

肥料研究報告

第5号

2012年

Research Report of Fertilizer

Vol. 5
2012



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

FAMIC は肥料取締法に定められている肥料の登録及び仮登録の申請に関する業務，肥料事業者等への立入検査に関する業務，肥料公定規格の設定等に関する業務と，地力増進法に定められている土壌改良資材の立入検査業務等を行っております。

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

「肥料研究報告」は，日進月歩する分析機器を導入して迅速・効率的な分析法の開発と妥当性の検証，既存の方法の性能調査，肥料由来の有害成分の土壌中での挙動や作物への吸収，全国肥料品質保全協議会と共同での精度管理試験など，日頃の業務の中から見いだされた課題に検討を加え，得られた知見を取り纏めたものです。今般，平成 23 年度に得られた成果を中心に収録した第 5 号を発行いたしましたので，関係各位の業務の参考にしていただくと共に，お気付きの点がありましたらご指摘いただければ幸いです。

2012 年 12 月

独立行政法人農林水産消費安全技術センター
理事長 吉羽 雅昭

肥料研究報告 第5号

- 2012 -

目次

<試験法等の検討及び妥当性確認>

- 1 イオンクロマトグラフ法による硫酸アンモニア中の硫青酸化物及びスルファミン酸同時測定
..... 廣井利明, 白井裕治 1
- 2 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による石灰窒素中のメラミン及びその関連物質の同時測定
..... 坂東悦子, 廣井利明, 惠智正宏, 白井裕治 24
- 3 シリカゲル肥料及びシリカゲル肥料を含む肥料中の可溶性けい酸測定 -共同試験成績-
..... 清水 昭, 阿部 進, 伊藤 潤 31
- 4 焼成汚泥肥料中のクロム測定 -共同試験成績-
..... 顯谷久典, 木村康晴, 竹葉佳己 41
- 5 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による液状肥料中の6種農薬の同時測定 -共同試験成績-
..... 八木寿治, 山西正将, 白井裕治, 柴田政人 48

<調査・試験業務>

- 6 カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における汚泥肥料連用の影響(続報)
..... 舟津正人, 山西正将, 阿部文浩 60

<試験成績の信頼性確保関連>

- 7 2011年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析
..... 惠智正宏, 渡部絵里菜, 小西範英, 阿部 進, 福中理絵,
八木啓二, 白井裕治, 上沢正志 68
- 8 2011年度 肥料認証標準物質の開発 -高度化成肥料 FAMIC-A-10, 普通化成肥料 FAMIC-B-10 及び汚泥発酵肥料 FAMIC-C-09 の長期安定性試験-
..... 廣井利明, 秋元里乃, 八木寿治, 坂東悦子, 惠智正宏,
山西正将, 白井裕治, 柴田政人 90

<ノート>

9	メラミンを添加した土壌におけるコマツナに対する害の確認試験とメラミン等の吸収 阿部文浩, 八木寿治, 坂東悦子	101
10	高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による土壌中のメラミン及びその関連物質の同時測定 坂東悦子, 惠智正宏, 白井裕治	108
11	液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による作物中のメラミン及びシアヌル酸 の同時測定 八木寿治, 白井裕治	114
12	牛糞堆肥及びその原料中の腸管出血性大腸菌 O157 ー実態調査ー 秋元里乃, 中村志野, 阿部文浩, 大木 純	126
13	燃焼法による汚泥肥料及びたい肥中の有機炭素測定 ー燃焼法全窒素全炭素測定装置の適 用ー 秋元里乃	138
14	コマツナの生理障害 ー窒素ー 阿部文浩, 惠智正宏	147
15	窒素全量試験法の性能調査 ーケルダール法ー 加藤公栄, 千田正樹, 渡部絵里菜	156
16	りん酸試験法の性能調査 ーバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法ー 須永善行, 杉村靖, 吉田一郎, 小西範英	167
17	可溶性りん酸試験法の性能調査 ーバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法ー 清水 昭, 阿部 進	180
18	加里試験法の性能調査 ー原子吸光光度法ー 木村康晴, 顯谷久典	190
19	加里試験法の性能調査 ーテトラフェニルほう酸ナトリウム重量法ー 八木啓二, 矢野愛子, 添田英雄	201

<資料>

20	2011 年度輸入肥料等の品質調査結果について 独立行政法人農林水産省肥安全技術センター肥飼料安全検査部 調整指導官及び肥料管理課	212
----	---	-----

Research Report of Fertilizer Volume 5

- 2012 -

Index

<Development and Validation for Determination Methods>

- 1 Simultaneous Determination of Sulfamic Acid and Ammonium Thiocyanate in Ammonium Sulfate by Nonsuppressed Ion Chromatography
..... Toshiaki HIROI and Yuji SHIRAI 1
- 2 Validation of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Determination of Melamine and Its Related Substances in Calcium Cyanamid
..... Etsuko BANDO, Toshiaki HIROI, Masahiro ECHI and Yuji SHIRAI 24
- 3 Determination of Solubility Silicic Acid in Silica gel Fertilizer and Silica gel-including Fertilizer by Potassium Fluoride Method: A Collaborative Study
..... Akira SHIMIZU, Shin ABE and Jun ITO 31
- 4 Evaluation of Digest Method for Determination of Chromium in Calcined Sludge Fertilizer by Atomic Absorption Spectrometry: A Collaborative Study
..... Hisanori ARAYA, Yasuharu KIMURA and Yoshimi TAKEBA 41
- 5 Simultaneous Determination of Six Kind of Agricultural Chemicals in Fluid Fertilizer by Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS): A Collaborative Study
..... Toshiharu YAGI, Masayuki YAMANISHI, Yuji SHIRAI
and Masato SHIBATA 48

<Investigation and Research>

- 6 Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued report)
..... Masato FUNATSU, Masayuki YAMANISHI and Fumihiko ABE 60

<Assurance Practices for Reliable Analytical Data>

- 7 Result of Proficiency Testing for Determination of Major Components and Harmful Elements of Ground Fertilizers Conducted in Fiscal Year 2011
..... Masahiro ECHI, Erina WATANABE, Hidenori KONISHI, Shin ABE,
Rie FUKUNAKA, Keiji YAGI, Yuji SHIRAI and Masashi UWASAWA 68

8	Long-term Stability Examination of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-10), Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-10) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-09)	<p style="text-align: center;">..... Toshiaki HIROI, Satono AKIMOTO, Toshiharu YAGI, Etsuko BANDO, Masahiro ECHI, Masayuki YAMANISHI, Yuji SHIRAI and Masato SHIBATA</p>	90
<Note>			
9	Confirmatory Study of the Harm and Absorption of Melamine etc. for Komatsuna in the Soil added Melamine	<p style="text-align: center;">..... Fumihiko ABE, Toshiharu YAGI and Etsuko BANDO</p>	101
10	Validation of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Determination of Melamine and Its Related Substances in Soil	<p style="text-align: center;">..... Etsuko BANDO, Masahiro ECHI and Yuji SHIRAI</p>	108
11	Simultaneous Determination of Melamine and Cyanuric acid in Crops by Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)	<p style="text-align: center;">..... Toshiharu YAGI and Yuji SHIRAI</p>	115
12	Verotoxin-producing <i>Escherichia coli</i> O157 in Bovine Fecal Compost and It's Raw Material	<p style="text-align: center;">..... Satono AKIMOTO, Shino NAKAMURA, Fumihiko ABE and Jun OHKI</p>	126
13	Measurement of organic carbon in sludge fertilizer and compost by combustion method	<p style="text-align: center;">..... Satono AKIMOTO</p>	138
14	Physiological disorder of Komatsuna —Nitrogen—	<p style="text-align: center;">..... Fumihiko ABE and Masahiro ECHI</p>	147
15	Verification of Performance Characteristics of Testing Method for Total Nitrogen Content in Fertilizer by Kjeldahl method	<p style="text-align: center;">..... Kimie KATO, Masaki CHIDA and Erina WATANABE</p>	156
16	Verification of Performance Characteristics of Testing Methods for Phosphorus Content in Fertilizer by Ammonium Vanadomolybdate Absorption Photometry	<p style="text-align: center;">..... Yoshiyuki SUNAGA, Yasushi SUGIMURA, Ichiro YOSHIDA and Hidenori KONISHI</p>	167
17	Verification of Performance Characteristics of Testing Method for Citrate-Soluble Phosphorus Content by Ammonium Vanadomolybdate Absorption Photometry	<p style="text-align: center;">..... Akira SHIMIZU and Shin ABE</p>	180

18	Verification of Performance Characteristics of Testing Methods for Potassium Content in Fertilizer by Atomic Absorption Spectrometry Yasuharu KIMURA and Hisanori ARAYA	190
19	Verification of Performance Characteristics of Testing Methods for Potassium Content in Fertilizer by Gravimetric Sodium Tetrphenylborate analysis Keiji YAGI, Aiko YANO and Hideo SOETA	201
<Information>		
20	The report of the quality of fertilizer originating in imported by-product fertilizer in fiscal year 2011 IAI Food and Agricultural Materials Inspection Center Fertilizer and Feed Inspection Department Coordinator and Fertilizer Control Division	212

1 イオンクロマトグラフ法による硫酸アンモニア中の 硫青酸化物及びスルファミン酸同時測定

廣井利明¹, 白井裕治¹

キーワード スルファミン酸, アミド硫酸, 硫青酸化物, チオシアン酸アンモニウム, 肥料,
硫酸アンモニア, イオンクロマトグラフ

1. はじめに

スルファミン酸(別名, アミド硫酸(Fig. 1))は, 6-ナイロン原料である ϵ -アミノカプロラクタムの製造工程における回収品の硫酸アンモニア(肥料の公定規格¹⁾における名称. 学術用語では, 硫酸アンモニウム)中に含まれることがある. 硫青酸化物(測定成分としては, チオシアン酸アンモニウム. 以下, 「チオシアン酸」ともいう(Fig.1))は, 石炭ガスまたはコークス炉ガスから副生される硫酸アンモニアに, 石炭に由来する硫黄化合物として混入することがある. これらの有害成分は, 一定量以上の濃度では発芽障害などの植害があることから, 含有する可能性のある硫酸アンモニア等の肥料(窒素質肥料及び複合肥料のうち 15 種類)の公定規格において, それぞれ「スルファミン酸」及び「硫青酸化物」として, その含有を許される最大量(以下, 「含有許容値」という.)が設定されている²⁾.

スルファミン酸及びチオシアン酸の測定については, 公定法である肥料分析法³⁾にはそれぞれ, 亜硝酸ナトリウム法及び硫酸銅法が採用されており, 両方法とも外部指示薬による滴定操作において, 終点の判定に高度な修練が必要である^{4, 5)}. また, 肥料の種類によっては, 試料溶液の着色や共存物質の影響により, 終点の判定が困難となり精確な測定が行えないという問題がある.

公定規格において, スルファミン酸の含有許容値が設定されている肥料については, チオシアン酸も設定されていること, また, スルファミン酸は紫外外部吸収を持たないが, 電気伝導度検出器で測定を行うイオンクロマトグラフでの測定が可能であり, チオシアン酸は紫外外部吸収を持つが, 電気伝導度検出器での測定例の報告も数多くあるため, これらの 2 成分を同時に測定することで効率化が図られると考えられる. そこで, スルファミン酸及びチオシアン酸について, 電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフ法により, 迅速かつ精確に定量することを目的に, 測定条件の検討及び単一試験室での妥当性確認を行ったので, その結果を報告する.

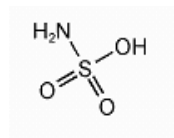
なお, 検討の当初は, スルファミン酸及びチオシアン酸の含有許容値が設定されている肥料(15 種類)に適用可能な測定方法について検討したが, 有機酸を多く含む肥料ではスルファミン酸定量の妨害となるという課題があったため, 平成 23 年度は, 対象を硫酸アンモニアのみとして検討を行った.

2. 材料および方法

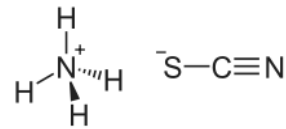
1) 供試試料

市販肥料の硫酸アンモニア 17 点を, それぞれ目開き 500 μm のスクリーンを通過するまで粉砕し分析用試料とし, 使用時までビニール袋に密封して常温保管した.

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

sulfamic acid H_3NSO_3

MW: 97.10 CAS No.: 5329-14-6

ammonium thiocyanate NH_4SCN

MW: 76.12 CAS No.: 1762-95-4

Fig.1 Chemical structures of sulfamic acid and ammonium thiocyanate

2) 試薬等の調製

- (1) アセトニトリル: HPLC 用試薬.
- (2) 1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液: イオンクロマトグラフィー用試薬.
- (3) 10.0 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液-アセトニトリル[22+3]: 1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液を水で希釈して調製した 10.0 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液 880 mL とアセトニトリル 120mL を混合した.
- (4) 硫酸: 有害重金属測定用試薬.
- (5) 水: 水道水を日本ミリポア製 Elix Advantage5及びMilliQ Academic A-10により精製したもの.
- (6) フタル酸: 純度 98 %以上の試薬
- (7) *p*-ヒドロキシ安息香酸: 純度 95 %以上の試薬
- (8) 1-オクタンスルホン酸ナトリウム: イオンペアクロマトグラフィー用試薬(純度 98 %以上の試薬)
- (9) 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム: イオンペアクロマトグラフィー用試薬(純度 98 %以上の試薬)
- (10) ほう酸: JIS K 8863 に規定する特級試薬
- (11) 溶離液(0.5 mmol/L フタル酸+4.0 mmol/L *p*-ヒドロキシ安息香酸+0.9 mmol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム+2.0 mmol/L 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム+100 mmol/L ほう酸):フタル酸 0.083 g, *p*-ヒドロキシ安息香酸 0.552 g, 1-オクタンスルホン酸ナトリウム 0.195 g, 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 0.376 g, ほう酸 6.183 g を全量フラスコ 1 L にはかりとり, 水約 500 mL を加え, 超音波発生器で超音波処理して溶かし, 標線まで水を加えた. 親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過した.
- (12) スルファミン酸標準液(1,000 mg/L): 容量分析用標準物質 アミド硫酸(HOSO_2NH_2 :シリカゲルデシケーター中で 48 時間乾燥したもの) 0.1 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg のけたまで測定した. 少量の水を加えて溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで水を加えた.
- (13) チオシアン酸アンモニウム標準液(1,000 mg/L): JIS K 8863 に規定する特級試薬 チオシアン酸アンモニウム(NH_4SCN :シリカゲルデシケーター中で 48 時間乾燥したもの) 0.1 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg のけたまで測定した. 少量の水を加えて溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで水を加えた.
- (14) 混合標準液(10 mg/L): 使用時に, (12), (13)の各標準液(1,000 mg/L)の 2.5 mL を全量フラスコ 250 mL にとり, 混合後, 標線まで水を加えた.
- (15) 検量線用混合標準液(0.3 mg/L~3 mg/L): 使用時に混合標準液(10 mg/L)の 3 mL~30 mL を全量フラスコ 100 mL に段階的にとり, 標線まで水を加えた.
- (16) その他の試薬は, 特級又は同等の品質の試薬を用いた.

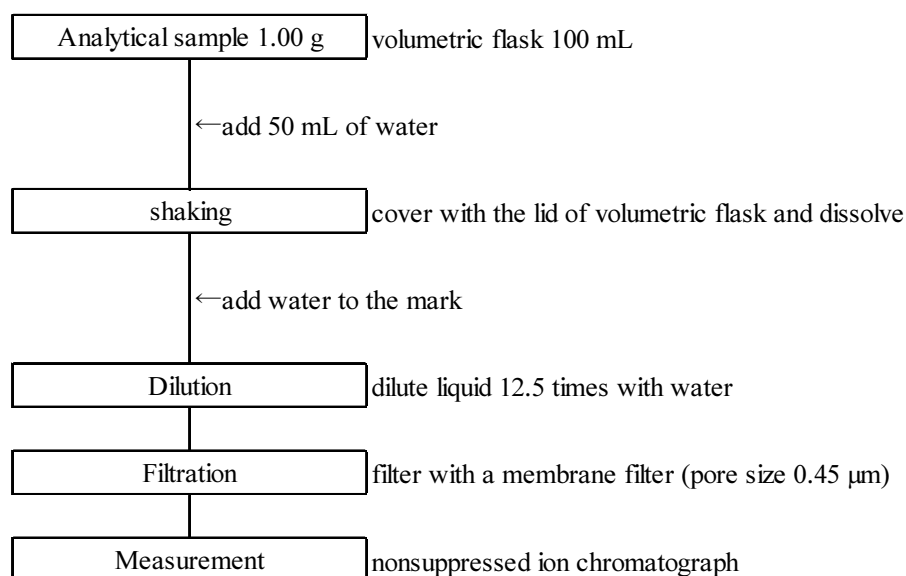
3) 器具及び装置

- (1) イオンクロマトグラフ:メトローム製 850 Professional IC
- (2) カラム:昭和電工製 Shodex IC NI-424(内径 4.6 mm,長さ 100 mm, 粒径 5 μ m, 充填剤 第4級アンモニウム基を結合した親水性メタクリレート系ゲル)
- (3) メンブレンフィルター:ADVANTEC 製 DISMIC-13HP(孔径 0.45 μ m)
- (4) 超音波発生器:ヤマト化学製 8510J-MT 高周波出力 250W

4) 試験操作

(1) 試料溶液の調製

分析試料 1.00 g を全量フラスコ 100 mL にはかりとり, 水約 50 mL を加え, 全量フラスコの蓋をして, 振り混ぜて溶かし, 標線まで水を加える. 溶解液の一定量を取り, 水で 12.5 倍希釈し, メンブレンフィルター(孔径 0.45 μ m) でろ過し, 試料溶液とした (Scheme 1).



Scheme 1 Analytical procedure for sulfamic acid and ammonium thiocyanate in ammonium sulfate

(2) イオンクロマトグラフ測定条件

- 検出器 : 電気伝導度検出器
 サプレッサ : なし
 カラム : Shodex IC NI-424 (昭和電工製 内径 4.6 mm, 長さ 100 mm, 粒径 5 μ m, 充填剤 第4級アンモニウム基を結合した親水性メタクリレート系ゲル)
 溶離液 : 0.5 mmol/L フタル酸 + 4.0 mmol/L *p*-ヒドロキシ安息香酸 + 0.9 mmol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム + 2.0 mmol/L 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム + 100 mmol/L ほう酸
 流量 : 1.0 mL/min
 注入量 : 20 μ L
 カラム槽温度 : 58 $^{\circ}$ C

(3) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、分析試料中のスルファミン酸、チオシアン酸(チオシアン酸アンモニウム)濃度を算出した。

3. 結果および考察

1) イオンクロマトグラフ測定条件の検討

イオンクロマトグラフにより肥料中のスルファミン酸及びチオシアン酸を測定するにあたり、肥料中に含まれる、測定の妨害となる様々な成分(無機陰イオンや有機酸イオン等)を分離し精度よく測定するためには、充填剤の基材やイオン交換基が異なるカラムの選定が重要である⁶⁾。そのため、Table 1 に示した 4 つのカラムを用いて最適な測定条件を検討した。

Table 1 Separation columns used in this study

Separation mode	Suppressor	Column	Size, long×i.d.	Resin	Particle size, μm	Function group
Ion-exchange	Suppressed	Shodex IC SI-52 4E	250 × 4.0 mm	PVA ^{a)}	5	QA ^{c)}
Ion-exclusion	Nonsuppressed	Shodex RSpak KC-811	300 × 8.0 mm	PVA ^{a)}	6	sulfo
Ion-exclusion	Nonsuppressed	TSKgel Super IC-A/C	150 × 6.0 mm	PM ^{b)}	4	carboxyl
Ion-exchange	Nonsuppressed	Shodex IC NI-424	100 × 4.6 mm	PM ^{b)}	5	QA ^{c)}

a)PVA: polyvinyl alcohol, b)PM: polymethacrylate, c)QA: quaternary ammonium

(1) イオン交換方式カラム(サプレッサ法)の検討

この方式は、陰イオン測定において現在最も広範に適用されている。塩基性溶離液(炭酸ナトリウム等)により陰イオン交換分離された陰イオンは、サプレッサにより対応する酸に変換され高電気伝導度化されるとともに、溶離液は炭酸や水のような低電気伝導度成分に変換されるため、検出器に到達する溶離液のバックグラウンド電気伝導度を下げることにより対象イオンの高感度検出ができる⁷⁾。まず、この方式(以下、「サプレッサ法」という。)のカラムにより検討を行った。

使用するイオンクロマトグラフのメーカーであるメトローム社のイオンクロマトグラフ測定アプリケーション⁸⁾を参考に、陰イオン分析用カラム Shodex IC SI-52 4E(昭和電工製 内径 4.0 mm,長さ 250 mm, 粒径 5 μm , 充填剤 第 4 級アンモニウム基を結合したポリビニルアルコール系多孔質粒子)及びケミカルサプレッサを用いた測定条件を検討した。3.6 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液の溶離液(溶離液 A)100 %の測定により、スルファミン酸のピーク検出後(測定開始から 15 分後)に、6.4 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液-アセトニトリル[7+3]の溶離液(溶離液 B)100 %の組成とするグラジエント分析により、スルファミン酸、チオシアン酸の混合標準液(10 mg/L)の測定を行ったところ、Fig. 2 のとおり良好な測定結果となった。

スルファミン酸は保持の弱い陰イオンであるため、3.6 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液で保持時間 8 分程度で溶出するが、保持の比較的強い陰イオンであるチオシアン酸は炭酸ナトリウム溶液の濃度を 6.4 mmol/L まで高くしても溶出は早まらないため⁹⁾、アセトニトリル 30 %を混合することで溶出を早め 40 分以内で測定する条件となっている。

しかし、この条件により肥料の水抽出溶液(分析試料 1 g を水 1 L に溶かし、メンブレンフィルター(孔径 0.45 μm)でろ過した溶液。以下、「水抽出溶液」という。)を測定したところ、有機物(特に、アミノ酸発酵廃液を原料とした副産複合肥料)を多く含む化成肥料において、Fig. 3 のとおりスルファミン酸のピークと重なる保持時間に有機酸と考えられる多くの妨害ピークが検出され、スルファミン酸の測定が不可能であった。スルファ

ミン酸の妨害ピークとして検出される物質について調べるため、スルファミン酸標準液に各種の試薬を添加して測定したところ、スルファミン酸ピークの直前及び直後に、それぞれプロピオン酸及びギ酸が検出されることが確認できた。

分離を改善するために、溶離液の濃度及び種類(炭酸ナトリウム, 炭酸水素ナトリウム, 水酸化ナトリウム), カラム槽温度の検討を行った結果から、最適と考えられる測定条件を Table 2 のとおり設定した。

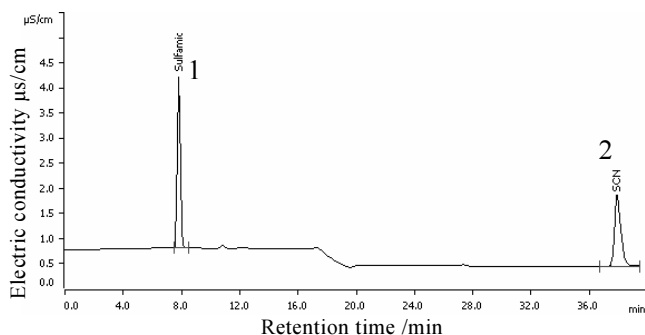


Fig. 2 Ion chromatogram of standard solution of sulfamic acid and thiocyanic acid
Peaks: 1=sulfamic acid (10 mg/L);
2=thiocyanic acid (10 mg/L)

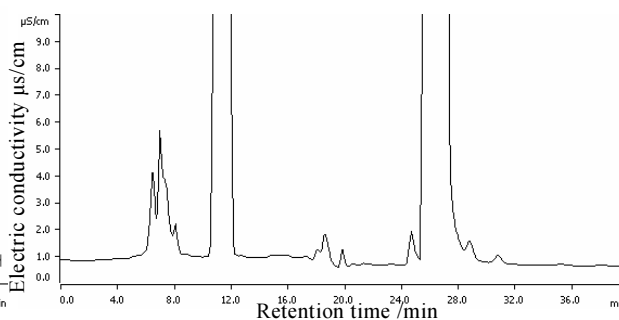


Fig. 3 Ion chromatogram of sample solution of compound fertilizer including organic matter

Table 2 Analytical conditions for suppressed ion chromatography

Detection	Conductivity
Suppressor	Chemical suppressor
Column	Shodex IC SI-52 4E
Mobile phase	A: 0.3 mmol/L sodium carbonate solution B: 10.0 mmol/L sodium carbonate solution – Acetonitrile [22 + 3] 0 min (100 v/v%A) → 25 min (100 v/v%A) → 29 min (100 v/v%B) → 82min (100 v/v%B) → 86min (100 v/v%A) → 90min (100 v/v%A)
Flow rate	0.8 mL/min
Injection volume	20 μL
Column temp.	40 °C
Scavenger	50 mmol/L H ₂ SO ₄
Cleaning fluid	H ₂ O

Fig. 3 で妨害ピークによりスルファミン酸の測定ができなかった有機入り化成肥料の水抽出溶液にスルファミン酸及びチオシアン酸各 5 mg/L 相当添加した試料溶液を Table 2 の測定条件によって測定した。クロマトグラムは Fig.4 のとおりであり、概ね他の妨害ピークから分離した状態でスルファミン酸及びチオシアン酸を測定時間 70 分程度で測定することができた (Fig. 4 左)。しかし、スルファミン酸、プロピオン酸及びギ酸の混合標準液で測定条件を検討した場合よりも、スルファミン酸とギ酸の分離が悪くなっていた (Fig. 4 右)。これは、他の共存イオンの影響によると考えられる。特に、ギ酸は多くの肥料から検出され、スルファミン酸と誤認識してしまうことや、今回測定した肥料よりも有機酸含有量の多い肥料では、ピークが重なり正確な測定ができなくなる可能性が高いと考えられる。

また、試料溶液調製の前処理での有機酸除去を検討するため、各種の固相抽出カートリッジによりスルファミン酸、プロピオン酸及びギ酸の混合標準液の精製を試み、標準液の pH を酸性、中性、アルカリ性に変化させて固相抽出処理を行ったが、プロピオン酸及びギ酸のみ、又はスルファミン酸のみを固相抽出できる条件を見つけることはできなかった。このため、他の分離方式のカラムによる検討を行うこととした。

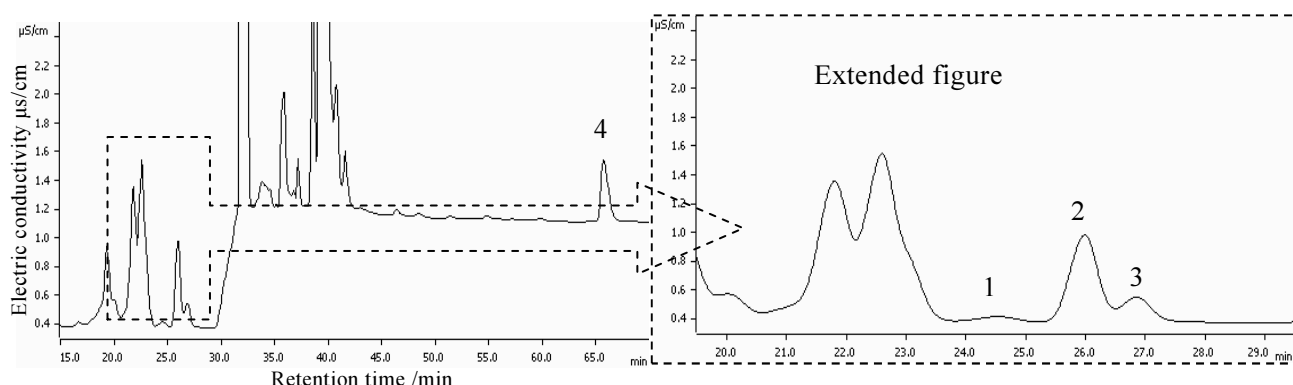


Fig. 4 Ion chromatograms of sample solution of compound fertilizer including organic matter which was spiked with sulfamic acid and thiocyanic acid

Peaks: 1=propionic acid; 2=sulfamic acid (5 mg/L); 3=formic acid; 4=thiocyanic acid (5 mg/L)

近年、粒状肥料原料の2種類以上を配合したバルクブレンド肥料用途に、粒径2~5 mm程度の大粒径を有する粗大硫酸アンモニア結晶の製造が求められており、その製造方法として、硫酸アンモニア溶液から晶析工程を経て粒状硫酸アンモニアを製造する際、硫酸アンモニア母液に媒晶剤としてスルファミン酸塩を肥料公定規格の含有許容値未満の濃度となるように添加して晶析する方法が開発されている^{10, 11)}。以下の検討では、多様なマトリックスを含む各種の肥料を一度に検討することは困難であると判断し、スルファミン酸の混入する可能性が最も高いと考えられる肥料である硫酸アンモニアを対象として検討を行うこととした。

しかし、硫酸アンモニアの中にもスルファミン酸測定を妨害する有機酸と思われる成分を含有するものが確認されたため、サプレッサ法ではない他の分離方式のカラムによる測定条件を検討した。

(2) イオン排除方式カラム(強酸性陽イオン交換樹脂カラム)の検討

イオン排除方式は、カラムのイオン交換基とそれと同符号の試料イオンとの間に生じるイオン排除および浸透の差を利用した分離方法である。本方式に関する報告例で最も多いのが、脂肪酸や酢酸などの脂肪族カルボン酸を対象とした分析例である。カルボン酸の分離に用いられる溶離液は、硫酸や硝酸などの強酸あるいはプロピオン酸や安息香酸などの弱酸などが一般的である。これは、カルボン酸の解離が、酸性の溶離液を用いることによって抑制されるため、イオン交換樹脂に浸透しやすくなるためである¹²⁾。

検討には、イオン排除クロマトグラフィ用カラム Shodex RSpak KC-811(昭和電工製 内径 8.0 mm,長さ 300 mm, 粒径 6 μ m, 充填剤 スルホン基を結合したポリビニルアルコール系多孔質粒子)を使用し、溶離液に様々な酸(りん酸, 過塩素酸, 硫酸, 硝酸, くえん酸, こはく酸)を使用し、カラム温度や溶離液流量を変えて、スルファミン酸及びチオシアン酸標準液の測定を行ったところ、どの測定条件でも、スルファミン酸とチオシアン酸のピークが重なり、分離して測定することはできなかった(Fig. 5)。これは、強酸性の無機陰イオンであるスルファミン酸とチオシアン酸のイオン排除分離は、強酸性陽イオン交換樹脂カラムを用いた場合、イオン交換基であるスルホン基の強い静電反発によって分離が困難なためと考えられる¹²⁾。このため、他の分離カラムによる測定条件を検討する必要があると考え、引き続き検討を行った。

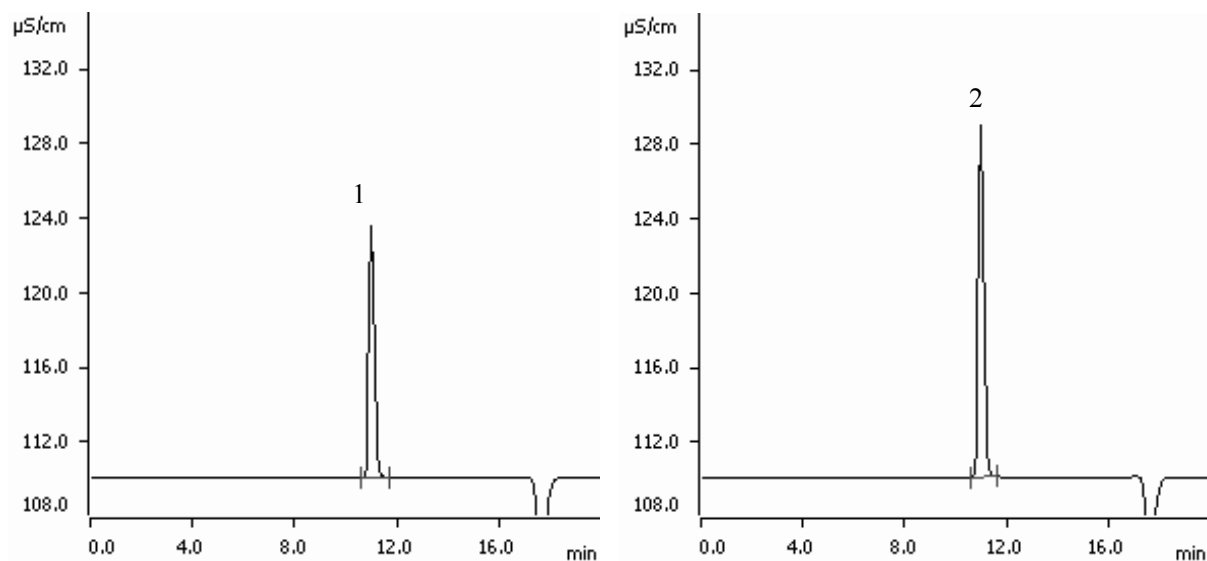


Fig. 5 Ion-exclusion chromatograms of standard solution of sulfamic acid and thiocyanic acid

Eluent: 2.5 mmol/L succinic acid, Column temp: 40 °C, Flow rate: 0.5 mL/min,

Peaks: 1=sulfamic acid (50 mg/L); 2=thiocyanic acid (50 mg/L)

(3) イオン排除/陽イオン交換方式カラム(弱酸性陽イオン交換樹脂カラム)の検討

本カラムは、上記(2)の強酸性陽イオン交換樹脂カラムと異なり、弱酸性陽イオン交換樹脂と弱酸の溶離液の組み合わせによって、酸性の硫酸イオン、塩化物イオン、硝酸イオン、ギ酸イオン等を分離することができるという報告があり、河川水等の水質モニタリング分析に適用されている¹³⁾。これを参考に、イオン排除/陽イオン交換型クロマトグラフィ用カラム TSKgel Super IC-A/C(東ソー製 内径 6.0 mm,長さ 150 mm, 粒径 4 μm, 充填剤 カルボキシル基を結合したポリメタクリレート系多孔質粒子)を使用し、溶離液に様々な酸(こはく酸、くえん酸、フタル酸、りん酸、過塩素酸、硫酸、スルホサリチル酸)を使用してスルファミン酸及びチオシアン酸標準液の測定を行った。その結果、Fig.6 のとおり、溶離液をくえん酸 20 mmol/L とした場合に、スルファミン酸とチオシアン酸を分離して測定することができた(Fig.6(A), (B))が、スルファミン酸のピーク付近(保持時間 3.6 min)に他の陰イオン(硫酸、塩化物、硝酸等)が溶出し(Fig.6(C))、更に、硫酸含有量の多い硫酸アンモニア水抽出溶液を測定した場合には、硫酸とその直後に溶出するスルファミン酸のピークが重なり、スルファミン酸の測定が不可能であった。本カラムは、酸性溶離液においてカラムの弱酸性陽イオン交換樹脂中のカルボキシル基の解離がかなり抑制されるため、イオン排除作用に関する樹脂相中の水素イオン濃度は減少し、イオン排除作用に基づいて強酸や弱酸の陰イオンが相互分離できる¹⁴⁾。しかし、イオン交換方式カラムに比べて陰イオンの分離域が狭いため、肥料のように陰イオンのマトリックスの多い試料の測定は困難であると考えられる。このため、他の分離カラムによる測定条件を検討する必要があると考え、更に引き続き検討を行った。

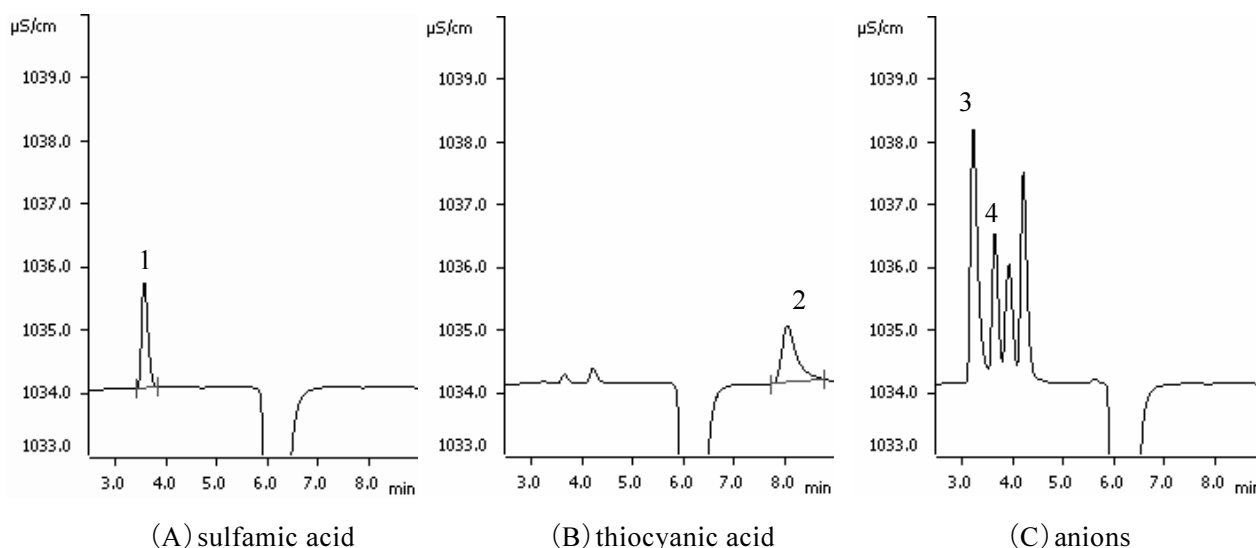


Fig. 6 Ion-exclusion/cation-exchange chromatograms of standard solution of sulfamic acid, thiocyanic acid and anions

Eluent: 20 mmol/L citric acid, Column temp: 35 °C, Flow rate: 0.6 mL/min,

Peaks: 1=sulfamic acid (5 mg/L); 2=thiocyanic acid (5 mg/L); 3=sulfuric acid (10 mg/L);

4=hydrochloric acid (4 mg/L))

(4) イオン交換方式カラム(ノンサプレッサ法)の検討

本方式は、上記(1)のサプレッサ法に類似しているが、サプレッサを使用せず、低交換容量のイオン交換分離カラムと低導電率の溶離液を用いて試料溶液中のイオンをイオン交換分離した後に導電率検出する方法を基本としている(以下、「ノンサプレッサ法」という.)。サプレッサ法に比べて溶離液のバックグラウンド導電率の増大によるノイズの増大があるものの、装置が簡便なことや一定の条件を満たす溶離液を使用する限り、pHや溶離イオンについての制限が緩いので、より多彩な測定条件を構築できるという利点もある^{7, 15)}。また、サプレッサ法では、使用する溶離液が塩基性のものに限定されてしまうため、スルファミン酸と有機酸の分離ができなかったが、ノンサプレッサ法では酸性溶離液を使用することができるので、有機酸の解離が抑制され、スルファミン酸との分離が調節可能となることが考えられる。

検討に用いたカラムは、陰イオン分析用カラム Shodex IC NI-424(昭和電工製 内径 4.6 mm,長さ 100 mm, 粒径 5 μ m, 充填剤 第4級アンモニウム基を結合した親水性メタクリレート系ゲル)である。

(4.1) 溶離液の最適化

① 一般的な溶離液での検討

既存の一般的な溶離液(8 mmol/L *p*-ヒドロキシ安息香酸+2.8 mmol/L Bis-Tris+2 mmol/L フェニルボロン酸+5 μ mol/L CyDTA)を使用し、スルファミン酸及びチオシアン酸の標準液に、フッ素、塩素、硝酸、硫酸、過塩素酸イオンを加えた溶液を測定したところ、Fig. 7のとおり、保持時間1~2分程度でシステムピークが検出され、その後、フッ素、スルファミン酸、塩素、硝酸、硫酸、チオシアン酸、過塩素酸の順に溶出した。

その他、文献やカラムメーカー測定アプリケーションで使用されている溶離液でスルファミン酸及びチオシアン酸の標準液を測定した結果を Table 3 に示した。溶離液の種類によっても異なるが、溶離液 pH を約 4 以下とするとシステムピークから分離しスルファミン酸の測定は可能であるが、チオシアン酸はカラムに強く保

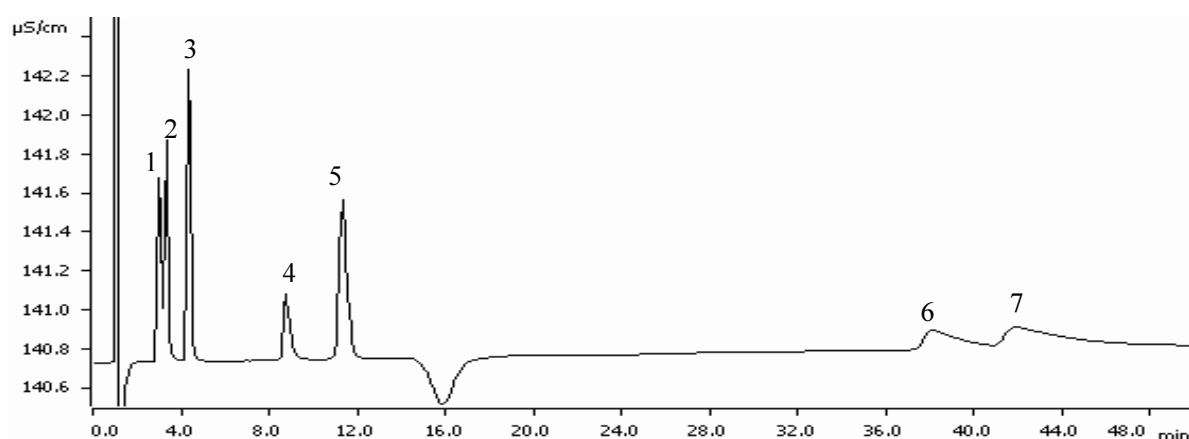


Fig. 7 Ion chromatogram of standard solution of anions using the eluent of maker recommendation
 Peaks: 1=hydrofluoric acid (10 mg/L); 2=sulfamic acid (20 mg/L); 3=hydrochloric acid (10 mg/L); 4=nitric acid (10 mg/L); 5=sulfuric acid (20 mg/L); 6=thiocyanic acid (20 mg/L); 7=perchloric acid (50 mg/L)

持され溶出までに 60 分以上を要する場合や、ピークが検出されなくなる場合もあった。溶離液 pH を上げるほどチオシアン酸の保持時間が短縮され、感度も向上するが、逆にスルファミン酸の保持時間が極端に短くなり、2 分以内に溶出してシステムピークと重複し測定不可能となった。また、硫酸アンモニア中のスルファミン酸及びチオシアン酸の含有許容値から算出した必要な測定用試料溶液の定量下限は 0.5 mg/L 未満であるため、標準液 50 mg/L を測定した際のピーク高さは 1.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上は必要と考えられる。スルファミン酸については、pH 約 4 未満の溶離液を使用することでその感度を得ることができたが、チオシアン酸は pH を 6 まで上げてても十分な感度は得られなかった。

Table 3 Retention time and peak hight of sulfamic acid and thiocyanic acid by different eluents and pH

Eluent (mmol/L)	Eluent pH ^{b)}	Sulfamic acid ^{a)}		Thiocyanic acid ^{a)}	
		Retention time (min)	Peak hight ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Retention time (min)	Peak hight ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Phthalic acid (2.5)	2.9	5.7	10.070	—	—
Phthalic acid (2.5)	4.7	— ^{c)}	—	15.4	0.348
Phthalic acid (2.5)	6.0	—	—	9.5	0.473
Phthalic acid (2.5)+BTC ^{c)} (0.005)	6.0	—	—	10.2	0.537
4-hydroxybenzoic acid (8.0)	3.7	6.9	1.691	—	—
4-hydroxybenzoic acid (8.0) + others ^{d)}	4.3	3.0	1.540	37.8	0.220
Succinic acid (2.5)	3.4	26.0	2.050	—	—
Succinic acid (5.0)	4.7	—	—	48.5	0.075
Citric acid (2.5)	3.0	14.6	3.160	—	—
Citric acid (2.5)	3.7	5.4	0.576	—	—
Citric acid (2.5)	4.7	—	—	11.1	0.368
Citric acid (2.5)	6.0	—	—	7.6	0.661
Tartaric acid (1.0)	3.2	14.1	3.330	—	—
Tartaric acid (1.0)	6.0	—	—	22.6	0.222
5-sulfosalicylic acid (1.0)	2.9	2.3	10.180	26.1	0.170
Sodium 1-octanesulfonate (0.9)+boric acid (20.0)	5.3	—	—	8.1	0.691

a) Concentration: 50 mg/L, Column temp.: 40 °C, Flow rate: 1.0 mL/min

b) pH was prepared by tris(hydroxymethyl)aminomethane or Bis-tris.

c) 1,3,5-Benzenetricarboxylic Acid

d) 8 mmol/L 4-hydroxybenzoic acid + 2.8 mmol/L Bis-Tris + 2 mmol/L Phenylboronic Acid + 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CyDTA

e) —; A measurement failure by duplication in a system peak, the shortage of sensitivity or elution took 60 minutes or more.

