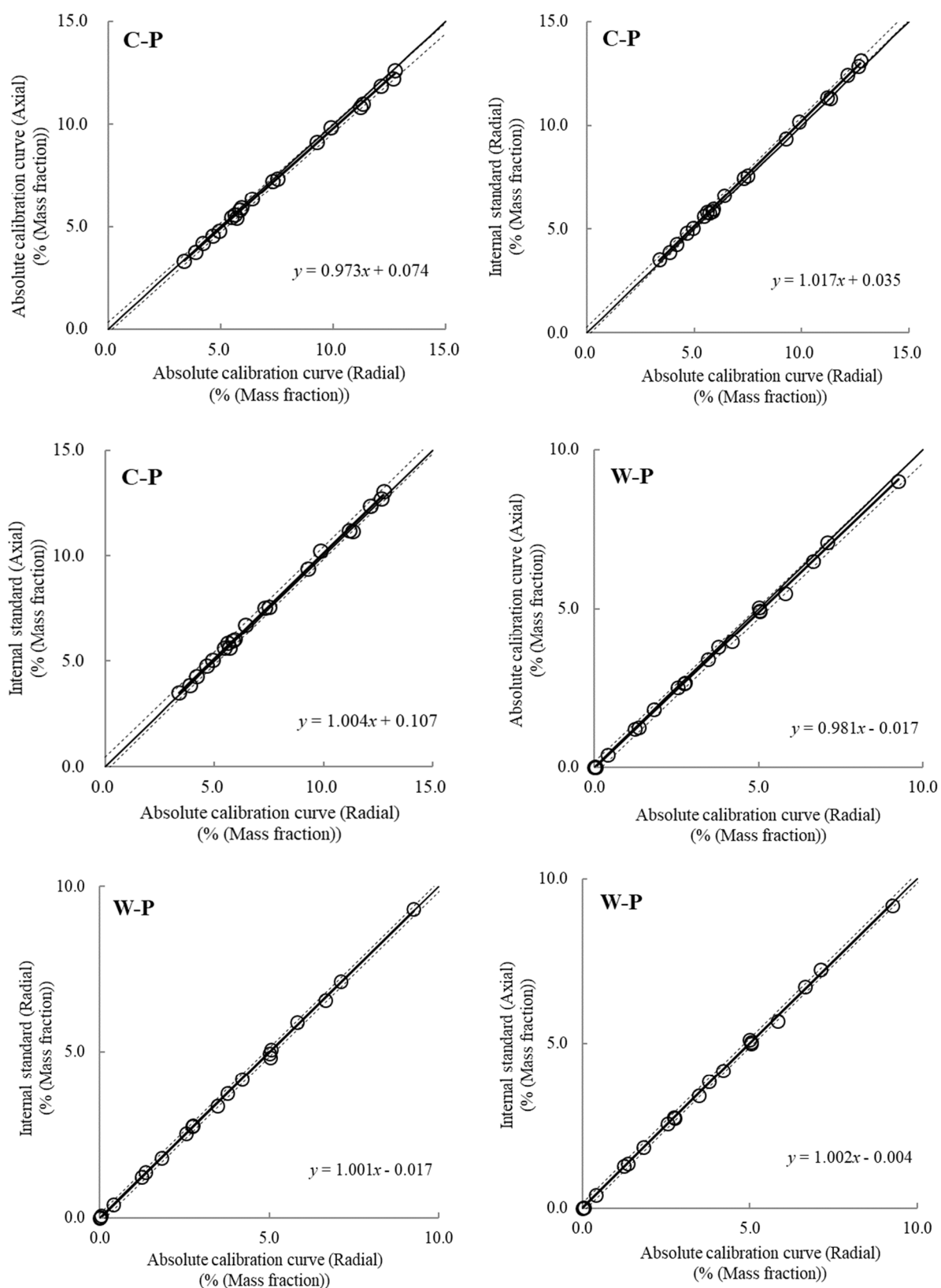


Figure 3 Comparison measurement value of C-P and W-P by ICP-OES depending on the combination of quantitation method and observation direction

Bold line: regression line, Dashed line: 95 % confidence interval of regression line, Thin line: $y=x$

Table 11 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line compared with ICP-OES measurement value of absolute calibration curve (Radial)

Component	Quantitation method	Observation direction	95 % confidence interval						Correlation coefficient (r)
			Inclination (b)			Intercept (a)			
C-P	Absolute calibration curve	Axial	0.957	–	0.989	-0.057	–	0.204	0.999
	Internal standard	Radical	1.002	–	1.032	-0.086	–	0.156	1.000
	Internal standard	Axial	0.983	–	1.025	-0.062	–	0.277	0.999
W-P	Absolute calibration curve	Axial	0.965	–	0.996	-0.082	–	0.049	0.999
	Internal standard	Radical	0.990	–	1.012	-0.064	–	0.031	1.000
	Internal standard	Axial	0.990	–	1.014	-0.054	–	0.047	1.000

4. まとめ

菌体りん酸肥料及び性質が近似している汚泥肥料を用い、肥料等試験法に収載されている C-P 及び W-P の吸光光度法について試験法の適用範囲確認のため単一試験室の妥当性確認を実施したところ、次の成果を得られた。