ノンサプレッサ法で一般的に環境測定分野等で使用されている、保持の弱いフッ素等を含めた陰イオンの同時分析を行う溶離液条件で測定した場合 (Fig. 7), スルファミン酸はシャープなピークとなり必要な感度を得られるが、それに比べて、チオシアン酸は疎水性を持つため、カラムのポリマー基材の陰イオン交換樹脂との疎水的相互作用によりピークがブロードとなり、高感度測定できないことが知られている¹⁶⁾。このように、スルファミン酸とチオシアン酸はイオン交換カラムにおける溶出特性が大きく異なるため、それぞれ個別の測定方法について報告がある。スルファミン酸単独の測定法としては、溶離液をくえん酸 2.5 mmol/L (pH 約 3) とし、スルファミン酸を溶出させた後に、5 mL のくえん酸 2.5 mmol/L (pH 6.0) を試料溶液として注入することで、肥料中の保持の強い残留イオン (硝酸、硫酸等) を早く溶出させ、連続分析での次の測定への影響を防ぎ、60 分程度で測定する方法⁵⁾が報告されている。チオシアン酸については、保持の強い疎水性を持つ硫黄化合物の同時分析法として、フタル酸に 1, 3, 5-ベンゼントリカルボン酸 (BTC) 等を添加した溶離液を使用する高感度測定法が報告されている⁹⁾。しかし、これらの方法では、スルファミン酸とチオシアン酸を同時に測定することは不可能であり、他の文献でも同時測定についての報告は確認できなかったため、両イオンの溶出時間のバランスが良好であり、かつ、必要な感度を得られるような溶離液条件を検討した。

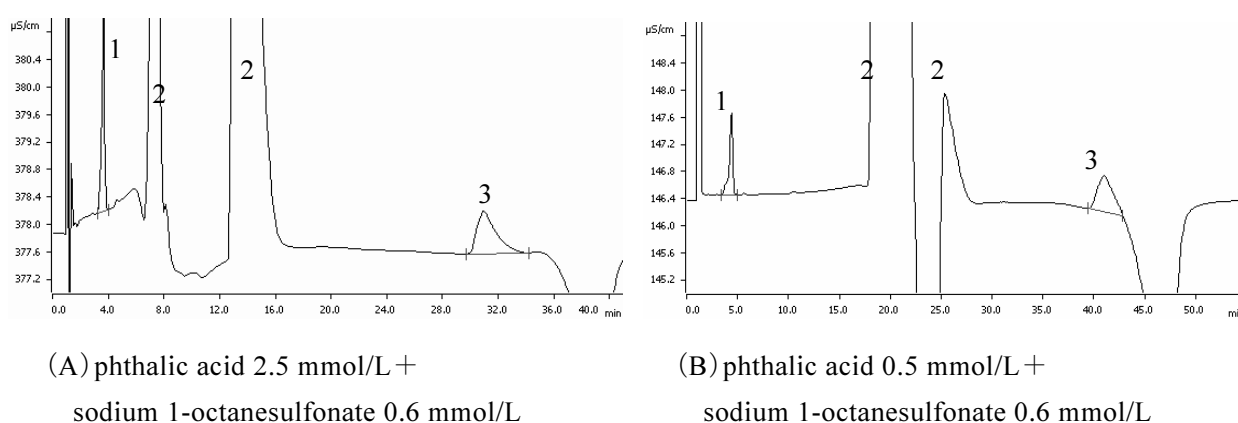
② 混合溶離液 A (フタル酸 + オクタンスルホン酸) での検討

上記 Table 3 で使用した溶離液を混合することでどのような溶出挙動や感度を示すか検討した。フタル酸、くえん酸、こはく酸等に 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (以下、「オクタンスルホン酸」という。) を混合した溶離液でスルファミン酸及びチオシアン酸の標準液を測定した結果を Table 4 に示した。オクタンスルホン酸を混合することにより、スルファミン酸をシステムピークよりも後に溶出させ、併せてチオシアン酸をより高感度に測定することができた。オクタンスルホン酸等のイオン対試薬は、主に逆相クロマトグラフィーにおいて保持の弱いイオンを測定する場合に、試料イオンと対イオンとの疎水性の複合分子を形成させることで、固定相に保持され良い分離を得ることを目的に使用されている¹⁷⁾。本カラムの場合は、これと逆の原理により、チオシアン酸の疎水性が低下し、固定相への保持が弱くなったことが感度向上の一因として考えられる。オクタンスルホン酸の混合濃度を高くすると、スルファミン酸及びチオシアン酸の保持時間が短縮され、ピーク高さは増加した。しかし、Table 3 の各溶離液を用いて、硫酸アンモニア水抽出溶液にスルファミン酸及びチオシアン酸を添加した試料溶液を測定したところ、フタル酸にオクタンスルホン酸を混合した溶離液の場合のみ、硫酸とチオシアン酸のピークを十分に分離でき、Table 3 中のその他の有機酸溶離液では、両ピークが重複しチオシアン酸の測定は不可能であった。一方、フタル酸にオクタンスルホン酸を混合した溶離液での測定では、Fig. 8(A) のとおり、フタル酸濃度を 2.5 mmol/L と高くすると、スルファミン酸ピーク前後のベースラインが右肩上がりとなる現象が起り、フタル酸濃度を 0.5 mmol/L まで低くすると、ベースラインの上昇は抑制された (Fig. 8(B))。しかし、フタル酸濃度を 0.5 mmol/L と低くすると、スルファミン酸ピークがブロードとなるとともに、チオシアン酸とその直後のシステムピークが近接することが分かった (Fig. 8(B))。このため、引き続き検討を行った。

Table 4 Retention time and peak height of sulfamic acid and thiocyanic acid by different mixed eluents

Eluent (mmol/L)	Mixed concentration of sodium 1- octanesulfonate (mmol/L)	Sulfamic acid ^{a)}		Thiocyanic acid ^{a)}	
		Retention time (min)	Peak height ($\mu\text{S/cm}$)	Retention time (min)	Peak height ($\mu\text{S/cm}$)
Phthalic acid (2.5)	0.4	4.2	9.442	36.4	1.011
Phthalic acid (2.5)	0.6	3.7	9.982	30.3	1.505
Phthalic acid (2.0)	0.4	4.4	8.179	38.2	0.988
Phthalic acid (1.5)	0.5	4.4	7.890	37.5	1.087
Phthalic acid (1.0)	0.7	4.0	6.815	33.6	1.847
Phthalic acid (0.5)	0.6	4.6	4.772	39.4	1.278
4-hydroxybenzoic acid (8.0)	0.4	5.9	4.580	52.6	1.406
4-hydroxybenzoic acid (8.0)	0.6	4.8	4.999	36.1	1.601
Succinic acid (2.5)	0.4	6.7	3.550	43.4	0.880
Citric acid (2.5)	0.4	6.0	5.362	38.5	0.660
Tartaric acid (1.0)	0.4	5.9	5.888	42.9	0.544

a) Concentration: 50 mg/L, Column temp.: 40 °C, Flow rate: 1.0 mL/min



(A) phthalic acid 2.5 mmol/L +
sodium 1-octanesulfonate 0.6 mmol/L

(B) phthalic acid 0.5 mmol/L +
sodium 1-octanesulfonate 0.6 mmol/L

Fig. 8 Ion chromatograms of ammonium sulfate solution spiked with sulfamic acid and thiocyanic acid using a mixture of phthalic acid and sodium 1-octanesulfonate as eluent

Column temp.: 40 °C, Flow rate: 1.0 mL/min

Peaks: 1=sulfamic acid (20 mg/L); 2=sulfuric acid; 3=thiocyanic acid (20 mg/L)

③ 混合溶離液 B (フタル酸 + オクタンスルホン酸 + ヘキサンスルホン酸) での検討

次に、②で検討した混合溶離液 (フタル酸 + オクタンスルホン酸) に、オクタンスルホン酸と同様に逆相クロマトグラフィーなどでイオン対試薬として使用される 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム (以下、「ヘキサンスルホン酸」という。) ¹⁷⁾ を混合したところ、システムピークの溶出時間を変えることができ、Fig. 9 (A) のとおり、チオシアン酸の妨害とならない位置に溶出させることができた。また、スルファミン酸のピークもよりシャープなものとなった。フタル酸濃度を 0.5 mmol/L に固定し、オクタンスルホン酸とヘキサンスルホン酸の混合濃度を変えて、スルファミン酸及びチオシアン酸の標準液を測定し、両イオンの感度、システムピークの溶出位置及びベースラインの安定性を確認した。オクタンスルホン酸の混合濃度を高くするとスルファミン酸及びチオシアン酸の感度は良くなったが 0.9 mmol/L を超えると、スルファミン酸の感度が悪くなった。ヘキサンスルホン酸は

混合濃度を高くすると、チオシアン酸の感度は良くなるが、スルファミン酸の感度が悪くなり、また 2.0 mmol/L を超えると、ベースラインのノイズが大きくなった。以上のことから、「フタル酸 0.5 mmol/L+オクタンスルホン酸 0.9 mmol/L+ヘキサンスルホン酸 2.0 mmol/L」とした場合が、Fig. 9(A)のとおり、最もスルファミン酸及びチオシアン酸の感度のバランスが良く、システムピークとの分離も良好であることが分かった。しかし、この条件の溶離液で硫酸アンモニア水抽出溶液に必要な定量下限程度のスルファミン酸及びチオシアン酸を添加して測定すると、Fig.9(B)のとおり、スルファミン酸ピークがブロードとなり妨害ピークと近接し、更に、チオシアン酸測定のベースライン安定性が悪く高感度測定ができないことが分かった。このため、引き続き検討を行った。

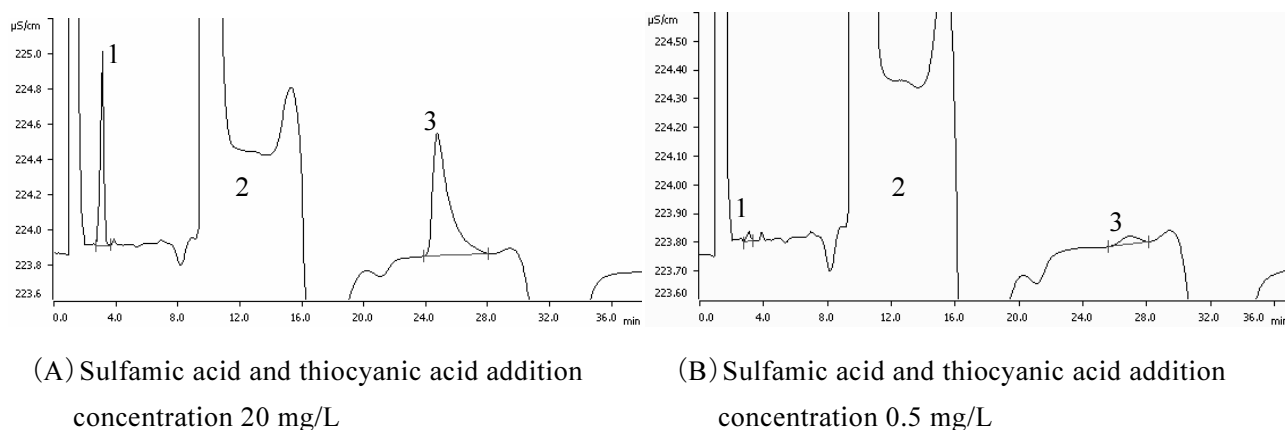


Fig. 9 Ion chromatograms of ammonium sulfate solution spiked with sulfamic acid and thiocyanic acid using a mixture of 0.5 mmol/L phthalic acid, 0.9 mmol/L sodium 1-octanesulfonate and 2.0 mmol/L sodium 1-hexanesulfonate as eluent
Column temp.: 45 °C, Flow rate: 1.0 mL/min
Peaks: 1=sulfamic acid (20 mg/L); 2=sulfuric acid; 3=thiocyanic acid (20 mg/L)

④ 混合溶離液 C(フタル酸+オクタンスルホン酸+ヘキサンスルホン酸+p-ヒドロキシル安息香酸)での検討

上記③の状況のうち、スルファミン酸ピークのブロード化を改善するためには、溶離液をより酸性にする必要があると考えられるが、フタル酸濃度を高くすることはスルファミン酸付近のベースラインの上昇を招くため不可能である。また、チオシアン酸測定のベースラインを安定化させるためには、前後に発生するシステムピークの間隔を広げる必要がある。それらを改善するために、ノンサプレッサ法においてフタル酸とともに一般的に使用される p-ヒドロキシル安息香酸、こはく酸又はくえん酸等の混合を検討したところ、p-ヒドロキシル安息香酸を 4.0 mmol/L 以上の濃度で混合した場合に、スルファミン酸と妨害ピークの分離を改善するとともに、ベースラインを安定化させ、より低濃度まで測定することができた。そこで、p-ヒドロキシル安息香酸の混合濃度を検討するため、4, 5, 6 mmol/L と変えて硫酸アンモニア水抽出溶液にスルファミン酸及びチオシアン酸 2.5 mg/L 添加した溶液を測定し、ピーク高さを比較した結果を、Table 5 に示した。また、混合濃度 4 mmol/L として測定したクロマトグラフを Fig. 10 に示した。

p-ヒドロキシル安息香酸の混合濃度を上げるとスルファミン酸のピークは高くなり、チオシアン酸は低くなる傾向があった。スルファミン酸に比べて、チオシアン酸のピークは常によりブロードとなっており、必要な定量下限を得るためにチオシアン酸の感度を極力上げる必要があると考えられたため、p-ヒドロキシル安息香酸

の混合濃度は 4.0 mmol/L とすることとした。

Table 5 Effect of concentration of 4-hydroxybenzoic acid in eluent containing 0.5 mmol/L phthalic acid, 0.9 mmol/L sodium 1-octanesulfonate and 2.0 mmol/L sodium 1-hexanesulfonate on the peak height of sulfamic acid and thiocyanic acid

Eluent (mmol/L)	Mixed concentration of 4-hydroxybenzoic acid (mmol/L)	Sulfamic acid ^{a)}	Thiocyanic acid ^{a)}
		Peak height ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Peak height ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Phthalic acid(0.5) + Sodium 1-octanesulfonate (0.9) + Sodium 1-hexanesulfonate (2.0)	4	0.167	0.093
	5	0.178	0.089
	6	0.183	0.086

a) Concentration: 2.5 mg/L, Column temp.: 58 °C, Flow rate: 1.0 mL/min

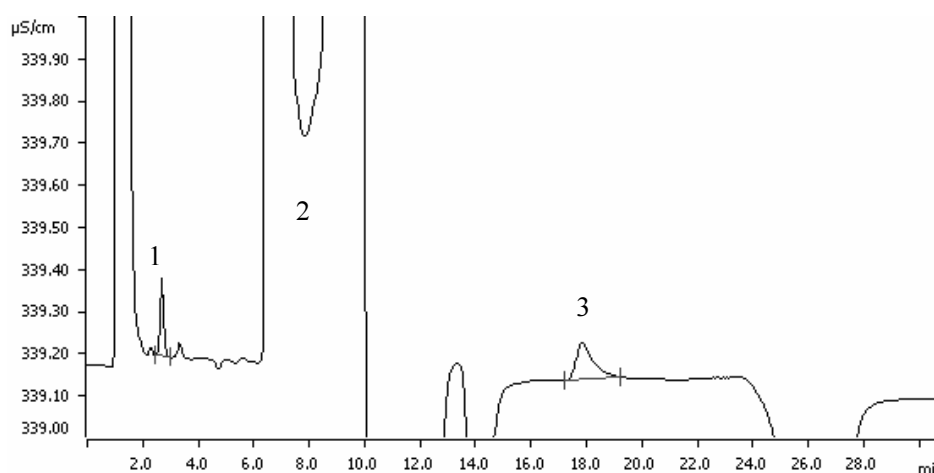


Fig. 10 Ion chromatogram of ammonium sulfate solution spiked with sulfamic acid and thiocyanic acid using a mixture of 0.5 mmol/L phthalic acid, 4.0 mmol/L 4-hydroxybenzoic acid, 0.9 mmol/L sodium 1-octanesulfonate and 2.0 mmol/L sodium 1-hexanesulfonate as eluent
Column temp.: 58 °C, Flow rate: 1.0 mL/min
Peaks: 1=sulfamic acid (2.5 mg/L); 2=sulfuric acid; 3=thiocyanic acid (2.5 mg/L)

以上の結果から、溶離液を「フタル酸 0.5 mmol/L + *p*-ヒドロキシ安息香酸 4.0 mmol/L + オクタンスルホン酸 0.9 mmol/L + ヘキサンスルホン酸 2.0 mmol/L」として測定した場合に、定量の妨げとなる妨害ピークの有無について確認したところ、Fig. 11 のとおり、くえん酸がスルファミン酸とほぼ同じ保持時間で溶出しピークが重なることが分かった。くえん酸は、スルファミン酸と同様に粒状の硫酸アンモニアを製造する工程で媒晶剤として使用する技術が開発されており¹⁸⁾、くえん酸を含有する硫酸アンモニアを測定した場合、スルファミン酸と誤認識する可能性がある。このため、スルファミン酸とくえん酸の分離が可能な溶離液条件について、引き続き検討した。

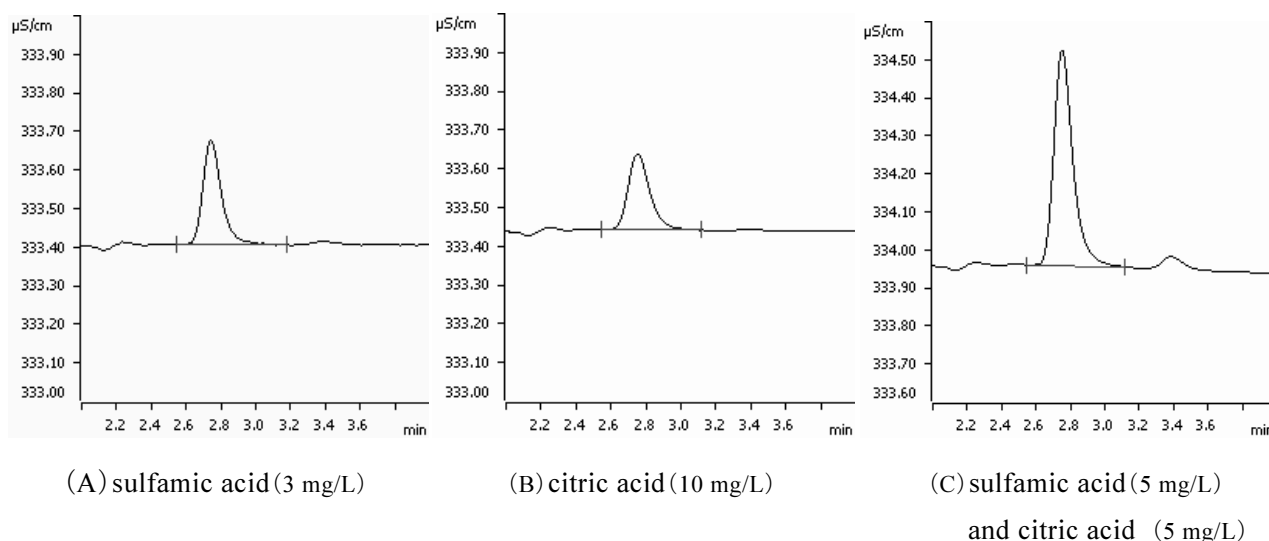


Fig. 11 Ion chromatograms of standard solution of sulfamic acid or citric acid using a mixture of 0.5 mmol/L phthalic acid, 4.0 mmol/L 4-hydroxybenzoic acid, 0.9 mmol/L sodium 1-octanesulfonate and 2.0 mmol/L sodium 1-hexanesulfonate as eluent
Column temp.: 58 °C, Flow rate: 1.0 mL/min

⑤ 混合溶離液 D (フタル酸 + オクタンスルホン酸 + ヘキサンスルホン酸 + *p*-ヒドロキシ安息香酸 + ほう酸) での検討

ノンプレッサ法による水質分析で課題とされていたフッ化物イオンとリン酸イオンの分離を改善するために、水溶液中でフッ化物イオンと反応して疎水性の高いホウフッ化物イオン (BF_4^-) を形成するほう酸 (100 mmol/L 程度) を溶離液に混合し、フッ化物イオンに由来するピークの溶出位置を選択的に遅らせる方法が開発されている¹⁹⁾。そこで、このほう酸の混合がスルファミン酸及びくえん酸ピークの分離にどのように影響するかを検討した。ほう酸混合濃度を 50, 100, 150 mmol/L と変えて硫酸アンモニア水抽出溶液にスルファミン酸及びくえん酸各 5 mg/L を添加した溶液を測定したクロマトグラムを、Fig. 12 (スルファミン酸ピークの拡大図) に示した。

スルファミン酸は、ほう酸混合濃度を高くするとその保持時間はほぼ変わらないが、くえん酸の保持時間が遅くなり、両ピークを分離することができた。ほう酸濃度を高くするほど、スルファミン酸とくえん酸の分離は良くなるが、スルファミン酸の直前に溶出するフッ素との分離が悪くなる可能性が考えられる。硫酸アンモニア中にはフッ素は多量には含まれないため、あまり問題にはならないと考えられるが、念のため、くえん酸及びフッ素との分離のバランスが最も良くなるよう、ほう酸の混合濃度は 100 mmol/L とした。チオシアン酸は、検討したほう酸混合濃度の範囲においては、妨害ピークとの近接等の影響はみられなかった。

以上の結果から、溶離液を「フタル酸 0.5 mmol/L + *p*-ヒドロキシ安息香酸 4.0 mmol/L + オクタンスルホン酸 0.9 mmol/L + ヘキサンスルホン酸 2.0 mmol/L + ほう酸 100 mmol/L」とすることとし、以下の検討を行った。

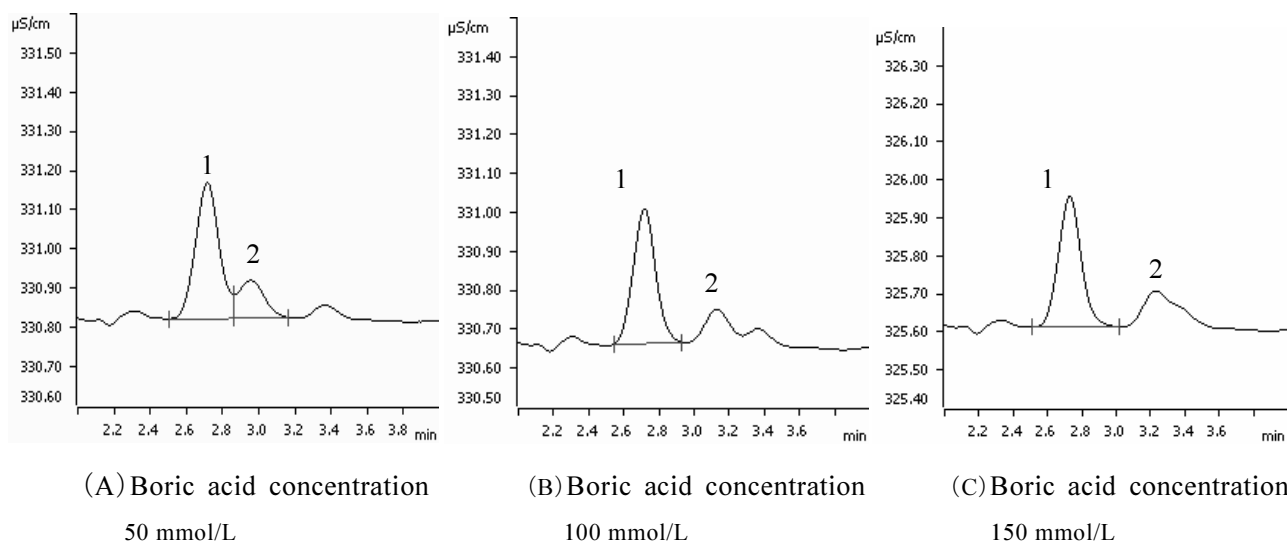


Fig. 12 Ion chromatograms of ammonium sulfate solution spiked with sulfamic acid and citric acid using the eluent which mixed different boric acid concentration

Column temp.: 58 °C, Flow rate: 1.0 mL/min

Peaks: 1=sulfamic acid (5 mg/L); 2=citric acid (5 mg/L)

(4.2) 最適カラム槽温度

カラム槽温度の違いによる、測定感度や保持時間の変化を確認するため、カラム槽温度を 50 °C, 54 °C, 58 °C と変えて硫酸アンモニア水抽出溶液にスルファミン酸及びチオシアン酸 2.5 mg/L を添加した溶液を測定し、ピーク高さを比較した結果を、Table 6 に示した。温度を 50 °C 未満とするとチオシアン酸ピークに対してシステムピークが妨害となること、カラムの使用上限温度が 60 °C であることからカラムの耐久性を考慮し、検討する温度範囲を 50 °C ~ 58 °C とした。

カラム槽温度を上げるとスルファミン酸のピーク高さは低くなり、チオシアン酸は高くなる傾向があった。カラム槽温度 50 °C ~ 58 °C の範囲では、温度の違いにより、測定対象成分のピークにシステムピーク等の妨害となるピークが影響することはなかった。スルファミン酸に比べて、チオシアン酸のピークは常にブロードとなっており、必要な定量下限を得るためにチオシアン酸の感度を極力上げる必要があると考えられたため、カラム槽温度は 58 °C とすることとした。

Table 6 Effect of column temp on the peak hight of sulfamic acid and thiocyanic acid

Column temp (°C)	Sulfamic acid ^{a)}	Thiocyanic acid ^{a)}
	Peak hight (μS/cm)	Peak hight (μS/cm)
50	0.170	0.083
54	0.168	0.087
58	0.167	0.093

a) Concentration: 2.5 mg/L, Flow rate: 1.0 mL/min

(4.3) 溶離液の最適流量

溶離液の流量の違いによる、測定感度や保持時間の変化を確認するため、流量を 0.8 mL/min, 1.0

mL/min, 1.2 mL/min と変えて硫酸アンモニア水抽出溶液にスルファミン酸及びチオシアン酸 2.5 mg/L を添加した溶液を測定したクロマトグラムを, Fig. 13 (スルファミン酸ピークの拡大図) に示した. カラムの標準的な流量が 1.0 mL/min であり, 使用上限が 1.2 mL/min であるため, 検討する流量の範囲を 0.8 mL/min~1.2 mL/min とした.

スルファミン酸は, 流量を 1.0 mL/min とした場合が, 最も妨害ピークから分離して測定することができた. チオシアン酸は, 設定した範囲の流量においては, 妨害ピークとの近接等の影響はみられなかった. このため, 溶離液の流量は 1.0 mL/min とすることとした.

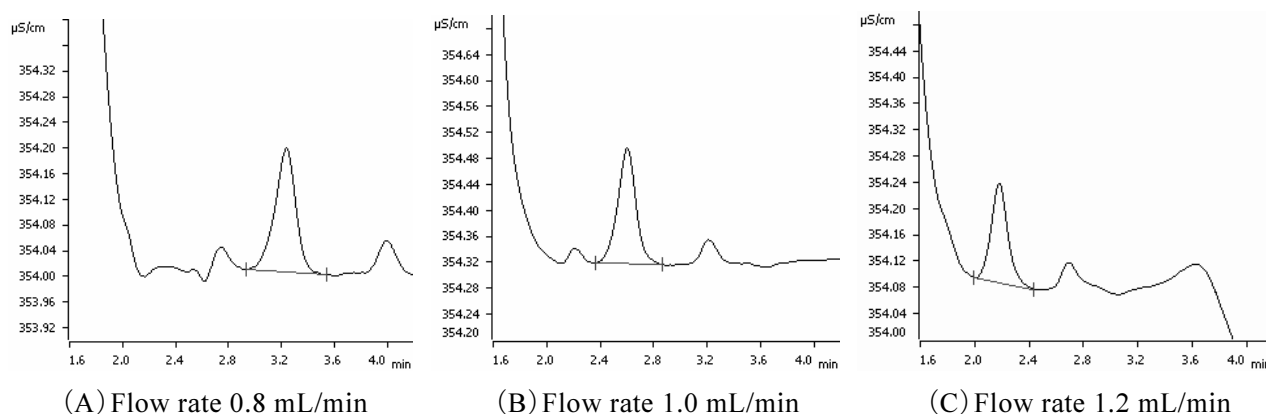


Fig. 13 Effect of flow rate on the separation of sulfamic acid

以上の結果から, イオンクロマトグラムの測定条件は, 2.4).(2)の条件とし, 最も遅く発生するシステムピーク及び連続分析に移る際の安定化時間を含めて約 35 分以内でスルファミン酸及びチオシアン酸を測定することができた. この条件により, 以下の検討を行った.

2) 検量線の直線性の確認

2.2) (12)~(14)に従って調製した標準液を 0.3 mg/L~10 mg/L まで段階的に希釈し, 20 μ L をイオンクロマトグラフに注入し, 得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成した. その結果, 0.3 mg/L~10 mg/L (6 ng~200 ng) の範囲で直線性を示した. 参考として検量線の一例を Fig. 14 に示した.

3) 試料溶液調製方法の検討

肥料分析法³⁾のスルファミン酸測定における硫酸アンモニウム塩の試料溶液調製方法は, 「分析試料 10 g~20 g をビーカーにとり, 水約 100 mL を加えて溶かす」としている. 一方で, チオシアン酸測定では, 含有許容値の設定されている肥料全体を対象として, 分析試料 5 g をビーカーにとり, 水を加えて溶かし, 煮沸したものを試料溶液としており, 抽出方法が異なる. また, 肥料中のスルファミン酸測定において, 分析試料 2.5 g を全量フラスコ 250 mLにとり, 水約 200 mL を加え回転振とう機でそれぞれ 30 分, 60 分, 120 分間振り混ぜて抽出した場合, 30 分, 60 分, 120 分いずれの抽出時間でも測定値に差は認められないという報告²⁾がある.

本検討では適用対象を硫酸アンモニアのみとしており, 硫酸アンモニア, スルファミン酸及びチオシアン酸は, 水への溶解度が非常に高いため(水への溶解度は, それぞれ 70.6 g/100 g (0 $^{\circ}$ C), 14.689 g/100 g (0 $^{\circ}$ C), 120 g/100 g (0 $^{\circ}$ C))²⁰⁾, 分析試料に水を加えて手で振り混ぜることで容易に溶解する. このため,

試料溶液調製方法は極力簡便なものとし、分析試料 1.00 g を全量フラスコ 100 mL にはかりとり、水約 50 mL を加え、全量フラスコの蓋をして振り混ぜて溶かし、標線まで水を加えることとした。

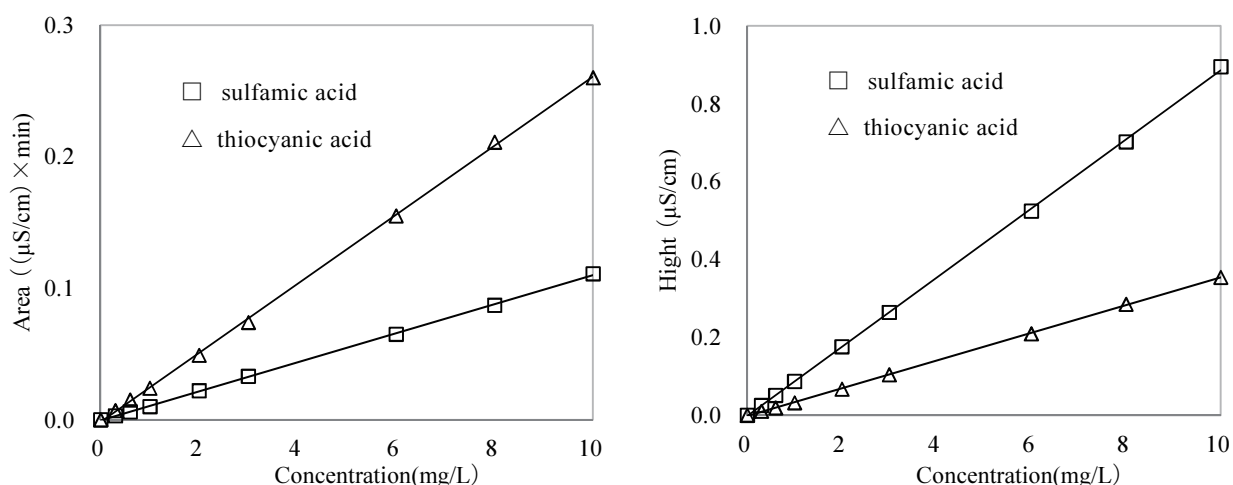


Fig. 14 Calibration curves of sulfamic acid and thiocyanic acid by peak area (left) and peak height (right)

4) 希釈倍率の検討

イオンクロマトグラフ法においては、試料中の硫酸イオンなどのマトリックスが高濃度に存在すると測定対象イオンの溶出バンドの収束性が低下する「ミクログラジエント溶出作用」という特殊な分離条件をカラム内で作り出すことが知られている²¹⁾。また、硫酸イオンが測定用試料溶液中に高濃度に存在すると、ベースラインの不安定化や、測定対象イオンのピークと重なり妨害となる場合もある。そこで、マトリックスの影響を抑えるため、上記3)で調製した試料溶液の希釈倍率について検討した。希釈倍率を5倍、10倍、12.5倍、20倍と変え、希釈後の濃度がそれぞれ 2.5 mg/L となるようにスルファミン酸及びチオシアン酸を添加した硫酸アンモニアの試料溶液を測定し、ピーク高さ又は面積により算出した回収率を比較した結果を Table 7 に示した。

スルファミン酸は、希釈倍率を上げることで回収率が改善したが、20倍としてもピーク高さで算出した回収率は90%未満であった。面積算出の回収率は、10倍以上の希釈で良好な回収率となった。これは、マトリックスである硫酸イオンによるミクログラジエント溶出作用が起きているためと考えられる。チオシアン酸については、5倍～20倍のいずれの回収率も良好な結果となった。チオシアン酸は、硫酸イオンの後に溶出するため、その影響をあまり受けないと考えられる。このことから、マトリックスの影響を抑えるためには20倍以上の希釈が必要であるが、必要な定量下限が得られなくなる可能性があるため、希釈倍率は12.5倍とし、濃度の算出は面積で行うこととした。

したがって、試験操作としては、上記3)の溶解液の一定量を正確にとり、水で正確に12.5倍希釈し、メンブレンフィルター(孔径 0.45 μm)でろ過し、イオンクロマトグラフに供する試料溶液とすることとした(2.4)(1)の試料溶液の調製)。

Table 7 Results of recovery test for sulfamic acid and thiocyanic acid at the different liquid dilution

Analyte	Dilution, fold	Spiked level ^{a)} (mg/L)	Peak high	Peak area
			Recovery ^{b)} (%)	Recovery ^{b)} (%)
Sulfamic acid	5	2.5	50.8	66.8
	10	2.5	73.4	99.1
	12.5	2.5	80.6	102.0
	20	2.5	89.8	101.4
Thiocyanic acid	5	2.5	97.7	97.4
	10	2.5	100.1	99.9
	12.5	2.5	96.9	99.2
	20	2.5	97.7	96.9

a) Solution intermediary concentration for measurement after dilution

b) Mean recovery ($n=3$)

5) マトリックスの検討

硫酸アンモニアは、製造方法により主に 3 種類に分けられる。副生硫酸アンモニア(以下、「副生硫酸」という。)は、石炭もしくは重油に含まれる窒素酸化物が分解され、生成したアンモニアを硫酸で捕集することで得られる。カプロラクタム回収硫酸アンモニア(以下、「カプロラクタム回収硫酸」という。)は、カプロラクタムの製造工程で中和用にアンモニアを使用し多量に生成される。アクリロニトリル回収硫酸アンモニア(以下、「アクリロニトリル回収硫酸」という。)は、アクリロニトリルの加水分解で生成するアクリルアミドは硫酸溶液で得られることから、これをアンモニアで中和して得られる²²⁾。

収集することができた硫酸アンモニア 17 銘柄(副生硫酸 10, カプロラクタム回収硫酸 5, アクリロニトリル回収硫酸 2)を本法により測定し、定量を妨げる妨害ピークの有無について確認した。その結果、スルファミン酸及びチオシアン酸の測定に対して妨害となるピークは確認されなかった。

また、硫酸アンモニア 1 銘柄を用いて本法の試料溶液調製方法により調製し、スルファミン酸及びチオシアン酸を含有許容値程度添加した試料溶液中に、各種の試薬を添加して、定量の妨げとなる物質の有無を確認した。添加した試薬は、無機陰イオンとして、りん酸、ふっ素、臭素酸、塩素酸、亜塩素酸、塩素、亜硝酸、硝酸、亜硫酸、チオ硫酸、硫酸、よう素、過塩素酸、また、有機酸イオンとして、酢酸、乳酸、ピログルタミン酸、りんご酸、プロピオン酸、ピルビン酸、くえん酸、酪酸、マロン酸、しゅう酸である。その結果、スルファミン酸及びチオシアン酸とほぼ同じ保持時間に溶出する成分はなかった。添加した成分のうち、特にスルファミン酸の保持時間の直前に溶出するふっ素及びプロピオン酸は濃度が高い場合は、スルファミン酸とピークが重なる場合があったが、硫酸アンモニア中にはこれらの成分が高濃度で含まれることはないため、特に問題とはならないと考えられる。試薬を添加した本試験でのクロマトグラフの一例を Fig. 15 に示した。

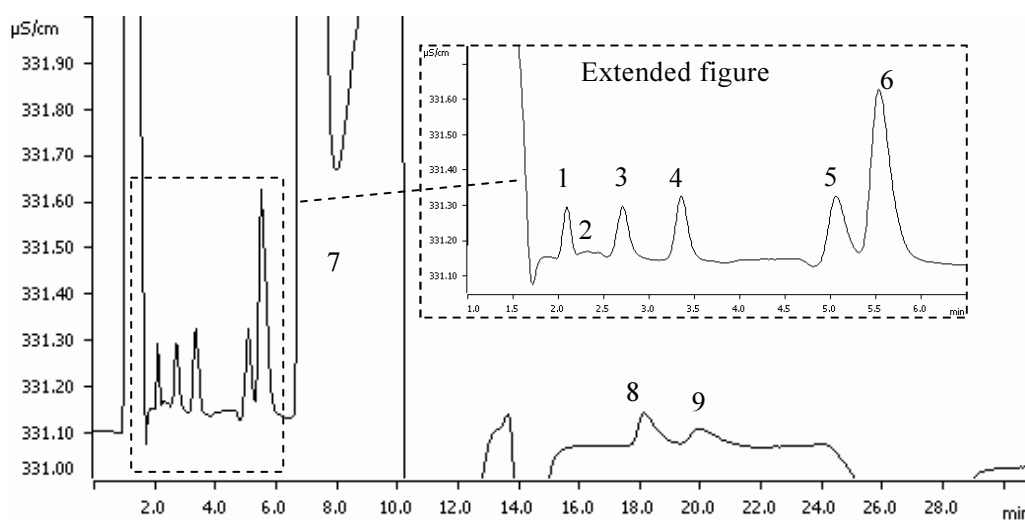


Fig. 15 Ion chromatograms of ammonium sulfate solution spiked with standard solution of anions obtained by the matrix check test in the proposed method

Peaks: 1= formic acid (5 mg/L); 2= propionic acid (5 mg/L); 3=sulfamic acid (2 mg/L); 4=hydrochloric acid (0.5 mg/L); 5= chloric acid (2.5 mg/L) ; 6=nitric acid (5 mg/L); 7=sulfuric acid; 8=thiocyanic acid (2 mg/L); 9=perchloric acid (2 mg/L)

Table 8 Recovery test for sulfamic acid and thiocyanic acid

Analyte	Sample	Spiked level (%) ^{a)}	Concentration ^{b)}	SD ^{c)} (%) ^{a)}	RSD ^{d)} (%)	Recovery ^{e)} (%)
Sulfamic acid	Ammonium sulfate 1	0.075	0.076	0.001	1.6	100.8
	(Byproduct)	0.250	0.252	0.006	2.3	101.0
	Ammonium sulfate 2	0.075	0.071	0.001	0.7	94.4
	(Caprolactam recovered)	0.250	0.259	0.004	1.4	103.5
	Ammonium sulfate 3	0.075	0.071	0.002	2.1	95.1
	(Acrylonitrile recovered)	0.250	0.249	0.003	1.3	99.4
Thiocyanic acid	Ammonium sulfate 1	0.075	0.073	0.001	1.1	97.1
	(Byproduct)	0.250	0.255	0.010	4.0	102.1
	Ammonium sulfate 2	0.075	0.073	0.000	0.6	97.4
	(Caprolactam recovered)	0.250	0.259	0.012	4.8	103.7
	Ammonium sulfate 3	0.075	0.070	0.004	5.9	93.9
	(Acrylonitrile recovered)	0.250	0.254	0.004	1.8	101.8

a) Mass percent

b) Mean value ($n=3$)

c) Standard deviation (SD)

d) Relative standard deviation (RSD)

e) Mean recovery ($n=3$)

6) 添加回収試験及び併行精度確認

肥料公定規格において、硫酸アンモニア中のスルファミン酸及びチオシアン酸の含有許容値は、窒素 1.0 %につき、0.01 %と定められている¹⁾。現在、肥料登録されている硫酸アンモニアのうち、窒素保証成分量の最大は 21.0 %、最小は 20.5 %であり、含有許容値の最大は 0.210 %、最小は 0.205 %となる。このことから、測定する可能性のある濃度範囲を考慮し、各成分について高濃度として 0.25 % (2,500 μg/g)、低濃度

として 0.075 % (750 $\mu\text{g/g}$) 相当量を添加した硫酸アンモニアについて回収試験を行った。

硫酸アンモニア 3 銘柄 (副生, カプロラクタム回収, アクリロニトリル回収硫酸の各 1 銘柄) に, スルファミン酸, チオシアン酸 (チオシアン酸アンモニウム) としてそれぞれ 0.075 % (750 $\mu\text{g/g}$) 及び 0.25 % (2,500 $\mu\text{g/g}$) 相当量添加し, 本法により 3 点併行分析を行い, 得られたその平均回収率及び併行相対標準偏差を Table 8 に示した. スルファミン酸及びチオシアン酸の平均回収率は 93.9 %~103.7 %, それらの併行相対標準偏差 (RSD) は 0.6 %~5.9 % であり, 良好な回収率及び併行精度が得られた。

なお, 標準液及び添加回収試験で得られた硫酸アンモニアにおけるクロマトグラムの一例を Fig. 16 に示した。

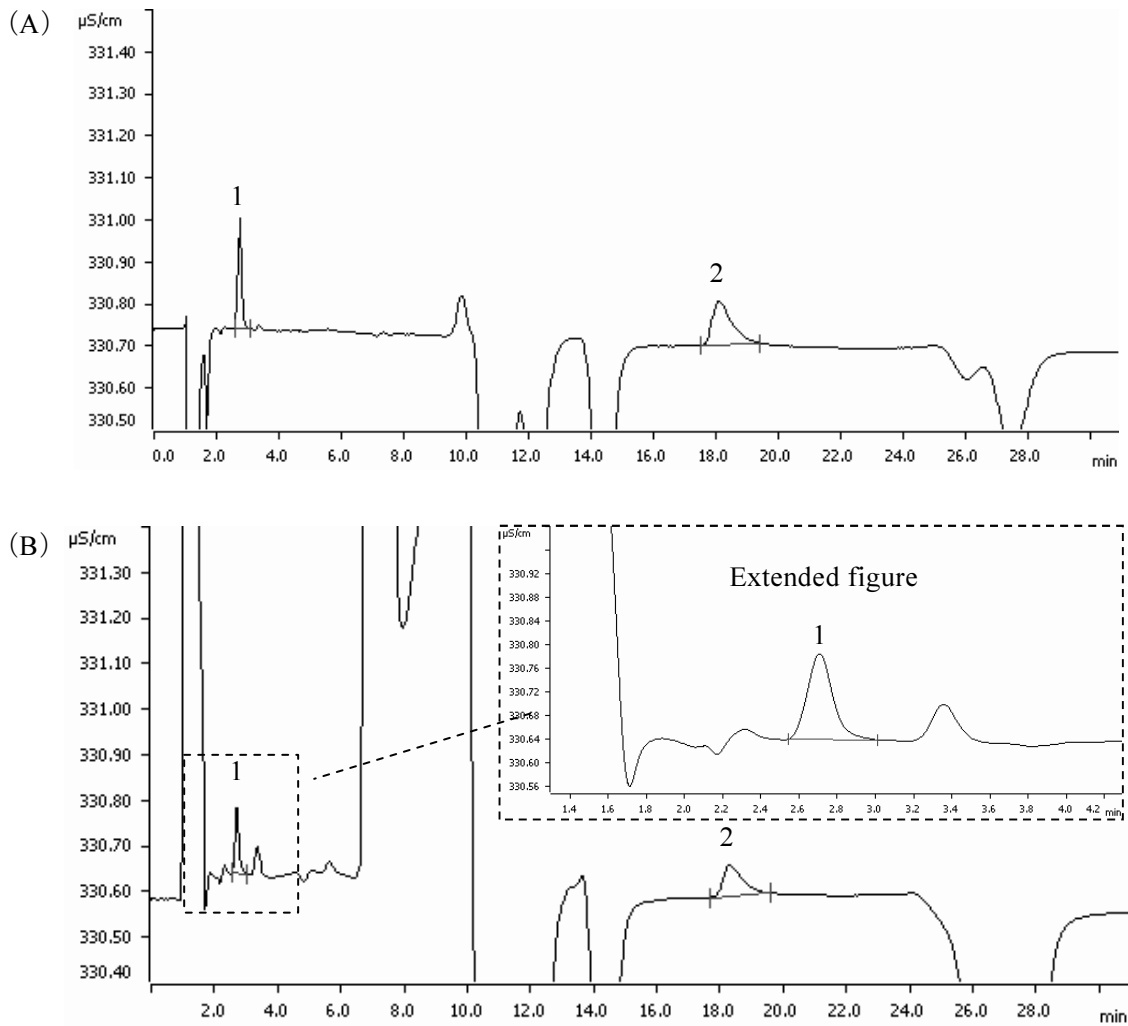


Fig. 16 Ion chromatograms of standard solution and sample solution

(A) Standard solution of sulfamic acid and thiocyanic (each 3 mg/L)

(B) Sample solution of ammonium sulfate (spiked with sulfamic acid and thiocyanic acid at 0.25 mass% (2500 $\mu\text{g/g}$))

Peaks: 1=sulfamic acid; 2=thiocyanic acid

7) 定量下限及び検出下限の確認

硫酸アンモニア 1 点を用いて, 分析試料中のスルファミン酸及びチオシアン酸アンモニウムの含有量として 0.05 % (500 $\mu\text{g/g}$) になるようにそれぞれ添加して 7 点併行試験を実施し, 定量下限及び検出下限の確認

試験を行った結果を Table 9 に示した. 定量下限は(標準偏差) $\times 10$, また, 検出下限は(標準偏差) $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$ として示される²³⁾ので, 本法の定量下限及び検出下限は 0.04 % (400 $\mu\text{g/g}$) 程度及び 0.02 % (200 $\mu\text{g/g}$) 程度と推定された. これは, 含有許容値の最低濃度である 0.20 % (2,000 $\mu\text{g/g}$) のそれぞれ 1/5 及び 1/10 以下であり, コーデックス委員会の受け入れ基準を満たしていた²⁴⁾.

Table 9 Limit of quantitation and detection of sulfamic acid and thiocyanic acid

Analyte	Spiked level	Concentration ^{a)}	SD ^{b)}	(mass%)	
				LOQ ^{c)}	LOD ^{d)}
Sulfamic acid	0.05	0.047	0.0034	0.034	0.013
Thiocyanic acid	0.05	0.047	0.0035	0.035	0.014

a) Mean value ($n=7$)

b) Standard deviation (SD)

c) $\text{SD} \times 10$

d) $\text{SD} \times 2 \times t(n-1, 0.05)$

4. まとめ

イオンクロマトグラフ法による硫酸アンモニア中の硫黄酸化物(チオシアン酸アンモニウム)及びスルファミン酸の定量法の単一試験室における妥当性確認のための試験を実施したところ, 次の結果を得た.

- 1) 使用する分離カラムを検討したところ, イオン交換方式(ノンサプレッサ法)のカラム(充填剤 第4級アンモニウム基を結合した親水性メタクリレート系ゲル)が最適であった.
- 2) 測定条件を検討したところ, 溶離液は「フタル酸 0.5 mmol/L + *p*-ヒドロキシ安息香酸 4.0 mmol/L + オクタンスルホン酸 0.9 mmol/L + ヘキサンスルホン酸 2.0 mmol/L + ほう酸 100 mmol/L, カラム槽温度 58 °C, 流量 1.0 mL/min が最適であり, この条件での測定時間は 35 分程度であった.
- 3) ピーク面積又は高さを用いて検量線を作成したところ, 0.3 mg/L ~ 10 mg/L (6 ng ~ 200 ng) の範囲で直線性を示した.
- 4) 17 銘柄の硫酸アンモニアについて本法に従ってスルファミン酸及びチオシアン酸測定を実施した結果, 定量を妨害する夾雑ピークはなかった.
- 5) 3 銘柄の硫酸アンモニアについてスルファミン酸, チオシアン酸(チオシアン酸アンモニウム)としてそれぞれ 0.075 % (750 $\mu\text{g/g}$) 及び 0.25 % (2,500 $\mu\text{g/g}$) 相当量添加し, 添加回収試験を行った結果, 平均回収率は 93.9 ~ 103.7 %, その併行精度は併行相対標準偏差(RSD)として 0.6 % ~ 5.9 % であった.
- 6) 本法における硫酸アンモニア中のスルファミン酸及びチオシアン酸の定量下限及び検出下限は 0.04 % 程度及び 0.02 % 程度と推定された.

本法で使用する測定機器は, グラジエント機能やサプレッサといった高価な設備を必要とせず, 電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフ又は高速液体クロマトグラフで測定することができるため, 日常的な品質管理用の測定法として活用が期待される.

文 献

- 1) 農林水産省告示:肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日, 農林水産省告示第 284 号, 最終改正平成 22 年 4 月 9 日, 農林省告示第 589 号 (2010)
- 2) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, 234~237.245~247, 養賢堂, 東京 (2005)
- 3) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992 年版), 日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
- 4) 田中壽雄:イオンクロマトグラフィーによる肥料中の硫青酸化物, 肥検回報, **48**, 33~39 (1995)
- 5) 坂上光一:イオンクロマトグラフィーによる肥料中のスルファミン酸(アミド硫酸)肥検回報, **49**, 26~32 (1996)
- 6) 岡田哲男, 山本敦, 井上嘉則:研究者・技術者のための手引書 クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析, 107~108, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 (2002)
- 7) 田中一彦:役にたつイオンクロマト分析, 4~5.58, 株式会社みみずく舎, 東京 (2009)
- 8) メトロームジャパン株式会社:IC アプリケーション A-040
<http://www.metrohm.jp/export/Homepages/Japan/IC_application/1ic_appli.html>
- 9) 三浦恭之:無機硫黄陰イオン混合物の迅速・高感度イオンクロマトグラフィー, 分析化学, **54** (8), 651~664 (2005)
- 10) 柴山人之, 津崎昌夫, 藤原聡, 浦和雄:粒状硫安の製造方法, 特願平 5-210260
- 11) 別役仁:硫安結晶の製造方法, 特願 2000-226211
- 12) 田中一彦:役にたつイオンクロマト分析, 14~16, 株式会社みみずく舎, 東京 (2009)
- 13) 小崎大輔, 後藤良三, 増田和香子, 齋藤大輔, 中谷暢丈, 中越信和, 森勝伸, 田中一彦:イオン排除/陽イオン交換型イオンクロマトグラフィーの中小都市河川水の水質モニタリングへの応用, 分析化学, **57** (8), 651~658 (2008)
- 14) 田中一彦:イオン排除型イオンクロマトグラフィーによる水質モニタリング法の開発に関する研究, 分析化学, **55** (5), 275~289 (2006)
- 15) 岡田哲男, 山本敦, 井上嘉則:研究者・技術者のための手引書 クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析, 113~114, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 (2002)
- 16) 東ソー株式会社:SEPARATION REPORT No.041 イオンクロマトグラフィーその実際, 13
- 17) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課:LC/MS を用いた化学物質分析法開発マニュアル, 32~33 <<http://www.env.go.jp/chemi/anzen/lcms/index.html>>
- 18) 北山拓郎, 大橋清:粒状硫安の製造方法, 特願 2000-390427
- 19) 岡田哲男, 山本敦, 井上嘉則:研究者・技術者のための手引書 クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析, 118, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 (2002)
- 20) 化学大辞典編集委員会:化学大辞典, **1**, 245, **5**, 812, **9**, 690, 共立出版株式会社, 東京 (1960)
- 21) 古月文志:イオンクロマトグラフィー—マトリックスイオンによる妨害とその対策—, ぶんせき, **3**, 153~154 (2004)
- 22) 尾和尚人, 木村真人, 越野正義, 三枝正彦, 但野利秋, 長谷川功, 吉羽雅昭:肥料の辞典, 79~80, 株式会社朝倉書店, 東京 (2006)
- 23) 環境省水・大気環境局水環境課:要調査項目等調査マニュアル(水質, 底質, 水生生物), 平成 20 年 3 月, 8~11 (2008)
- 24) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition, 66 (2011)
<ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>

Simultaneous Determination of Sulfamic Acid and Ammonium Thiocyanate in Ammonium Sulfate by Nonsuppressed Ion Chromatography

Toshiaki HIROI¹ and Yuji SHIRAI¹

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

An analytical method using ion chromatograph (IC) for simultaneous determination of sulfamic acid and ammonium thiocyanate in ammonium sulfate was developed. Sulfamic acid and ammonium thiocyanate was extracted with water. The eluate was filtered through membrane filter and analyzed using IC. IC was performed with an anion exchange column (4.6 mm internal diameter, 100 mm length, 5 µm particle size) at a flow-rate of 1.0 mL/min, using mobile phase of phthalic acid 0.5 mmol/L + 4-hydroxybenzoic acid 4.0 mmol/L + sodium 1-octanesulfonate 0.9 mmol/L + sodium 1-hexanesulfonate 2.0 mmol/L + boric acid 100 mmol/L. Sulfamic acid and ammonium thiocyanate was detected with a conductivity detector. The means recovery rates from 3 samples with concentration of 0.075 and 0.25 % of dicyandiamide ranged from 93.9 to 100.8 % and from 99.4 to 103.7 %, respectively. The relative standard deviations (RSD) were from 0.6 to 5.9 % and from 1.3 to 4.8 %, respectively. The result of 7 replicate measurements of sulfamic acid and ammonium thiocyanate in ammonium sulfate, the lower limit of quantitation value was 0.04 %. These results show the method has sufficient sensitivity and accuracy for determination of sulfamic acid and ammonium thiocyanate in ammonium sulfate.

Key words fertilizer, ammonium sulfate, sulfamic acid, ammonium thiocyanate, ion chromatograph

(Research Report of Fertilizer, **5**, 1~23, 2012)

2 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による石灰窒素中の メラミン及びその関連物質の同時測定

坂東悦子¹, 廣井利明¹, 恵智正宏¹, 白井裕治¹

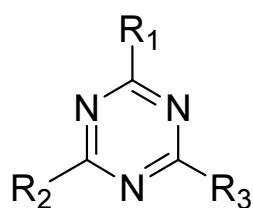
キーワード メラミン, 肥料, 石灰窒素, 高速液体クロマトグラフ

1. はじめに

メラミンは日本国内において肥料として有効性が認められておらず, 国内では流通していない。また, 現時点では肥料取締法に基づく公定規格においてメラミンに関する基準値等はない。今般, 石灰窒素(肥料・農薬)のうち石灰窒素粉状品に水を加えて造粒した粒状製品について, メラミンの含有量が高い製品があることが確認された¹⁾ことから, 肥料中のメラミンに関する規制等が必要か検討することとなった。

肥料中のメラミンに関する調査を行うためには, メラミン及びその関連物質であるアンメリン, アンメリド及びシアヌル酸(以下「メラミン等」という(Fig.1).)の分析方法の検討を行う必要がある。肥料等試験法には肥料中のメラミン等の測定法としてガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法²⁾が記載されているが, この試験法は操作が煩雑であり, また, 誘導体化後の試料溶液中の余剰試薬がGC/MSの試料溶液導入部及びイオン化部にダメージを与えることがあり, 連続分析には適さない。よって, 誘導体化操作を必要としない迅速で汎用性のある試験法として, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた測定法を検討することとなった。

今回, メラミンの含有量が高い製品があることが確認された石灰窒素について, HPLCを用いたメラミン等の定量試験法を検討したので, 概要を報告する。



Substance name	R ₁	R ₂	R ₃	MW	N-content (%)
Melamine	NH ₂	NH ₂	NH ₂	126.12	67
Ammeline	OH	NH ₂	NH ₂	127.10	55
Ammelide	OH	OH	NH ₂	128.09	44
Cyanuric acid	OH	OH	OH	129.07	33

Fig.1 Chemical structural formula of melamine and its related substances

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

3種類の石灰窒素をそれぞれ目開き0.5 mmのふるいに通し, 通過したものを分析用試料とした。分析用試料はビニール袋に入れ, 常温で保存した。

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) 試薬等の調製

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水又は同等の品質のもの。
- (2) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級試薬. なお, HPLC の溶離液には HPLC 用試薬を使用.
- (3) ジエチルアミン: 特級試薬.
- (4) リン酸塩緩衝液: JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 0.237 g 及び JIS K 9009 に規定するりん酸二水素ナトリウム二水和物 0.520 g を水に溶かして 1,000 mL とした. HPLC の溶離液に使用する場合は, 親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過した.
- (5) メラミン等標準液(0.5 mg/mL): メラミン[$\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$], アンメリン[$\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$], アンメリド[$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$] 及びシアヌル酸[$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_3$]約 0.05 g をそれぞれひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg の桁まで測定した. 少量のジエチルアミン-水(1+4)で溶かし, それぞれ全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた.
- (6) 混合標準液(50 $\mu\text{g/mL}$): 各メラミン等標準液(0.5 mg/mL) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加えた.
- (7) 検量線用混合標準液(2~20 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に混合標準液(50 $\mu\text{g/mL}$)の 2 mL~20 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加えた.
- (8) 検量線用混合標準液(0.1~2 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に検量線用混合標準液(5 $\mu\text{g/mL}$)の 1 mL~20 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加えた.

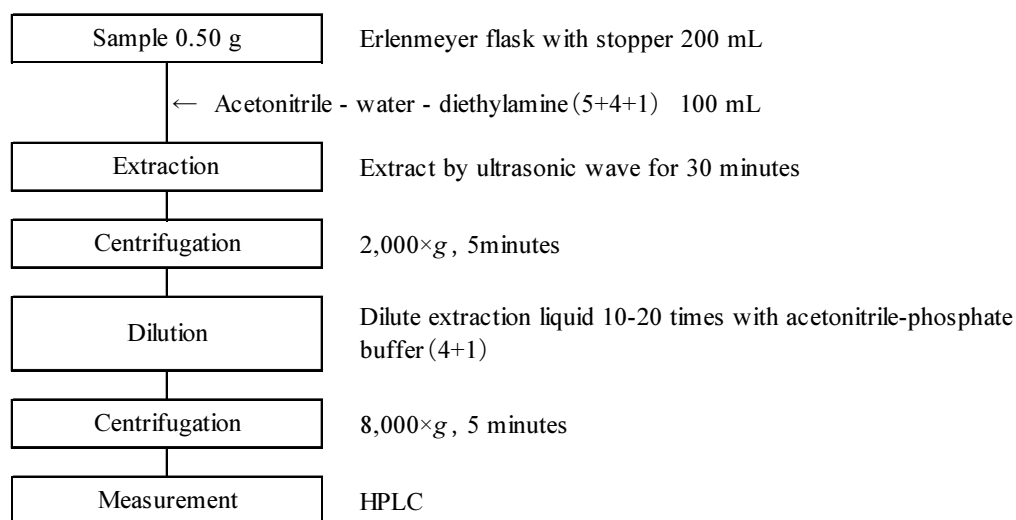
3) 器具及び装置

- (1) 高速液体クロマトグラフ(以下 HPLC): 島津製作所 LC-VP シリーズ
- (2) カラム: 東ソー TSKgel Amide-80(内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm)
- (3) 超音波発生器: YAMATO 8510J-MT
- (4) 遠心分離機: KOKUSAN H-26F
- (5) 高速遠心分離機: AS ONE MCD-2000

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 0.50 g をはかりとり, 共栓三角フラスコ 200 mL に入れた. 抽出溶媒としてアセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1) 100 mL を加え, 超音波発生器を用いて 30 分間超音波処理を行った. 静置後, 上澄み液を 50 mL 容の共栓遠心沈殿管に取り, 2,000 \times g で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を抽出液とした. 抽出液 2.5 mL ~5 mL を 50 mL 容の全量フラスコに取り, 標線までアセトニトリル+りん酸塩緩衝液(4+1)を加えて希釈した. 希釈液を 1.5 mL 容の共栓遠心沈殿管に取り, 8,000 \times g で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を HPLC 測定用試料溶液とした(Scheme 1).



Scheme 1 Method flow sheet of melamine and its related substances in calcium cyanamid

(2) 測定

各検量線用混合標準液 10 μ L を HPLC に注入し, Table 1 の HPLC 条件で測定し, 得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した. 試料溶液 10 μ L を HPLC に注入し, ピーク面積又は高さから検量線により試料溶液中のメラミン等の量を求め, 分析試料中の濃度を算出した.

Table 1 HPLC conditions

HPLC system	Shimadzu corporation LC-VP series
Column	TOSOH corporation TSKgel Amide-80 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m particle size)
Column temperatures	40 $^{\circ}$ C
Mobile phase	Acetonitrile - phosphate buffer (4+1)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector system	UV detector at a wavelength of 214 nm

3. 結果及び考察

1) 測定条件

メラミン等検量線用混合標準液(各 10 μ g/mL 相当量)の HPLC クロマトグラムを Fig.2 に示した. 東ソー株式会社のカラムのテクニカルインフォメーション³⁾を参考に HPLC 条件(Table 1)を設定したところ, メラミン等の各ピーク形状及び分離度は満足するものであった. 0.1 μ g/mL~20 μ g/mL 相当量の検量線用混合標準液を調製し, 本法に従って検量線を作成した. その結果, 0.1 μ g/mL~20 μ g/mL 相当量の範囲で直線性のある検量線が得られた(Fig. 3).

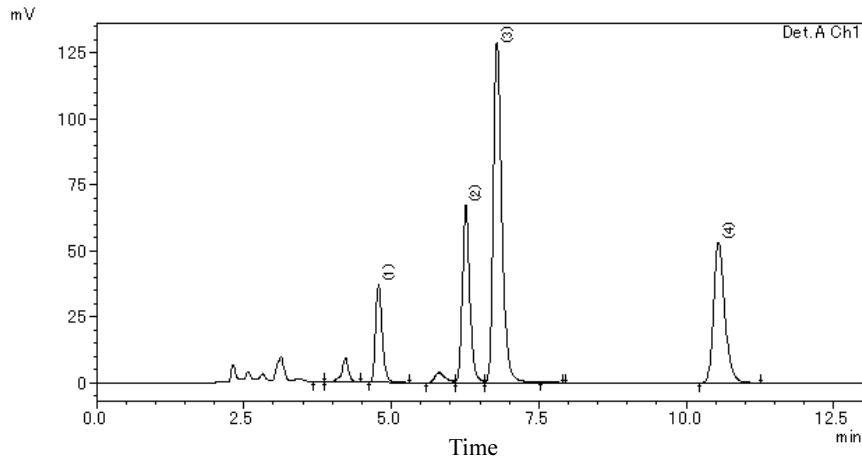


Fig. 2 HPLC chromatogram of standard

Substance name (1) Cyanuric acid (2) Ammelide (3) Melamine (4) Ammeline

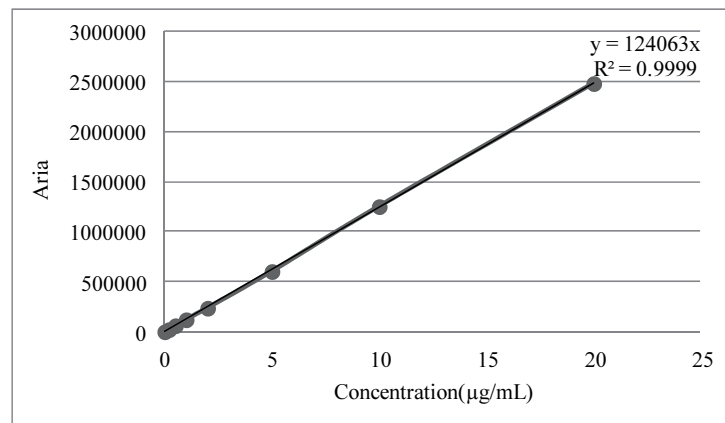


Fig. 3 Calibration curve of melamine

2) 抽出方法の検討

GC/MS 法による肥料中のメラミン等の分析方法²⁾では、分析試料にアセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1)を加えて抽出をしている。この溶媒を石灰窒素中のメラミン等の抽出に用いたところ、メラミン、アンメリド、アンメリンは検出されたが、シアヌル酸は検出されなかった。抽出溶媒にジエチルアミンの代わりに塩酸を添加して pH 2 以下にすることでシアヌル酸を検出することは出来たが、カラムの性能低下が見られた。

このことから、アセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1)を抽出溶媒として用いることとし、シアヌル酸に関しては測定対象成分から除くこととした。

3) 添加回収試験

メラミンを 0%~0.02% 程度含有する 3 種類の石灰窒素にメラミン等として 4% 及び 0.4% をそれぞれ添加し、3 点併行で回収試験を実施した結果、メラミンの回収率は 95.7%~103.2% 及び 93.6%~102.5%、相対標準偏差は 0.8%~2.3% 及び 0.5%~1.0% と良好な回収率及び併行精度が得られた (Table 2)。一方、アンメリドの回収率は 93.9%~99.2% 及び 87.8%~101.2%、相対標準偏差は 1.6%~3.0% 及び 0.8%~3.1% で、アンメリドの回収率は 86.3%~94.1% 及び 80.3%~96.8%、相対標準偏差は 0.7%~2.5% 及び 0.6%~1.1% であり、

良好な回収率が得られなかった。よって、本試験法はメラミン関連物質のうち、メラミンのみを測定対象成分とすることとした。

Table 2 Recovery and precision data (%)

	Content ¹⁾	Melamine		Ammeline		Ammelide	
		Mean ²⁾	RSD ³⁾	Mean	RSD	Mean	RSD
Calcium cyanamid-1	4	103.2	2.3	99.2	3.0	94.1	2.5
	0.4	102.5	0.5	101.2	0.8	96.8	0.6
Calcium cyanamid-2	4	95.7	0.8	94.3	1.6	86.3	1.1
	0.4	95.5	1.0	88.0	1.4	86.7	1.1
Calcium cyanamid-3	4	96.7	2.2	93.9	2.7	88.0	0.7
	0.4	93.6	0.6	87.8	3.1	80.3	1.0

1) Content of melamine and its related substances

2) $n=3$

3) Relative standard deviation

4) 定量下限の確認

石灰窒素 1 点を用いたメラミンの定量下限確認の試験結果を Table 3 に示した。分析試料にメラミンの含有量として 0.04 % になるように添加して 10 点併行試験を実施したところ、本法の定量下限はメラミンで 0.01 % 程度と推定された。また、本法の検出下限は 0.004 % 程度と推定された。

Table 3 Calculated LOQ and LOD (%)

	Content ¹⁾	Calcium cyanamid		LOQ ⁴⁾	LOD ⁵⁾
		Mean ²⁾	SD ³⁾		
Melamine	0.04	0.038	0.001	0.01	0.004

1) Content of melamine

2) $n=10$

3) Standard deviation

4) Standard deviation $\times 10$

5) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$

4. まとめ

石灰窒素中のメラミン及びその関連物質の試験法の検討を行ったところ、次のとおりの成績を得た。

1) 抽出溶媒の検討を行った結果、メラミン、アンメリン、アンメリドは GC/MS 法で抽出に使用するアセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1)で抽出可能であったが、シアヌル酸は抽出不能だったため測定対象成分から除くこととした。

2) メラミン等の含有量が 4 % 及び 0.4 % になるよう添加した石灰窒素 3 点を用いて回収試験を実施した結果、メラミンに関しては回収率 95.7 % ~ 103.2 % 及び 93.6 % ~ 102.5 %、相対標準偏差 0.8 % ~ 2.3 % 及び 0.5 % ~ 1.0 % と良好な回収率と併行精度が得られた。また、アンメリン及びアンメリドは良好な回収率が得られなかったため、本測定法は石灰窒素中のメラミンのみを測定対象とした。

3) 本法のメラミンの定量下限は 0.01 % 程度、検出下限は 0.004 % 程度と推定された。

なお、メラミン以外のメラミン関連物質については、引き続き試験方法を検討するとともに、石灰窒素以外の肥料についても随時試験方法の適用拡大を行う予定である。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知:石灰窒素の肥料登録に関する当面の取扱いについて,平成 23 年 4 月 15 日, 23 消安第 524 号 (2011)
- 2) 白井裕治, 大木純:ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定, 肥料研究報告, **1**, 114~121 (2008)
- 3) 東ソー株式会社:テクニカルインフォメーション No.109 順相クロマトグラフィーによるメラミン及びその加水分解物の分析
< <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/7F1EAA68-798B-494F-B4C5-487A397B5536/0/109.pdf>>

Validation of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Determination of Melamine and Its Related Substances in Calcium Cyanamid

Etsuko BANDO¹, Toshiaki HIROI¹, Masahiro ECHI¹ and Yuji SHIRAI¹

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

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for determination of melamine was validated. Melamine was extracted with diethylamide-water-acetonitrile (1+4+5). The extract was centrifuged and a portion of the supernatant was diluted to analyze by HPLC. It was impossible to extract cyanuric acid, Ammeline and Ammelide with diethylamide-water-acetonitrile.

As a result of 3 replicate analysis of 3 calcium cyanamid samples, the mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) were 93.6 %~102.5 % and 0.5 %~2.3 %, respectively. On the basis of 10 replicate measurement of melamine added samples the LOQ values were 0.01 % for all melamine samples. The results demonstrated the validity of the HPLC method for determination of melamine in calcium cyanamid.

Key words melamine, fertilizer, calcium cyanamid, HPLC

(Research Report of Fertilizer, **5**, 24~30, 2012)

3 シリカゲル肥料及びシリカゲル肥料を含む肥料中の可溶性けい酸測定

— 共同試験成績 —

清水昭¹, 阿部進², 伊藤潤¹

キーワード 可溶性けい酸, ふっ化カリウム法, シリカゲル肥料, 共同試験

1. はじめに

シリカゲル肥料は、平成 11 年に普通肥料の公定規格改正¹⁾により追加され、同時に農林水産省告示²⁾に「可溶性けい酸とは、シリカゲル肥料に由来するものにあつては 2 分の 1 モル毎リットルの水酸化ナトリウム溶液(水酸化ナトリウム溶液(20 g/L))に溶けるけい酸を、その他の原料に由来するものにあつては 2 分 1 モル毎リットル塩酸(塩酸 1+23)に溶けるけい酸をいう」と規定された。

また、シリカゲル肥料を原料とする化成肥料等は、平成 15 年に普通肥料の公定規格改正により「けい酸質肥料(シリカゲル肥料に限る)」が化成肥料及び配合肥料に使用できる原料として追加された。シリカゲル肥料単体の可溶性けい酸については、水酸化ナトリウム溶液(20 g/L)で抽出した後ふっ化カリウム法で測定する方法を検討^{3, 4)}したところ測定操作にかかる時間を短縮し、満足する結果が得られた。

シリカゲル肥料を含む可溶性けい酸については、カルシウム含有量の割合が大きい肥料において設計値より低い値を示したことから、水酸化ナトリウム溶液(20 g/L)で抽出する前に塩酸(1+23)を加えて抽出する方法⁵⁾を適用したところ、抽出効率が改善し満足な結果が得られた。

このことから、両試験法について IUPAC の共同試験プロトコル⁶⁾を参考に共同試験を実施し、試験室間の再現精度を調査したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料の調製

シリカゲル肥料 5 点各 2 kg~3 kg, シリカゲル肥料を含む肥料については、混合りん酸肥料 2 点, 化成肥料 3 点各 2 kg~3 kg を試験品として採取し、超遠心粉砕器(Retsch ZM1000)で目開き 500 µm のふるいを全通するまで粉砕して共同試験用試料を調製した。

共同試験用試料 1.8 g をビニール袋に入れ密封した。一対のブラインド試料を提供するため、共同試験用試料の袋にランダムに番号のラベルを付け、各 10 点を参加試験室に送付した。

2) 装置及び器具

各試験室で準備したものを使用した。

3) シリカゲル肥料及びシリカゲル肥料を含む肥料中の可溶性けい酸測定

¹ (独)農林水産消費安全技術センター名古屋センター

² (独)農林水産消費安全技術センター名古屋センター (現)仙台センター

(1) シリカゲル肥料

分析試料 1.00 g を量って 250 mL ポリエチレン製全量フラスコ 250 mL に入れ、65 °C に調整した水酸化ナトリウム溶液 (20 g/L) 約 150 mL を加え、65 °C の水浴中で 10 分ごとに振り混ぜながら 60 分間加温させ、加温終了後室温まで放冷し、標線まで水を加え、ろ過して試料溶液を調製した。

試料溶液 25 mL を 200 mL のポリエチレン製ビーカーにとり、塩酸約 10 mL、ふっ化カリウム溶液約 15 mL 及び塩化カリウム約 2 g を加えてポリエチレン製の攪拌棒でかき混ぜて溶かし、10 °C 以下の冷蔵庫で約 30 分間冷却した後、ポリエチレン製グーチャーつぼにろ紙 6 種及びろ紙くずを敷いて吸引ろ過し、塩化カリウム溶液で 6~7 回洗浄した。ろ紙上の沈殿物はろ紙とともに水でトールビーカー 300 mL に移して水で約 200 mL とし、70 °C~80 °C に加熱した後直ちにフェノールフタレイン溶液 (1 g/100 mL) を数滴加え、標準水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) で溶液の色が淡赤色になるまで滴定し、可溶性けい酸の量を算出した (Fig. 1)。

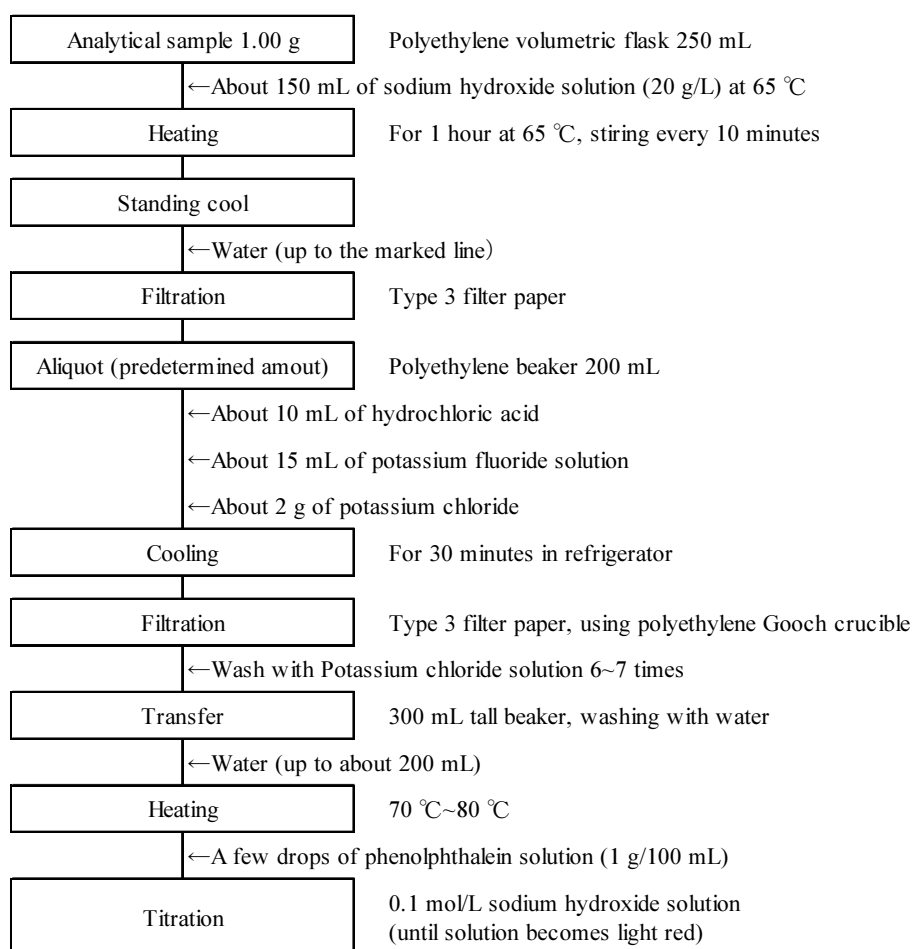


Fig. 1 Flow sheet for silic acid in silica gel fertilizer

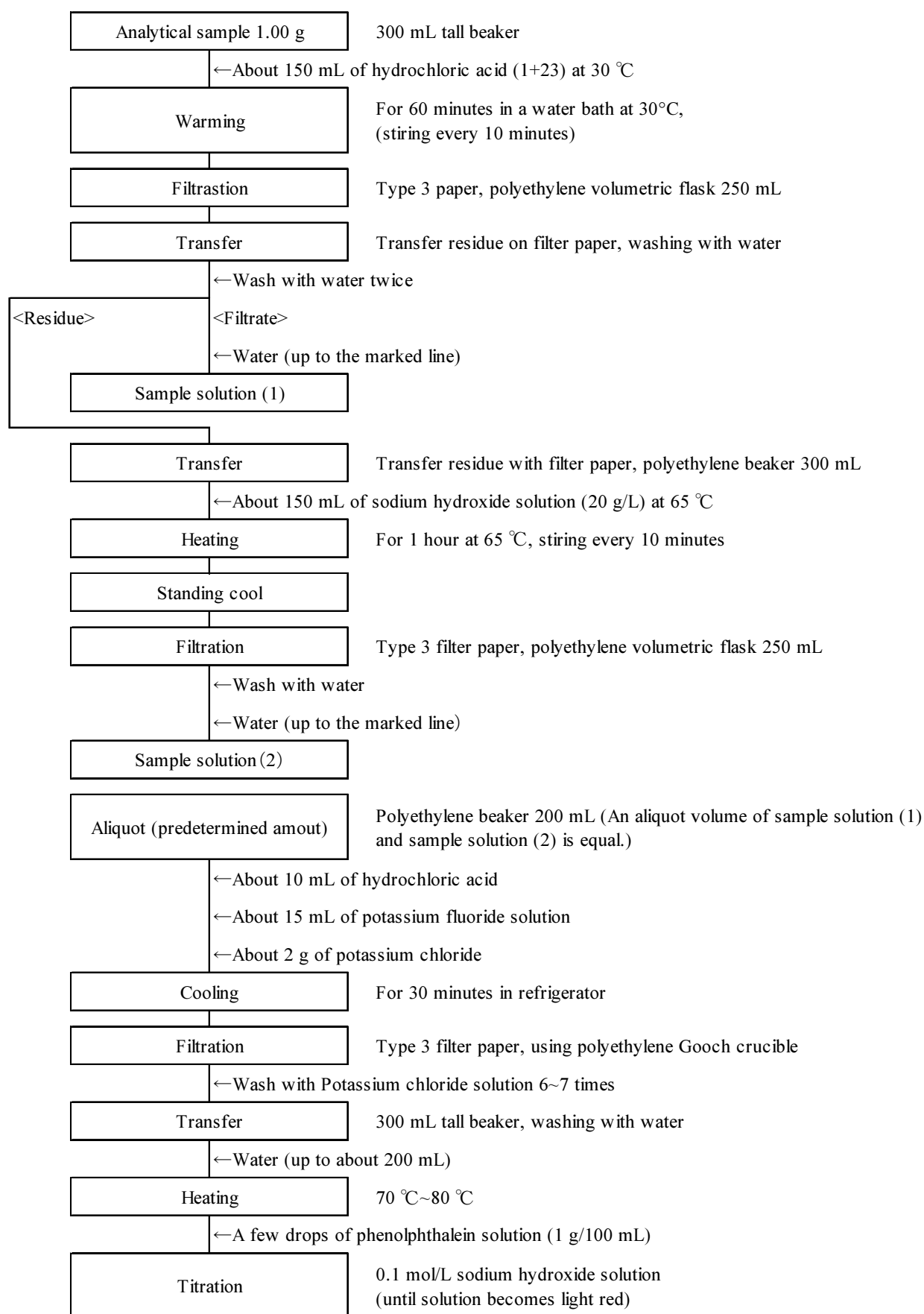


Fig. 2 Flow sheet for silic acid in silica gel-including fertilizer

(2) シリカゲル肥料を含む肥料

分析試料 1.00 g を量って 300 mL のトールビーカーに入れ、30 °C に調整した塩酸(1+23) 150 mL を加え、30 ± 2 °C の水浴中で 10 分ごとにガラス棒でかき混ぜながら 60 分間加温した後、全量フラスコ 250 mL を受器とし、ろ紙 3 種でろ過する。容器を 2 回、ろ紙上の不溶解物を 2 回水で洗浄してから標線まで水を加えた(以下試料溶液(1))とする。ろ紙上の不溶解物はろ紙とともに、300 mL ポリエチレン製ビーカーに入れて 65 °C に調整した水酸化ナトリウム溶液(20 g/L) 約 150 mL を加え、65 °C の水浴中で 10 分ごとにポリエチレン製の攪拌棒でかき混ぜながら、60 分間加温する。室温まで放冷した後、ろ紙 3 種でろ過し、容器を 2 回、ろ紙を 2 回水で洗浄してポリエチレン製全量フラスコ 250 mL を受器とし標線まで水を加えた(以下試料溶液(2))とする。)

試料溶液(1) 25 mL 及び試料溶液(2)の 25 mL を同一のポリエチレン製ビーカー 200 mL にとり、塩酸約 10 mL、ふっ化カリウム溶液約 15 mL 及び塩化カリウム約 2 g を加えてポリエチレン製の攪拌棒でかき混ぜて溶かし、10 °C 以下の冷蔵庫で約 30 分間冷却した後、ポリエチレン製ゲーチるつぼにろ紙 6 種及びろ紙くずを敷いて吸引ろ過し、塩化カリウム溶液で 6~7 回洗浄した。ろ紙上の沈殿物はろ紙とともに水でトールビーカー 300 mL に移して水で約 200 mL とし、70 °C ~ 80 °C に加熱した後直ちにフェノールフタレイン溶液(1 g/100 mL)を数滴加え、標準水酸化ナトリウム溶液(0.1 mol/L)で溶液の色が淡赤色になるまで滴定し、可溶性けい酸の量を算出した(Fig. 2)。

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⁷⁾の均質性試験に従い、各系列の共同試験用試料からそれぞれ 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 3) に従って分析を実施した。

3. 結果及び考察

Table 1 Base-soluble silicic acid in silica gel fertilizers by proposed method in the homogeneity test for the collaborative study

Material	Mean ¹⁾ (%) ²⁾	RSD ³⁾ (%)	F value ⁴⁾	F critical value ⁵⁾
Silica gel fertilizer 1	80.38	2.7	1.32	3.02
Silica gel fertilizer 2	84.66	1.3	1.62	3.02
Silica gel fertilizer 3	89.62	0.3	0.64	3.02
Silica gel fertilizer 4	84.41	1.1	0.94	3.02
Silica gel fertilizer 5	85.75	1.9	0.87	3.02

1) Grand mean of the result obtained by analyzing ten sample containers in duplicate

2) Mass fraction

3) Reproducibility relative standard deviation between sample

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

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の成績及び繰返し2回×各10試料の一元配置による分散分析から得られた統計量をシリカゲル肥料については Table 1, シリカゲル肥料を含む肥料については Table 2 に示した. いずれの試料においても, F値が $F(9, 10; 0.05)$ を下回ったことから, 有意水準 5% において試料間に有意な差は認められず, すべての分析試料が共同試験に用いることができる均質性を有していることを確認した.

Table 2 Acid-soluble and base-soluble silicic acid of silica gel-containing fertilizers by proposed method in the homogeneity test for the collaborative study

Material	Mean ¹⁾ (%)	RSD ²⁾ (%)	F value ³⁾	F critical value ⁴⁾
Phosphate fertilizer mixture 1	24.42	0.68	1.17	3.02
Phosphate fertilizer mixture 2	33.58	0.67	0.71	3.02
Compound fertilizer 1	11.47	10.36	1.99	3.02
Compound fertilizer 2	5.69	6.54	2.7	3.02
Compound fertilizer 3	20.86	7.03	2.95	3.02

* The footnote are showed in Table 1

2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験成績を Table 3 及び Table 4 に示した. 参加試験室が 8 試験室のため, 外れ値検定は行わなかった.

Table 3 Collaborative study result¹⁾ for determination of base-soluble silicic acid in silica gel fertilizers (Mass fraction, %)

Lab. ID ²⁾	Silica gel fertilizer 1		Silica gel fertilizer 2		Silica gel fertilizer 3	
A	78.28	78.87	84.61	83.72	89.10	89.31
B	79.19	79.57	83.85	84.16	89.58	89.55
C	78.91	79.32	84.26	84.99	88.95	90.20
D	80.15	80.02	85.44	84.43	89.26	89.61
E	79.24	79.36	84.49	84.58	89.19	89.52
F	79.10	78.90	84.70	84.50	89.00	89.30
G	79.23	79.51	84.37	83.78	89.48	90.18
H	80.19	80.05	86.54	86.45	90.64	90.34

1) Not run outlier test

2) Laboratory identification

Table 3 (continued)

Lab. ID ²⁾	Silica gel fertilizer 4		Silica gel fertilizer 5	
	A	84.72	83.82	85.25
B	83.53	84.15	85.18	85.08
C	83.84	84.58	85.83	86.63
D	84.91	84.32	86.16	85.72
E	83.89	83.60	84.94	85.37
F	84.10	84.20	86.40	85.00
G	84.66	84.58	85.82	86.34
H	85.93	86.15	86.54	86.36

Table 4 Collaborative study result¹⁾ for determination of acid-soluble and base-soluble silicic acid in silica gel-including fertilizers (Mass fraction, %)

Lab. ID ²⁾	Phosphate fertilizer mixture 1		Phosphate fertilizer mixture 2		Compound fertilizer 1	
	A	25.01	25.09	32.69	32.40	11.78
B	25.31	24.37	32.21	31.84	11.58	11.56
C	24.71	24.88	32.18	32.08	12.31	12.22
D	24.66	24.72	33.27	33.28	12.03	12.15
E	27.62	27.20	35.47	35.02	12.69	12.83
F	26.70	26.80	33.50	33.80	12.10	12.50
G	25.91	26.02	35.21	35.11	13.40	14.21
H	24.59	24.51	33.06	32.80	12.75	12.49

* The footnote are showed in Table 3

Table 4 (continued)

Lab. ID ²⁾	Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
	A	6.11	5.95	22.29
B	5.80	5.64	22.05	21.84
C	6.49	6.22	22.68	22.59
D	5.99	6.04	22.33	22.46
E	6.09	6.00	23.10	23.28
F	5.98	6.01	23.00	22.80
G	6.45	6.13	24.68	24.94
H	6.32	6.20	22.97	23.10

3) 併行精度及び室間再現精度

試験成績より算出した平均値, 併行標準偏差 (SD_r), 相対標準偏差 (RSD_r) 及び HorRat 値 ($HorRat_r$) 並びに

室間再現標準偏差 (SD_R), 相対標準偏差 (RSD_R) 及び HorRat 値 ($HorRat_R$) をシリカゲル肥料は Table 5, シリカゲル肥料を含む肥料は Table 6 に示した. HorRat 値は分析方法の精度の評価をするために用いられており, 現在のところ肥料に使用している事例は少ないが参考に記載した. $HorRat_r$ は $RSD_r/RSD_r(P)$ 及び $HorRat_R$ は $RSD_R/RSD_R(P)$ により求められる.

なお, $RSD_R(P)$ は平均値から Horwitz の修正式⁹⁾により求め, $RSD_r(P)$ は Horwitz の修正式に係数 (1/2) を乗じて求めた^{10, 11)} 試験成績についてシリカゲル肥料では, 平均値は質量分率 79.37 % ~ 89.58 %, SD_r 及び SD_R は質量分率 0.23 % ~ 0.46 % 及び質量分率 0.51 % ~ 0.85 %, RSD_r 及び RSD_R は 0.3 % ~ 0.5 % 及び 0.6 ~ 1.0, $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ 0.51 ~ 1.00 及び 0.54 ~ 0.93 であった. シリカゲル肥料を含む肥料では, 平均値は質量分率 6.09 % ~ 33.37 %, SD_r 及び SD_R は質量分率 0.13 % ~ 0.27 % 及び質量分率 0.22 % ~ 1.26 %, RSD_r 及び RSD_R は 0.5 % ~ 2.2 % 及び 3.7 % ~ 5.6 %, $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ 0.52 ~ 1.58 及び 1.21 ~ 2.23 であった¹²⁾.

シリカゲル肥料を含む肥料の共同試験において 2 試料の RSD_R が 1 % を超え, それらの RSD_R はシリカゲル肥料おける RSD_R に比較して大きかった. また, それぞれの RSD_r に対する RSD_R 算出したところ, シリカゲル肥料では 1.3 ~ 2.4 であったが, シリカゲル肥料を含む肥料では 1.8 ~ 8.7 であり, そのうち 3 試料が 6.5 以上と大きかった¹⁰⁾. よって, 試験室間の操作について聞き取り調査を実施したところ, 試料溶液 (2) の調製において水酸化ナトリウム溶液 (20 g/L) で処理後のろ過における残渣を十分に洗浄するためには熟練を要することが判明した.

Table 5 Statistical analysis of collaborative result for base-soluble silicic acid in silica gel fertilizers

Material	No. of lab. ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	SD_r ⁴⁾ (%)	RSD_r ⁵⁾ (%)	$HorRat_r$ ⁶⁾	SD_R ⁷⁾ (%)	RSD_R ⁸⁾ (%)	$HorRat_R$ ⁹⁾
Silica gel fertilizer 1	8	79.37	0.23	0.3	0.51	0.55	0.7	0.61
Silica gel fertilizer 2	8	84.68	0.42	0.5	0.92	0.85	1.0	0.93
Silica gel fertilizer 3	8	89.58	0.40	0.4	0.84	0.51	0.6	0.54
Silica gel fertilizer 4	8	84.44	0.37	0.4	0.81	0.77	0.9	0.84
Silica gel fertilizer 5	8	85.77	0.46	0.5	1.00	0.59	0.7	0.64

1) Number of accepted laboratories

2) Grand mean (n =number of laboratories \times number of samples (2))

3) Mass fraction

4) Relative standard deviation

5) Repeatability relative standard deviation

6) Repeatability HorRat value

7) Relative standard deviation

8) Reproducibility relative standard deviation

9) Reproducibility HorRat value

Table 6 Statistical analysis of collaborative result for acid-soluble and base-soluble silicic acid in silica gel-including fertilizers

Material	No. of lab. ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	SD _r ⁴⁾ (%)	RSD _r ⁵⁾ (%)	HorRat _r ⁶⁾	SD _R ⁷⁾ (%)	RSD _R ⁸⁾ (%)	HorRat _R ⁹⁾
Phosphate fertilizer mixture 1	8	25.60	0.13	0.5	0.52	1.13	4.4	2.23
Phosphate fertilizer mixture 2	8	33.37	0.19	0.6	0.67	1.26	3.8	2.19
Compound fertilizer 1	8	12.43	0.27	2.2	1.58	0.69	5.6	2.04
Compound fertilizer 2	8	6.09	0.13	2.1	1.35	0.22	3.7	1.21
Compound fertilizer 3	8	22.91	0.13	0.5	0.52	0.87	3.8	1.82

* The footnote are showed in Table 5

4. まとめ

8 試験室においてシリカゲル肥料 5 試料(10 点)及びシリカゲル肥料を含む肥料, 混合りん酸肥料 2 試料, 化成肥料 3 試料(計 10 点)を用いて可溶性けい酸の共同試験を実施し, 各試験法の評価を行った. その結果, シリカゲル肥料において室間再現精度(相対標準偏差)は 0.6 %~1.0 %であり, 満足する成績であった.

しかしながら, シリカゲル肥料を含む肥料における室間再現精度(相対標準偏差)は 3.7 %~5.6 %と大きかった. この原因を調査したところ, 水酸化ナトリウム溶液(20 g/L)で処理後のろ過における残渣を十分に洗浄し, 安定した成績を得るするためには熟練を要することが判明した.

既報により単一試験室による妥当性の確認が実施されており, シリカゲル肥料のための試験法は可溶性けい酸の測定に用いることができる十分な性能を有する事が確認された. これらのことから, 2011 年度肥料等技術検討会の審議を受け, 肥料等試験法に正式に収載された⁴⁾. しかしながら, シリカゲル肥料含む肥料中の可溶性けい酸の試験法は満足する再現精度が得られなかったため, 肥料等試験法から削除された. シリカゲル肥料含む肥料中の可溶性けい酸の試験法は一部改良して再度単一試験室の妥当性確認を実施することとした.

謝 辞

共同試験にご協力頂きました, 全国農業協同組合連合会(JA 全農), 財団法人日本肥糧検定協会本部, 財団法人日本肥糧検定協会関西支部の各位に謝意を表します.