(1) W-P 分析において、吸光光度法の現在の活性炭による脱色時間では脱色が不十分な試料が確認された。そこで、今回の検討で最も着色の濃かった試料溶液について脱色の放置時間を 20 時間に延長した吸光光度法と、妥当性が確認されている ICP-OES 法(絶対検量線法, 横方向)の 2 方法の分析値で *t*-検定を実施したところ、有意差は認められなかった。このことから、活性炭による脱色時間の延長は有効と考えられ、放置時間が 0.5 時間で脱色が不十分な場合は 20 時間とすることとした。なお、C-P では放置時間 0 時間、0.5 時間の吸光光度法と ICP-OES 法の分析値に差はほとんどなく、着色の影響は少ないと考えられた。

(2) 真度の評価のため、試料 20 点について ICP-OES 法(絶対検量線法, 横方向)と吸光光度法の 2 方法で分析し、回帰式を作成した結果、いずれの成分においても肥料等試験法附属書 A に示された推奨基準を満たしていた。

(3) 併行精度及び中間精度の評価のため、C-P は試料 2 種類、W-P は試料 3 種類について 2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った。その結果、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の許容範囲内であったことから、吸光光度法は菌体りん酸肥料等の測定にも十分な精度を有していることが確認された。

(4) 肥料等試験法附属書 A に示されている手順に従って 7 点併行試験を行い、定量下限等を推定した結果、C-P の定量下限は 0.3 %程度、検出下限は 0.09 %程度、W-P の定量下限は 0.1 %程度、検出限界は 0.04 %程度と推定された。

(5) 肥料等試験法に収載されている ICP-OES 法の測定条件の追加として内標準法及び観測方向の検討を行った。検量線は、いずれの定量方法及び観測方向においても P 濃度 0~100 mg/L の範囲で決定係数 $r^2=0.999$ 以上であり、直線性を示した。また、真度の評価のため、試料 20 点について ICP-OES 法(絶対検量線法, 横方向)とそれぞれの測定条件の分析値の回帰式を作成したところ、いずれの成分においても真度の推奨

基準を概ね満たしていた。

以上、吸光光度法の菌体りん酸肥料等への適用について、C-Pの測定は現在の方法で測定可能であり、W-Pの測定についても着色が濃い試料溶液は活性炭による脱色の放置時間を20時間に延長することで適用可能であることが確認された。

文 献

- 1) 農林水産省令:肥料の品質の確保等に関する法律施行規則の一部を改正する省令 令和5年9月1日, 農林水産省令第43号
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2024)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho/shikenho_2024.pdf>
- 3) 松尾信吾: ICP 発光分光分析(ICP-OES)法によるく溶性主成分の測定, 肥料研究報告, **11**, 14~28 (2018)
- 4) 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の開発, 肥料研究報告, **12**, 28~51 (2019)
- 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(2024)附属書 A
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho/shikenho_2024_fuzokusho_A.pdf>
- 6) 山西正将, 橋本良美, 平田絵里香, 白井裕治: 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, 肥料研究報告, **15**, 1~23 (2022)
- 7) 青山恵介: ICP-OES を用いた肥料中の可溶性りん酸の分析法の開発, 肥料研究報告, **15**, 24~32 (2022)
- 8) 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 (2015)

Performance Evaluation of Analytical Methods for Citric Acid-soluble Phosphoric Acid and Water-soluble Phosphoric Acid for Fertilizers Such as Microbe Phosphate Fertilizers - Single Laboratory Validation -

TAMURA Chiaki¹, AOYAMA Keisuke²

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

(Now) Fukuoka Regional Center

² FAMIC, Kobe Regional Center

A single laboratory validation was conducted to evaluate performance of analysis method for Citric acid-soluble phosphoric acid (C-P) and Water-soluble phosphoric acid (W-P) in microbe phosphate fertilizer and sludge fertilizer by absorptiometric analysis in Testing Methods for Fertilizers.

It was confirmed that the current absorptiometric analysis can be used for microbe phosphate fertilizer and sludge fertilizer, but some fertilizers need to extend the leaving time of decolorization processing to 20 hours for the in analysis of W-P.

To evaluate the trueness, comparison of measurement values by ICP-OES (validated method in Testing Methods for Fertilizers) and absorptiometric analysis was conduct in C-P and W-P with 20 samples, and the regression line was calculated. The trueness evaluated from these result was within the standards of Testing Methods for Fertilizers Annex A. In addition, comparison of measurement values by ICP-OES with absolute calibration curve and internal standard was conducted with 20 samples, and it exhibited a strong correlation.

To evaluate the precision, we conduct duplicate test in C-P and W-P for 5 days and analyze by one-way analysis of variance. The repeatability relative standard deviation and intermediate relative standard deviation calculated from these result were also within the standards of Testing Methods for Fertilizers Annex A.

The lower limit of quantification and the lower limit of detection by absorptiometric analysis were estimated to be approximately 0.3 % and 0.09 %, respectively, for C-P, and approximately 0.1 % and 0.04 %, respectively, for W-P.

These results show that for fertilizers such as microbe phosphate fertilizers the current absorptiometric analysis can be used to analyze C-P, but some of samples needs extending the leaving time of decolorization processing time to 20 hours to analyze W-P.

Key words microbe phosphate fertilizers, citric acid-soluble phosphoric acid, water-soluble phosphoric acid, absorptiometric analysis, ICP Optical Emission Spectrometry, decolourization

(Research Report of Fertilizer, **18**, 10-27, 2025)