文 献

- 1) 農林水産省告示:肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日, 農林水産省告示第 284 号, 最終改正平成 22 年 4 月 9 日, 農林省告示第 589 号 (2010)
- 2) 農林水産省告示:肥料取締法第十七条第一項第三号の規定に基づき, 肥料取締法第四条第一項第三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, 最終改正平成 13 年 3 月 15 日, 農林水産省告示第 337 号 (2001)
- 3) 橋本健志, 清水昭, 岡田かおり:シリカゲル肥料中の可溶性けい酸測定 —ふっ化カリウム法の適用—, 肥料研究報告, **3**, 19~24 (2010)
- 4) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2012)

< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html> >

- 5) 清水昭, 伊藤 潤, 阿部 進:シリカゲル肥料を含む肥料中の可溶性けい酸測定 —アルカリ抽出法の改良—, 肥料研究報告, **4**, 1~8 (2012)
- 6) Horwitz, W. :Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies. , Pure & Appl. Chem., **67** (2), 331~343 (1995)
- 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) AOAC OFFICIAL METHOD OF ANALYSIS Appendix D: Guideline for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 9) Thompson, M. : Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, Analyst, **125**, 385~386 (2000)
- 10) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix E: Laboratory Quality Assurance, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 11) Horwitz, W. , Kamps, L. R, Boyer, K.W. : Quality control. Quality assurance in the analysis of food for trace constituents, J.. AOAC Int., **63**(6), 1344~1354 (1980)
- 12) Codex Alimentarius: “Recommendation for a checklist of information required to evaluate method of analysis and submitted to the Codex Committee on Method of Analysis and Sampling for endorsement”, Vol.13, p.129 (1994)

Determination of Solubility Silicic Acid in Silica gel Fertilizer and Silica gel-including Fertilizer by Potassium Fluoride Method: A Collaborative Study

Akira SHIMIZU¹, Shin ABE² and Jun ITO¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

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

A collaborative study was conducted to evaluate the applicability of the method of potassium fluoride for determination of base-soluble silicic acid in silica gel fertilizer and acid-soluble and base-soluble silicic acid in silica gel-including fertilizer. Silicic acid in silica gel fertilizer was extracted with sodium hydroxide solution (0.5 mol/L). Silicic acid in silica gel-including fertilizer was extracted with hydrochloric acid (0.5 mol/L) and sodium hydroxide solution (0.5 mol/L) successively, and then each extract was mixed. The silicic acid in the extract from silica gel fertilizer and in the mixture from silica gel-including fertilizer was determined by potassium fluoride method.

Five samples of silica gel fertilizer and 5 samples of silica gel-including fertilizer, respectively, were sent to 8 collaborators. These samples were analyzed as blind duplicates by each method. Mean values reported from 79.37 % to 89.58 % for silica gel fertilizer, and for silica gel-including fertilizer these values ranged from 6.09 % to 33.37 %. For silica gel fertilizer, the relative standard deviation (RSD_r) for repeatability ranged from 0.3 % to 0.5 %, for silica gel-including fertilizer these values ranged from 0.5 % to 2.2 %. For silica gel fertilizer, the relative standard deviation (RSD_R) for reproducibility ranged from 0.6 % to 1.0 %, for silica gel-including fertilizer these values ranged from 3.7 % to 5.6 %.

These results indicated that the method for silica gel fertilizer has an acceptable precision for determination of base-soluble silicic acid in silica gel fertilizer. But the method for silica gel-including fertilizer showed an unacceptable precision for determination of acid-soluble and base-soluble silicic acid in silica gel-including fertilizer.

Key words available silicic acid, potassium fluoride method, silica gel, fertilizer, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **5**, 31~40, 2012)

4 焼成汚泥肥料中のクロム測定

— 共同試験成績 —

顯谷久典¹, 木村康晴², 竹葉佳己³

キーワード 焼成汚泥肥料, クロム, 原子吸光法, 過塩素酸

1. はじめに

現在, 農林水産消費安全技術センター (FAMIC) では, 肥料分析法¹⁾との整合性に配慮しながら新たに試験法の妥当性の確認を行い, 「肥料等試験法」²⁾を策定し, 肥料試験業務等への活用を進めている. 当試験法では焼成汚泥肥料中のクロム測定について, 肥料分析法の 5.8.2 D.a.1) (無機質肥料及びリン鉱石) に基づいた試料溶液調製法 (りん酸-硝酸-硫酸分解法) が検討され, 掲載されている. しかし, その後, 小規模試験室間試験を実施した結果, りん酸-硝酸-硫酸分解法では試験室間のばらつきが大きい等の問題が明らかになった. そこで, 焼成汚泥肥料中のクロム測定について, 肥料等試験法におけるひ素の試料溶液調製法で採用されている, 硝酸-硫酸-過塩素酸分解法を用い, アルカリ融解法との比較及び繰返し精度及び定量下限等の検討を行ったところ, 試験室内における試験方法の妥当性を確認した³⁾.

今回, 焼成汚泥肥料中のクロム測定における硝酸-硫酸-過塩素酸分解法の性能評価のため, 共通試料 (焼成汚泥肥料) を用いて共同試験を実施し, 試験室間の再現精度を確認したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料の調製

流通している焼成汚泥肥料 5 点を試験品として収集し, それぞれ 100 °C で 5 時間乾燥した後, 超遠心粉砕器 (Retsch ZM200) で目開き 500 µm の網ふるいを通過するまで粉砕して共同試験用試料それぞれ 60 袋を調製した.

各共同試験用試料約 1.5 g をビニール袋に採取し密封した. ブラインド試料を提供するため, それぞれの共同試験用試料の袋 (各 2 点) にランダムに番号を付し, 共同試験用試料 (10 点) を参加試験室に送付した.

2) 装置及び器具

各試験室に設置の原子吸光分析装置, 砂浴及びホットプレートを使用した.

3) クロムの測定

分析試料 1.00 g を量りとり, 200 mL~300 mL トールビーカーに入れ, 少量の水で試料を浸した後, 硝酸約 10 mL 及び硫酸約 5 mL を加え, 時計皿で覆い一夜放置した後, 170 °C~220 °C の砂浴上で穏やかに 30 分以上加熱後, 突沸が生じないように徐々に温度を上げ, 300 °C 以上で強熱し, 黄褐色煙が発生しなくなつてから砂浴から下ろした. 室温まで放冷後, 過塩素酸約 5 mL を加え, 時計皿で覆い, 徐々に温度を上げ, 300 °C 以上

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

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

で3時間以上加熱し、さらに時計皿をずらして液量が2 mL以下になるまで加熱した。放冷後、塩酸(1+10)約5 mL及び水約20 mLを残留物に加え、トールビーカーを時計皿で覆い、静かに加熱し溶解した。放冷後、水を用いて全量フラスコ100 mLに移し、標線まで水を加えた後、ろ紙3種でろ過し、試料溶液とした。その試料溶液の一定量(25 mL)を全量フラスコ100 mLにとり、干渉抑制剤溶液10 mLを加え、更に標線まで塩酸(1+17)を加え、原子吸光分析装置に導入し、波長357.9 nm又は波長359.3 nmの吸光度を測定し分析試料中のクロムの濃度を求めた(Scheme 1)。

測定にあたっては、各試験室の原子吸光分析装置の操作方法に従った。

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⁵⁾の均質性試験に従い、各系列の共同試験用試料からそれぞれ10試料を抜き取り、各試料につき2点併行で、2.3)に従って試験を実施した。

5) 共同試験

試験に参加した11試験室と使用した原子吸光分析装置及び測定波長は以下のとおりであり、それぞれの試験室において送付した10試料について2.3)に従って試験を実施した。

- ・小野田化学工業株式会社 新潟工場
(日立ハイテクノロジー Z-2300,359.3 nm)
 - ・内藤環境管理株式会社
(Agilent AA220,357.9 nm)
 - ・社団法人新潟県環境衛生中央研究所
(日立ハイテクノロジー Z-2000,359.3 nm)
 - ・財団法人日本肥糧検定協会 関西支部
(島津製作所 AA-6300,357.9 nm)
 - ・財団法人日本肥糧検定協会 本部
(島津製作所 AA-6300,357.9 nm)
 - ・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, 札幌センター, 仙台センター, 名古屋センター, 福岡センター及び本部肥飼料安全検査部
(日立ハイテクノロジー Z-2310,359.3 nm)
- (50音順)

Sample 1.00 g	Tall beaker 200 mL~300 mL
← Moisten with water	
← Nitric acid 10 mL	
← Sulfuric acid 5 mL	
Allow to stand a night	Cover with a watch glass
Heat	Cover with the watch glass and Heat 170 °C~220 °C over 30 minutes
Heat	Cover with the watch glass and heat over 300 °C until disappearance brown smoke
Allow to cool	Room temperature
← Perchloric acid 5 mL	
Heat	Cover with the watch glass and heat over 300 °C 2 hours~3 hours
Heat	Sift the watch glass to opening and concentrate the acid until under 2 mL
Allow to cool	Room temperature
← Water-hydrochloric acid (10:1) 5 mL	
← Water 20 mL	
Solution	Cover with the watch glass
Allow to cool	Room temperature
Be transferred	Volumetric flask 100 mL
← Fill up to 100 mL with water	
Filtrate	
Collect (25 mL)	Volumetric flask 100 mL
← Potassium pyrosulfate aqueous solution (100 g/L) 10 mL	
← Fill up to 100 mL with water-hydrochloric acid (17:1)	
Atomic absorption spectrometer	Wavelength 357.9 nm or 359.3 nm

Scheme 1 Analytical procedure for chromium in calcined sludge fertilizer

3. 結果および考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の成績及び繰返し2回×10試料の一元配置による分散分析から得られた統計量を Table 1 に示した。いずれの試料においても、F 値が $F(9, 10; 0.05)$ を下回ったことから、有意水準 5 %において試料間に有意な差は認められず⁴⁾、すべての分析試料が共同試験に用いることができる均質性を有していることを確認した。

Sample (calcined sludge fertilizer)	Average ¹⁾ (µg/g)	RSDr ²⁾ (%)	F value ³⁾	Critical value of F-distribution ⁴⁾
a	104	1.6	0.62	3.02
b	135	2.8	1.01	3.02
c	182	0.7	0.56	3.02
d	211	1.3	0.86	3.02
e	111	2.0	1.06	3.02

1) Average(n=20=10×The number of times of a repetition(2))

2) Relative standard deviation of repeatability

3) Variance ratio calculated with one-way analysis of variance

4) F(9,10:0.05)

2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験成績を Table 2 に示した。各系列の分析試料の試験結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{4, 6)}に従って統計処理した。試験成績の外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施したところ、11 試験室の試験成績のうち焼成汚泥肥料 a で 1 試験室、焼成汚泥肥料 b, c, d 及び e で 2 試験室の試験成績が外れ値と判別された。

Lab.	Sample a		Sample b		Sample c	
A	96.9	103	130	128	176	178
B	102	103	137	133	181	184
C	97.9	106	143	133	188	191
D	126	127	134	140	177	174
E	98.2	96.6	135	133	181	180
F	111	108	141	141	181	179
G	119	123	153 ²⁾	142 ²⁾	187	188
H	98.3	108	133	145	182	187
I	97.8	102	133	138	183	180
J	100	118	121 ²⁾	108 ²⁾	141 ¹⁾	158 ¹⁾
K	190 ¹⁾	132 ¹⁾	129	136	160 ²⁾	156 ²⁾

1) Outlier of Cochran test

2) Outlier of Grubbs tests

Table 2 (continued) (μg/g)

Lab.	Sample d		Sample e	
A	197	196	111 ¹⁾	161 ¹⁾
B	210	209	113	116
C	215	214	113	117
D	210	218	120	121
E	209	207	115	111
F	215	214	121	118
G	225	229	123	122
H	215	219	122	124
I	212	211	113	114
J	192 ¹⁾	217 ¹⁾	121 ¹⁾	102 ¹⁾
K	173 ²⁾	173 ²⁾	109	114

1) Outlier of Cochran test

2) Outlier of Grubbs tests

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した試験成績より算出した平均値, 併行標準偏差 (SD_f), 併行相対標準偏差 (RSD_f) 及び HorRat 値 ($HorRat_f$) 並びに室間再現標準偏差 (SD_R), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) 及び HorRat 値 ($HorRat_R$) を Table 3 に示した. HorRat 値は化学分析法の性能評価指標の一つとして用いられ, 現在のところ肥料に使用している事例が少ないが参考として記載した. $HorRat_f$ は $RSD_f/PRSD_f$ 及び $HorRat_R$ は $RSD_R/PRSD_R$ により求められる. なお, $PRSD_R$ は平均定量値から Horwitz の修正式⁷⁾により求め, $PRSD_f$ は Horwitz の修正式に係数 (1/2) を乗じて求めた^{8, 9)}. 外れ値を除外した試験成績の平均値は 107 μg/g ~ 213 μg/g であり, その SD_f 及び SD_R は 2.0 μg/g ~ 5.3 μg/g 及び 4.6 μg/g ~ 10.4 μg/g であり, RSD_f 及び RSD_R は 1.1 % ~ 5.0 % 及び 2.6 % ~ 9.7 % であった. また, $HorRat_f$ 及び $HorRat_R$ は 0.30 ~ 1.26 及び 0.36 ~ 1.22 であり, いずれも 2 以下でコーデックス委員会の分析精度の受け入れ基準を満たした¹⁰⁾.

Table 3 Collaborative study analysis results

Sample	Collaborators ¹⁾	Average ²⁾ (μg/g)	SD_f ³⁾ (μg/g)	RSD_f ⁴⁾ (%)	$HorRat_f$ ⁵⁾	SD_R ⁶⁾ (μg/g)	RSD_R ⁷⁾ (%)	$HorRat_R$ ⁸⁾
a	10 (1)	107	5.3	5.0	1.26	10.4	9.7	1.22
b	9 (2)	136	4.6	3.4	0.88	4.9	3.6	0.47
c	9 (2)	182	2.0	1.1	0.30	4.8	2.6	0.36
d	9 (2)	213	2.4	1.1	0.32	8.3	3.9	0.55
e	9 (2)	117	2.1	1.8	0.47	4.6	4.0	0.51

1) The number of participating testing laboratories ; (): The number of outliers

2) Average (n = The number of participating testing laboratories × The number of times of a repetition (2))

3) Standard deviation of repeatability

4) Relative standard deviation of repeatability

5) Horwitz ratio of repeatability

6) Standard deviation of reproducibility

7) Relative standard deviation of reproducibility

8) Horwitz ratio of reproducibility

4. まとめ

11 試験室において 5 銘柄(10 点)の焼成汚泥肥料を用いてクロム測定の実験を実施し、焼成汚泥肥料中のクロム試験法の評価を行った。その結果、室間再現精度(相対標準偏差)は 2.6 %~9.7 %であった。また、参考としてその評価に用いた室間再現 HorRat 値は 0.36~1.22 であった。このことから、試験室間の比較による本試験法の室間再現精度は満足する成績であり、本試験法は、焼成汚泥肥料中のクロム測定に用いることが出来る十分な性能を有していることが確認できた。

謝 辞

共同試験にご協力頂いた小野田化学工業株式会社 新潟工場、内藤環境管理株式会社、社団法人新潟県環境衛生中央研究所並びに財団法人日本肥糧検定協会 本部及び関西支部の各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992 年版), 財団法人日本肥糧検定協会, 東京(1992)
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 3) 顯谷久典, 竹葉佳己, 廣井利明:焼成汚泥肥料中のクロム測定 - 一ひ素測定の分解法の適用 -, 肥料研究報告, **4**, 23~29 (2011)
- 4) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 5) 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)
- 6) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guideline for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 7) Thompson, M.: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385~386 (2000)
- 8) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix E: Laboratory Quality Assurance, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 9) Horwitz, W., Kamps, L.R., Boyer, K.W.: Quality control. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. AOAC Int.*, **63** (6), 1344~1354 (1980)
- 10) Codex Alimentarius:CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL Twentieth edition, p66 (2011)

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

Hisanori ARAYA¹, Yasuharu KIMURA² and Yoshimi TAKEBA³

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

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

A collaborative study was conducted to evaluate atomic absorption spectrometry for determination of chromium in calcined sludge fertilizer. We validated a method using atomic absorption spectrometry for determination of chromium in calcined sludge fertilizer. The sample was digested by nitric acid, sulfuric acid and perchloric acid. Chromium was measured by an atomic absorption spectrometer at the wavelength of 357.9 nm or 359.3 nm, respectively. The samples of 5 kinds of calcined sludge fertilizers were sent to 11 collaborators. The samples were analyzed as blind duplicates. After removing the outlying data using Cochran and Grubbs outlier test, mean values were reported from 107 $\mu\text{g/g}$ to 213 $\mu\text{g/g}$ for each kind of samples. The relative standard deviation (RSD_r) for repeatability ranged from 1.1 % to 5.0 %. The relative standard deviation (RSD_R) for reproducibility ranged from 2.6 % to 9.7 %. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of chromium in calcined sludge fertilizer.

Key words chromium, calcined sludge fertilizer, atomic absorption spectrometry, perchloric acid

(Research Report of Fertilizer, **5**, 41~47, 2012)

5 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による

液状肥料中の6種農薬の同時測定

— 共同試験成績 —

八木寿治¹, 山西正将², 白井裕治¹, 柴田政人¹

キーワード 農薬, 家庭園芸用複合肥料, 液状複合肥料, 一斉分析法,
液体クロマトグラフタンデム型質量分析計, 共同試験

1. はじめに

肥料取締法¹⁾第 25 条に異物混入の禁止規定があるが, 液状の家庭園芸用複合肥料において, 混入が認められていない農薬成分が確認される事例が頻発している. 過去に混入が認められた事例から, 混入危険性の高い農薬成分として, アバメクチン, イベルメクチン, エプリノメクチン, ピレトリン, ロテノン及びピペロニルブトキシドの 6 種類が挙げられるが, 肥料の品質を保全し, その公正な取引と安全な施用の確保を担保するには, 当該農薬の検査・確認分析法の開発は急務である. このため, 先般, 当該農薬一斉試験法が新規開発され, 液状複合肥料にも適用範囲を拡大し, 併行精度, 定量下限等の検討を行い, ISO/IEC 17025²⁾で要求されている試験室内における試験方法の妥当性確認がなされたところである³⁾.

今般, 更に同基準の要求事項である試験所間の比較試験について, IUPAC の共同試験プロトコル⁴⁾を参考に, 共通試料(液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料)を用いて, 肥料中の 6 種農薬一斉試験法の共同試験を実施し, 試験室間再現精度を確認したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 試験対象成分

本共同試験の農薬分析対象成分としては Table 1 のとおりとした.

6 種農薬 7 種分析対象成分

2) 共同試験用試料の調製

試験対象成分の農薬を含有していない市販の液状の家庭園芸用複合肥料 3 銘柄, 液状複合肥料 2 銘柄(計 5 銘柄)を試験品として収集し, 冷蔵保管した. それぞれ試験品を容器内でよく混合した後, 約 7 mL をポリ容器に入れ, 密栓し試験用試料とした. 一対のブラインド試料を提供するため, それぞれの試験用試料の容器にランダムに番号のラベルを付けた. 試験用試料(10 点)を参加試験室に送付した.

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) 神戸センター

Table 1 The ingredient for analysis in this collaborative study

Kind of pesticide	Measuring ingredient	Molecular formula	MW	CAS No.
Abamectin	Abamectin B1a	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	873.1	65195-55-3
Ivermectin	Ivermectin B1a	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄	875.1	70161-11-4
Eprinomectin	Eprinomectin B1a	C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₄	914.1	133305-88-1
Rotenone	Rotenone	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	394.4	83-79-4
Piperonylbutoxide	Piperonylbutoxide	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	338.4	51-03-6
Pyrethrin	Pyrethrin I	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	328.5	121-21-1
	Pyrethrin II	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	372.5	121-29-9

3) 添加用混合標準液の調製

市販されている試験対象成分の各農薬をアセトニトリルに溶解し添加用混合標準液を調製した。液状の家庭園芸用複合肥料 3 銘柄に添加するための添加用混合標準液を 3 濃度、液状複合肥料 2 銘柄に添加するための添加用混合標準液を 2 濃度用意した。添加用混合標準液約 1.8 mL をガラス容器に入れ、密栓し試験用試料に添加するための添加用混合標準液とした。一対のブラインドの添加用混合標準液を提供するため、それぞれの添加用混合標準液の容器にランダムに番号のラベルを付けた。添加用混合標準液(10 点)を参加試験室に送付した。なお、各試料への添加濃度は Table 4 に示した。

4) 器具及び装置

試料溶液調製時の精製には多孔性けいそう土カートリッジカラム(Varian Chem Elut (5 mL 容))及びグラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラム(Supelco Envi-carb/LC-NH₂ (500 mg/500 mg, 6 mL 容))を、超音波処理装置、ロータリーエバポレーター及び液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)は各試験室に設置しているものを使用した。

5) 試料溶液の調製及び測定

(1) 抽出

分析試料 5 mL を全量フラスコ 10 mL に入れ、添加用混合標準液 1 mL (溶媒はアセトニトリル)を正確にとり同全量フラスコに加えた(添加の方法は次のとおり。試験用試料に振られている番号と同じ番号の添加用混合標準液を添加するものとした。例:試験用試料番号 3 の試料には添加用混合標準液番号 3 のものを添加。)。アセトニトリル 2 mL を正確にとり同全量フラスコに加え、標線まで水を加えてよく振り混ぜた。その後、超音波処理装置を用いて 5 分間超音波処理をし、抽出液とした。

(2) 精製1

抽出液 5 mL を正確にとり、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、5 分間保持させた。なすフラスコ 100 mL を同カートリッジカラムの下に置き、酢酸エチル約 5 mL を 4 回、順次同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溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、アセトニトリル-トルエン(3+1)2 mL を加えて残留物を溶かした。

(3) 精製2

グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラムを、予めアセトニトリル-トルエン(3+1)約 5 mL で 2 回洗浄した。なすフラスコ 100 mL を同カートリッジカラムの下に置き、先の溶解液を同カートリッジカラムに入れ、液面が

充てん剤の上端に達するまで流出させた。容器をアセトニトリル-トルエン(3+1)約 5 mL で 5 回洗浄し、洗液を順次同カートリッジカラムに加え流出させた。流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、メタノール 5 mL を全量ピペットで正確に加えて残留物を溶かした。溶解液の 4 mL を正確にとり、20 mL 全量フラスコに入れ、メタノールで定容した。当該溶液を測定に供する試料溶液とした。

(4) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

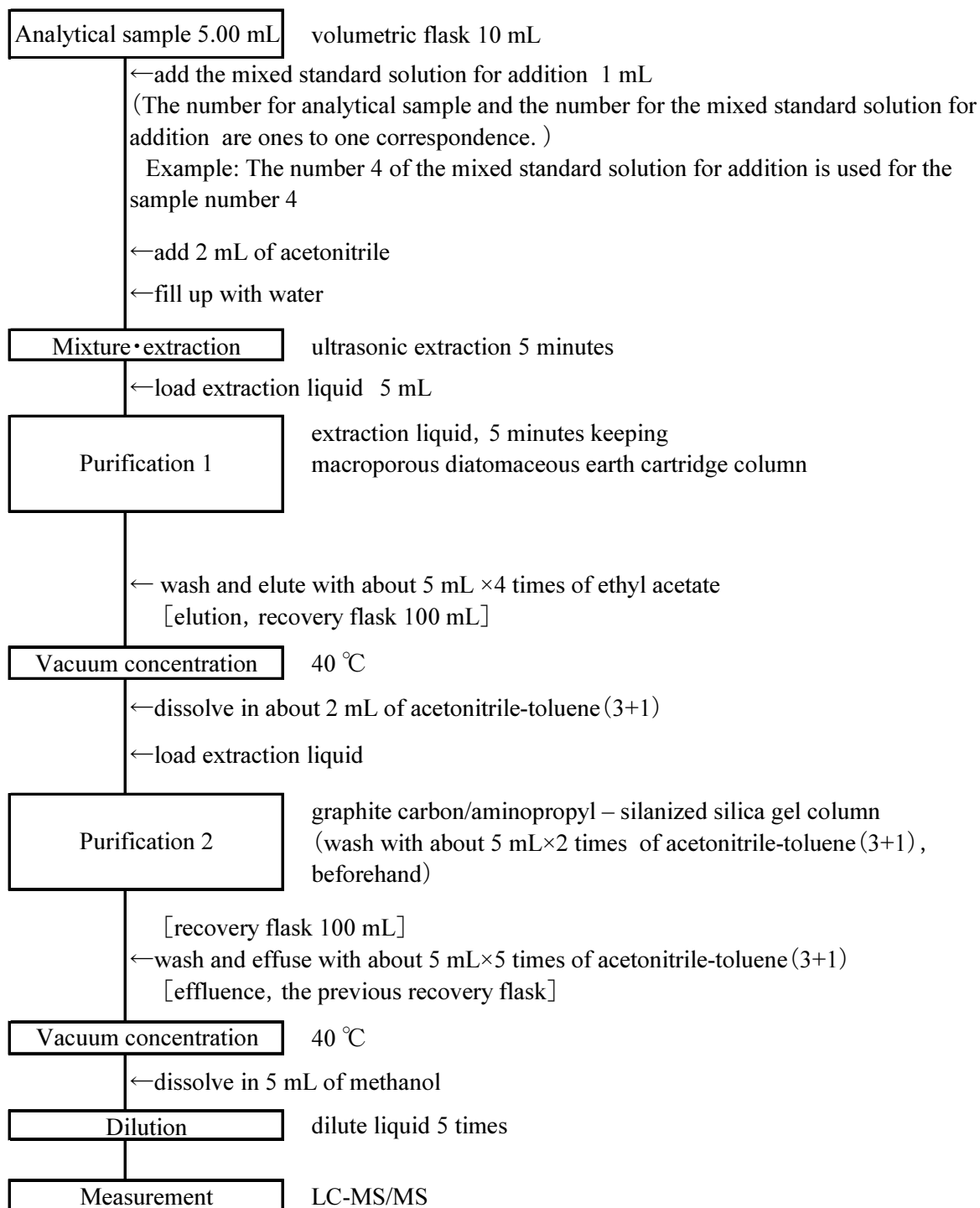
試料溶液及び検量線作成用混合標準液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得た。得られた選択反応検出クロマトグラムから各農薬のピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料溶液中の各農薬量を求め、分析試料中の各農薬濃度を算出した。なお、測定にあたっては、肥料等試験法 (2011) (現在は肥料等試験法 (2012) に更新されている。) ¹⁰⁾ 8.3.a 項を参照し各試験室の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の操作方法に従い、測定値を求め、比重(密度)を用いた単位質量あたりの各農薬濃度の算出は実施主体で一括して行った。

定量法の概要を Scheme 1 に示した。

6) 共同試験

次の 8 試験室において、送付した試験用試料 10 点を 2.5) に従って共同試験を実施した。

- ・ 株式会社島津製作所
 - ・ 財団法人日本食品分析センター
 - ・ ジーエルサイエンス株式会社
 - ・ 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, 仙台センター, 名古屋センター, 福岡センター, 本部
- (50 音順)



Scheme 1 Collaborative testing operating procedure for simultaneous determination

3. 結果及び考察

1) 共同試験成績

各試験室から報告された共同試験成績を Table 2 に示した. 各系列の分析試料の試験結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{4, 5)}に従って統計処理した. なお, 解析に用いる試験室数は 8 試験室以上が推奨されているため試験成績の外れ値の検定は行わなかった.

参考のため, 共同試験で使用された液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の機種等を Table 3 に示した.

2) 併行精度及び室間再現精度

試験成績より算出した平均値, 併行精度(相対標準偏差(RSD_r))及びその HorRat 値($HorRat_r$)並びに室間再現精度(相対標準偏差(RSD_R))及びその HorRat 値($HorRat_R$)を Table 4 に示した. HorRat 値は分析方法の精度の評価をするために用いられており, 現在のところ肥料に使用している事例は少ないが参考に記載した. $HorRat_r$ は $RSD_r/PRSD_r$ 及び $HorRat_R$ は $RSD_R/PRSD_R$ により求められる. なお, $PRSD_R$ は平均定量値から Horwitz 修正式⁶⁾より求め, $PRSD_r$ は Horwitz 修正式に係数(5/8)を乗じて求めた^{7, 8)}.

アバメクチン B1a の平均回収率は 81.1~86.6 %であり, それらの RSD_r 及び RSD_R は 13.4 %以下及び 14.8 %以下であった. また, RSD_r 及び RSD_R の評価に用いる $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ は 1.15 以下及び 0.79 以下であり, いずれも 2 以下であった⁹⁾.

イベルメクチン B1a の平均回収率は 81.0~91.8 %であり, それらの RSD_r 及び RSD_R は 14.9 %以下及び 19.3 %以下であった. また, RSD_r 及び RSD_R の評価に用いる $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ は 1.24 以下及び 1.04 以下であり, いずれも 2 以下であった⁹⁾.

エプリノメクチン B1a の平均回収率は 79.6~88.1 %であり, それらの RSD_r 及び RSD_R は 9.2 %以下及び 14.3 %以下であった. また, RSD_r 及び RSD_R の評価に用いる $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ は 0.79 以下及び 0.77 以下であり, いずれも 2 以下であった⁹⁾.

ロテノンの平均回収率は 77.0~85.3 %であり, それらの RSD_r 及び RSD_R は 11.0 %以下及び 12.5 %以下であった. また, RSD_r 及び RSD_R の評価に用いる $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ は 0.90 以下及び 0.67 以下であり, いずれも 2 以下であった⁹⁾.

ピペロニルブトキシドの平均回収率は 87.2~95.5 %であり, それらの RSD_r 及び RSD_R は 8.4 %以下及び 13.6 %以下であった. また, RSD_r 及び RSD_R の評価に用いる $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ は 0.73 以下及び 0.74 以下であり, いずれも 2 以下であった⁹⁾.

ピレトリン I の平均回収率は 80.0~87.0 %であり, それらの RSD_r 及び RSD_R は 12.6 %以下及び 12.8 %以下であった. また, RSD_r 及び RSD_R の評価に用いる $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ は 0.99 以下及び 0.63 以下であり, いずれも 2 以下であった⁹⁾.

ピレトリン II の平均回収率は 81.5~89.0 %であり, それらの RSD_r 及び RSD_R は 10.8 %以下及び 13.6 %以下であった. また, RSD_r 及び RSD_R の評価に用いる $HorRat_r$ 及び $HorRat_R$ は 0.82 以下及び 0.65 以下であり, いずれも 2 以下であった⁹⁾.

Table 2-1 Collaborative study results of abamectin B1a (µg/kg)

Lab. ¹⁾	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
A	255.4	249.7	312.9	390.4	429.0	424.0
B	315.1	269.2	408.4	341.7	470.7	460.4
C	255.3	304.4	330.1	292.6	411.9	399.2
D	286.8	266.3	309.8	316.1	380.8	433.5
E	258.3	276.2	371.6	349.4	416.4	383.7
F	290.5	419.4	382.8	498.7	438.6	545.1
G	302.3	299.3	329.0	413.8	436.6	464.1
H	289.6	251.6	378.5	316.5	395.6	323.6
Lab.	Fluid mixed fertilizer 1		Fluid mixed fertilizer 2			
A	256.0	274.8	403.7	439.0		
B	294.4	276.5	450.3	393.6		
C	311.2	290.3	396.7	398.3		
D	284.7	280.6	445.9	428.8		
E	274.2	259.3	412.2	391.3		
F	302.0	353.0	377.5	433.6		
G	262.7	314.8	422.2	352.5		
H	296.9	286.7	370.1	372.6		

1) The code of laboratory which participated in the collaborative study

Table 2-2 Collaborative study results of ivermectin B1a (µg/kg)

Lab. ¹⁾	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
A	251.8	269.6	323.3	335.7	381.6	391.3
B	322.3	288.0	390.0	369.8	424.6	459.5
C	237.1	310.8	337.4	297.0	412.2	434.4
D	278.8	273.5	313.3	323.6	412.6	401.6
E	257.2	300.8	364.4	356.3	430.6	385.7
F	291.4	415.8	410.7	520.4	415.3	561.0
G	333.3	294.1	382.5	448.1	460.7	499.0
H	367.8	290.4	557.0	390.8	436.0	391.1
Lab.	Fluid mixed fertilizer 1		Fluid mixed fertilizer 2			
A	259.2	259.3	390.8	392.6		
B	303.1	283.1	426.2	440.6		
C	322.8	302.4	405.6	416.7		
D	276.5	259.8	424.6	437.5		
E	277.0	255.5	422.3	410.4		
F	298.1	368.8	364.5	392.3		
G	275.8	360.3	406.1	371.1		
H	323.9	355.3	408.3	373.5		

1) Refer to the footnote 1 of Table 2-1

Table 2-3 Collaborative study results of eprinomectin B1a (µg/kg)

Lab. ¹⁾	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
A	264.0	303.9	332.2	365.8	405.1	433.2
B	309.7	283.1	404.6	321.5	433.4	458.6
C	264.3	298.4	343.9	291.8	411.2	414.7
D	292.8	282.4	293.4	317.2	391.9	419.4
E	251.6	249.0	355.8	313.6	399.7	352.8
F	313.8	366.6	415.0	481.8	428.5	522.9
G	325.1	314.6	382.4	391.5	486.6	463.5
H	296.6	279.8	397.0	383.2	399.6	384.3
Lab.	Fluid mixed fertilizer 1		Fluid mixed fertilizer 2			
A	281.3	270.6	423.8	434.3		
B	300.9	227.6	491.7	408.0		
C	310.3	288.8	395.2	401.0		
D	273.0	260.4	425.0	432.2		
E	232.7	225.0	340.3	335.5		
F	295.7	330.9	416.0	431.1		
G	310.5	304.2	403.6	327.7		
H	237.3	288.3	370.1	336.4		

1) Refer to the footnote 1 of Table 2-1

Table 2-4 Collaborative study results of rotenone (µg/kg)

Lab. ¹⁾	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
A	266.1	248.8	330.8	341.5	375.7	438.3
B	270.2	252.7	359.2	331.4	420.9	442.3
C	293.6	280.1	363.9	309.2	452.6	463.3
D	265.4	281.8	317.5	300.8	390.7	412.6
E	260.2	249.1	353.7	285.4	425.7	366.3
F	319.9	294.9	406.8	413.8	453.7	462.3
G	304.4	279.1	338.4	402.0	493.6	437.8
H	301.0	261.8	440.0	361.9	410.6	379.2
Lab.	Fluid mixed fertilizer 1		Fluid mixed fertilizer 2			
A	242.9	233.6	311.7	355.5		
B	296.2	239.9	414.9	411.5		
C	302.2	273.4	399.5	431.7		
D	268.6	244.1	414.1	397.4		
E	258.7	227.8	368.0	351.0		
F	297.3	309.1	475.8	441.2		
G	318.3	238.4	375.7	322.2		
H	214.7	251.2	350.4	342.2		

1) Refer to the footnote 1 of Table 2-1

Table 2-5 Collaborative study results of piperonylbutoxide (µg/kg)

Lab. ¹⁾	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
A	260.9	269.5	321.4	355.7	367.1	415.5
B	334.4	309.6	420.1	380.4	472.7	492.8
C	319.6	318.8	398.8	336.9	469.5	487.4
D	296.3	308.5	348.7	354.2	423.3	450.5
E	271.9	285.1	372.7	360.9	436.1	396.3
F	317.9	334.7	431.0	445.8	461.7	491.9
G	340.3	352.3	390.5	452.1	506.2	495.0
H	433.6	337.4	521.8	438.7	410.0	428.8
Lab.	Fluid mixed fertilizer 1		Fluid mixed fertilizer 2			
A	237.8	265.3	370.3	420.4		
B	328.8	287.3	490.6	444.8		
C	335.0	317.3	428.4	469.5		
D	285.9	275.6	456.8	446.3		
E	278.3	262.2	421.4	408.6		
F	311.4	318.8	464.1	469.2		
G	324.8	342.9	444.1	385.5		
H	279.3	344.8	420.5	433.1		

1) Refer to the footnote 1 of Table 2-1

Table 2-6 Collaborative study results of pyrethrin I (µg/kg)

Lab. ¹⁾	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
A	141.8	156.3	173.9	215.6	204.0	231.1
B	167.1	165.6	232.0	198.5	249.5	260.3
C	149.3	162.8	193.7	166.8	229.8	236.3
D	159.3	193.3	188.3	181.6	234.3	237.0
E	147.6	147.2	204.3	179.1	232.2	198.4
F	175.3	168.8	215.8	231.4	244.1	255.7
G	124.2	148.3	162.9	229.5	226.4	213.9
H	200.9	163.2	249.6	212.5	196.3	207.8
Lab.	Fluid mixed fertilizer 1		Fluid mixed fertilizer 2			
A	137.3	154.7	196.7	240.6		
B	178.0	155.5	258.8	230.6		
C	178.0	163.2	214.4	234.7		
D	154.5	155.7	231.0	239.9		
E	149.7	141.6	224.8	224.7		
F	184.1	165.4	247.8	211.7		
G	170.2	172.1	228.7	196.1		
H	125.9	145.4	201.6	187.7		

1) Refer to the footnote 1 of Table 2-1

Table 2-7 Collaborative study results of pyrethrin II (µg/kg)

Lab. ¹⁾	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
A	111.6	123.5	135.8	166.7	163.5	182.6
B	131.5	135.1	186.6	156.3	200.1	214.3
C	132.1	139.4	159.8	134.7	186.3	197.9
D	136.3	135.6	149.7	146.7	179.6	186.3
E	117.0	117.1	161.1	144.9	181.7	158.5
F	137.0	143.1	186.0	190.3	186.3	202.3
G	115.2	127.8	141.4	167.3	173.0	169.3
H	161.7	134.3	211.6	173.2	165.3	165.9
Lab.	Fluid mixed fertilizer 1		Fluid mixed fertilizer 2			
A	116.8	122.2	163.1	182.3		
B	136.8	118.7	200.3	187.7		
C	138.1	121.3	178.1	189.8		
D	125.8	114.0	171.5	192.6		
E	118.1	112.7	178.5	177.3		
F	140.1	131.5	191.2	195.4		
G	159.2	141.5	196.9	168.9		
H	101.7	120.8	161.3	148.1		

1) Refer to the footnote 1 of Table 2-1

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Lab. ¹⁾	LC	MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters ACQUITY UPLC System	Waters Quattro Premier XE	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm ×50 mm, 1.7 µm)
2	Waters Alliance2695	Waters Micromass Quattro micro API	Waters Atlantis dC18 (2.1 mm ×100 mm, 3 µm)
3	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	KANTO Chemical Mightysil RP-18GP (2.0 mm ×150 mm, 3 µm)
4	Waters ACQUITY Ultra Performance LC	Waters Xevo TQ MS	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm ×100 mm, 1.7 µm)
5	Shimadzu LCMS-8030 System	Shimadzu LCMS-8030	Shimadzu Shim-Pak XR-ODS II (2.0 mm ×100 mm, 2.2 µm)
6	Waters ACQUITY UPLC System	Waters Quattro Premier XE	Waters ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm ×100 mm, 1.8 µm)
7	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Waters ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm ×100 mm, 1.8 µm)
8	GL Sciences LC800	AB SCIEX API4001Q trap	GL Sciences InertSustain C18 (2.1 mm ×100 mm, 2 µm)

1) The number of laboratory which participated in the collaborative study

Table 4 The analysis results of collaborative study results

Agricultural chemical	Sample	Lab. number ¹⁾	Average ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	RSD _r ³⁾ (%)	RSD _R ⁴⁾ (%)	HorRat _r ⁵⁾	HorRat _R ⁶⁾
Abamectin B1a	Home garden-use mixed fertilizer 1	8	286.8	333.3	86.1	13.3	14.4	1.10	0.75
	Home garden-use mixed fertilizer 2	8	358.9	416.7	86.1	13.4	14.8	1.15	0.79
	Home garden-use mixed fertilizer 3	8	425.8	500.0	85.2	8.6	11.6	0.76	0.64
	Fluid mixed fertilizer 1	8	288.6	333.3	86.6	7.1	8.5	0.59	0.44
	Fluid mixed fertilizer 2	8	405.5	500.0	81.1	7.1	7.2	0.62	0.39
Ivermectin B1a	Home garden-use mixed fertilizer 1	8	298.9	333.3	89.7	14.9	15.0	1.24	0.78
	Home garden-use mixed fertilizer 2	8	382.5	416.7	91.8	14.1	19.3	1.22	1.04
	Home garden-use mixed fertilizer 3	8	431.1	500.0	86.2	9.8	10.9	0.87	0.60
	Fluid mixed fertilizer 1	8	298.8	333.3	89.6	10.1	12.8	0.85	0.67
	Fluid mixed fertilizer 2	8	405.2	500.0	81.0	3.8	5.8	0.33	0.32
Eprinomectin B1a	Home garden-use mixed fertilizer 1	8	293.5	333.3	88.1	7.0	10.4	0.58	0.54
	Home garden-use mixed fertilizer 2	8	361.9	416.7	86.9	9.2	14.3	0.79	0.77
	Home garden-use mixed fertilizer 3	8	425.3	500.0	85.1	7.0	10.0	0.61	0.55
	Fluid mixed fertilizer 1	8	277.3	333.3	83.2	9.0	12.0	0.75	0.62
	Fluid mixed fertilizer 2	8	398.2	500.0	79.6	7.5	11.6	0.65	0.63
Rotenone	Home garden-use mixed fertilizer 1	8	276.8	333.3	83.1	5.7	7.8	0.47	0.40
	Home garden-use mixed fertilizer 2	8	353.5	416.7	84.8	9.8	12.5	0.83	0.67
	Home garden-use mixed fertilizer 3	8	426.6	500.0	85.3	6.6	8.5	0.58	0.47
	Fluid mixed fertilizer 1	8	263.5	333.3	79.1	11.0	12.3	0.90	0.63
	Fluid mixed fertilizer 2	8	385.2	500.0	77.0	5.7	12.1	0.49	0.66
Piperonylbutoxide	Home garden-use mixed fertilizer 1	8	318.2	333.3	95.5	8.1	13.2	0.68	0.70
	Home garden-use mixed fertilizer 2	8	395.6	416.7	94.9	8.4	13.6	0.73	0.74
	Home garden-use mixed fertilizer 3	8	450.3	500.0	90.1	4.6	9.3	0.41	0.52
	Fluid mixed fertilizer 1	8	299.7	333.3	89.9	7.4	11.0	0.62	0.57
	Fluid mixed fertilizer 2	8	435.8	500.0	87.2	5.8	7.4	0.51	0.41
Pyrethrin I	Home garden-use mixed fertilizer 1	8	160.7	186.0	86.4	9.3	11.9	0.71	0.57
	Home garden-use mixed fertilizer 2	8	202.2	232.5	87.0	12.6	12.8	0.99	0.63
	Home garden-use mixed fertilizer 3	8	228.6	279.0	81.9	5.4	8.8	0.43	0.44
	Fluid mixed fertilizer 1	8	158.2	186.0	85.1	6.8	10.4	0.51	0.49
	Fluid mixed fertilizer 2	8	223.1	279.0	80.0	8.5	9.1	0.68	0.45
Pyrethrin II	Home garden-use mixed fertilizer 1	8	131.1	147.3	89.0	6.5	9.7	0.48	0.45
	Home garden-use mixed fertilizer 2	8	163.2	184.2	88.6	10.8	13.6	0.82	0.65
	Home garden-use mixed fertilizer 3	8	182.0	221.0	82.4	5.4	8.9	0.42	0.43
	Fluid mixed fertilizer 1	8	126.2	147.3	85.7	7.8	11.4	0.57	0.52
	Fluid mixed fertilizer 2	8	180.2	221.0	81.5	6.3	8.3	0.49	0.40

1) The number of collaborative laboratories used for analysis

2) Total average ($n = \text{lab. number} \times \text{repetitions number} (2)$)

3) Repeatability (relative standard deviation)

4) Reproducibility (relative standard deviation)

5) Repetition HorRat

6) Interlaboratory reproduction HorRat

4. まとめ

8 試験室において5 銘柄(液状の家庭園芸用複合肥料3 銘柄, 液状複合肥料2 銘柄)の肥料を用い, Table 4 に示した濃度相当量を添加して 6 種農薬の共同試験を実施し, 本分析法の評価を行った. その結果, アバメクチン B1a の平均回収率は 81.1 %~86.6 %であり, 室間再現精度(相対標準偏差)が 14.8 %以下, その評価に用いる HorRat_r 値は 0.79 以下, イベルメクチン B1a の平均回収率は 81.0 %~91.8 %であり, 室間再現精度(相対標準偏差)が 19.3 %以下, その評価に用いる HorRat_r 値は 1.04 以下, エプリノメクチン B1a の平均回収率は

79.6 %～88.1 %であり、室間再現精度(相対標準偏差)が 14.3 %以下、その評価に用いる HorRat_R 値は 0.77 以下、ロテノンの平均回収率は 77.0 %～85.3 %であり、室間再現精度(相対標準偏差)が 12.5 %以下、その評価に用いる HorRat_R 値は 0.67 以下、ピペロニルブトキシドの平均回収率は 87.2 %～95.5 %であり、室間再現精度(相対標準偏差)が 13.6 %以下、その評価に用いる HorRat_R 値は 0.74 以下、ピレトリン I の平均回収率は 80.0 %～87.0 %であり、室間再現精度(相対標準偏差)が 12.8 %以下、その評価に用いる HorRat_R 値は 0.63 以下、ピレトリン II の平均回収率は 81.5 %～89.0 %であり、室間再現精度(相対標準偏差)が 13.6 %以下、その評価に用いる HorRat_R 値は 0.65 以下であり、いずれも 2 を下回った。このことから、試験所間の比較による本分析法の室間再現精度は満足する成績であった。

既報により併行精度、検量線の直線性範囲及び定量下限等の検討がなされており、本試験法は液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料中の 6 種農薬の同時測定に用いることができる十分な性能を有することが確認された。このことから、2011 年度肥料等技術検討会の審議を受け、本試験法の妥当性確認の事項は肥料等試験法(2012)に記載された¹⁰⁾。

謝 辞

共同試験にご協力頂いた株式会社島津製作所、財団法人日本食品分析センター及びジーエルサイエンス株式会社の各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 肥料取締法:昭和 25 年 5 月 1 日, 法律第 127 号, 最終改正 平成 23 年 8 月 30 日, 法律第 105 号 (2011)
- 2) ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (1999)
- 3) 八木寿治, 山西正将, 白井裕治:液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC/MS/MS)による液状肥料中の農薬の同時測定, 肥料研究報告, **4**, 36~48 (2011)
- 4) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 5) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guideline for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 6) Thompson, M.: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385~386 (2000)
- 7) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix E: Laboratory Quality Assurance, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 8) Horwitz, W., Kamps, L.R., Boyer, K.W.: Quality control. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. AOAC Int.*, **63** (6), 1344~1354 (1980)
- 9) Codex Alimentarius: CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL Twentieth edition, p.66 (2011)
- 10) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2012)
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html> >

**Simultaneous Determination of Six Kinds of Agricultural Chemicals in Fluid Fertilizer
by Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)
: A Collaborative Study**

Toshiharu YAGI¹, Masayuki YAMANISHI², Yuji SHIRAI¹ and Masato SHIBATA¹

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

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Kobe Regional Center

A collaborative study was conducted to evaluate analysis by liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) for simultaneous determination of agricultural chemicals (abamectin, ivermectin, eprinomectin, rotenone, piperonylbutoxide and pyrethrin) in fluid fertilizers (fluid home garden-use mixed fertilizer and fluid mixed fertilizer). The fluid fertilizer that contains agricultural chemicals was purified with macroporous diatomaceous earth cartridge column and graphite carbon/aminopropyl – silanized silica gel column, and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The LC separation was carried out on a C18 column using solvent gradient with formic acid ammonium solution (0.1 mmol/L) – formic acid solution (0.1 v/v%)[1+1] and formic acid acetonitrile solution (0.1 v/v%) as a mobile phase. The determination was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode.

The samples of 5 kinds of fluid fertilizers and standard solutions for addition were sent to 8 collaborators. After standard solutions for addition were added to the samples, the samples were analyzed as blind duplicates. The means recovery, the repeatability relative standard deviation (RSD_t), the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) and the HorRat values (RSD_R/predicted RSD_R) of determination of abamectin(ingredient : abamectin B1a) were reported range from 81.1 % to 86.6 %, 7.1 % to 13.4 %, 7.2 % to 14.8 % and 0.39 to 0.79, respectively. Those of determination of ivermectin (ingredient : ivermectin B1a) were reported range from 81.0 % to 91.8 %, 3.8 % to 14.9 %, 5.8 % to 19.3 % and 0.32 to 1.04, respectively. Those of determination of eprinomectin (ingredient : eprinomectin B1a) were reported range from 79.6 % to 88.1 %, 7.0 % to 9.2 %, 10.0 % to 14.3 % and 0.54 to 0.77, respectively. Those of determination of rotenone were reported range from 77.0 % to 85.3 %, 5.7 % to 11.0 %, 7.8 % to 12.5 % and 0.40 to 0.67, respectively. Those of determination of piperonylbutoxide were reported range from 87.2 % to 95.5 %, 5.8 % to 8.4 %, 7.4 % to 13.6 % and 0.41 to 0.74, respectively. Those of determination of pyrethrin (ingredient : pyrethrin I) were reported range from 80.0 % to 87.0 %, 5.4 % to 12.6 %, 8.8 % to 12.8 % and 0.44 to 0.63, respectively. Those of determination of pyrethrin (ingredient : pyrethrin II) were reported range from 81.5 % to 89.0 %, 5.4 % to 10.8 %, 8.3 % to 13.6 % and 0.40 to 0.65, respectively. These results indicated that this method has acceptable precision.

Key words agricultural chemicals, fluid home garden-use mixed fertilizer, fluid mixed fertilizer, simultaneous determination, liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS), collaborative study

(Research Report of Fertilizer, 5, 48~59, 2012)

6 カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における

汚泥肥料連用の影響(続報)

舟津正人¹, 山西正将², 阿部文浩¹

キーワード 汚泥肥料, 連用試験, カドミウム

1. はじめに

肥料の公定規格¹⁾では汚泥肥料中の含有を許されるカドミウムの最大量は 0.0005 %と定められており, 汚泥肥料はこの範囲内において流通, 施用されている. 一方, 汚泥肥料の施用により土壌に負荷された重金属が蓄積し, 更に長期に施用すると土壌の保持力を超えて農作物へ移行し, 人畜に有害な農作物が生産されることが懸念されている. 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ている.

2009年夏から2010年冬にかけては, 汚泥肥料施用区及び標準区の2試験区に栽培前に施肥し, ニンジン, ホウレンソウ, ホウレンソウ, チンゲンサイの順で栽培し, 土壌中のカドミウム濃度の変化及び作物体へのカドミウム吸収量を確認した結果は既に肥料研究報告第4号²⁾で報告した. 2011年夏においては, カブを用いて前季と同様の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) 試験圃場及び供試土壌

試験は, 汚泥肥料の施用履歴がある土壌(汚泥肥料施用区)と施用履歴がない土壌(標準区)を供試土壌でそれぞれ2試験区2反復とし, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター岩槻圃場(埼玉県さいたま市)で行った. 供試土壌のうち汚泥肥料の施用履歴がある土壌は2004年度及び2006年度に汚泥肥料(し尿汚泥肥料及び下水汚泥肥料)を施用した. この時の汚泥肥料由来のカドミウム負荷量は, 試験区(4 m²)当たり約100 mgであった. その後2年間肥料成分のクリーニング作物としてギニアグラスを栽培し, 地上部は圃場外に持ち出した. 2009年度及び2011年度の試験開始時供試土壌の理化学性はTable 1に示した.

2) 供試肥料等

施用する汚泥肥料はし尿汚泥肥料を使用し, 補正肥料として特級試薬の硫酸アンモニウム, リン酸一アンモニウム及び塩化カリウムを使用した. 汚泥肥料及び補正肥料の各成分の分析は肥料等試験法³⁾によった. なお, 汚泥肥料中の0.1 mol/L塩酸可溶カドミウムは, 汚泥肥料1 gを0.1 mol/L塩酸50 mLで1時間振とうして抽出したカドミウムを原子吸光光度法により測定した⁴⁾. 汚泥肥料の分析結果はTable 2に, 補正肥料の成分量はTable 3に示した.

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

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)神戸センター

Table 1 Characteristics of soil used in this study

	Unit	Year	AP ¹⁾ -1	AP-2	SP ²⁾ -1	SP-2
pH (H ₂ O) ³⁾		2009 ⁴⁾	6.1	6.1	6.2	6.2
		2011 ⁵⁾	6.0	6.2	6.2	6.2
EC ⁶⁾	mS/m	2009	9.98	10.31	13.96	11.56
		2011	12.75	14.66	16.66	18.74
Acid-solubility-cadmium ⁷⁾	mg/kg	2009	0.18	0.19	0.18	0.21
		2011	0.17	0.16	0.14	0.14
Kind of soil			Andosol		Andosol	
Soil texture			Light clay		Light clay	

- 1) Sludge-fertilizer-application plot
- 2) Standard plot
- 3) Soil pH determined on 1:5 (soil:water) suspensions with a glass electrode
- 4) The year when the study was designed to evaluate the effects of sludge fertilizer applications on soil intended for long-term use
- 5) The year when this study was conducted
- 6) Soil electrical conductivity determined on 1:5 (soil:water) suspensions with an electrical conductivity meter.
- 7) Content of cadmium dissolved with 0.1 mol/L hydrochloric acid in the drying soil

Table 2 Properties of sludge fertilizer

Property	Unit	Content	Property	Unit	Content
Total nitrogen	%	3.31	Total copper	mg /kg	546
Total phosphorus ¹⁾	%	5.22	Total zinc	mg /kg	1,760
Total potassium ²⁾	%	0.36	Total cadmium	mg /kg	3.64
Total calcium ³⁾	%	2.14	Acid-solubility-cadmium ⁴⁾	mg /kg	3.24
Moisture	%	26.09			

- 1) Content as P₂O₅
- 2) Content as K₂O
- 3) Content as CaO
- 4) Content of cadmium dissolved with 0.1 mol/L hydrochloric acid

Table 3 Properties of the reagent

Property	Unit	Ammonium sulfate	Ammonium dihydrogenphosphate	Potassium chloride
Total nitrogen	%	21.1	12.0	—
Total phosphorus ¹⁾	%	—	61.5	—
Total potassium ²⁾	%	—	—	63.1

- 1) Content as P₂O₅
- 2) Content as K₂O

3) 試験区の構成

汚泥肥料施用区及び標準区は、1 試験区の面積を 4 m²(縦 2 m×横 2 m)とし、縦横 2 区ずつ計 4 試験区、汚泥肥料施用区と標準区を Fig. 1 のとおり配置した。施肥量は夏作のカブの施肥基準がある栃木県の施肥基

準⁵⁾を基に決定し、一試験区当たり窒素全量 60.0 g, リン酸全量 60.0 g, 加里全量 60.0 g とした. 汚泥肥料の施用量は, 窒素全量を基準に決定し, 50 %を汚泥肥料で施用し残りの 50 %を補正肥料で施用した. リン酸及び加里についても不足分は補正肥料を用いて調製した. 標準区については, 補正肥料を用いて汚泥肥料施用区と同じの成分量になるよう調製し施用した (Table 4 参照).

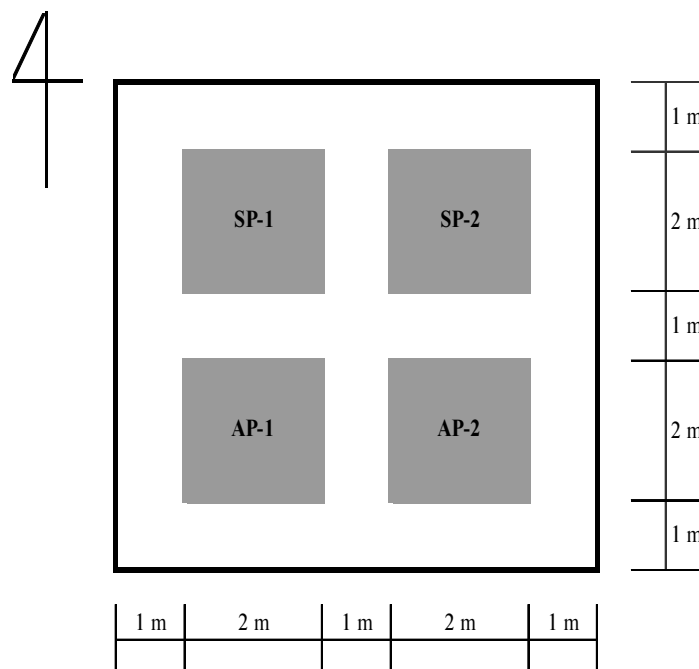


Fig.1 Plot plan of the test field

AP: Sludge-fertilizer-application plot

SP: Standard plot

Table 4 The design of the test plots

	Amount of application (g)	The applied components			
		N (g)	P ¹⁾ (g)	K ²⁾ (g)	Cd (mg)
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>					
Sluge fertilizer	906	30.0	47.3	3.3	3.30
Ammonium sulfate	130	27.5	—	—	—
Ammonium dihydrogenphosphate	21	2.5	12.7	—	—
Potassium chloride	90	—	—	56.7	—
Total		60.0	60.0	60.0	3.30
<Standard plot (SP)>					
Sluge fertilizer	—	—	—	—	—
Ammonium sulfate	229	48.3	—	—	—
Ammonium dihydrogenphosphate	98	11.7	60.0	—	—
Potassium chloride	95	—	—	60.0	—
Total		60.0	60.0	60.0	0.00

1) Content as P₂O₅

2) Content as K₂O

4) 栽培方法

供試作物はカブ(品種名:玉波)とした。各試験区の周辺部にはガードプランツとして供試作物を栽培した。施肥は播種11日前の2011年4月28日に、肥料と表層土約10kgを予め混合したものを試験区に均等に散布した後に耕耘機で深さ約15cmまで耕耘した。試験区内は9畝とし、播種は5月9日にシーダーテープ種子を用いて行った。間引きは5月25日及び5月30日に行い、収穫時の株間が約20cmとなるようにした。収穫は6月22日に行った。農薬散布はヨトウムシ等の害虫防除のため施肥時にダイアジノン粒剤、5月25日及び6月8日にアセフェート・クロチアニジン粒剤を散布した。雑草防除は手除草により適宜実施した。

5) 作物体のカドミウム濃度分析

収穫したカブは試験区毎に全株重量を測定して収量とした。分析用試料として試験区中央の3畝分全てを根部と葉部に切り分け、洗浄後に重量を測定し葉部は葉が重ならないように広げ、根部は薄く切り分けて自然乾燥した。その後、乾燥機により65℃で24時間乾燥を行い乾物重を測定した後、根部と葉部を別々に目開き1mmのふるいを通過するまで粉砕機で粉砕した。作物体のカドミウム含有量の分析は、試料0.5gに硝酸5mL及び過酸化水素2mLを加えマイクロ波分解装置(Multiwave 3000:Perkin Elmar製)⁶⁾で分解したものを全量フラスコ100mLに移し込んだ後、標線まで水を加えた物を試料溶液とし、ICP質量分析計(ICPM-8500:島津製作所製)により測定した。

6) 跡地土壌の分析

試験終了後、試験区の頂点から対角線を引き交点の位置を定め、更に交点と各頂点の midpoint (4点) を決定する。交点及び midpoint の5箇所から採土器(50mm×250mm:内径×長さ)を用いて表層から約15cmまでの土壌を採取し、全量を2mmのふるいを通過した後風乾し分析に供した。土壌pH及びECは風乾土壌に対して5倍量の水を加え30分間振とう後ろ過し、pHはガラス電極計(F-23:HORIBA製)により、ECは電気伝導率計(F-54:HORIBA社製)により測定した。土壌中のカドミウムは供試土壌と同様に0.1mol/L塩酸で1時間振とうして抽出したカドミウムをICP質量分析計により測定した。風乾した土壌は、乾土当たりのカドミウムを換算するためハロゲン水分計を用いて水分を測定した。

3. 結果

カブの収量及びカドミウム濃度・吸収量はTable 5に、跡地土壌の分析結果はTable 6に示した。播種から収穫までの試験期間は約2ヶ月であり、その間に異常な症状等は観察されなかった。

汚泥肥料施用区及び標準区の収量は、それぞれの平均は根部で8.900kgと9.350kg、葉部で8.725kgと9.950kgであり、根部・葉部共に標準区の収量が多くなる傾向が認められた。汚泥肥料施用区及び標準区のカドミウム濃度については、それぞれの平均が根部では両試験区とも0.084mg/kgであったが、葉部では0.160mg/kgと0.166mg/kgであり、両試験区において大きな差は認められなかった。汚泥肥料施用区及び標準区のカドミウム吸収量の平均は根部では両試験区とも0.044mg/試験区であったが、葉部では0.103mg/試験区と0.114mg/試験区となり、葉部の標準区は汚泥肥料施用区に比べて若干高くなる傾向が認められた。作物体全体のカドミウム吸収量の平均は汚泥肥料施用区で0.147mg、標準区で0.158mgとなり、両試験区間で明確な差は認められなかった。

土壌中の0.1mol/L塩酸で抽出したカドミウムは汚泥肥料施用区と標準区の違いがなく0.168~0.191

mg/kg であった。

Table 5 Absorbed amount of cadmium in the harvested turnip

	Part	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Mean value
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
Yield	Root	kg	8.50		9.30		8.90
	Leaf	kg	8.05		9.40		8.73
Cadmium concentration ¹⁾	Root	mg/kg	0.080	0.073	0.096	0.085	0.083
	Leaf	mg/kg	0.155	0.156	0.160	0.167	0.160
The amount of cadmium absorption	Root	mg/plot	0.045	0.041	0.047	0.041	0.043
	Leaf	mg/plot	0.098	0.098	0.104	0.109	0.102
	Total	mg/plot	0.143	0.139	0.151	0.151	0.146
<Standard plot (SP)>							
Yield	Root	kg	10.00		8.70		9.35
	Leaf	kg	10.85		9.05		9.95
Cadmium concentration ¹⁾	Root	mg/kg	0.084	0.081	0.083	0.084	0.083
	Leaf	mg/kg	0.162	0.163	0.160	0.176	0.165
The amount of cadmium absorption	Root	mg/plot	0.047	0.045	0.041	0.041	0.044
	Leaf	mg/plot	0.121	0.122	0.102	0.112	0.114
	Total	mg/plot	0.168	0.167	0.143	0.153	0.158

1) Content in the dry matter

Table 6 Characteristics of soil after harvest

	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Mean value
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>						
Cadmium concentration ¹⁾	mg/kg	0.18	0.18	0.19	0.19	0.19
pH (H ₂ O) ²⁾		6.20		6.40		
EC ³⁾	mS/m	12.92		12.37		
<Standard plot (SP)>						
Cadmium concentration	mg/kg	0.17	0.17	0.18	0.19	0.18
pH (H ₂ O)		6.40		6.30		
EC	mS/m	14.27		13.79		

1) Content in the drying soil

2) Soil pH determined on 1:5 (soil:water) suspensions.

3) Soil electrical conductivity determined on 1:5 (soil:water) suspensions.

4. 考察

2011年度のカブで実施した試験では、作物体のカドミウム濃度及び吸収量並びに跡地土壌の0.1mol/L塩酸可溶カドミウムは両試験区間で明確な差は認められなかった。

2009年度の試験開始時からの跡地土壌の0.1mol/L塩酸可溶カドミウム濃度の推移についてはTable 7のとおりであり、両試験区を比較すると2009年夏及び2011年夏の試験では差はなかったが、他の3回の試験では汚泥肥料施用区が高い数値を示した。また、各試験での作物のカドミウム濃度及び吸収量の推移はTable 8及

び Table 9 のとおりである。2009 年度夏及び 2011 年夏のカドミウム濃度については、両試験区に差は見られなかった。他の 3 回の試験では差が認められたが、22 年夏のように必ずしも汚泥肥料施用区が高い濃度になるとは限らない結果であった。作物のカドミウムの吸収量については、これまで実施した 5 回の試験の合計は、汚泥肥料施用区で 2.338 mg、標準区で 2.742 mg であり標準区の吸収量が高くなった。このことは、無機質肥料のみを施肥している標準区の作物の生育が汚泥肥料施用区よりも良好なことにより収量が高くなったことが要因であると考えられる。これまでの各試験の結果では十分な把握ができないことから、カドミウムの吸収の傾向を確認するためには引き続き連用試験を実施していく必要があると思われる。

Table 7 Transition of Acid-solubility-cadmium¹⁾ in the soil after harvest

Year	Season	AP ²⁾ (mg/kg)	SP ³⁾ (mg/kg)
2009	Summer	0.22	0.21
2009	winter	0.18	0.15
2010	Summer	0.16	0.15
2010	winter	0.17	0.14
2011	Summer	0.18	0.19

- 1) Content of cadmium dissolved with 0.1 mol/L hydrochloric acid in the drying soil
- 2) Sludge-fertilizer-application plot
- 3) Standard plot

Table 8 Cadmium cocentration¹⁾ in the harvested crop for 2009~2011

Year	Season	Crop	Part	AP ²⁾ (mg/kg)	SP ³⁾ (mg/kg)
2009	Summer	Carrot	Root	0.02	0.02
			Leaf	0.04	0.04
2009	Winter	Spinach		0.62	0.61
2010	Summer	Spinach		1.40	1.56
2010	Winter	Qing geng cai		0.20	0.18
2011	Summer	Turnip	Root	0.08	0.08
			Leaf	0.16	0.17

- 1) Content in the dry matter
- 2) Sludge-fertilizer-application plot
- 3) Standard plot

Table 9 Absorbed amount of cadmium in the harvested crop for 2009~2011

Year	Season	Crop	AP ¹⁾		SP ²⁾	
			The applied amount (mg/kg)	Absorbed amount (mg/kg)	The applied amount (mg/kg)	Absorbed amount (mg/kg)
2009	Summer	Carrot	4.84	0.074	0	0.070
2009	Winter	Spinach	4.40	1.185	0	1.344
2010	Summer	Spinach	3.30	0.721	0	0.962
2010	Winter	Qing geng cai	2.64	0.212	0	0.208
2011	Summer	Turnip	3.30	0.146	0	0.158
Total			18.48	2.338	0	2.742

1) Sludge-fertilizer-application plot

2) Standard plot

5. まとめ

2011年夏、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、カブを栽培し、土壌中のカドミウム濃度の変化及び作物体へのカドミウム吸収量を確認した。その結果、作物体のカドミウム濃度及び吸収量並びに跡地土壌の0.1mol/L塩酸可溶カドミウムは両試験区間で明確な差は認められなかった。当該試験は引き続き連用試験として実施していく予定である。

文 献

- 1) 農林水産省告示:肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件,昭和61年2月22日,農林水産省告示第284号,最終改正平成22年4月9日,農林省告示第589号(2010)
- 2) 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)
- 3) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 4) 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12年6月1日総理府令第58号
- 5) 農林水産省ホームページ:都道府県施肥基準等,栃木県
(http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_sehi_kizyun/toc01.html)
- 6) Perkin Elmer社 マイクロ波分解装置取扱説明書:分解メソッド集 ホウレンソウ

Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued report)

Masato FUNATSU¹, Masayuki YAMANISHI² and Fumihiro ABE¹

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

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Kobe Regional Center

In the upland fields derived from Andosol, continuous application experiments of sludge fertilizer and chemical fertilizer have performed in order to monitor the change of the cadmium which was dissolved with 0.1 mo/L hydrochloric acid (acid-solubility-Cd) from the soil and to investigate the cadmium absorption by the crop since 2009. In 2011, the turnip was cultivated in standard plot (SP) and sludge-fertilizer-application plot (AP). The amount of nitrogen, phosphorus and potassium applied to each plot was designed on The Basis of Fertilization Standard showed MAFF web site. The SP used reagents only. The AP used the reagents and the sludge fertilizer controlled the half of nitrogen content deriving from the sludge fertilizer, and another deriving from reagents. Total cadmium amount in the turnip and acid-solubility-Cd in soil after harvest were measured by a high frequency plasma mass spectrometry (ICP-MS). As a result, the cadmium content in the soil of AP was similar to that in SP.

Key words sludge fertilizer, continuous application, cadmium

(Research Report of Fertilizer, **5**, 60~67, 2012)

7 2011年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた

肥料の共同試験成績の解析

惠智正宏¹, 渡部絵里菜², 小西範英³, 阿部 進⁴,
福中理絵⁵, 八木啓二⁶, 白井裕治¹, 上沢正志⁷

キーワード 外部精度管理, 化成肥料, 鉍さいけい酸質肥料, ISO/IEC Guide 43-1, ISO/IEC 17025,
zスコア

1. はじめに

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

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

これまで外部精度管理としての共通試料による肥料の共同試験は, 全国 6 か所の肥料品質保全協議会が個々に試料調製及び解析を行ってきた. しかし, 試験成績数が増加することで解析精度の向上が図れることから, 2006年度より肥料品質保全協議会等の試験所を中心に全国共通の試料を用いた共同試験を実施している. 均質性試験及び共同試験成績について ISO/IEC Guide 43-1:1997 (JIS Q 0043-1:1998)³⁾を参考に解析しており, 2011年度は化成肥料及び鉍さいけい酸質肥料について全国共通試料を調製し, 共同試験を実施したのでその結果を報告する.

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 (現) 仙台センター

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 財団法人日本肥糧検定協会

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料調製

化成肥料は、粉碎して目開き 500 μm の網ふるいを全通させ、品質の安定を図るため約 3 ヶ月間常温で保管した。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。次に、試料を表 1 の混合操作表の組合せに従い 4 区分を抽出、よく混合したのち 4 等分して元の容器に戻す操作を 7 回繰返した。それを 1~9 の各区分から一定量ずつ採取してよく混合したものを、ポリエチレン製袋で密封して 1 袋当たり約 200 g 入りの試料約 280 個を調製し配付時まで常温保管した。

鉍さいけい酸質肥料は、粉碎して目開き 212 μm の網ふるいを全通させたのち、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。次に、試料を表 1 の混合操作表の組合せに従い 4 区分を抽出、よく混合したのち 4 等分して元の容器に戻す操作を 7 回繰返した。それを 1~9 の各区分から一定量ずつ採取して、よく混合した後、ポリエチレン製袋で密封して 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 170 個を調製し配付時まで常温保管した。

表1 混合操作表

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

2) 均質性確認試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁴⁾の均質性試験に従い、2.1) で調製した共同試験用試料から 10 試料ずつ抜き取り均質性確認用試料とした。化成肥料についてはく溶性加里 (C-K₂O) 及び水溶性苦土 (W-MgO)、鉍さいけい酸質肥料についてはく溶性苦土 (C-MgO) を各均質性確認用試料につき 2 点併行で試験して均質性確認試験の成績とした。

3) 配付

試料番号を付した試料、実施要領及び分析成績報告書を参加試験所に送付した。2011 年度、化成肥料は 144 試験室、鉍さいけい酸質肥料は 80 試験室が参加した。

3. 共同試験成績の試験項目及び試験方法

1) 試験項目

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

2) 試験方法

肥料分析法(1992年版)⁵⁾を次のとおり例示した。なお、その他の試験方法を採用した試験室には、その方法の概要の報告を求めた。

- (1) Mois は、肥料分析法 3.1.1(加熱減量法).C により定量。但し、揮発物の補正は行わない。
- (2) A-N は、肥料分析法 4.1.2.1(蒸留法).C.1)により試料液を調製、同項.D により定量。
- (3) S-P₂O₅ は、肥料分析法 4.2.1.C.c.1)により試料液を調製、4.2.3(バナドモリブデン酸アンモニウム法).E.b により定量。
- (4) W-P₂O₅ は、肥料分析法 4.2.1.C.b により試料液を調製、4.2.3(バナドモリブデン酸アンモニウム法).E.a により定量。
- (5) C-K₂O は、肥料分析法 4.2.1.C.d.により試料液を調製、4.3.3(フレイム光度法または原子吸光測光法).E により定量。
- (6) W-K₂O は、肥料分析法 4.3.1.C.b.2)により試料液を調製、4.3.3(フレイム光度法または原子吸光測光法).E により定量。
- (7) C-MgO は、肥料分析法 4.2.1.C.d により試料液を調製、4.6.1(EDTA法).D.b により定量。又は、同様の方法で試料液を調製、4.6.2(原子吸光測光法).E により定量。なお、当該肥料はマンガンを含有していない。
- (8) W-MgO は、肥料分析法 4.6.1.C.b により試料液を調製、4.6.2(原子吸光測光法).E により定量。
- (9) T-As は、肥料分析法 5.24.1(ジエチルジチオカルバミン酸銀法).D.a.1)により試料液を調製、同項Eにより定量。又は、同様の方法で試料液を調製、5.24.2(原子吸光測光法(水素化ヒ素発生装置と原子吸光分析装置)).E により定量。
- (10) T-Cd は、肥料分析法 5.6.1(原子吸光測光法).D.a.1) (王水分解)により試料液を調製、同項 E.a により定量。但し、定量の際の標準液にはカルシウム液を添加しないものとし、直接噴霧する場合は D₂ランプ等で BG 補正すること。又は、同様の方法で試料液を調製、5.19.1.E(溶媒抽出)により定量。
- (11) S-SiO₂ は、肥料分析法 4.4.1.B.b により試料液を調製、4.4.3(フッ化カリウム法).D により定量。
- (12) AL は、肥料分析法 4.5.1.1.C.b により試料液を調製、4.5.2.2(エチレンジアミン四酢酸塩法(以下「EDTA 法」という)).D により定量。
又は、同様の方法で試料液を調製、可溶性石灰(肥料分析法 4.5.1.2.E)及び可溶性苦土(肥料分析法 4.6.2.E)を測定、肥料分析法 4.5.2.3(原子吸光測光法).E により算出。なお、当該肥料はマンガンを含有していない。
- (13) C-MgO は、肥料分析法 4.2.1.C.d により試料液を調製、4.6.1(EDTA法).D.b により定量。又は、同様の方法で試料液を調製、4.6.2(原子吸光測光法).E により定量。なお、当該肥料はマンガンを含有していない。

4. 統計解析方法及び試験成績の評価方法

1) 報告された試験成績の評価

(1) ロバスト法によるzスコアの求め方

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

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

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

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

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

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

(2) z スコアによる評価

データの解析手法として、ISO/IEC Guide 43-1 (JIS Q 0043-1)³⁾を用い、各試験室の試験成績の z スコアより次のように評価を行った。

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

2) 試験成績全体を評価する統計量

各成分の報告された試験成績全体を評価するため、次の統計量を求めた。

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

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

- (6) 全データの標準偏差(SD)。
- (7) 標準化された四分位範囲(NIQR)を(b)式により算出した。正規分布の場合、NIQRはSDと一致する。
- (8) Horwitz 修正式^{6~8)}((e)~(g)式)より、平均的な室間再現標準偏差(Horwitz' SD: HSD)を算出した。なお、Cは各成分の含有量の割合で1%の場合は0.01という値になる。

$$\text{HSD} = 0.01 \times C^{0.5} \quad (0.138 < C) \quad \dots (e)$$

$$\text{HSD} = 0.02 \times C^{0.8495} \quad (1.2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0.138) \quad \dots (f)$$

$$\text{HSD} = 0.22 \times C \quad (C < 1.2 \times 10^{-7}) \quad \dots (g)$$

(9) RSD_{rob} は、ロバスト法から求めた相対標準偏差の表現であり、(h)式により算出した。

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

(10) $HorRat_{rob}$ は、ロバスト法から求めた $HorRat$ 値の表現であり、(i)式により算出した。 $HorRat$ 値は、共同試験で得られた室間再現相対標準偏差が、過去の実験に基づく室間再現相対標準偏差の予測値に比べてどの程度かを確認する指標である。AOAC のガイドラインでは、 $0.5 \leq HorRat \text{ 値} \leq 2$ を許容範囲としている。

$$HorRat_{rob} = NIQR / HSD \quad \dots (i)$$

5. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の成績及び繰返し 2 回×10 試料の一元配置による分散分析から得られた統計量を表 2 に示した。いずれの試料においても、F 値が $F(9,10;0.05)$ を下回ったことから、有意水準 5 % において試料間に有意な差は認められなかった⁴⁾。また、試料間の相対標準偏差は 0.5%~1.5 % であり、全ての種類の分析用試料は均質であることを確認した。

表2 均質性確認試験の結果

肥料の種類	分析成分	Mean ¹⁾ (%)	SD ²⁾ (%)	RSD ³⁾ (%)	F値 ⁴⁾⁵⁾
化成肥料	C-K ₂ O	10.33	0.05	0.5	1.95
	W-MgO	2.03	0.01	0.5	0.71
鉍さいけい酸質肥料	C-MgO	3.00	0.05	1.5	2.17

- 1) 10試料2点併行分析の総平均定量値
- 2) 試料間の標準偏差
- 3) 試料間の相対標準偏差
- 4) 一元分散分析値により算出された分散比
- 5) $F(9,10;0.05) : 3.02$

2) 試験成績の解析結果

4.2) (1)の試験室数及びzスコアで評価された各試験室数及びその割合を表3に示した。各成分の試験成績で「満足」との評価を受けた試験室の割合は、いずれの成分も 80 % 以上であり、その中で化成肥料中のT-Asが 94 % と最も高く、化成肥料中のW-MgO並びに鉍さいけい酸質肥料中のAL(S-MgO)が 80 % と最も低い割合を示した。一方、「不満足」と評価を受けた試験室は、化成肥料ではW-MgOの 14 %、鉍さいけい酸質肥料中ではS-MgOの 15 % が最も「不満足」が多い結果となった。

4.2) (3)~(10)で求めた統計量を表4に示した。大部分の成分で全体のMeanは、Medianとほぼ一致しており、外れ値の影響を受けていなかった。しかしながら、全体の標準偏差SDは、ロバスト法によって得られたNIQRに比較して大きな値を示し、外れ値の影響を受けていた。このことから、NIQRを標準偏差とみなしてMedianとの関係を図1に示し、Horwitz修正式から得られたHSD、 $HSD \times 0.5$ 及び $HSD \times 2$ を同図に表示した。

2006～2011 年度に実施した試験項目の Median, NIQR, RSD_{rob} 及び $HorRat_{rob}$ 等について, 化成肥料は表 5-1 に, 鉍さいけい酸質肥料は表 5-2 に示した. また, 本年度 10 試験室以上報告のあった試験方法別の Median, NIQR, RSD_{rob} , $HorRat_{rob}$ 及び HSD を表 6 に示した.

表3 zスコアによる試験成績の評価

試験項目	参加 試験室数	$ z \leq 2$ ¹⁾		$2 < z < 3$ ²⁾		$3 \leq z $ ³⁾	
		試験室数	割合 (%)	試験室数	割合 (%)	試験室数	割合 (%)
(化成肥料)							
Mois	137	127	92	5	4	5	4
A-N	138	123	89	7	5	8	6
S-P ₂ O ₅	114	102	90	5	4	7	6
W-P ₂ O ₅	133	118	88	9	7	6	5
C-K ₂ O	122	106	87	5	4	11	9
W-K ₂ O	132	110	83	6	5	16	12
C-MgO	128	107	84	9	7	12	9
W-MgO	119	95	80	7	6	17	14
T-As	52	49	94	2	4	1	2
T-Cd	74	60	81	6	8	8	11
(鉍さいけい酸質肥料)							
S-SiO ₂	59	52	88	3	5	4	7
AL	76	64	84	6	8	6	8
S-CaO	55	47	86	4	7	4	7
S-MgO	55	44	80	3	5	8	15
C-MgO	78	66	85	4	5	8	10

1) 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 (%)

2) 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 (%)

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

表4 共同試験成績の統計量

試験項目	Mean ¹⁾ (%,mg/kg) ⁹⁾	Median ²⁾ (%,mg/kg)	U _{95%} ³⁾ (%,mg/kg)	SD ⁴⁾ (%,mg/kg)	NIQR ⁵⁾ (%,mg/kg)	HSD ⁶⁾ (%,mg/kg)	RSD _{rob} ⁷⁾ (%)	HorRat _{rob} ⁸⁾
(化成肥料)								
Mois	1.03	1.00	0.02	0.16	0.12	0.04	12.0	3.00
A-N	13.49	13.49	0.03	0.42	0.18	0.36	1.3	0.49
S-P ₂ O ₅	17.43	17.44	0.04	0.33	0.22	0.45	1.3	0.48
W-P ₂ O ₅	14.50	14.51	0.03	0.28	0.19	0.39	1.3	0.49
C-K ₂ O	10.49	10.41	0.04	0.47	0.23	0.29	2.2	0.79
W-K ₂ O	10.15	10.17	0.03	0.36	0.17	0.29	1.7	0.59
C-MgO	2.47	2.48	0.01	0.20	0.07	0.09	2.8	0.81
W-MgO	1.89	1.94	0.02	0.23	0.09	0.07	4.6	1.28
T-As	4.75	4.74	0.17	0.72	0.61	0.60	12.9	1.02
T-Cd	2.03	2.03	0.02	0.18	0.09	0.29	4.4	0.31
(鉱さいけい酸質肥料)								
S-SiO ₂	30.79	30.69	0.20	0.99	0.75	0.55	2.4	1.35
AL	49.47	49.48	0.16	1.40	0.68	0.70	1.4	0.97
S-CaO	40.83	40.78	0.21	1.95	0.81	0.64	2.0	1.27
S-MgO	6.41	6.24	0.03	0.71	0.12	0.19	1.9	0.63
C-MgO	3.35	3.36	0.05	0.54	0.23	0.11	6.9	2.06

- 1) 全体の平均値
- 2) 全体の中央値
- 3) 全体の中央値の不確かさ
- 4) 全体の標準偏差
- 5) 標準化された四分位範囲
- 6) Horwitz修正式より得られた平均的な室間再現標準偏差
- 7) ロバスト法から求めた相対標準偏差
- 8) ロバスト法から求めたHorRat値
- 9) T-As及びT-Cdはmg/kg, その他の成分は%

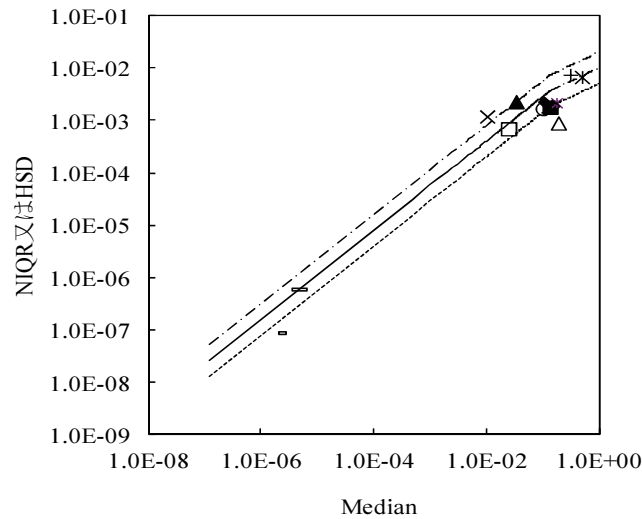


図1 共同試験のNIQRとHorwitz修正式との関係

- × Mois (化成肥料)
- A-N (化成肥料)
- × S-P₂O₅ (化成肥料)
- ◇ C-P₂O₅ (化成肥料)
- ◆ C-K₂O (化成肥料)
- W-K₂O (化成肥料)
- C-MgO (化成肥料)
- △ W-MgO (化成肥料)
- T-As (化成肥料)
- T-Cd (化成肥料)
- + S-SiO₂ (鉱さいけい酸質肥料)
- × AL (鉱さいけい酸質肥料)
- ▲ C-MgO (鉱さいけい酸質肥料)
- 累乗 (Horwitz修正式)
- - - 累乗 (Horwitz修正式×2)
- 累乗 (Horwitz修正式×0.5)

表5-1 化成肥料における2006～2011年度の共同試験成績の統計量

試験項目	実施年	試験項目に由来するの主な原料名	参加 試験室数	Median ¹⁾ (%,mg/kg) ⁶⁾	NIQR ²⁾ (%,mg/kg)	RSD _{rob} ³⁾ (%)	HorRat _{rob} ⁴⁾	HSD ⁵⁾ (%,mg/kg)
Mois	2006		147	1.70	0.30	17.7	4.78	0.06
	2007		146	4.99	0.35	7.0	2.21	0.16
	2008		145	2.87	0.24	8.5	2.50	0.10
	2009		145	3.53	0.15	4.2	1.27	0.12
	2010		143	1.58	0.41	26.0	6.97	0.06
	2011		137	1.00	0.12	12.0	3.00	0.04
T-N	2006	尿素	158	14.60	0.13	0.9	0.33	0.38
	2007	有機質肥料	145	8.74	0.07	0.8	0.26	0.25
	2010	尿素	140	14.11	0.11	0.8	0.30	0.38
A-N	2006	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	150	11.46	0.10	0.9	0.33	0.32
	2007	硫酸アンモニア	143	6.20	0.09	1.4	0.47	0.19
	2008	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	147	12.56	0.16	1.2	0.45	0.34
	2009	硝酸アンモニア,硝酸アンモニア石灰肥料	144	5.56	0.07	1.3	0.43	0.17
	2010	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	128	11.53	0.18	1.6	0.56	0.32
	2011	硫酸アンモニア,りん酸アンモニア	138	13.49	0.18	1.3	0.49	0.36
N-N	2009	硝酸アンモニア,硝酸アンモニア石灰肥料	123	3.62	0.11	3.2	0.96	0.12
T-P ₂ O ₅	2007	有機質肥料	140	10.35	0.10	0.9	0.33	0.29
C-P ₂ O ₅	2007	りん酸アンモニア	143	9.81	0.13	1.3	0.47	0.28
	2008	りん酸アンモニア	146	15.82	0.13	0.8	0.32	0.40
	2010	りん酸アンモニア	141	14.59	0.18	1.2	0.47	0.38
S-P ₂ O ₅	2006	過りん酸石灰,りん酸アンモニア	144	10.88	0.11	1.0	0.37	0.30
	2009	過りん酸石灰	125	6.37	0.12	1.9	0.62	0.19
	2011	りん酸アンモニア,過りん酸石灰	114	17.44	0.22	1.3	0.53	0.42
W-P ₂ O ₅	2006	過りん酸石灰,りん酸アンモニア	157	9.02	0.12	1.3	0.46	0.26
	2007	りん酸アンモニア	143	7.02	0.23	3.2	1.08	0.21
	2008	りん酸アンモニア	149	9.16	0.24	2.7	0.93	0.26
	2009	過りん酸石灰	144	4.57	0.08	1.8	0.56	0.15
	2010	りん酸アンモニア	144	11.56	0.52	4.5	1.63	0.32
	2011	りん酸アンモニア,過りん酸石灰	133	14.51	0.19	1.3	0.50	0.38
C-K ₂ O	2011	硫酸加里	122	10.41	0.23	2.2	0.79	0.29
W-K ₂ O	2006	塩化加里	156	12.38	0.22	1.8	0.64	0.34
	2007	硫酸加里	145	8.43	0.15	1.8	0.61	0.24
	2008	塩化加里	147	11.39	0.15	1.3	0.47	0.32
	2009	硫酸加里	145	8.35	0.13	1.5	0.52	0.24
	2010	塩化加里	142	14.72	0.17	1.2	0.44	0.38
	2011	塩化加里	132	10.17	0.17	1.7	0.59	0.29
C-MgO	2007	副産苦土肥料	137	3.41	0.07	2.2	0.65	0.11
	2008	水酸化苦土肥料	142	4.62	0.12	2.5	0.80	0.15
	2010	副産苦土肥料	137	3.11	0.07	2.4	0.71	0.10
	2011	水酸化苦土肥料	128	2.48	0.07	2.8	0.81	0.09
W-MgO	2011	水酸化苦土肥料	119	1.94	0.09	4.6	1.28	0.07
C-MnO	2009	熔成微量元素複合肥料	126	0.54	0.02	3.6	0.83	0.02
C-B ₂ O ₃	2009	熔成微量元素複合肥料	120	0.28	0.02	5.6	1.16	0.01
W-B ₂ O ₃	2006	ほう酸塩肥料	132	0.40	0.02	4.2	0.91	0.02
	2008	ほう酸塩肥料	119	0.26	0.01	2.9	0.58	0.01
	2010	ほう酸塩肥料	116	0.29	0.01	3.4	0.70	0.01
T-As	2006		84	1.89	0.19	10.1	0.70	0.27
	2007		68	3.84	0.38	9.8	0.75	0.50
	2008		65	4.14	0.41	9.8	0.76	0.53
	2009		59	4.31	0.60	13.9	1.09	0.55
	2010		61	3.62	0.36	9.8	0.75	0.48
	2011		52	4.74	0.61	12.9	1.02	0.60
T-Cd	2006		95	1.26	0.11	9.1	0.59	0.19
	2007		85	1.24	0.12	9.6	0.62	0.19
	2008		86	2.60	0.15	5.9	0.43	0.36
	2009		73	0.47	0.08	17.3	0.97	0.08
	2010		79	1.22	0.08	6.7	0.43	0.19
	2011		74	2.03	0.09	4.4	0.31	0.29

1) 全体の中央値

2) 標準化された四分位範囲

3) ロバスト法から求めた相対標準偏差

4) ロバスト法から求めたHorRat値

5) Horwitz修正式より得られた平均的な室間再現標準偏差

6) T-As及びT-Cdはmg/kg, その他の成分は%

表5-2 鉍さいけい酸質肥料における2006～2011年度の共同試験成績の統計量

試験項目	実施年	試験項目に由来するの主な原料名	参加 試験室数	Median ¹⁾ (%,mg/kg) ⁶⁾	NIQR ²⁾ (%,mg/kg)	RSD _{rob} ³⁾ (%)	HorRat _{rob} ⁴⁾	HSD ⁵⁾ (%,mg/kg)
S-SiO ₂	2006		66	33.92	0.60	1.8	1.03	0.58
	2007		67	28.25	0.87	3.1	1.63	0.53
	2008		68	33.35	0.49	1.5	0.85	0.58
	2009		69	32.67	0.62	1.9	1.09	0.57
	2010		67	33.52	0.57	1.7	0.98	0.58
	2011		59	30.69	0.75	2.4	1.35	0.55
AL	2006		75	50.56	0.64	1.3	0.91	0.71
	2007		83	48.70	0.76	1.6	1.08	0.70
	2008		86	50.90	0.71	1.4	0.99	0.71
	2009		85	39.03	0.92	2.4	1.47	0.62
	2010		85	49.26	0.80	1.6	1.14	0.70
	2011		76	49.48	0.68	1.4	0.97	0.70
C-MgO	2006		78	6.18	0.13	2.0	0.67	0.19
	2007		86	3.17	0.21	6.6	1.95	0.11
	2008		89	5.80	0.14	2.4	0.79	0.18
	2009		87	2.34	0.20	8.7	2.48	0.08
	2010		88	5.42	0.11	2.1	0.67	0.17
	2011		78	3.36	0.23	6.8	2.05	0.11

1) 全体の中央値

2) 標準化された四分位範囲

3) ロバスト法から求めた相対標準偏差

4) ロバスト法から求めたHorRat値

5) Horwitz修正式より得られた平均的な室間再現標準偏差

6) T-As及びT-Cdはmg/kg, その他の成分は%

表6 試験方法別の共同試験成績の統計量

試験項目	試験方法	報告 試験室数	Median ¹⁾ (%, mg/kg) ⁶⁾	NIQR ²⁾ (%, mg/kg)	RSD _{rob} ³⁾ (%)	HorRat _{rob} ⁴⁾	HSD ⁵⁾ (%, mg/kg)
(化成肥料)							
A-N	蒸留法	130	13.50	0.17	1.3	0.47	0.36
S-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム法	117	17.44	0.22	1.3	0.53	0.42
W-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム法	132	14.51	0.19	1.3	0.50	0.38
C-K ₂ O	炎光度法	50	10.35	0.15	1.4	0.52	0.29
	原子吸光法	68	10.45	0.22	2.1	0.75	0.29
W-K ₂ O	炎光度法	51	10.13	0.13	1.3	0.45	0.29
	原子吸光法	75	10.20	0.17	1.7	0.59	0.29
C-MgO	原子吸光法	116	2.48	0.06	2.4	0.69	0.09
W-MgO	原子吸光法	110	1.94	0.08	4.1	1.14	0.07
T-As	ジエチルカルバミン酸銀法	31	4.51	0.39	8.6	0.68	0.58
	原子吸光法	19	5.13	0.39	7.6	0.61	0.64
T-Cd	原子吸光法(溶媒抽出)	14	2.11	0.11	5.2	0.36	0.30
	原子吸光法(連続スペクトル光源補正)	26	2.02	0.07	3.5	0.24	0.29
	原子吸光法(ゼーマン分裂補正)	27	2.00	0.14	7.0	0.49	0.29
(鉍さいけい酸質肥料)							
S-SiO ₂	ふっ化カリウム法	46	30.69	0.76	2.5	1.37	0.55
AL	原子吸光法	56	49.48	0.62	1.3	0.88	0.70
	EDTA法	16	49.44	0.59	1.2	0.84	0.70
S-CaO	原子吸光法	55	40.78	0.79	1.9	1.24	0.64
S-MgO	原子吸光法	55	6.24	0.12	1.9	0.63	0.19
C-MgO	原子吸光法	69	3.33	0.20	6.0	1.80	0.11

1) 全体の中央値

2) 標準化された四分位範囲

3) ロバスト法から求めた相対標準偏差

4) ロバスト法から求めたHorRat値

5) Horwitz修正式より得られた平均的な室間再現標準偏差

6) T-As及びT-Cdはmg/kg, その他の成分は%

3) 試験成績の傾向

同一の試験室において報告された異なる試験成績の z スコアの関係を図 2-1～2-8 に示した。具体的には、同一の共同試験用試料について同様の抽出方法で異なる成分(化成肥料中の $W-P_2O_5$ と $W-K_2O$ 等)、同一の共同試験用試料について異なる抽出方法で同一の成分(化成肥料中の $S-P_2O_5$ と $W-P_2O_5$ 等)、そして同様の抽出方法及び同一の成分で異なる共同試験用試料(化成肥料及び鉱さいけい酸質肥料中の $C-MgO$ 等)である。

更に、 z スコアが同じ値となる点線を書き加えた。この直線に平行方向のプロットは同様の抽出方法又は同一の成分の測定方法において系統的な偏りの要因があると考えられる。

なお、2)及び3)を参考に「4) 成分別の試験成績の評価」で各成分別の試験成績を評価することとする。

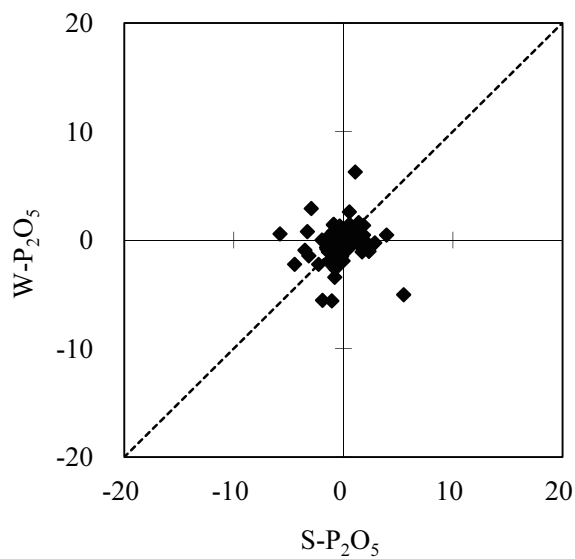


図2-1 化成肥料中の $W-P_2O_5$ - $S-P_2O_5$ の z スコアの関係

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

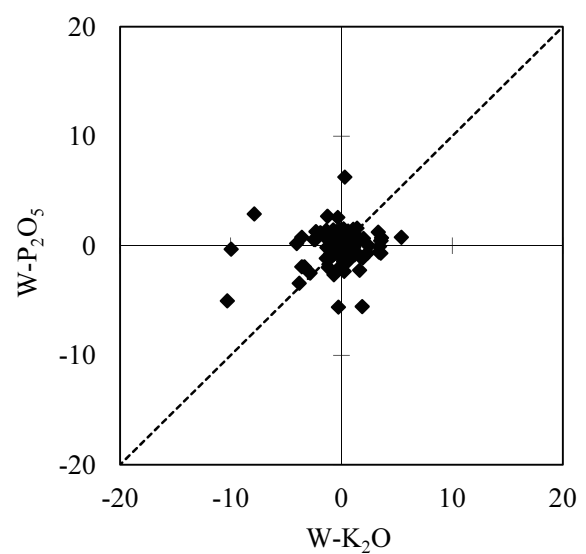


図2-2 化成肥料中の $W-P_2O_5$ - $W-K_2O$ の z スコアの関係

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

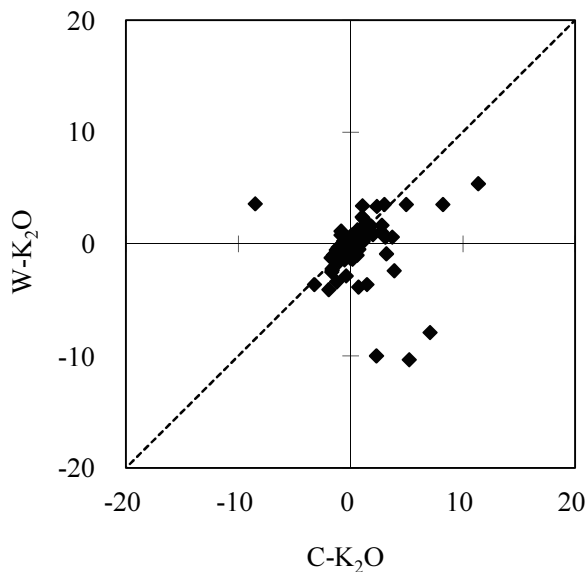


図2-3 化成肥料中の W-K₂O—C-K₂O の zスコアの関係

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

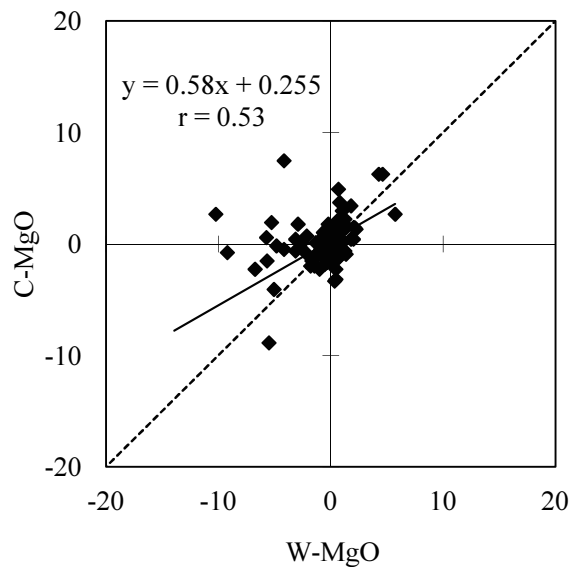


図2-4 化成肥料中の C-MgO—W-MgO のzスコアの関係

◆ 同一試験室におけるzスコアのプロット

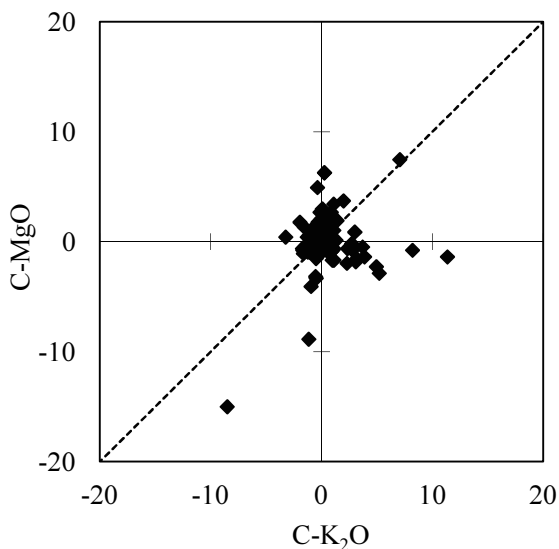


図2-5 化成肥料中の C-MgO—C-K₂O の zスコアの関係

◆ 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)

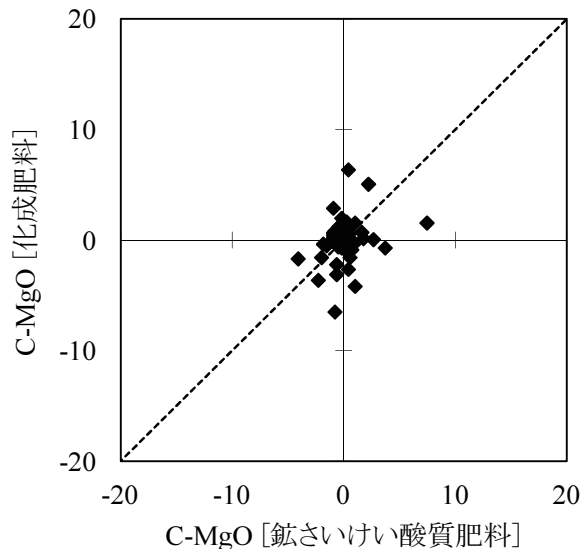


図2-6 化成肥料及び鉍さいけい酸質肥料中の C-MgOの zスコアの関係

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

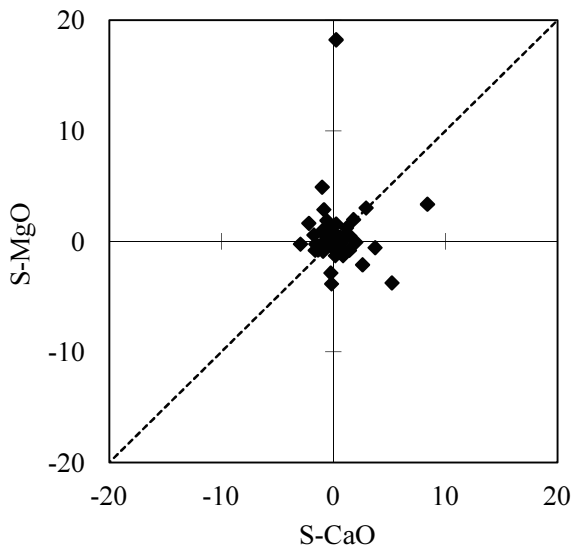


図2-7 鉍さいけい酸質肥料中の
S-MgO-S-CaO の zスコアの関係

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

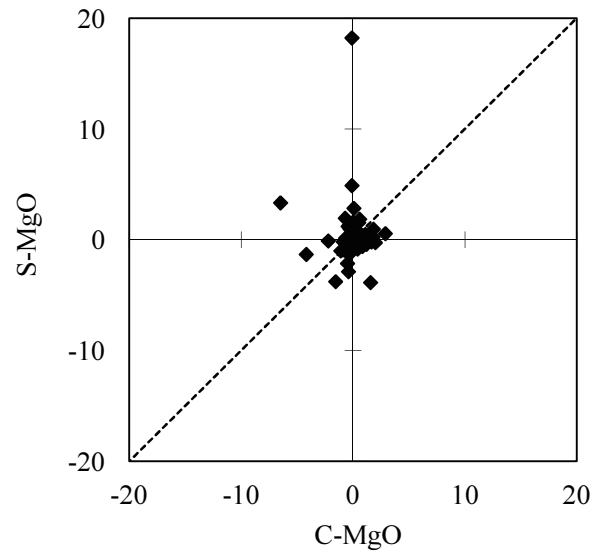


図2-8 鉍さいけい酸質肥料中の
S-MgO-C-MgO の zスコアの関係

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

4) 成分別の試験成績の評価

(1) 化成肥料中の水分 (Mois)

参加 137 試験室のうち、すべての試験室が加熱減量法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-1 に示す。平均値 1.03 % と Median 1.00 % はほぼ一致し、「満足」と評価された試験室は全体の 92 % であった。NIQR 0.12 % は、HSD 0.04 % より大きい値であり、2006～2010 年度の NIQR 0.15 %～0.41 % 及び HSD 0.06 %～0.16 % と比較して HSD はやや低い値を示した。「不満足」と評価された試験室は全体の 4 % にあたる 5 試験室が該当し、いずれも高い値を示した。要因として、乾燥が不十分であること、乾燥機内の温度が不均一であること等が考えられる。

(2) 化成肥料中のアンモニア性窒素 (A-N)

参加 138 試験室のうち、130 試験室が蒸留法、5 試験室が自動分析装置、そしてホルムアルデヒド法、ブレンナー法、及びホウ酸捕集による蒸留法を用いた試験室が各 1 試験室存在した。試験成績の度数分布を図 3-2 に示す。平均値 13.49 % と Median 13.49 % は一致し、「満足」と評価された試験室は全体の 89 % であった。NIQR 0.18 % は、HSD 0.36 % より小さい値であったが、2006～2010 年度の NIQR 0.07 %～0.18 % 及び HSD 0.17 %～0.34 % とほぼ変わらない値であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 6 % にあたる 8 試験室が該当し、蒸留法が 6 試験室、自動分析装置及びブレンナー法が各 1 試験室であった。「不満足」の要因として、公定法に定めのない方法を用いたこと、蒸留法では蒸留操作の初期でアンモニアの流出が多かった等が考えられる。

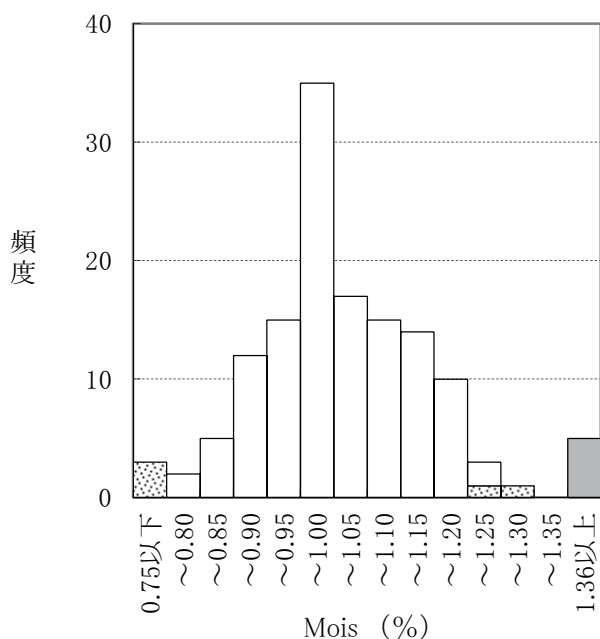


図3-1 化成肥料中のMoissの試験成績

□満足 □疑わしい ■不満足

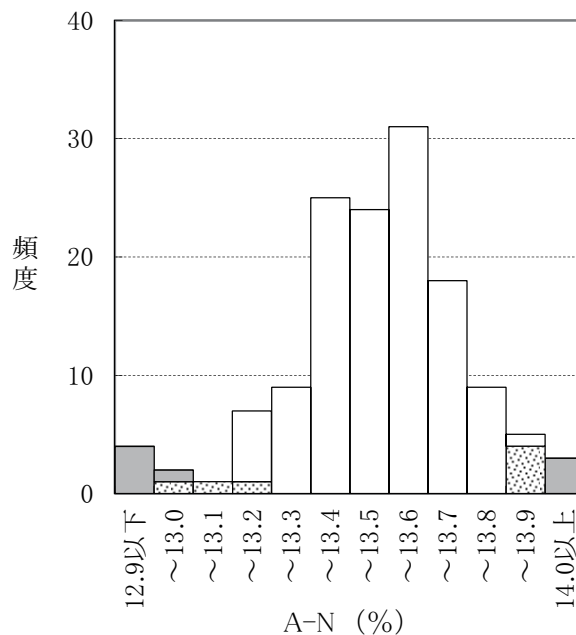


図3-2 化成肥料中のA-Nの分析成績

□満足 □疑わしい ■不満足

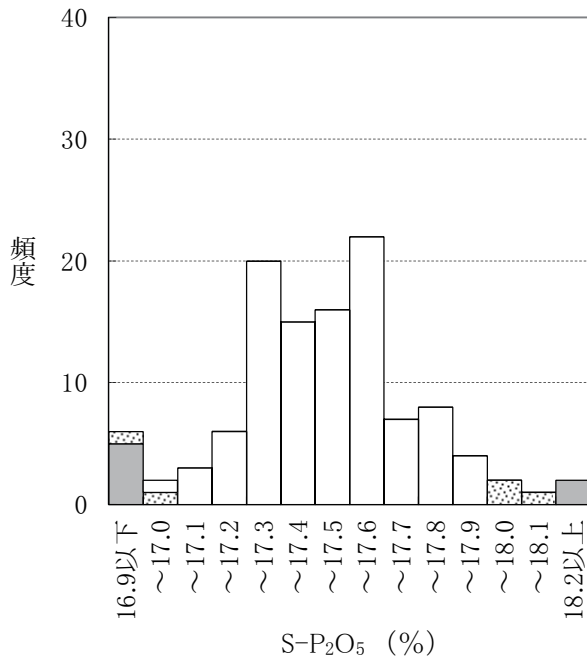
(3) 化成肥料中の可溶性りん酸 (S-P₂O₅)

参加 114 試験室のうち、113 試験室がバナドモリブデン酸アンモニウム法、1 試験室がキノリン重量法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-3 に示す。平均値 17.43 % と Median 17.44 % はほぼ一致し、「満足」と評価された試験室は全体の 90 % であった。NIQR 0.22 % は、HSD 0.42 % より小さい値であり、2006 及び 2009 年度の NIQR 0.11 % 及び 0.12 % , HSD 0.30 % 及び 0.19 % と比較すると NIQR, HSD とともに高い値であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 6 % にあたる 6 試験室が該当し、すべてバナドモリブデン酸アンモニウム法によるものであった。

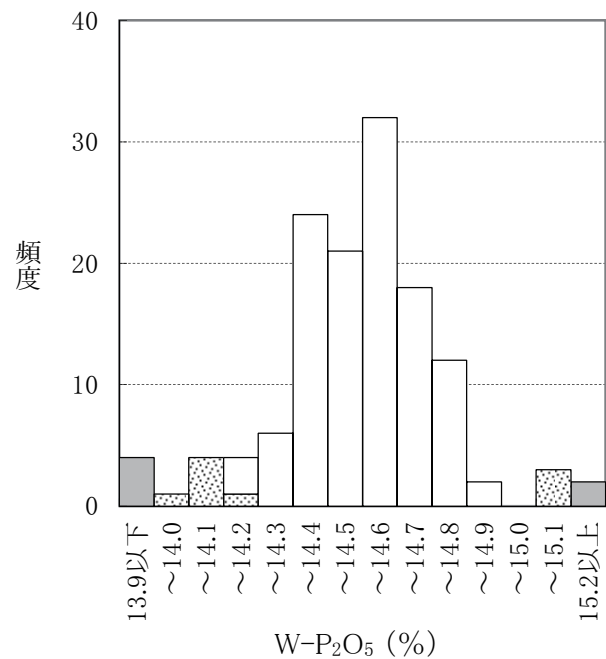
(4) 化成肥料中の水溶性りん酸 (W-P₂O₅)

参加 133 試験室のうち、132 試験室がバナドモリブデン酸アンモニウム法、1 試験室がキノリン重量法を用いた。試験成績の度数分布を図 3-4 に示す。平均値 14.50 % と Median 14.51 % はほぼ一致し、「満足」と評価された試験室は全体の 88 % であった。NIQR 0.19 % は、HSD 0.38 % より小さい値であり、2006~2010 年度の NIQR 0.08 %~0.52 % 及び HSD 0.15 %~0.32 % と比較して HSD はやや高い値を示した。「不満足」と評価された試験室は全体の 6 % にあたる 6 試験室が該当し、すべてバナドモリブデン酸アンモニウム法によるものであった。

また、図 2-1 及び図 2-2 のとおり、化成肥料中の W-P₂O₅ と S-P₂O₅ 及び W-K₂O の試験成績の z スコアには相関は認められず、測定方法及び抽出方法による系統的な要因による偏りがないと考えられる。

図3-3 化成肥料中のS-P₂O₅の分析成績

□満足 □疑わしい ■不満足

図3-4 化成肥料中のW-P₂O₅の分析成績

□満足 □疑わしい ■不満足

(5) 化成肥料中のく溶性加里(C-K₂O)

参加122試験室のうち、68試験室が原子吸光法、50試験室がフレーム光度法、そしてテトラフェニルほう酸ナトリウム容量法及びICP発光法が各2試験室存在した。試験成績の度数分布を図3-5に示す。平均値10.49%とMedian 10.41%はやや剥離したが、「満足」と評価された試験室は全体の87%であった。C-K₂Oは、2006年以降で初めての実施であり、過去の値との比較はできないがNIQR 0.23%は、HSD 0.29%より小さい値であった。「不満足」と評価された試験室は全体の9%にあたる11試験室が該当し、内訳は原子吸光測光法が6試験室、フレーム光度法が3試験室、ICP発光法は2試験室であり全体的に高い値を示す傾向が認められた。

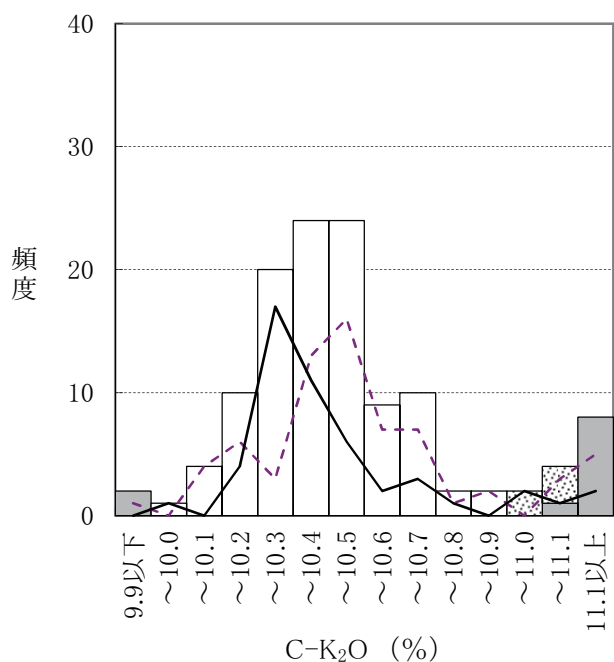
原子吸光法及びフレーム光度法のMedianは、10.45%及び10.35%と剥離していたが、方法間の平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に5%の水準で有意な差は認められなかった。

(6) 化成肥料中の水溶性加里(W-K₂O)

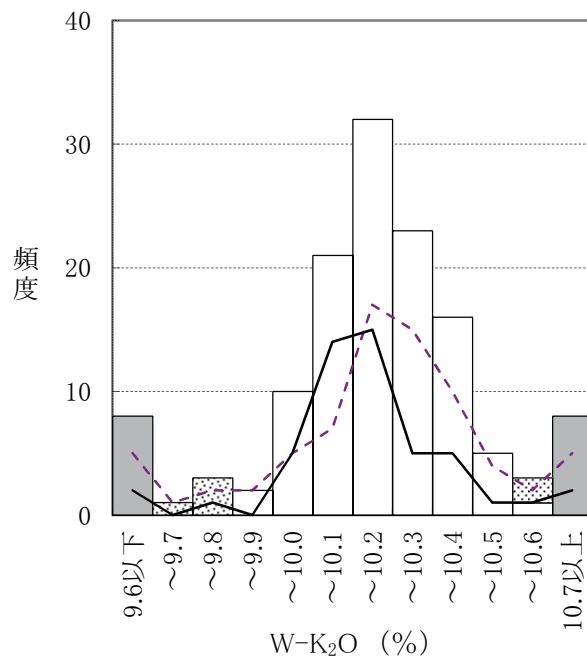
参加132試験室のうち、75試験室が原子吸光測光法、51試験室がフレーム光度法、そしてテトラフェニルほう酸ナトリウム容量法及びICP発光法が各3試験室であった。試験成績の度数分布を図3-6に示す。平均値10.15%とMedian 10.17%はほぼ一致し、「満足」と評価された試験室は全体の83%であった。NIQR 0.17%は、HSD 0.29%より小さい値であり、2006～2010年度のNIQR 0.13%～0.22%及びHSD 0.24%～0.38%とほぼ変わらない値であった。「不満足」と評価された試験室は全体の12%にあたる16試験室が該当し、内訳は原子吸光法が10試験室、フレーム光度法が4試験室、そしてICP発光法が2試験室であった。

原子吸光法及びフレーム光度法のMedianは、10.20%及び10.13%とほぼ一致し、方法間の平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に5%の水準で有意な差は認められなかった。

また、図2-3及び図2-5のとおり、化成肥料中のC-K₂OとW-K₂O及びC-MgOの試験成績のzスコアには相関は認められず、測定方法及び抽出方法による系統的な要因による偏りはないと考えられる。

図3-5 化成肥料中のC-K₂Oの分析成績

□ 満足 ▨ 疑わしい
 ■ 不満足 - - - 原子吸光
 — フレイム

図3-6 化成肥料中のW-K₂Oの分析成績

□ 満足 ▨ 疑わしい
 ■ 不満足 - - - 原子吸光
 — フレイム

(7) 化成肥料中のく溶性苦土(C-MgO)

参加 128 試験室のうち、116 試験室が原子吸光法、8 試験室が ICP 発光法、そして 4 試験室が EDTA 法を用いた。試験成績の度数分布を図3-7に示す。平均値 2.47 % と Median 2.48 % はほぼ一致し、「満足」と評価された試験室は全体の 84 % であった。NIQR 0.07 % は、HSD 0.09 % とほぼ一致し、2007～2009 年の NIQR 0.07 %～0.12 % 及び HSD 0.10 %～0.15 % とほぼ変わらない値であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 9 % にあたる 12 試験室が該当し、すべて原子吸光法であった。その他、ICP 発光法による試験成績は 8 試験室中 7 試験室が「満足」、1 試験室が「疑わしい」と評価された。

図 2-4 に示したとおり、化成肥料中の C-MgO-W-MgO の試験成績の z スコアには系統的な要因による弱い相関($r=0.53$)が認められた。このことは、抽出時における系統的な偏りと考えられるため、抽出液の調製方法及び抽出条件等に留意する必要があると考えられる。図 2-5 に示した化成肥料中の C-MgO-C-K₂O 及び図 2-6 に示した化成肥料と鉍さいけい酸質肥料中の C-MgO については、試験成績の z スコアに相関は認められず、測定方法及び抽出方法による系統的な要因による偏りは見られなかった。

(8) 化成肥料中の水溶性苦土(W-MgO)

参加 119 試験室のうち、110 試験室が原子吸光法、4 試験室が EDTA 法、そして 5 試験室が ICP 発光法を用いた。試験成績の度数分布を図3-8に示す。平均値 1.89 % と Median 1.84 % はほぼ一致し「満足」と評価された試験室は全体の 80 % であり、全分析項目中で最も低い割合を示した。W-MgO は、2006 年以降で初めての実施であり、過去の値との比較はできないが NIQR 0.09 % は HSD 0.07 % とほぼ一致した。「不満足」と評価された試験室は全体の 14 % にあたる 17 試験室が該当し、それらは低い値を示す傾向が見られた。その他、ICP 発光法による試験成績は 6 試験室中 4 試験室が「満足」、1 試験室が「疑わしい」及び「不満足」が各 1 試験室であった。1 試験室からクルクミン法による試験成績の報告があり、「不満足」と評価され、高い値を示した。

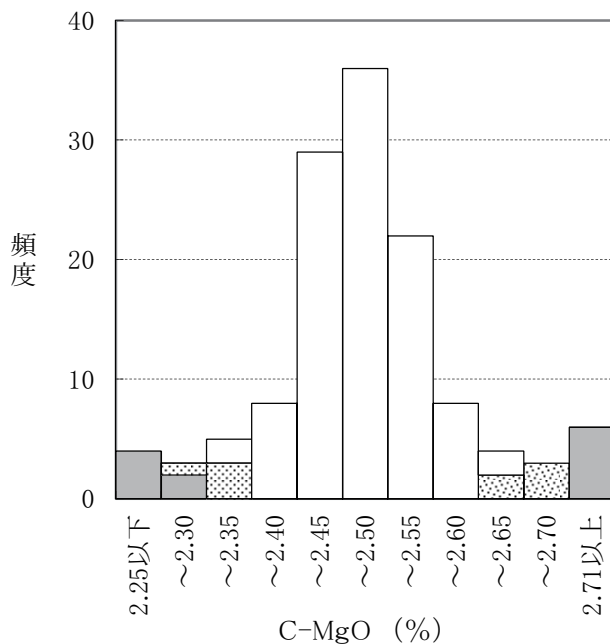


図3-7 化成肥料中のC-MgOの分析成績

□満足 □疑わしい ■不満足

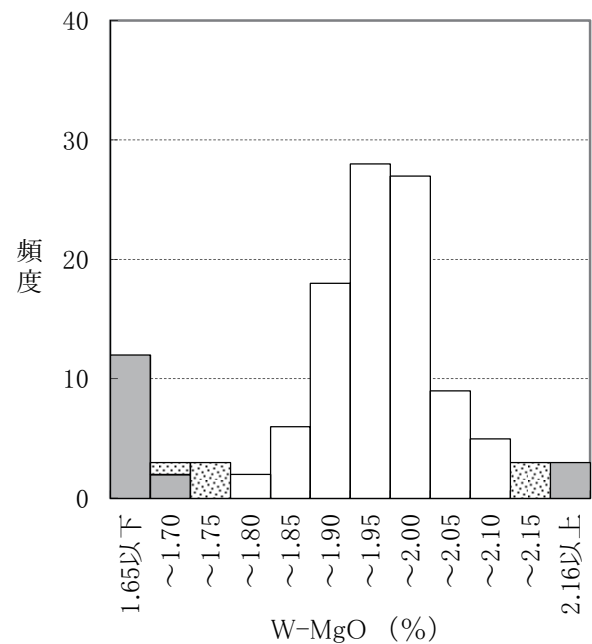


図3-8 化成肥料中のW-MgOの分析成績

□満足 □疑わしい ■不満足

(9) 化成肥料中のひ素全量(T-As)

参加 52 試験室のうち, 31 試験室がジエチルチオカルバミン酸銀法, 19 試験室が原子吸光法, 2 試験室が ICP 発光法を用いた. 試験成績の度数分布を図 3-9 に示す. 平均値 4.75 mg/kg と Median 4.74 mg/kg はほぼ一致した. 「満足」と評価された試験室は全体の 94 % であり, 全分析項目中最も高い割合を示した. NIQR 0.61 mg/kg は HSD 0.60 mg/kg とほぼ一致しており, 2007~2009 年の NIQR 0.19 mg/kg~0.60 mg/kg 及び HSD 0.27 mg/kg~0.55 mg/kg とほぼ変わらない値であった.

ジエチルチオカルバミン酸銀法及び原子吸光法の Median は 4.51 mg/kg 及び 5.13 mg/kg と剥離したが, 方法間の平均値の差による検定を行ったところ, それぞれの平均値に 5 % の水準で有意な差は認められなかった.

(10) 化成肥料中のカドミウム全量(T-Cd)

参加 74 試験室のうち, 67 試験室が原子吸光法を用い, その内訳は MIBK による溶媒抽出法(溶媒抽出法)が 14 試験室, 連続スペクトル補正方式(D2 補正法)が 26 試験室, ゼーマン分裂補正方式(ゼーマン補正法)が 27 試験室であった. また, 7 試験室が ICP 発光法を用いた. 試験成績の度数分布を図 3-10 に示す. 平均値 2.03 mg/kg と Median 2.03 mg/kg は一致しており, 「満足」と評価された試験室は全体の 81 % であった. NIQR 0.09 mg/kg は HSD 0.29 mg/kg より小さい値であり, NIQR 0.08 mg/kg~0.15 mg/kg 及び HSD 0.08 mg/kg~0.36 mg/kg とほぼ変わらない値であった. 「不満足」と評価された試験室は全体の 11 % にあたる 8 試験室が該当し, 内訳は溶媒抽出法が 4 試験室, ゼーマン補正法と ICP 発光法が各 2 試験室であった.

原子吸光法について, 溶媒抽出法, D2 補正法及びゼーマン補正法による試験成績の Median は, 2.11 mg/kg, 2.02 mg/kg 及び 2.00 mg/kg と溶媒抽出法が高い値を示した. NIQR は 0.11 mg/kg, 0.07 mg/kg 及び 0.14 mg/kg といずれの方法でも大差はなかった. その他, ICP 発光法による試験成績は, Median は 2.03

mg/kg, NIQR は 0.06 mg/kg であり, 7 試験室中 5 試験室が「満足」と評価された。

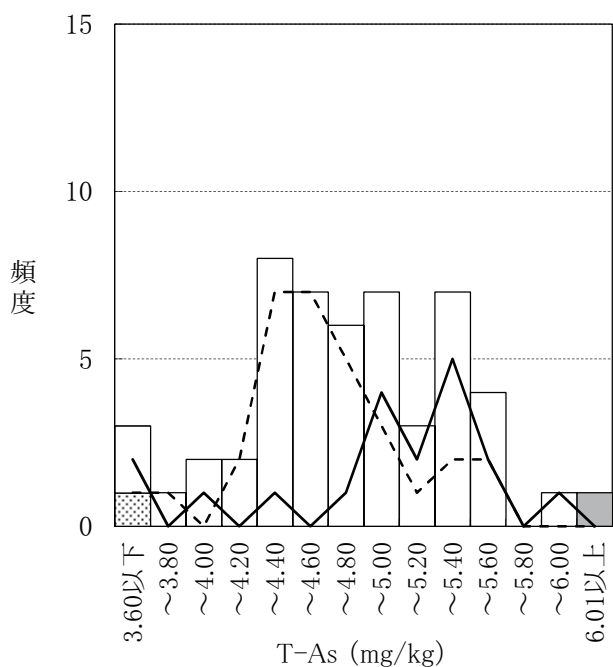


図3-9 化成肥料中のT-Asの分析成績

□ 満足
 ■ 疑わしい
 ■ 不満足
 — 原子吸光法
 - - - ジエチルジチオカルバミン酸銀法

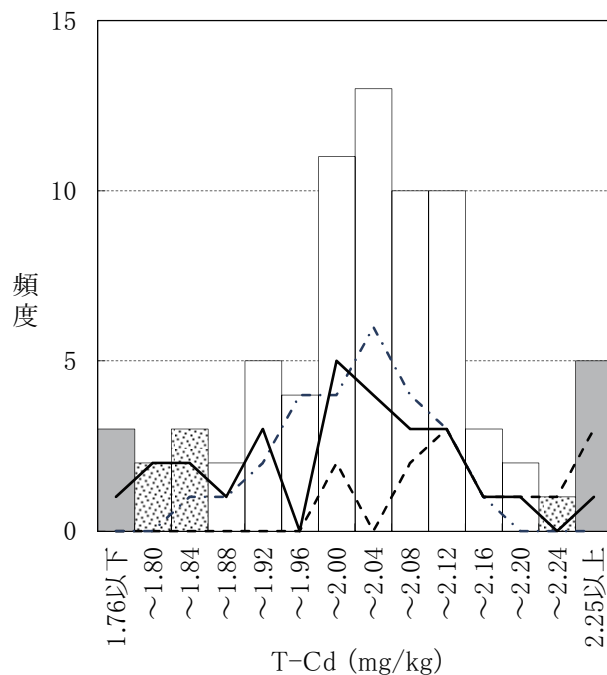


図3-10 化成肥料中のT-Cdの分析成績

□ 満足
 ■ 不満足
 ■ 疑わしい
 - - - 溶媒抽出
 — ゼーマン補正

(11) 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性けい酸(S-SiO₂)

参加 59 試験室のうち, 46 試験室がフッ化カリウム法, 9 試験室が過塩素酸法, そして塩酸法及び ICP 発光法が各 2 試験室であった。試験成績の度数分布を図 4-1 に示す。平均値 30.79 % と Median 30.69 % はやや剥離したが, 「満足」と評価された試験室は全体の 88 % であった。NIQR 0.75 % は, HSD 0.55 % より大きい値であったが, 2006~2010 年度の NIQR 0.49 %~0.87 % 及び HSD 0.53 %~0.58 % とほぼ変わらない値であった。「不満足」と評価された試験室は 4 試験室であり, 内訳はフッ化カリウム法が 2 試験室, 塩酸法及び過塩素酸法は 1 試験室ずつであった。その他, フッ化カリウム法及び過塩素酸法の Median は, フッ化カリウム法 30.69 % 及び過塩素酸法 30.51 % とフッ化カリウム法がやや高い値を示した。それらの NIQR は 0.76 % 及び 1.00 % であり, 過塩素酸法の NIQR がやや高い値を示した。2 試験室から塩酸法による試験成績の報告があり, うち 1 試験室が「不満足」と評価された。

(12) 鉍さいけい酸質肥料中のアルカリ分(AL)

参加 76 試験室のうち, 56 試験室が原子吸光法, 16 試験室が EDTA 法, 4 試験室が ICP 発光法を用いた。試験成績の度数分布を図 4-2 に示す。平均値 49.47 % と Median 49.48 % はほぼ一致しており, 「満足」と評価された試験室は全体の 84 % であった。NIQR 0.68 % は, HSD 0.70 % とほぼ同じ値を示した。「不満足」と評価された試験室は全体の 8 % にあたる 6 試験室が該当し, 内訳は原子吸光法が 5 試験室, ICP 発光法が 1 試験室であった。

原子吸光法及び EDTA 法の Median は, 49.48 % 及び 49.44 % とほぼ一致しており, それらの NIQR は

0.62 % 及び 0.59 % とほぼ同じ値であった。方法間の平均値の差による検定を行ったところ、それぞれの平均値に 5 % の水準で有意な差は認められなかった。

なお、原子吸光法で測定を行い AL の試験成績を報告した 56 試験室の内、55 試験室から S-CaO 及び S-MgO の試験成績の報告を受けた。それらの試験成績の度数分布を図 4-3 及び図 4-4 に示す。S-CaO の平均値 40.83 % と Median 40.78 % はほぼ一致し、NIQR は 0.79 % であった。一方、S-MgO の平均値 6.41 % と Median 6.24 % はやや剥離し、NIQR は 0.12 % であった。また、8 試験室が「不満足」という評価であった。図 2-6、図 2-7 及び図 2-8 のとおり、化成肥料及び鉍さいけい酸質肥料中の C-MgO、鉍さいけい酸質肥料中の S-MgO と S-CaO 及び C-MgO の試験成績の z スコアには相関は認められず、測定方法及び抽出方法による系統的な要因による偏りがないと考えられる。

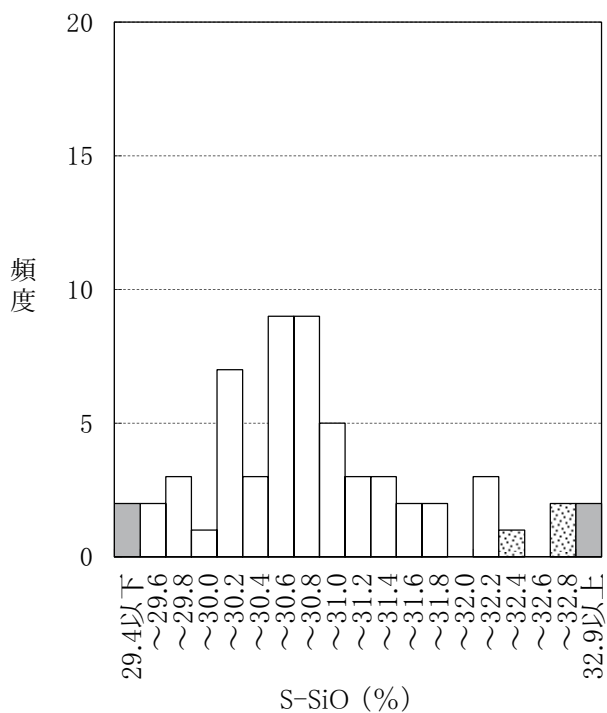


図4-1 鉍さいけい酸質肥料中の S-SiO の分析成績

□満足 □疑わしい ■不満足

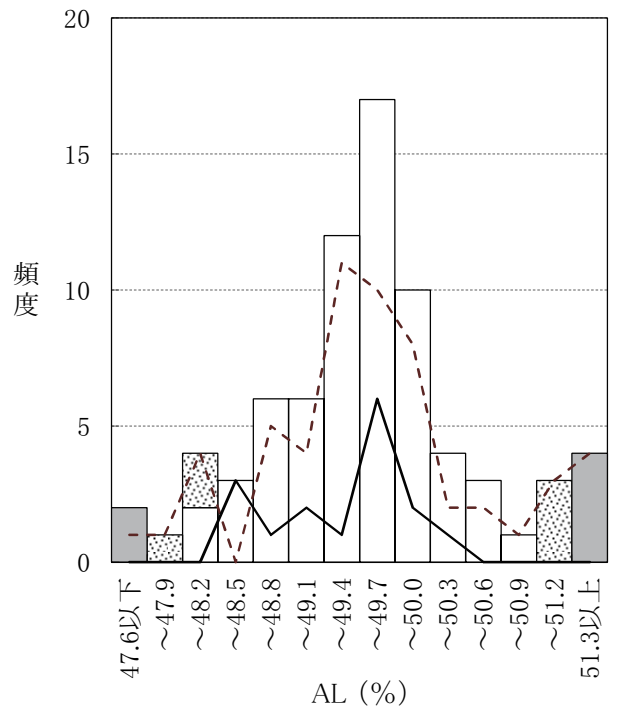


図4-2 鉍さいけい酸質肥料中の AL の分析成績

□満足 □疑わしい
 ■不満足 --- 原子吸光測光法
 — EDTA法

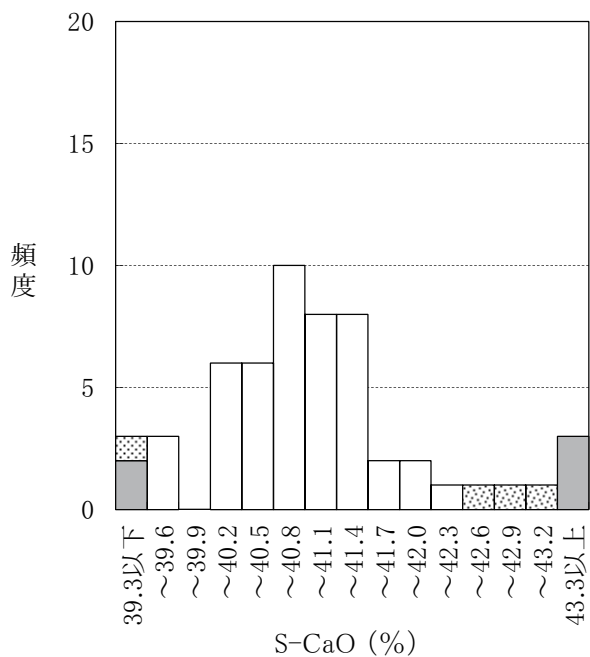


図4-3 鉍さいけい酸質肥料中のS-CaOの分析成績

□満足 □疑わしい □不満足

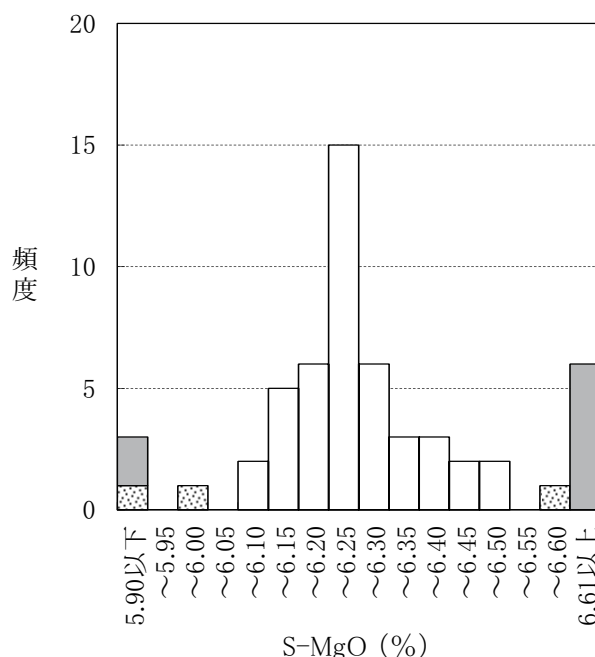


図4-4 鉍さいけい酸質肥料中のS-MgOの分析成績

□満足 □疑わしい □不満足

(13) 鉍さいけい酸質肥料中のく溶性苦土(C-MgO)

参加 78 試験室のうち、69 試験室が原子吸光法、5 試験室が EDTA 法、4 試験室が ICP 発光法を用いた。試験成績の度数分布を図 4-5 に示す。平均値 3.35 % と Median 3.36 % はほぼ一致しており、「満足」と評価された試験室は全体の 85 % であった。NIQR 0.23 % は、HSD 0.11 % より大きい値を示し、2006～2010 年度の NIQR 0.11 %～0.21 % 及び HSD 0.08 %～0.19 % と比較して NIQR はやや高い値であった。「不満足」と評価された試験室は全体の 10 % にあたる 8 試験室が該当し、内訳は原子吸光法が 5 試験室、ICP 発光法が 2 試験室、そして EDTA 法が 1 試験室であった。ICP 発光法については、「不満足」の 2 試験室は高めと低めに 1 試験室ずつ分布し、EDTA 法については「疑わしい」及び「不満足」が各 1 試験室あり、いずれも高めの値を示した。

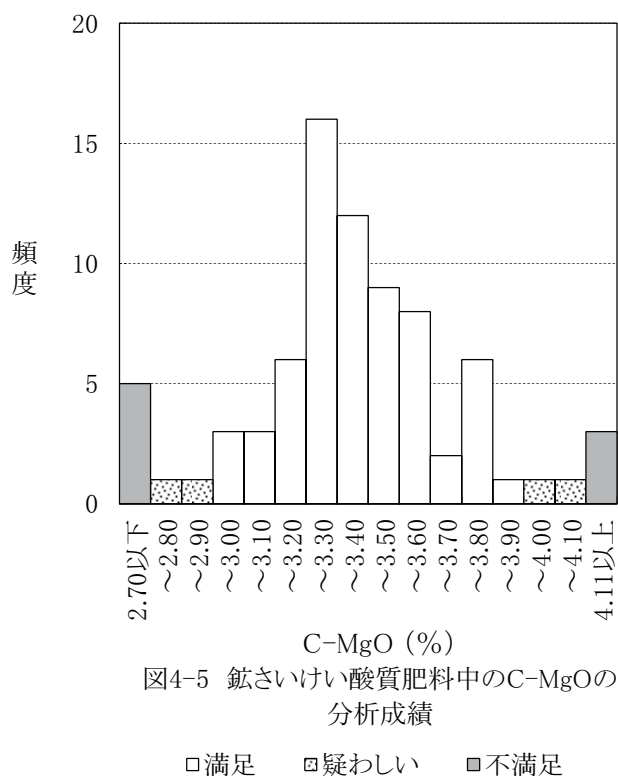


図4-5 鉍さいけい酸質肥料中のC-MgOの分析成績

□満足 □疑わしい □不満足

6. 総 括

2011年度外部精度管理のための共同試験は、化成肥料10成分に154試験室、鉍さいけい酸質肥料3成分に90試験室が参加した。各試験成績をロバスト法によるzスコアを用いて評価したところ、「満足 ($|z| \leq 2$)」と評価された試験室の割合は80%~94%、「不満足 ($|z| \geq 3$)」と評価された試験室の割合は2%~14%であった。全体的に平均値 Mean は、中央値 Median とほぼ一致していた。複数の試験法による報告で10試験室以上が採用した方法間について平均値の差を検定したところ、解析した全ての成分で方法間に有意な差は認められなかった。

今回の結果から「不満足」となった要因として、試験者が分析方法に熟練していないことがあげられた。また、機器分析を行う際には検量線の直線性に注意し、各標準液の確認、日頃から分析機器の管理に注意を払われたい。一方で、肥料分析に習熟していると思われる試験室において、測定値の誤記載が認められた。一例を挙げると、加里の測定値でW-K₂Oの測定値をC-K₂Oより大きい値で報告した試験室、アルカリ分におけるS-MgOの測定値で、アルカリとして可溶性石灰に合算する際の換算係数1.3914を乗じた値を報告した試験室等であり、測定値の取り扱いには十分注意を払う必要がある。

肥料分析は熟練を要する実験操作が多く、日々練度の向上に努める必要がある。更に危機管理の側面から内部管理分析を取り入れると、一層試験室の信頼性は高まると考えられる。

謝 辞

この共同試験を実施するにあたり、試料の準備・調製、均質性試験等多大なご協力を賜りました、株式会社テツゲン室蘭支店並びに多木化学株式会社本社工場の関係者各位に深く感謝致します。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料分析標準試料の配布申請手続き
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6.html> >
- 3) ISO/IEC Guide 43-1 (1997): “Proficiency testing by interlaboratory comparisons—Part 1 : Development and operation of proficiency testing schemes” (JIS Q 0043-1 : 1998, 「試験所間比較による技能試験 第1部:技能試験の開発及び運営」)
- 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) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992年版), 日本肥糧検定協会, 東京(1992)
- 6) Horwitz, W., Kamps, L.R., Boyer, K.W.: Quality control. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. AOAC Int.*, **63** (6), 1344~1354 (1980)
- 7) Thompson, M.: Recent Trend in Interlaboratory Precision at ppb and sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing, *Analyst*, **124**, 385~386 (2000)
- 8) Horwitz, W. Albert, R.: The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, *J. AOAC Int.*, **89** (4), 1095~1109 (2006)
- 9) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guideline for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2000)

Result of Proficiency Testing for Determination of Major Components and Harmful Elements of Ground Fertilizers Conducted in Fiscal Year 2011

Masahiro ECHI¹, Erina WATANABE², Hidenori KONISHI³, Shin ABE⁴,
Rie FUKUNAKA⁵, Keiji YAGI⁶, Yuji SHIRAI¹ and Masashi UWASAWA⁷

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

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

⁴ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center
(Now) Sendai Regional Center

⁵ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

⁶ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

⁷ Japan Fertilizer and Feed Inspection Association

A proficiency testing of analytical laboratories was conducted in fiscal year 2011, using reference materials of ground compound fertilizer and silicate slug fertilizer based on ISO/IEC Guide 43-1, "Proficiency testing by interlaboratory comparisons". Moisture(Mois), total nitrogen (T-N), ammonium nitrogen (A-N), acid-soluble phosphorus (S-P₂O₅), water-soluble phosphorus (W-P₂O₅), citric acid-soluble potassium (C-K₂O), water-soluble potassium (W-K₂O), citric acid-soluble magnesium (C-MgO), water-soluble magnesium (W-MgO), total arsenic (T-As), and total cadmium (T-Cd) were analyzed using a compound fertilizer sample. Acid-soluble silicon (S-SiO₂), alkalinity (AL) and citric acid-soluble magnesium (C-MgO) were analyzed using a silicate slug fertilizer sample. Two homogenized samples were sent to the participants. From the 154 participants which received a compound fertilizer sample, 52~138 results were returned for each element. From the 90 participants which received a silicate slug fertilizer sample, 55~78 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 79 %~92 % and the results from the satisfactory participants were normally distributed. The mean and median of all data mostly agreed except an element. The median-NIQR plots were distributed near Horwitz curve for each element, and the HorRat values were less than 2.0 for all elements except for moisture and C-MgO. Where more than ten results were returned, no significant distribution difference was observed between the different methods used.

Key words proficiency testing, compound fertilizer, silicate slug fertilizer, harmful element, ISO/IEC Guide 43-1, ISO/IEC 17025, *z* score

(Research Report of Fertilizer, **5**, 68~89, 2012)

8 2011 年度 肥料認証標準物質の開発

— 高度化成肥料 FAMIC-A-10, 普通化成肥料 FAMIC-B-10 及び
汚泥発酵肥料 FAMIC-C-09 の長期安定性試験 —

廣井利明¹, 秋元里乃¹, 八木寿治¹, 坂東悦子¹,
恵智正宏¹, 山西正将², 白井裕治¹, 柴田政人¹

キーワード 認証標準物質, 化成肥料, 汚泥発酵肥料, 主成分, 主要な成分, 有害成分, ISO Guide 31, ISO Guide 35, 長期安定性

1. はじめに

安心・安全な肥料の流通を確保するために独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) が行っている立入検査において収去した肥料の主成分および有害成分の分析は不可欠であり, その試験法には信頼性の確保が求められている. 従前から, 肥料生産事業場の品質管理室, 生産事業場から分析依頼を受けた民間分析機関, 肥料検査機関等の試験所では, 試験成績の信頼性維持及び分析技術の向上のために管理用試料又は肥料認証標準物質¹⁾による内部精度管理が日常的に行われている.

近年国際的な適合性評価の動きが進む中, 我が国においても ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2005)²⁾ の要求事項を参考にした試験成績の信頼性確保の考え方が重要視されている. その要求事項には, 「認証標準物質の定期的な使用」を実施することが推奨されている.

また, 現在 FAMIC においては, 肥料認証標準物質 A (高度化成肥料 FAMIC-A-10), 同 B (普通化成肥料 FAMIC-B-10) 及び同 C (汚泥発酵肥料 FAMIC-C-09) (以下, それぞれ「標準物質 A」「標準物質 B」「標準物質 C」という.) を調製^{3, 4)}, 販売しており (表 1), これらの作成については, 国際的整合性を確保するため, ISO Guide 35:2006 (JIS Q 0035:2008)⁵⁾ を参考に調製することとし, ISO Guide 31:2000 (JIS Q 0031:2002)⁶⁾ 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.

2011 年度は, 2012 年 6 月末に有効期限満了となる標準物質 C について, 在庫試料を用い, 認証成分の長期安定性試験を実施し, 有効期限の延長を行った. 併せて, 標準物質 A, B についても認証値設定から 1 年後の長期安定性試験を実施し, 認証成分の安定性を確認したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 長期安定性試験の方法

認証値を付与してから一定期間を過ぎた認証標準物質の値を認証値とほぼ同じ不確かさで確認するためには, 同ロットの試料を特性が変化しないと思われる低温に保持してそれと平行条件で分析する同時期測定型安定性試験が ISO Guide 35:2006 (JIS Q 0035:2008)⁵⁾ では推奨されている. しかし, この方法は実行が困難なため, 日本分析化学会における標準物質開発⁷⁾ で採用されている, 小規模の再共同試験を実施し, これにより得られた平均値と認証値との比較により安定性を評価する方法を下記の手順により実施した.

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) 神戸センター

- 1) 標準物質 A, B, C の在庫から、それぞれランダムに 6 本を抜き取る。
- 2) 全認証成分を試験する。
- 3) 認証値設定の共同試験で使用された試験方法(肥料等試験法⁸⁾)を使用する。
- 4) 試験室は FAMIC の本部及び地域センター計 6 試験室とする。

この小規模共同試験の平均値と認証値を、JIS Q 0035:2008⁵⁾ 8.4.2 及び JIS Z 8402-6:1999⁹⁾ 8.4.9.3.2 を参考に統計解析し、安定性を評価した。

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-10	高度化成肥料	尿素, 硫酸アンモニア, 塩化加里, 副産苦土肥料, 熔成微量元素複合肥料, りん酸, アンモニア	窒素全量, アンモニア性窒素, <溶性りん酸, 水溶性加里, <溶性苦土, <溶性マンガ, <溶性ほう素(全7成分)	2013年 6月末
FAMIC-B-10	普通化成肥料	硫酸アンモニア, 過りん酸石灰, 塩化加里	アンモニア性窒素, 可溶性りん酸, 水溶性りん酸, 水溶性加里, ひ素, カドミウム, 水銀, ニッケル, 鉛(全9成分)	2013年 6月末
FAMIC-C-09	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, 水銀, ニッケル, クロム, 鉛(全13成分)	2012年 6月末

2) 試験成分及び試験方法

試験成分及び使用した肥料等試験法の試験方法を表 2A, 2B 及び 2C に示す。

表 2A 標準物質 A の試験方法

試験成分	試料溶液の調製	測定
窒素全量 (T-N)	4.1.1.a ケルダール分解法	同左
	4.1.1.b 燃焼法	4.1.1.b 燃焼法 (3) 測定 備考3,備考4
アンモニア性窒素 (A-N)	4.1.2.b ホルムアルデヒド法 (4.1.2) 備考5	4.1.2.b ホルムアルデヒド法
<溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	4.2.3.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法	同左
水溶性加里 (W-K ₂ O)	4.3.3.a フレーム原子吸光法又はフレーム光度法 (4.1.2)	4.3.3.a フレーム原子吸光法又はフレーム光度法
<溶性苦土 (C-MgO)	4.6.2.a フレーム原子吸光法	同左
<溶性マンガ (C-MnO)	4.7.2.a フレーム原子吸光法	同左
<溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	4.8.1.a アゾメチンH法	同左

表 2B 標準物質 B の試験方法

試験成分	試料溶液の調製	測定
アンモニア性窒素 (A-N)	4.1.2.a 蒸留法	同左
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	4.2.2.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法	同左
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	4.2.4.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法	同左
水溶性加里 (W-K ₂ O)	4.3.3.a フレーム原子吸光法又はフレーム光度法 (4.1.2)	4.3.3.a フレーム原子吸光法又はフレーム光度法
砒素 (As)	5.2.a 水素化物発生原子吸光法	同左
カドミウム (Cd)	5.3.a フレーム原子吸光法 (4.1) 備考2	5.3.a フレーム原子吸光法
水銀 (Hg)	5.1.a 還元気化原子吸光法	同左
ニッケル (Ni)	5.4.a フレーム原子吸光法 (4.1) 備考2	5.4.a フレーム原子吸光法
鉛 (Pb)	5.6.a フレーム原子吸光法 (4.1) 備考2	5.6.a フレーム原子吸光法

表 2C 標準物質 C の試験方法

試験成分	試料溶液の調製	測定
窒素全量 (T-N)	4.1.1.a ケルダール分解法	同左
	4.1.1.b 燃焼法	同左
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	4.2.1.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法 (4.1.1)ケルダール分解	4.2.1.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法 (4.2)～(4.3)
	4.9.1.a フレーム原子吸光法 (4.1) a)～h) (灰化王水分解)	
加里全量 (T-K ₂ O)	4.9.1.a フレーム原子吸光法 (4.1) a)～h) (灰化王水分解)	4.3.1.a フレーム原子吸光法又はフレーム光度法 (4.2)
	4.3.1.a フレーム原子吸光法又はフレーム光度法 (4.1) 備考4 (炭化塩酸分解)	
石灰全量 (T-CaO)	4.9.1.a フレーム原子吸光法 (4.1) a)～h) (灰化王水分解)	4.5.1.a フレーム原子吸光法 (4.2)
	4.5.1.a フレーム原子吸光法 (4.1) 備考4 (炭化塩酸分解)	
有機炭素 (O-C)	4.11.1.a ニクロム酸酸化法	同左
銅全量 (T-Cu)	4.10.1.a フレーム原子吸光法	同左
亜鉛全量 (T-Zn)	4.9.1.a フレーム原子吸光法	同左
砒素 (As)	5.2.a 水素化物発生原子吸光法	同左
カドミウム (Cd)	5.3.a フレーム原子吸光法	同左
水銀 (Hg)	5.1.a 還元気化原子吸光法	同左
ニッケル (Ni)	5.4.a フレーム原子吸光法	同左
クロム (Cr)	5.5.a フレーム原子吸光法	同左
鉛 (Pb)	5.6.a フレーム原子吸光法	同左

3) 小規模共同試験の実施

FAMIC の 6 試験室による小規模共同試験を 2011 年 7~9 月に実施した。

各試験室においては、未開封の標準物質 A, B, C 各 1 瓶を用いて、試験成分毎に 2 点併行試験を行った。報告値のけた数は、標準物質 A, B については、有害成分(As, Cd, Hg, Ni, Pb), C-MnO 及び C-B₂O₃ の試験成績は有効数字 3 けた、それ以外の成分は、小数点以下 2 けたとし、C 試料については、有効数字 3 けたとした。また、報告値は、現状の認証値と同じ水分換算しない濃度(有姿濃度)とした。

・小規模共同試験参加試験室(五十音順)

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、札幌センター、仙台センター、名古屋センター、福岡センター、本部

3. 結果及び考察

1) 小規模共同試験成績及び解析結果

(1) 試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験成績を表 3A, 3B, 3C に示した。各試験項目の試験成績について ISO 5725-2:1994 (JIS Z 8402-2:1999)¹⁰⁾を参考に統計処理することとし、試験成績の外れ値を検出するために、コクラン(Cochran)の検定及びグラブズ(Grubbs)の検定を実施し、有意水準 1%で外れ値は検出されなかった。

表 3A 標準物質 A の共同試験結果

試験室 ¹⁾	窒素全量 (T-N)		アンモニア性窒素 (A-N)		＜溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)		質量分率(%) 水溶性加里 (W-K ₂ O)	
	A	14.71	14.69	10.67	10.68	9.99	10.05	13.56
B	14.80	14.80	10.78	10.90	10.11	10.14	13.63	13.72
C	14.58	14.71	10.62	10.87	10.10	10.12	13.36	13.35
D	14.62	14.61	10.68	10.66	9.88	10.08	13.44	13.31
E	14.62	14.63	10.65	10.59	10.08	10.09	13.46	13.63
F	14.72	14.76	10.75	10.78	10.02	10.10	13.52	13.63

試験室 ¹⁾	＜溶性苦土 (C-MgO)		＜溶性マンガ (C-MnO)		＜溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	
	A	3.25	3.23	0.398	0.399	0.210
B	3.29	3.35	0.397	0.398	0.200	0.206
C	3.38	3.38	0.392	0.397	0.210	0.212
D	3.42	3.35	0.400	0.412	0.215	0.202
E	3.38	3.30	0.409	0.412	0.203	0.211
F	3.29	3.30	0.402	0.404	0.206	0.209

1) 共同試験に参加した試験室の記号(順不同)

表 3B 標準物質 B の共同試験結果

試験室 ¹⁾	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)		質量分率(%) 水溶性加里 (W-K ₂ O)	
	A	8.44	8.41	8.07	8.12	6.97	6.97	8.92
B	8.27	8.30	8.11	8.11	7.01	7.01	8.81	8.84
C	8.26	8.18	8.16	8.19	7.01	6.99	8.95	8.93
D	8.34	8.30	8.13	8.14	7.07	7.07	8.65	8.64
E	8.22	8.17	8.16	8.08	7.00	6.98	8.85	8.93
F	8.37	8.35	8.10	8.11	6.97	6.97	8.81	8.89

試験室 ¹⁾	ひ素 (As)		カドミウム (Cd)		水銀 (Hg)		(mg/kg) ニッケル (Ni)	
	A	2.41	2.41	5.92	6.09	0.895	0.870	45.9
B	2.48	2.32	5.95	5.93	0.885	0.889	47.3	47.3
C	2.30	2.40	5.56	5.74	0.833	0.846	46.9	47.3
D	2.38	2.45	6.06	6.10	0.804	0.838	47.4	47.9
E	2.41	2.41	6.01	6.05	0.892	0.880	48.1	47.4
F	2.42	2.51	6.01	6.06	0.858	0.849	45.1	45.6

試験室 ¹⁾	鉛 (Pb)	
A	26.3	25.1
B	26.9	25.8
C	25.7	26.3
D	24.6	26.2
E	27.4	28.0
F	25.9	26.7

1) 共同試験に参加した試験室の記号(順不同)

表 3C 標準物質 C の共同試験結果

試験室 ¹⁾	窒素全量 (T-N)		りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)		加里全量 (T-K ₂ O)		質量分率(%) 石灰全量 (T-CaO)	
	A	4.15	4.20	7.93	7.98	0.145	0.148	2.55
B	4.31	4.33	7.89	7.88	0.158	0.158	2.63	2.76
C	4.27	4.31	8.24	8.15	0.162	0.166	2.62	2.57
D	4.08	4.05	8.11	8.12	0.204	0.203	2.49	2.53
E	3.97	4.00	7.91	7.91	0.161	0.147	2.60	2.85
F	4.30	4.27	8.07	8.06	0.185	0.192	2.69	2.67

試験室 ¹⁾	有機炭素 (O-C)	
A	31.2	31.2
B	30.6	30.2
C	30.9	31.1
D	32.2	32.3
E	30.3	31.4
F	29.7	29.7

1) 共同試験に参加した試験室の記号(順不同)

表 3C (続き)

試験室 ¹⁾	銅全量 (T-Cu)		亜鉛全量 (T-Zn)		砒素 (As)		カドミウム (Cd)	
	A	750	750	1650	1680	9.8	10.0	2.71
B	781	787	1680	1690	12.9	12.8	2.58	2.60
C	792	794	1730	1720	12.6	12.5	2.72	2.78
D	841	875	1770	1800	12.1	12.3	2.78	2.80
E	804	824	1740	1570	11.3	11.3	2.74	2.78
F	811	817	1720	1740	12.8	13.1	2.64	2.62

試験室 ¹⁾	水銀 (Hg)		ニッケル (Ni)		クロム (Cr)		鉛 (Pb)	
	A	0.95	1.00	35.9	36.2	56.6	57.4	46.3
B	0.97	0.95	36.8	37.3	68.3	68.7	44.6	44.4
C	1.01	1.02	38.4	40.0	75.2	71.2	49.5	48.6
D	1.04	1.00	40.7	41.0	67.6	68.5	49.0	49.0
E	0.86	0.97	37.8	37.9	69.5	69.5	48.7	47.7
F	0.94	0.92	37.1	37.2	57.0	55.7	42.5	43.7

1) 共同試験に参加した試験室の記号(順不同)

(2) 併行精度及び室間再現精度

試験成績より算出した平均値, 拡張不確かさ, 併行標準偏差 (SD_r), 併行相対標準偏差 (RSD_r), 室間再現標準偏差 (SD_R), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を表 4 に示した.

なお, 拡張不確かさは下記 (3) により算出した. また, 参考値として室間再現 HorRat 値を示した. 室間再現 HorRat 値は食品分析分野において化学分析法の精度を評価するために用いられており, $RSD_R/RSD_R(P)$ により求められる¹¹⁾. なお, $RSD_R(P)$ は, 平均定量値から修正 Horwitz 式¹²⁾により求めた. 室間再現 HorRat 値はいずれも 2 以下でコーデックス委員会の分析精度の受け入れ基準を満たした¹³⁾.

(3) 拡張不確かさの算出

共同試験の総平均値の標準不確かさ u は JIS Z 8402-6⁹⁾ 8.4.9.3.2 に従い, 共同試験の併行標準偏差 (SD_r), 室間再現標準偏差 (SD_R), 試験室数 ($p=6$) 及び各試験室での併行分析回数 ($n=2$) 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 ($U_{95\%}$) とし, 標準不確かさ (u) に包含係数 (k) を乗じて求め ((b) 式), 有効数字 2 けた以内に丸めた. なお, 包含係数 (k) は認証値設定時と同様に正規分布の信頼水準 95 % に該当する $k=2$ とした.

$$\text{標準不確かさ}(u) = \sqrt{\frac{SD_R^2 - \left(1 - \frac{1}{n}\right)SD_r^2}{p}} \quad \dots (a)$$

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

表4 標準物質 A, B, C の共同試験成績の解析結果

試験項目	試験 ¹⁾ 室数	平均値 ²⁾	拡張不確かさ ³⁾	SD _r ⁴⁾	RSD _r ⁵⁾ (%)	SD _R ⁶⁾	RSD _R ⁷⁾ (%)	HorRat _R ⁸⁾	
(標準物質A)									
窒素全量 (T-N)	6	14.69 % ⁹⁾	0.06 %	0.04 %	0.3	0.08 %	0.5	0.20	
アンモニア性窒素 (A-N)	6	10.72 %	0.06 %	0.08 %	0.8	0.10 %	0.9	0.33	
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	6	10.06 %	0.04 %	0.07 %	0.7	0.07 %	0.7	0.25	
水溶性加里 (W-K ₂ O)	6	13.51 %	0.10 %	0.07 %	0.6	0.13 %	1.0	0.37	
く溶性苦土 (C-MgO)	6	3.33 %	0.04 %	0.04 %	1.1	0.06 %	1.8	0.54	
く溶性マンガン (C-MnO)	6	0.402 %	0.005 %	0.004 %	1.0	0.007 %	1.6	0.36	
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	6	0.207 %	0.002 %	0.005 %	2.4	0.004 %	2.1	0.42	
(標準物質B)									
アンモニア性窒素 (A-N)	6	8.30 %	0.07 %	0.03 %	0.4	0.09 %	1.1	0.37	
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	6	8.12 %	0.02 %	0.03 %	0.4	0.04 %	0.4	0.15	
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	6	7.00 %	0.03 %	0.01 %	0.1	0.04 %	0.5	0.18	
水溶性加里 (W-K ₂ O)	6	8.84 %	0.09 %	0.04 %	0.4	0.11 %	1.2	0.42	
砒素 (As)	6	2.41 mg/kg	0.03 mg/kg	0.06 mg/kg	2.6	0.06 mg/kg	2.4	0.17	
カドミウム (Cd)	6	5.96 mg/kg	0.13 mg/kg	0.07 mg/kg	1.3	0.17 mg/kg	2.8	0.23	
水銀 (Hg)	6	0.862 mg/kg	0.023 mg/kg	0.014 mg/kg	1.6	0.029 mg/kg	3.4	0.21	
ニッケル (Ni)	6	46.8 mg/kg	0.9 mg/kg	0.3 mg/kg	0.7	1.1 mg/kg	2.3	0.25	
鉛 (Pb)	6	26.2 mg/kg	0.7 mg/kg	0.7 mg/kg	2.8	1.0 mg/kg	3.7	0.37	
(標準物質C)									
窒素全量 (T-N)	6	4.25 %	0.08 %	0.02 %	0.5	0.09 %	2.2	0.68	
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	6	7.97 %	0.07 %	0.01 %	0.1	0.09 %	1.1	0.37	
加里全量 (T-K ₂ O)	6	0.159 %	0.007 %	0.002 %	1.4	0.008 %	5.1	0.97	
石灰全量 (T-CaO)	6	2.50 %	0.06 %	0.02 %	0.7	0.07 %	2.9	0.82	
有機炭素 (O-C)	6	30.7 %	0.2 %	0.25 %	0.8	0.33 %	1.1	0.59	
銅全量 (T-Cu)	6	810 mg/kg	22 mg/kg	8.4 mg/kg	1.0	27.0 mg/kg	3.3	0.57	
亜鉛全量 (T-Zn)	6	1700 mg/kg	21 mg/kg	16.1 mg/kg	0.9	28.0 mg/kg	1.6	0.31	
砒素 (As)	6	13.0 mg/kg	0.3 mg/kg	0.14 mg/kg	1.0	0.38 mg/kg	3.0	0.27	
カドミウム (Cd)	6	2.70 mg/kg	0.03 mg/kg	0.01 mg/kg	0.4	0.03 mg/kg	1.2	0.09	
水銀 (Hg)	6	1.09 mg/kg	0.04 mg/kg	0.01 mg/kg	1.2	0.05 mg/kg	5.0	0.31	
ニッケル (Ni)	6	38.6 mg/kg	0.5 mg/kg	0.14 mg/kg	0.4	0.65 mg/kg	1.7	0.18	
クロム (Cr)	6	62.1 mg/kg	1.9 mg/kg	0.77 mg/kg	1.2	2.33 mg/kg	3.8	0.44	
鉛 (Pb)	6	48.0 mg/kg	0.5 mg/kg	0.44 mg/kg	0.9	0.66 mg/kg	1.4	0.16	

1) 解析に用いた試験室数

2) 平均値 (n = 試験室数 × 併行試験(2))3) 拡張不確かさ(包含係数 ($k=2$))

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 室間再現標準偏差

7) 室間再現相対標準偏差

8) 室間再現HorRat値(ただし、参考値)

9) 表中の%は、質量分率%(RSDを除く)

2) 認証標準物質の長期安定性の評価

標準物質 A, B, C の認証値設定時の認証値等及び1又は2年後の小規模共同試験の平均値等並びに安定性試験の評価結果を表5に示した。評価手法として、認証値設定時の共同試験平均値(認証値)とその1又は2年後の小規模共同試験成績の平均値の差について JIS Z 8402-6⁹⁾ 8.4.9.3.2 を参考に式(c)により有意差検定を行った。

なお、認証値の標準不確かさは、認証値設定時の共同試験成績から 1) (3)式(a)と同様に(試験室数 ($p=9\sim 12$))算出されたものである。

その結果、全ての認証成分において、 $|\mu - m|/s \leq 2.0$ となり、有意差は認められなかった。これにより、認証値設定から標準物質 A, B は1年間、標準物質 C は2年間、認証成分は安定であったと評価した。

判定基準： $|\mu - m|/s \leq 2.0 \dots$ 有意でない(安定) $|\mu - m|/s \geq 2.0 \dots$ 有意である(不安定)

$$|\mu - m|/s \dots (c)$$

$$s = \sqrt{u_{CRM}^2 + u_{meas}^2} \quad : \text{認証値と小規模共同試験成績の合成標準不確かさ}$$

μ : 認証値

u_{CRM} : 認証値の標準不確かさ

m : 小規模共同試験成績の平均値

u_{meas} : 小規模共同試験成績の平均値の標準不確かさ(1)(3)式(a)により算出)

表5 安定性試験の評価結果

試験項目	認証値設定時の共同試験結果 ¹⁾			小規模共同試験結果(2011年9月)			安定性評価		
	試験 ²⁾ 室数	認証値 ³⁾	標準 不確かさ	試験 ²⁾ 室数	平均値	標準 不確かさ	$ \mu - m $	s	$\frac{ \mu - m }{s}$
(標準物質A)									
窒素全量(T-N)	9	14.71 % ⁴⁾	0.04 %	6	14.69 %	0.03 %	0.02	0.05	0.38
アンモニア性窒素(A-N)	10	10.66 %	0.05 %	6	10.72 %	0.03 %	0.06	0.06	1.10
く溶性りん酸(C-P ₂ O ₅)	11	10.05 %	0.04 %	6	10.06 %	0.02 %	0.01	0.04	0.26
水溶性加里(W-K ₂ O)	11	13.59 %	0.04 %	6	13.51 %	0.05 %	0.08	0.07	1.20
く溶性苦土(C-MgO)	11	3.28 %	0.02 %	6	3.33 %	0.02 %	0.05	0.03	1.46
く溶性マンガン(C-MnO)	9	0.403 %	0.003 %	6	0.402 %	0.002 %	0.001	0.004	0.34
く溶性ほう素(C-B ₂ O ₃)	11	0.209 %	0.002 %	6	0.207 %	0.001 %	0.002	0.002	0.82
(標準物質B)									
アンモニア性窒素(A-N)	11	8.38 %	0.03 %	6	8.30 %	0.04 %	0.08	0.05	1.54
可溶性りん酸(S-P ₂ O ₅)	10	8.10 %	0.01 %	6	8.12 %	0.01 %	0.02	0.02	1.21
水溶性りん酸(W-P ₂ O ₅)	9	7.00 %	0.02 %	6	7.00 %	0.02 %	0.002	0.03	0.08
水溶性加里(W-K ₂ O)	9	8.85 %	0.04 %	6	8.84 %	0.04 %	0.01	0.06	0.14
ひ素(As)	11	2.36 mg/kg	0.05 mg/kg	6	2.41 mg/kg	0.01 mg/kg	0.04	0.05	0.83
カドミウム(Cd)	11	6.04 mg/kg	0.05 mg/kg	6	5.96 mg/kg	0.06 mg/kg	0.09	0.08	1.06
水銀(Hg)	10	0.86 mg/kg	0.01 mg/kg	6	0.86 mg/kg	0.01 mg/kg	0.004	0.02	0.24
ニッケル(Ni)	11	45.3 mg/kg	0.62 mg/kg	6	46.8 mg/kg	0.43 mg/kg	1.48	0.75	1.96
鉛(Pb)	12	26.2 mg/kg	0.73 mg/kg	6	26.2 mg/kg	0.33 mg/kg	0.01	0.80	0.01
(標準物質C)									
窒素全量(T-N)	12	4.19 %	0.04 %	6	4.25 %	0.04 %	0.05	0.05	1.01
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	12	7.99 %	0.03 %	6	7.97 %	0.03 %	0.02	0.05	0.38
加里全量(T-K ₂ O)	11	0.168 %	0.005 %	6	0.159 %	0.003 %	0.009	0.01	1.54
石灰全量(T-CaO)	10	2.55 %	0.05 %	6	2.50 %	0.03 %	0.05	0.05	0.98
有機炭素(O-C)	12	30.7 %	0.2 %	6	30.7 %	0.1 %	0.01	0.24	0.05
銅全量(T-Cu)	12	810 mg/kg	8 mg/kg	6	810 mg/kg	11 mg/kg	0.5	13.61	0.04
亜鉛全量(T-Zn)	11	1700 mg/kg	20 mg/kg	6	1700 mg/kg	10 mg/kg	0	22.52	0.00
ひ素(As)	10	12.5 mg/kg	0.4 mg/kg	6	13.0 mg/kg	0.2 mg/kg	0.5	0.40	1.29
カドミウム(Cd)	12	2.71 mg/kg	0.02 mg/kg	6	2.70 mg/kg	0.01 mg/kg	0.01	0.02	0.26
水銀(Hg)	12	1.03 mg/kg	0.02 mg/kg	6	1.09 mg/kg	0.02 mg/kg	0.06	0.03	1.89
ニッケル(Ni)	11	38.8 mg/kg	0.5 mg/kg	6	38.6 mg/kg	0.3 mg/kg	0.1	0.61	0.20
クロム(Cr)	12	64 mg/kg	2 mg/kg	6	62 mg/kg	1 mg/kg	2	1.90	1.17
鉛(Pb)	12	47.2 mg/kg	0.7 mg/kg	6	48.0 mg/kg	0.2 mg/kg	0.8	0.73	1.05

1) 標準物質A、Bは2010年9月、標準物質Cは2009年9月

2) 解析に用いた試験室数

3) 平均値(n =試験室数×試料数(2)×併行試験(3))

4) 表中の%は、質量分率%

3) 認証標準物質の有効期限

標準物質Cの有効期限については、2012年6月としていたが、長期安定性試験の結果、認証値設定から2年間の安定性が確認されたため、有効期限を1年延長し、2013年6月に変更した。また、この有効期限内に変質等が見られた場合には、FAMICのホームページに掲載することで使用者に周知することを認証書に明記した。更に、既に配付済みの使用者に対しては、有効期限が2013年6月まで延長されたことを、電子メール又は文書の郵送で周知した。

標準物質A、Bの有効期限については、認証値設定から1年間の安定性が確認されたため、現状のまま2013年6月とした。

4) 認証値の不確かさについて

ISO Guide 35:2006 (JIS Q 0035:2008)⁵⁾では、認証値に付随する不確かさに長期安定性の不確かさを評価することを推奨しているが、現状の標準物質 A, B, C の不確かさに、長期安定性の不確かさは含まれていない。今回、上記 2) の長期安定性試験の評価結果により、認証値及び不確かさの現時点での有効性が確認されたことから、不確かさについては変更せず、認証値設定時の数値のままとした。

4. まとめ

FAMIC は、肥料認証標準物質として高度化成肥料 FAMIC-A-10 及び普通化成肥料 FAMIC-B-10 並びに汚泥発酵肥料 FAMIC-C-09 の有効期限を確認するために長期安定性試験を実施した。長期安定性試験は、小規模共同試験により実施した。その試験結果を JIS Z 8402-6:1999 を参考に統計解析し、安定性を評価した。FAMIC-A-10 及び FAMIC-B-10 については調製後 1 年間、FAMIC-C-09 については調製後 2 年間の全認証成分の安定性が確認された。この試験結果について、肥料等技術検討会 肥料認証標準物質調製部会 (2012 年 2 月) の審議を受け、FAMIC-C-09 について有効期限を 1 年間延長し、2013 年 6 月までとした。

肥料認証標準物質の認証成分の長期安定性を確認し、有効期限をより長く設定することにより、利用者の利便性が向上すると考えられる。肥料の標準物質は、国内には他に作成している例はなく、また、国外の肥料成分と測定方法が異なる。このような観点から、この標準物質の利用促進が、肥料分析の信頼性確保に貢献するところは大きいものと期待される。

謝 辞

2011 年度の肥料認証標準物質の開発にあたり、2012 年 2 月 2 日に FAMIC 本部で行われた肥料等技術検討会 肥料認証標準物質調製部会において有効期限延長等の審議を受けた。当該部会の専門家委員である財団法人 日本肥糧検定協会 上沢正志 理事、独立行政法人 産業技術総合研究所 黒岩貴芳 主任研究員、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 内藤成弘 上席研究員、全国農業協同組合連合会 営農・技術センター 日高秀俊 氏、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 安井明美 専門員にご指導頂き、感謝いたします。

文 献

- 1) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料分析標準試料の配布申請手続き
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6.html>>
- 2) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 3) 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 関根優子, 及川裕美, 添田英雄, 阿部文浩, 白井裕治, 柴田政人: 2009 年度 肥料認証標準物質の開発—汚泥発酵肥料 FAMIC-C-09—, 肥料研究報告, **3**, 95~106 (2010)
- 4) 高橋佐貴子, 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 山西正将, 秋元里乃, 白井裕治, 柴田政人: 2010 年度 肥料認証標準物質の開発—高度化成肥料 FAMIC-A-10 及び普通化成肥料 FAMIC-B-10—, 肥料研究報告, **4**, 107~121 (2009)
- 5) 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」)

- 6) ISO Guide 31 (2000): “Reference materials－Contents of certificates and labels” (JIS Q 0031 : 2002, 「標準物質－認証書及びラベルの内容」)
- 7) 保母敏行, 飯田芳男, 石橋耀一, 岡本研作, 川瀬晃, 中村利廣, 中村洋, 平井昭司, 松田りえ子, 山崎慎一, 四方田千佳子, 小野昭紘, 柿田和俊, 坂田衛, 滝本憲一: 日本分析化学会における標準物質開発, 分析化学, **57**, 6, 363~392 (2008)
- 8) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html> >
- 9) JIS Z 8402-6, 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度)－第6部: 精確さに関する値の実用的な使い方 (1999)
- 10) JIS Z 8402-2, 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的方法(1999)
- 11) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guideline for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 12) Thompson, M.: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385~386(2000)
- 13) Codex Alimentarius: CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL Twentieth edition, p.66 (2011)

**Long-term Stability Examination of Fertilizer Certified Reference Materials for
Determination of Major Components and Harmful Elements:
High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-10), Ordinary Compound Fertilizer
(FAMIC-B-10) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-09)**

Toshiaki HIROI¹, Satono AKIMOTO¹, Toshiharu YAGI¹, Etsuko BANDO¹, Masahiro ECHI¹,
Masayuki YAMANISHI², Yuji SHIRAI¹ and Masato SHIBATA¹

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

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Kobe Regional Center

Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) has performed long-term stability examinations to confirm shelf life of fertilizer certified reference materials (CRMs): high-analysis compound fertilizer (FAMIC-A-10), ordinary compound fertilizer (FAMIC-B-10) and composted sludge fertilizer (FAMIC-C-09), for analysis of major components and harmful elements. FAMIC-A-10 is certified for the contents of total nitrogen (T-N), ammonium nitrogen (A-N), citric acid-soluble phosphorus (C-P₂O₅), water-soluble potassium (W-K₂O), citric acid-soluble magnesium (C-MgO), citric acid-soluble manganese (C-MnO) and citric acid-soluble boron (C-B₂O₃). FAMIC-B-10 is certified for the concentrations of ammonium nitrogen (A-N), neutral citrate-soluble phosphorus (S-P₂O₅), water-soluble phosphorus (W-P₂O₅), water-soluble potassium (W-K₂O), arsenic (As), cadmium (Cd), lead (Pb), nickel (Ni) and mercury (Hg). FAMIC-C-09 is certified for the concentrations of total nitrogen (T-N), total phosphoric acid (T-P₂O₅), total potassium (T-K₂O), total calcium (T-CaO), total copper (T-CuO), total zinc (T-ZnO), organic carbon (O-C), arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg), nickel (Ni), chromium (Cr), and lead (Pb). The long-term stability was evaluated by a statistical analysis of the results of a small scale collaborative study on the chemical analysis of the stock CRMs. Six laboratories participated in this study. The data reported from participants was performed a statistical analysis of in reference to JIS Z 8402-6:1999. From the result of the statistical analysis, the all certified values of the CRMs was stable for 1-2 years after preparation. 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 fertilizer, sludge fertilizer or compost.

Key words certified reference material (CRM), compound fertilizer, composted sludge fertilizer, major component, harmful elements, ISO Guide 31, ISO Guide 35, long-term stability,

(Research Report of Fertilizer, 5, 90~100, 2012)

9 メラミンを添加した土壌におけるコマツナに対する害の

確認試験とメラミン等の吸収

阿部文浩¹, 八木寿治¹, 坂東悦子¹

キーワード コマツナ, メラミン, シアヌル酸, 植害試験

1. はじめに

一部の水造粒した石灰窒素はメラミン含有量が高いことが判明したため、自主回収や出荷の自粛に至った¹⁾。メラミンは作物によっては吸収し蓄積することがあるとの情報から、石灰窒素工業会や全農等がメラミンの吸収試験等を実施している。そこで、FAMIC においてもノイバウエルポットの試験規模でメラミンを土壌に添加してコマツナを栽培しメラミンのコマツナに対する害の有無を確認するとともに、栽培したコマツナ中のメラミン及びメラミンが変換して生じたシアヌル酸の吸収の有無を確認することとした。

2. 材料および方法

1) 栽培試験方法

供試土壌の理化学性等については表 1 に示した。栽培試験は農林水産省農蚕園芸局長通知による植物に対する害に関する栽培試験(以下、「植害試験」という)の方法²⁾に準じ、ノイバウエルポット(1/10000 a)当たり乾土として 290 g の黒ボク土を充填し、メラミン(和光純薬工業, 特級)添加量を 0 mg, 1 mg, 2 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 60 mg, 80 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 500 mg の 13 段階とした。供試作物はコマツナ(品種名:夏楽天)を用い、共通肥料は硫酸アンモニア, 過りん酸石灰及び塩化加里を用いて窒素, りん酸及び加里の成分量をそれぞれ 100 mg とし 1 区1反復の規模で試験を実施した。平成 23 年 5 月 16 日に土壌充填, 肥料及びメラミン混合を行い, 翌 17 日にポット当たり 20 粒を播種した。試験中 2 回の発芽調査と生育調査を実施し, 同年 6 月 10 日に収穫し生体重を測定した。試験期間中は人工気象装置内で, 温度は昼間(12 時間)25 °C, 夜間(12 時間)15 °C, 水分量は最大容水量の 60 %を目安に管理した。

表1 供試土壌の理化学性等

土壌の種類	土性	沖積土又は 洪積土の別	pH (H ₂ O) 1+5	交換酸度	電気伝導率 (mS/m)	塩基置換容量 (meq/乾土100 g)	容積重 (g/風乾土500 ml)	最大容水量 (%/100 g乾土)
黒ボク土	壤土	洪積土	5.74	0.3	11	35.6	360	111

2) 作物体の分析方法

収穫したコマツナは地上部の生体重を測定した後, 試験区毎に約 5 g に分け, 重量を測定した後ビニール袋に入れ密封して冷凍庫で保存し分析用試料とした。分析用試料は分析前に 40 °Cで一晩乾燥させた後, 目開

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

き 0.5 mm の網ふるいを通すまで粉砕した。メラミン及びシアヌル酸の分析は液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による方法³⁾によった。メラミン及びシアヌル酸の分析結果とポット当たりの生体重から試験区当たりのメラミン吸収量及びシアヌル酸含有量を算出した。

3) 跡地土壌の分析方法

コマツナを収穫したポットの土壌は根を取り除き風乾したのち目開き 2 mm の網ふるいを通させ、ビニール袋に入れ密封し室温で保存しメラミン及びシアヌル酸の分析に供した。分析は土壌中のメラミン及びその関連物質の試験法(参考法)^{4, 5)}によった。別に、乾土当たりのメラミン等を換算するためハロゲンランプ水分計(100 °C)を用いて水分を測定した。なお、土壌の分析については分析法を検討・確立した後となったため栽培試験終了から約 6 か月後に実施した。

3. 結果及び考察

1) 栽培試験

栽培試験結果は表 2 に示した。ポットに添加するメラミン量を 0 mg から 500 mg まで設定しコマツナを栽培した。発芽時は特に差はなく異常な症状も認められず、葉長、生体重についても特に差は認められなかった(写真 1)。なお、メラミン 10 の生体重が低い原因は試験後半に水管理が不適(水切れ)であったことによるものである。播種 14 日後にメラミン 500 で本葉の先端中央部が枯れる症状が認められ、その後症状は徐々に広がり、葉の先端部のみならず葉の縁辺部に及び、試験終了時まで回復することはなかった。なお、この症状はメラミン 500 のみに限られた(写真 2)。

メラミン 500 は 10 a 当たり 150 kg (作土層 15 cm) のメラミンが施用された時を想定したものである。石灰窒素中にメラミンが混入していたとしても石灰窒素の施用量には限りがあることから、1 回に負荷されるメラミン量が 10 a 当たり 150 kg になることは考えられず、コマツナの初期生育には障害が現れないと考えられた。

表2 栽培試験結果

試験区	発芽調査成績		生育調査成績				異常症状
	5月20日	5月23日	5月31日	6月10日(収穫時)			
	発芽率 (%)	発芽率 (%)	葉長 (mm)	葉長 (mm)	生体重 (g/ポット)	生体重 指数 ¹⁾	
メラミン0	100	100	73	98	39.3	100	無
メラミン1	100	100	70	101	37.4	95	無
メラミン2	100	100	69	106	41.5	106	無
メラミン5	100	100	67	102	39.5	101	無
メラミン10	95	100	66	99	29.7	76	無
メラミン20	100	100	71	103	41.2	105	無
メラミン40	95	100	71	102	39.8	101	無
メラミン60	100	100	71	104	41.4	105	無
メラミン80	100	100	68	104	39.3	100	無
メラミン100	90	100	74	103	38.2	97	無
メラミン200	95	100	71	101	40.5	103	無
メラミン300	90	95	70	106	39.0	99	無
メラミン500	90	95	65	99	38.2	97	有

1) 生体重指数は各試験区の生体重をメラミン0の生体重で除し100倍して算出

2) コマツナ中のメラミン濃度等

コマツナ中のメラミン濃度等は表3に示した。コマツナ中のメラミン濃度はメラミンの添加量が多くなるに従い高くなり $6.8 \times 10^1 \mu\text{g/kg}$ ～ $1.7 \times 10^5 \mu\text{g/kg}$ であった。メラミン 20 からメラミン 500 はコーデックスの食品中のメラミンの基準値 2.5mg/kg を超えた。メラミン吸収量もメラミンの添加量が多くなるに従い高くなるが、メラミン吸収率は0.2 %～1.3 %の間で推移した。特に添加量が 10 mg 以上になると添加量の増加に従い吸収率が高くなった。ポットという閉鎖環境であるもののメラミンは土壌中に少量存在していても植物が吸収するが、濃度が高くなると吸収量も増加することが明らかとなった。なお、メラミン 0 でコマツナにメラミンが検出された理由については不明である。

シアヌル酸についてはメラミン 60 からメラミン 500 の間で検出された。その濃度はメラミン添加量が多くなるに従い高くなり $3.1 \times 10^1 \mu\text{g/kg}$ ～ $5.2 \times 10^2 \mu\text{g/kg}$ であった。シアヌル酸含有量もメラミンの添加量が多くなるに従い高くなった。添加量が 40 mg 以下では生体内に検出されないことと、跡地土壌中のシアヌル酸が N.D. であることから土壌中でメラミンからシアヌル酸が生成して吸収することよりも生体内のメラミンが一定濃度以上になるとシアヌル酸を生成している可能性が示唆された。また、メラミン 300 とメラミン 500 でシアヌル酸濃度が同じ値であることについては、生体内での代謝が抑制されたのか、他の物質を生成しているのかが考えられるが今回の試験では明らかにすることができなかった。

表3 コマツナ中のメラミン濃度等

試験区	メラミン濃度 ¹⁾ ($\mu\text{g/kg}$)	メラミン吸収量 ¹⁾ ($\mu\text{g/ポット}$)	メラミン吸収率 ²⁾ (%)	シアヌル酸濃度 ¹⁾ ($\mu\text{g/kg}$)	シアヌル酸含有量 ¹⁾ ($\mu\text{g/ポット}$)
メラミン0	6.8E+01	2.7E+00	N.D.	N.D.	N.D.
メラミン1	3.0E+02	1.1E+01	0.9	N.D.	N.D.
メラミン2	2.5E+02	1.0E+01	0.4	N.D.	N.D.
メラミン5	3.8E+02	1.5E+01	0.2	N.D.	N.D.
メラミン10	1.1E+03	3.2E+01	0.3	N.D.	N.D.
メラミン20	2.6E+03	1.1E+02	0.5	N.D.	N.D.
メラミン40	5.6E+03	2.2E+02	0.5	N.D.	N.D.
メラミン60	8.5E+03	3.5E+02	0.6	3.1E+01	1.0E+00
メラミン80	1.3E+04	5.3E+02	0.7	3.7E+01	1.0E+00
メラミン100	1.9E+04	7.2E+02	0.7	5.7E+01	2.2E+00
メラミン200	4.6E+04	1.9E+03	0.9	2.5E+02	1.0E+01
メラミン300	8.4E+04	3.3E+03	1.1	5.2E+02	2.0E+01
メラミン500	1.7E+05	6.5E+03	1.3	5.2E+02	2.0E+01

1) 指数表記(例: $6.8\text{E}+01=6.8 \times 10^1$)

2) メラミン0区のメラミン吸収量を減じた後添加量で除し算出

3) 跡地土壌中のメラミン濃度等

コマツナを栽培した跡地土壌のメラミン濃度等は表4に示した。メラミン添加量が少ないメラミン 1 及びメラミン 2 については誤差と考えられるメラミン残存量が定量されたが、メラミン 5 よりメラミン添加量が多い試験区は添加量の増加に伴いメラミン濃度及びメラミン残存量が増加した。また、シアヌル酸は検出下限(0.5 mg/kg 程度)以下であった。なお、土壌の分析は栽培試験終了から約 6 か月後に実施していることから試験直後のメラミンの収支とシアヌル酸への分解の有無については確認ができなかった。

表4 跡地土壌のメラミン濃度等

試験区	メラミン濃度 ¹⁾ (mg/kg乾土)	メラミン残存量 ¹⁾ (mg)	シアヌル酸濃度 (mg/kg乾土)
メラミン0	N.D.	N.D.	N.D.
メラミン1	1.0E+01	3.0E+00	N.D.
メラミン2	1.0E+01	2.9E+00	N.D.
メラミン5	1.4E+01	4.1E+00	N.D.
メラミン10	3.1E+01	8.8E+00	N.D.
メラミン20	6.9E+01	2.0E+01	N.D.
メラミン40	1.1E+02	3.1E+01	N.D.
メラミン60	1.6E+02	4.7E+01	N.D.
メラミン80	2.1E+02	6.1E+01	N.D.
メラミン100	2.9E+02	8.5E+01	N.D.
メラミン200	5.9E+02	1.7E+02	N.D.
メラミン300	9.1E+02	2.6E+02	N.D.
メラミン500	1.5E+03	4.2E+02	N.D.

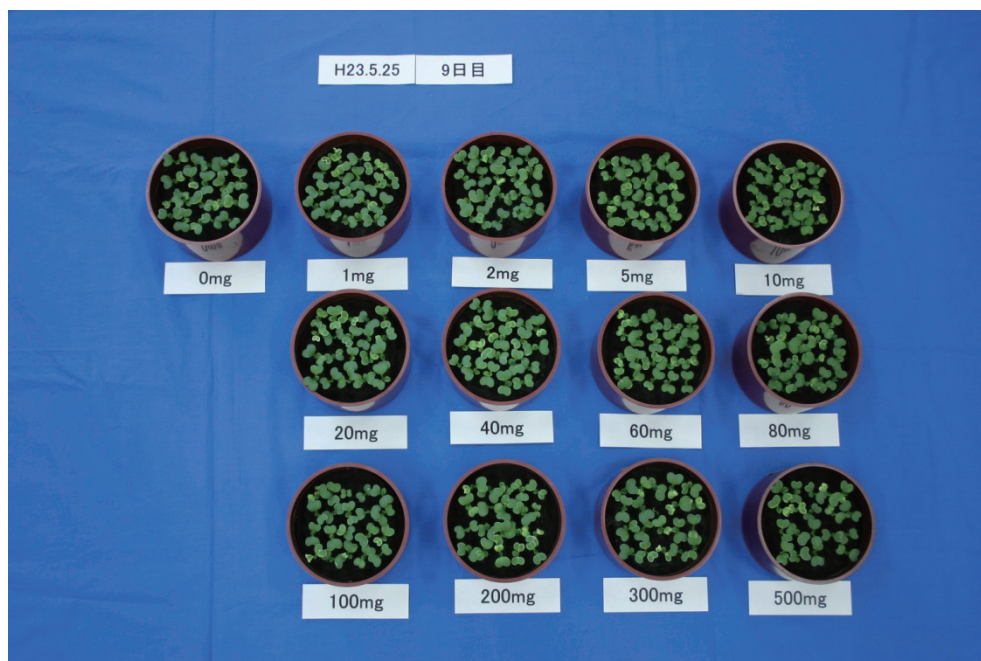
1) 指数表記 (例: 1.0E+01=1.0×10¹)

4. まとめ

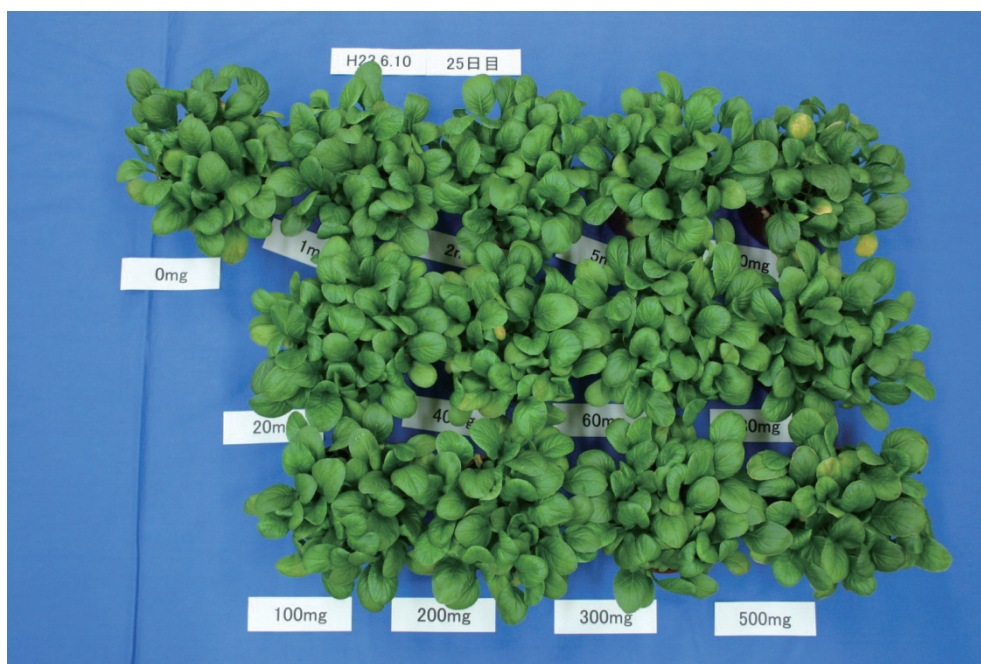
ノイバウエルポットの規模でメラミン添加量を 0 mg から 500 mg まで設定した試験区でコマツナを栽培した。その結果、500 mg 添加区で葉の縁辺部が枯れる症状が確認された。栽培したコマツナ中のメラミン濃度及び吸収量はメラミンの添加量が多くなるに従い高くなる傾向にあることからメラミンは生育初期から植物に吸収されることが確認された。シアヌル酸についてはメラミン 60 からメラミン 500 の間でシアヌル酸が検出され、その濃度はメラミン添加量が多くなるに従い高くなったが、跡地土壌中のシアヌル酸が N.D.であったことと、メラミン添加量が 40 mg までは生体内に認められないことから、作物体内のメラミン濃度が一定以上になるとシアヌル酸が代謝生成されていることが示唆された。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知: 石灰窒素の肥料登録に関する当面の取扱いについて, 平成 23 年 4 月 15 日, 23 消安第 524 号 (2011)
- 2) 農林水産省農蚕園芸局長通知: 肥料取締法の一部改正に伴う今後の肥料取締りについて, 別添 1, 植物に対する害に関する栽培試験, 昭和 59 年 4 月 18 日, 59 農蚕第 1943 号 (1984)
- 3) 八木寿治, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) による作物中のメラミン及びシアヌル酸の同時測定, 肥料研究報告, 5, 114~125 (2012)
- 4) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 土壌中のメラミン及びその関連物質の試験法 (参考法)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/sub9_4.pdf>
- 5) 坂東悦子, 恵智正宏, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による土壌中のメラミン及びその関連物質の同時測定, 肥料研究報告, 5, 108~113 (2012)



平成 23 年 5 月 25 日 (9 日目) 発芽状況



平成 23 年 6 月 10 日 (25 日目) 生育状況

写真 1 発芽状況及び生育状況



5月31日 初期の枯れ症状



6月6日 枯れ症状



6月10日 メラミン 500



6月10日 枯れ症状

写真2 メラミン 500 の症状

Confirmatory Study of the Harm and Absorption of Melamine etc. for Komatsuna in the Soil added Melamine

Fumihiro ABE¹, Toshiharu YAGI¹ and Etsuko BANDO¹

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

There is information that melamine may be absorbed and it may accumulate depending on plants. Therefore, this study was intended to observe the harm and absorption of melamine etc. for komatsuna (*Brassica rapa var. perviridis*) in the soil added melamine. Komatsuna was grown by the experimental plot which set up the melamine addition from 0 mg to 500 mg in neubauer pot. The growing tests were applied to the method of "vegetation test on the harm against plants " by the notice of the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries correspondingly. The ingredient amount of nitrogen, phosphorus, and potassium were set to 100 mg respectively ,using ammonium sulfate, calcium superphosphate, and potassium chloride as fertilizers, and the growing tests of 1 division 1 repetition was performed.

As the result, the border part of a leaf withers were observed in 500 mg melamine addition division. Analysis of plants object was conducted by LC-MS/MS and analysis of former site soil was conducted by LC. Because the melamine concentration and the amount of absorption in the komatsuna tended to become high as the addition of melamine increased, it was confirmed that melamine is absorbed by the plant from the early stages of growth. Cyanuric acid concentration became high as the melamine addition increased. Cyanuric acid was detected between the melamine 60 mg and the melamine 500 mg. However, for the cause of that the cyanuric acid in former site soil was N.D., and an addition not being accepted to 40 mg in the living body, when melamine concentration in the living body became more than fixed, it was suggested that metabolism generation of the cyanuric acid is carried out.

Key words komatsuna, melamine, cyanuric acid, vegetation test on the harm against plants

(Research Report of Fertilizer, **5**, 101~107, 2012)

10 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による土壤中の メラミン及びその関連物質の同時測定

坂東悦子¹, 恵智正宏¹, 白井裕治¹

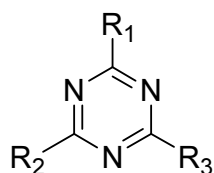
キーワード メラミン, 肥料, 石灰窒素, 高速液体クロマトグラフ

1. はじめに

メラミンは日本国内において肥料として有効性が認められておらず, 国内では流通していない. また, 現時点では肥料取締法に基づく公定規格においてメラミンに関する基準値等はない.

今般, 石灰窒素(肥料・農薬)のうち石灰窒素粉状品に水を加えて造粒した粒状製品について, メラミンの含有量が高い製品があることが確認された¹⁾. このため, 土壤中のメラミンの動態や農作物への移行に関する情報収集及び各種試験を実施し, 公定規格におけるメラミンに関する基準設定等の検討が進められている.

今回, 土壤中のメラミンとその関連物質であるアンメリン, アンメリド及びシアヌル酸(以下「メラミン等」という(Fig.1.))の動態を調査するため, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた定量試験方法を検討したので, 概要を報告する.



Substance name	R ₁	R ₂	R ₃	MW	N-Content (%)
Melamine	NH ₂	NH ₂	NH ₂	126.12	67
Ammeline	OH	NH ₂	NH ₂	127.10	55
Ammelide	OH	OH	NH ₂	128.09	44
Cyanuric acid	OH	OH	OH	129.07	33

Fig. 1 Chemical structural formula of melamine and its related substances

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

黒ぼく土(2点)及び灰色低地土(2点)を目開き1mmのふるいに通し, 通過したものを分析用試料とした. 分析用試料はビニール袋に入れ, 常温で保存した.

2) 試薬等の調製

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水又は同等の品質のもの.
- (2) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級試薬. なお, HPLC の溶離液には HPLC 用試薬を使用.
- (3) ジエチルアミン: 特級試薬.
- (4) りん酸塩緩衝液: JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 0.237 g 及び JIS K 9009 に規定するり

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

ん酸二水素ナトリウム二水和物 0.520 g を水に溶かして 1,000 mL とした. HPLC の溶離液に使用する場合は, 親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過した.

(5) メラミン等標準液 (0.5 mg/mL): メラミン [C₃H₆N₆], アンメリン [C₃H₅N₅O], アンメリド [C₃H₄N₄O₂] 及びシアヌル酸 [C₃H₃N₃O₃] 約 0.05 g をそれぞれひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg の桁まで測定した. 少量のジエチルアミン-水 (1+4) で溶かし, それぞれ全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた.

(6) 混合標準液 (50 $\mu\text{g/mL}$): 各メラミン等標準液 (0.5 mg/mL) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液 (4+1) を加えた.

(7) 検量線用混合標準液 (2 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に混合標準液 (50 $\mu\text{g/mL}$) の 2 mL~20 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液 (4+1) を加えた.

(8) 検量線用混合標準液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~2 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に検量線用混合標準液 (5 $\mu\text{g/mL}$) の 1 mL~20 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液 (4+1) を加えた.

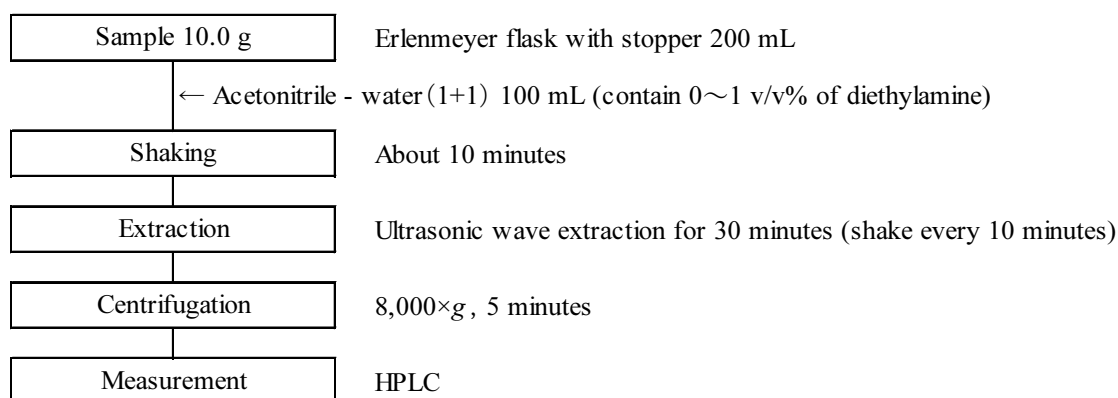
3) 器具及び装置

- (1) 高速液体クロマトグラフ (以下 HPLC): 島津製作所 LC-VP シリーズ
- (2) カラム: 東ソー TSKgel Amide-80 (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm)
- (3) 振とう機: AS ONE AW1
- (4) 超音波発生器: YAMATO 8510J-MT
- (5) 高速遠心分離機: AS ONE MCD-2000

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 10.0 g をはかりとり, 共栓三角フラスコ 200 mL に入れた. アセトニトリル-水 (1+1) にジエチルアミン濃度が容量分率 0%~1% になるよう添加した抽出溶媒 100 mL を加え, 振とう機で約 10 分間振り混ぜた後, 超音波発生器を用いて 10 分間ごとに振り混ぜながら 30 分間超音波処理を行った. 静置後, 上澄み液を 1.5 mL 容の共栓遠心沈殿管に取り, 8,000 \times g で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を HPLC 測定用試料溶液とした (Scheme 1).



Scheme 1 Method flow sheet of melamine and its related substances in soil

(2) 測定

各検量線用混合標準液 10 μL を HPLC に注入し, Table 1 の条件で測定し, 得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した. 試料溶液 10 μL を HPLC に注入し, ピーク面積又は高さから検量線により試料溶液中のメラミン等の量を求め, 分析試料中の濃度を算出した.

Table 1 HPLC Conditions

HPLC system	Shimadzu corporation LC-VP series
Column	TOSOH corporation TSKgel Amide-80 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm particle size)
Column temperatures	40 $^{\circ}\text{C}$
Mobile phase	Acetonitrile - phosphate buffer (4+1)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector system	UV detector at a wavelength of 214 nm

3. 結果及び考察

1) 測定条件

メラミン等検量線用混合標準液(各 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量)の HPLC クロマトグラムを Fig.2 に示した. 東ソー株式会社のカラムのテクニカルインフォメーション²⁾を参考に HPLC 条件 (Table 1) を設定したところ, メラミン等の各ピーク形状及び分離度は満足するものであった. 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量の検量線用混合標準液を調製し, 本法に従って検量線を作成した. その結果, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量の範囲で直線性のある検量線が得られた.

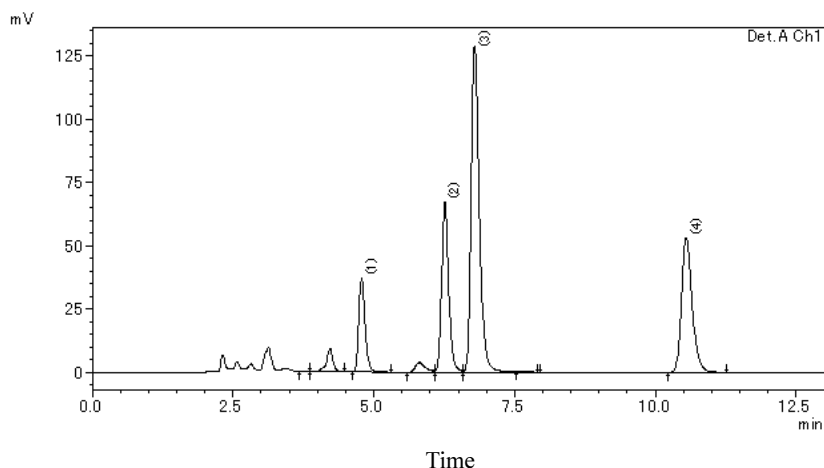


Fig. 2 HPLC chromatogram of standard

Substance name (1)Cyanuric acid (2) Ammelide (3) Melamine (4) Ammeline

2) 抽出方法の検討

GC/MS 法による肥料中のメラミン等の分析方法³⁾では, 分析試料にアセトニトリル-水-ジエチルアミン (5+4+1) 100 mL を加えて抽出をしている. この溶媒を土壌中のメラミン等の抽出に用いると, 定量を妨害する夾雑ピークが検出された.

このことから, アセトニトリル-水(1+1)にジエチルアミンを濃度が 0 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1 % になるよう添加したものをを用いて, 最適な抽出溶媒の条件を検討した. 黒ぼく土 1 点及び灰色低地土 1 点にメラミン等を 50

mg/kg もしくは 100 mg/kg になるよう加えて添加回収試験を行ったところ、メラミン、アンメリン、アンメリドに関してはジエチルアミン濃度 1 % での回収率が最も良好であった(Fig. 3)。シアヌル酸に関しては、ジエチルアミン濃度 0 % での回収率が十分に良好であることと、ジエチルアミンを添加することでシアヌル酸のピークと同じ位置に目的以外のピークが検出されるため、シアヌル酸のみジエチルアミンを添加しない溶媒を抽出に用いることとした。

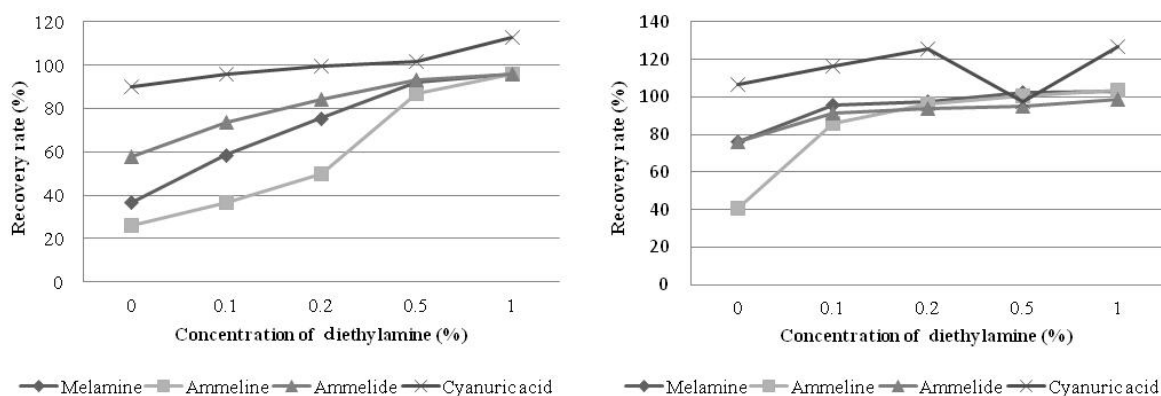


Fig 3. Result of requirement study about extraction solvent (Left: Andosol Right: Gray lowland soil)

3) 添加回収試験

メラミン等を含む黒ぼく土 2 点及び灰色低地土 2 点にメラミン等として 100 mg/kg 及び 10 mg/kg をそれぞれ添加し、3 点併行で回収試験を実施した結果、メラミンの回収率及び併行相対標準偏差は 91.9 % ~ 101.2 % 及び 1.3 % ~ 6.2 % で、アンメリンでは 93.1 % ~ 106.2 % 及び 0.2 % ~ 9.3 % で、アンメリドでは 88.4 % ~ 97.4 % 及び 0.6 ~ 6.3 % 並びにシアヌル酸では 79.5 % ~ 108.2 % 及び 1.4 % ~ 10.0 % と良好な回収率及び併行精度が得られた (Table 2)。

Table 2 Recovery and precision data

Content ¹⁾ (mg/kg)	Melamine		Ammeline		Ammelide		Cyanuric acid		
	Mean ²⁾ (%)	RSD ³⁾ (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	
Andosol-1	100	93.9	2.0	93.1	3.4	94.5	1.4	86.2	5.8
	10	91.9	2.3	94.7	9.3	88.4	1.4	91.3	5.3
Andosol-2	100	93.8	1.3	95.6	0.2	92.6	1.0	86.9	7.9
	10	101.2	6.2	95.1	5.3	92.0	6.3	96.1	1.4
Gray lowland soil-1	100	100.8	2.3	101.3	2.4	97.4	1.6	89.9	2.3
	10	98.1	2.2	94.3	4.5	97.1	0.9	106.6	9.4
Gray lowland soil-2	100	97.5	1.3	100.6	0.7	95.9	0.6	79.5	10.0
	10	94.4	3.5	106.2	6.1	89.6	1.8	108.2	3.7

1) Content of melamine and its related substances

2) $n=3$

3) Relative standard deviation

4) 定量下限の確認

灰色低地土を用いたメラミン等の定量下限確認の試験結果を Table 3 に示した。分析試料にメラミン等の含有量として 1 mg/kg もしくは 2 mg/kg になるようにそれぞれ添加して 7 点併行試験を実施したところ、本法の定量下限はメラミン、アンメリド及びシアヌル酸で 0.5 mg/kg 程度、アンメリンで 2 mg/kg 程度と推定された。また、本法の検出限界はメラミン、アンメリド及びシアヌル酸で 0.2 mg/kg 程度、アンメリドで 0.6 mg/kg 程度と推定された。

Table 3 Calculated LOQ and LOD

	Content ¹⁾ (mg/kg)	Mean ²⁾ (mg/kg)	SD (mg/kg)	LOQ ³⁾ (mg/kg)	LOD ⁴⁾ (mg/kg)
Melamine	1.00	0.87	0.03	0.3	0.1
Ammeline	2.00	1.90	0.16	1.6	0.6
Ammelide	1.00	0.86	0.03	0.3	0.1
Cyanuric acid	1.00	1.02	0.04	0.4	0.2

- 1) Content of melamine and its related substances
- 2) $n=7$
- 3) Standard deviation $\times 10$
- 4) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$

4. まとめ

土壌中のメラミン及びその関連物質の試験法の妥当性確認のための試験を実施したところ、次のとおり満足する成績を得た。

1) 抽出溶媒の検討を行った結果、メラミン、アンメリン、アンメリドはアセトニトリル-水-ジエチルアミン (50+49+1) (ジエチルアミン 1%含有)、シアヌル酸はアセトニトリル-水 (1+1) が最適であった。

2) メラミン等の含有量が 100 mg/kg 及び 10 mg/kg になるよう添加した黒ぼく土 2 点、灰色低地土 2 点を用いて回収試験を実施した結果、メラミンの回収率及び併行相対標準偏差は 91.9%~101.2% 及び 1.3%~6.2% で、アンメリンでは 93.1%~106.2% 及び 0.2%~9.3% で、アンメリドでは 88.4%~97.4% 及び 0.6%~6.3% 並びにシアヌル酸では 79.5%~108.2% 及び 1.4%~10.0% と良好であった。

3) 本法の定量下限はメラミン、アンメリド及びシアヌル酸で 0.5 mg/kg 程度、アンメリンで 2 mg/kg 程度、検出下限はメラミン、アンメリド及びシアヌル酸で 0.2 mg/kg 程度、アンメリドで 0.6 mg/kg 程度と推定された。

なお、この試験法は FAMIC ホームページに参考法として掲載されている⁴⁾。

文 献

- 1) 農農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知: 石灰窒素の肥料登録に関する当面の取扱いについて, 平成 23 年 4 月 15 日, 23 消安第 524 号 (2011)
- 2) 東ソー株式会社: テクニカルインフォメーション No.109 順相クロマトグラフィーによるメラミン及びその加水分解物の分析
< <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/7F1EAA68-798B-494F-B4C5-487A397B5536/0/109.pdf> >
- 3) 白井裕治, 大木純: ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) 法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定, 肥料研究報告, **1**, 114~121 (2008)
- 4) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 土壌中のメラミン及びその関連物質の試験法 (参考法)
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/sub9.pdf> >

Validation of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Determination of Melamine and Its Related Substances in Soil

Etsuko BANDO¹, Masahiro ECHI¹ and Yuji SHIRAI¹

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

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for determination of melamine was validated. Melamine, Ammeline and Ammelied were extracted with diethylamide-water-acetonitrile (1+49+50). Cyanuric acid was extracted with water-acetonitrile (1+1). The extract was centrifuged and a portion of the supernatant was analyzed by HPLC.

As a result of 3 replicate analysis used two types of soil (2 andosol and 2 gray lowland soil), the mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) of Melamine were 91.9 %~101.2 % and 1.3~6.2 % respectively. Ammeline were 93.1 %~106.2 % and 0.2 %~9.3 %, Ammelied were 88.4 %~97.4 % and 0.6 %~6.3 %, and Cyanuric Acid were 79.5 %~108.2 % and 1.4 %~10.0 % respectively. On the basis of 7 replicate measurement of Melamine and its degradation products added samples the LOQ values were 0.5mg/kg for Melamine, Ammelied and Cyanuric acid, 2mg/kg for Ammeline. The results demonstrated the validity of the HPLC method for determination of Melamine and its degradation products in soil.

Key words melamine, fertilizer, calcium cyanamid, HPLC

(Research Report of Fertilizer, **5**, 108~113, 2012)

11 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による

作物中のメラミン及びシアヌル酸の同時測定

八木寿治¹, 白井裕治¹

キーワード 作物, メラミン, シアヌル酸, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

1. はじめに

メラミンはメラミン樹脂等の原料として使用され、広く工業的に利用されている。一方、シアヌル酸はメラミン類似化合物であり、塩素系殺菌剤の原料として活用されている。両者が生体内に取り込まれた場合は水素結合により結びつきメラミンシアヌレートとして腎臓等に結石の問題を引き起こすことが知られている。

肥料用途として、メラミンは海外で利用されていることもあるが、国内では流通・利用が認められてはいない。しかしながら、肥料の主要成分である窒素量を見かけ上、かさ上げする欺瞞材として、肥料に意図的に混入されたり、また近年においては石灰窒素を水和造粒する際に生産される副生成物として問題になっている¹⁾。

メラミンが作物中に移行することを示す報告はあるが移行量まで示した報告は乏しく、また、今後メラミンを含有した肥料が故意・過失を問わず施用された場合には、作物中への移行量確認のための分析法が必要となってくる。現在、肥料中のメラミンの分析法は幾つか開発されている^{2~4)}が、同定性の高い作物中のメラミンの分析法の開発は確認できない。

このため FDA が示した食品中のメラミン及びシアヌル酸の定量法⁵⁾(以下、FDA 法とする)を参考に、作物中のメラミン及びシアヌル酸の同時測定法を検討・確認したところ良好な成績を得たのでその概要を報告する。

なお、メラミン及びシアヌル酸の構造式を図 1 に示した。

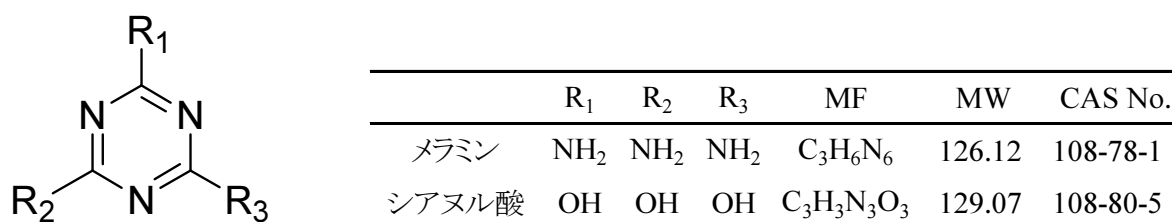


図1 メラミン及びシアヌル酸の構造式

2. 材料及び方法

1) 供試試料

供試作物としては多種あるが、第一選択として、植害試験で使用されるコマツナ、そして同じく吸収試験等で使用実績のあるチンゲンサイ及びカブ、さらにニンジンを用いた。これら作物は葉部と根部に切り分け洗浄した

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

後、コマツナ、チンゲンサイ及びカブは葉部を、ニンジン根は根部を乾燥器(40℃)で一晩乾燥した後、目開き500µmのスクリーンを通過するまで粉碎し、分析用試料とした。なお、同時に当該部の水分量を測定し、現物換算係数を算出し、現物あたりの定量値を算出できるようにした。

2) 試薬等の調製

- (1) 水: 水精製装置(Elix Advantage5 及び Milli-Q Academic A-10, Millipore)で精製した JIS K 0557 に規定する A4 相当の水を用いた。
- (2) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級試薬。
- (3) ぎ酸: LC-MS 用試薬。
- (4) ぎ酸溶液(4 v/v%): ぎ酸 4 mL に水を加えて 100 mL とした。
- (5) ぎ酸アセトニトリル溶液(4 v/v%): ぎ酸 4 mL にアセトニトリルを加えて 100 mL とした。
- (6) アンモニア水: JIS K 8085 に規定する 25 w/w%の特級試薬。
- (7) アンモニア溶液(5 v/v%): アンモニア水 20 mL に水を加えて 100 mL とした。
- (8) ジエチルアミン: 特級試薬。
- (9) ジエチルアミンアセトニトリル溶液(2 v/v%): ジエチルアミン 2 mL にアセトニトリルを加えて 100 mL とした。
- (10) ジエチルアミンアセトニトリル溶液(0.2 v/v%): ジエチルアミン 0.2 mL にアセトニトリルを加えて 100 mL とした。
- (11) 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。
- (12) 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) 1 mL に水を加えて 100 mL とした。
- (13) メラミン標準原液(100 µg/mL): メラミン[C₃H₆N₆] (和光純薬工業, 食品分析用) 0.01 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg のけたまで測定した。少量のアセトニトリル-水(1+1)で溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加えた。
- (14) メラミン標準液(10 µg/mL): メラミン標準原液(100 µg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までアセトニトリル-水(1+1)を加えた。
- (15) 安定同位体元素標識メラミン(メラミン-¹³C₃¹⁵N₃)内標準液(1 µg/mL): メラミン[¹³C₃H₆¹⁵N₃N₃]標準原液(100 µg/mL) (CIL) 1 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までアセトニトリルを加えた。
- (16) 検量線用メラミン標準液(0 ng/mL~1000 ng/mL): 使用時にメラミン標準液(10 µg/mL)の 0 mL~5 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、安定同位体元素標識メラミン内標準液(1 µg/mL)の 0.5 mL を同全量フラスコにそれぞれ加えて標線までジエチルアミンアセトニトリル溶液(2 v/v%)を加えた。
- (17) シアヌル酸標準原液(100 µg/mL): シアヌル酸[C₃H₃N₃O₃] (林純薬工業, 食品分析用) 0.01 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg のけたまで測定した。少量のアセトニトリル-水(1+1)で溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加えた。
- (18) シアヌル酸標準液(10 µg/mL): シアヌル酸標準原液(100 µg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までアセトニトリル-水(1+1)を加えた。
- (19) 安定同位体元素標識シアヌル酸(シアヌル酸-¹³C₃)内標準液(10 µg/mL): シアヌル酸[¹³C₃H₃N₃O₃] (林純薬工業, 食品分析用) 0.001 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg のけたまで測定した。少量のアセトニトリルで溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加えた。
- (20) 検量線用シアヌル酸標準液(0 ng/mL~1000 ng/mL): 使用時にシアヌル酸標準液(10 µg/mL)の 0

mL～5 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、安定同位体元素標識シアヌル酸内標準液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の 0.5 mL を同全量フラスコにそれぞれ加えて標線までぎ酸アセトニトリル溶液 (4 v/v%) を加えた。

(21) 溶離液用アセトニトリル: LC-MS 用試薬.

3) 器具及び装置

(1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS): Waters Quattro Premier XE

カラム: ZIC-HILIC (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μm)

(2) P.P.製ねじ口試験管: ジーエルサイエンス DigiTUBEs

(3) 振とう機: iuch AW-1

(4) マニホールド

(5) 遠心分離機: KOKUSAN H-26F

(6) 高速遠心分離機: AS ONE MCD-2000

(7) 強酸性陽イオン交換体カートリッジカラム

: Waters Oasis MCX (充てん剤量 150 mg, 容量 6 mL, 粒径 60 μm)

(8) 強酸性陰イオン交換体カートリッジカラム

: Waters Oasis MAX (充てん剤量 150 mg, 容量 6 mL, 粒径 60 μm)

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 0.50 g を P.P.製ねじ口試験管 50 mL に入れ, メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液を正確にそれぞれ 250 μL 加えた. 次にアセトニトリル-水 (1+1) 20 mL を同 P.P.製ねじ口試験管に加え, 振とう機で 15 分間振り混ぜた. 遠心力 1,300 $\times g$ で 5 分間遠心分離し, 上澄み液を抽出液とした.

(2) 精製

・メラミンの場合

MCX カートリッジカラムを予めアセトニトリル 5 mL 及びぎ酸溶液 (4 v/v%) 5 mL で洗浄し, ぎ酸溶液 (4 v/v%) 3 mL と抽出液 2 mL とを同カートリッジカラムに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 次にアセトニトリル 5 mL 及びジエチルアミンアセトニトリル溶液 (0.2 v/v%) 5 mL を順次同カートリッジカラムに加えて流出させた. 試験管 10 mL を同カートリッジカラムの下に置き, ジエチルアミンアセトニトリル溶液 (2 v/v%) 4 mL を同カートリッジカラムに加えてメラミンを溶出させた. 溶出液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ, 遠心力 5,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し, 上澄み液を試料溶液とした.

・シアヌル酸の場合

MAX カートリッジカラムを予めアセトニトリル 5 mL 及びアンモニア溶液 (5 v/v%) 5 mL で洗浄し, アンモニア溶液 (5 v/v%) 3 mL と抽出液 2 mL とを同カートリッジカラムに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 次にアセトニトリル 5 mL を同カートリッジカラムに加えて流出させた. 試験管 10 mL を同カートリッジカラムの下に置き, ぎ酸アセトニトリル溶液 (4 v/v%) 2 mL を同カートリッジカラムに加えてシアヌル酸を溶出させた. 溶出液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ, 遠心力 5,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し, 上澄み液を試料溶液とした.

(3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各検量線用メラミン標準液または各検量線用シアヌル酸標準液 5 μ L を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)に注入し、表 1 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

表1 LC-MS/MS測定条件

カラム	ZIC-HILIC(内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒径3.5 μ m)
溶離液	A:酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L)-アセトニトリル[5+95] B:酢酸アンモニウム(10 mmol/L)[アセトニトリル-水(1+1)]溶液
グラジエント	0 min (0 %B)→10 min (0 %B)→11 min (50 %B) →20 min (50 %B)→21 min (0 %B)→30 min (0 %B)
流速	0.3 mL/min
カラム槽温度	40 °C
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
デソルベーションガス	N ₂ (800 L/h)
コーンガス	Ar (50 L/h)
イオン源温度	120 °C
デソルベーション温度	400 °C
モード	表2のとおり
キャピラリー電圧	表2のとおり
コーン電圧	表2のとおり
コリジョンエネルギー	表2のとおり
モニターイオン	表2のとおり

表2 各物質のモニターイオン条件等

物質名	モード	キャピラリー電圧 (kV)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (定量用) (m/z)	プロダクトイオン (確認用) (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
メラミン	+	4.0	127	85	68	34	25
メラミン- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	+	4.0	133	89		34	16
シアヌル酸	-	3.5	128	42	85	22	12
シアヌル酸- ¹³ C ₃	-	3.5	131	43		22	10

(4) 計算

得られた選択反応検出クロマトグラムからメラミン及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ のピーク面積またはシアヌル酸及びシアヌル酸-¹³C₃ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のメラミン量またはシアヌル酸量を算出した。

なお、定量法の概要を図 2 に示した。

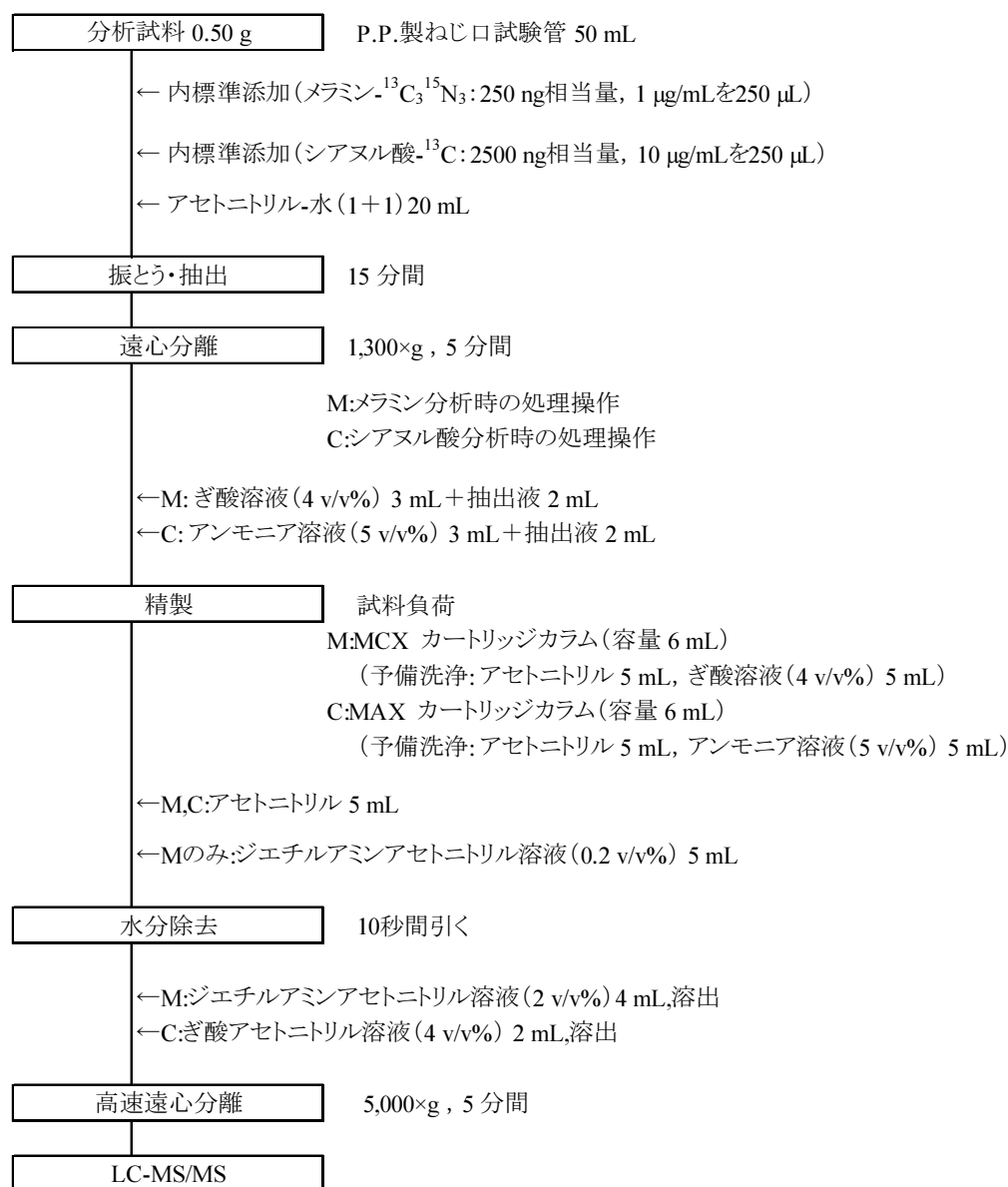


図 2 作物中のメラミン及びシアヌル酸の定量法フロー

3. 結果および考察

1) 試料溶液の調製及び測定条件の検討

本法はFDA法と比較して主として以下の点を変更した。FDA法においては試料採取量が5gであるが、本法においては3.3)の検討を踏まえて0.5gとした。また、ホモジェナイザーによる抽出ではなく、振とう抽出を採用し、一部試料について溶出操作後の最終調製液に懸濁が認められたため高速遠心分離の操作を追加した。その他、LC-MS/MS測定条件の一部を今回検討に用いた機種に合わせて表1及び表2のとおりに変更した。

2) 検量線の作成

2.2)の(16)及び(20)に従って調製した標準液を5 μL , LC-MS/MSに注入し、得られた選択反応検出クロマト

グラムからメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積またはシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ のピーク面積を求めて内標準法による検量線を作成した。その結果、メラミン及びシアヌル酸とも 1 ng/mL~1,000 ng/mL (注入量として 5 pg~5,000 pg) の範囲で直線性を示した。参考として検量線の一例を図 3 及び図 4 に示した。

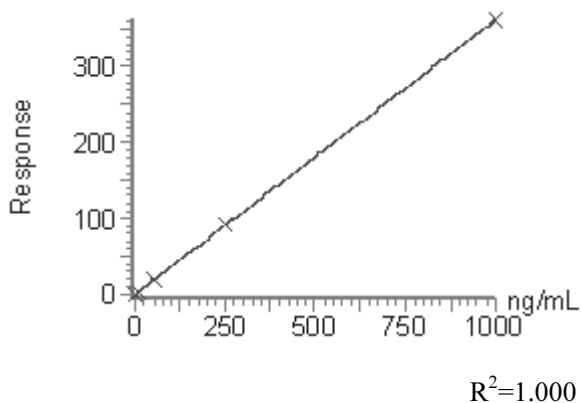


図 3 メラミンの検量線

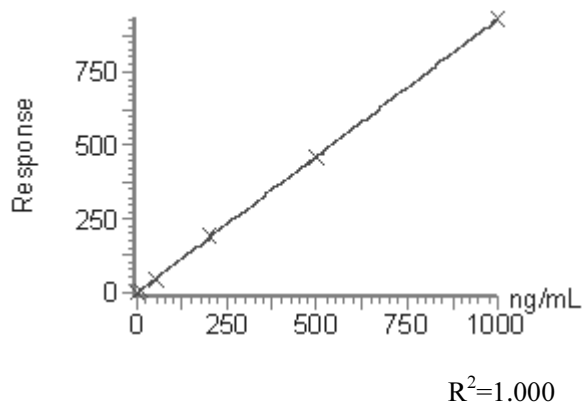


図 4 シアヌル酸の検量線

3) 試料供与量の検討

FDA 法においては、試料採取量を 5.0 g とし、以降 2.4) に従い試料溶液の調製を行っている。しかしながら、今回用いた作物に関しては、試料供与量が多すぎて予め添加した内標準物質の回収率が芳しくなかった。これは最終溶液中の夾雑成分の影響によるイオン化抑制効果が働いたためであると考えられた。当該効果を回避するには最終溶液中に共存している夾雑成分量を減らすことが有効であるため、試料採取量を段階的に 1.0 g 及び 0.5 g と減らし、以降 2.4) に従い試料溶液の調製を行い、内標準物質の回収率向上の検討を行うこととした。これら一連の結果を表 3 に示した。内標準であるメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率は試料採取量を減らすほど向上した。内標準の回収率の基準としては 40 % 以上が推奨・目標とされている^{6, 7)}。このため、この基準を満足した試料採取量 0.5 g を本法に採用した。

なお、内標準の回収率を確認することと同時に、試験的にメラミン及びシアヌル酸としてそれぞれ 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加して、添加回収試験による当該成分の回収率確認も行ったが、試料供与量が 5.0 g の場合の真度(回収率)及び精度は試料供与量 1.0 g または 0.5 g に比べてやや悪かった。

表3 試料供与量の検討

作物種類	試料供与量 (g)	成分名	添加量 ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ^{b)} (%)	標準偏差 (%)	相対標準偏差 (%)
コマツナ	5.0	メラミン	2,000	119.3	5.6	4.7
		シアヌル酸	2,000	109.0	15.5	14.2
		メラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$	-	26.2	1.2	4.4
		シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	-	4.0	0.6	15.4
	1.0	メラミン	2,000	101.3	1.5	1.5
		シアヌル酸	2,000	103.4	6.4	6.2
		メラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$	-	32.2	1.0	3.3
		シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	-	44.8	1.5	3.4
	0.5	メラミン	2,000	92.3	2.0	2.2
		シアヌル酸	2,000	88.7	7.3	8.3
		メラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$	-	54.6	0.8	1.6
		シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	-	67.1	3.6	5.3

a) メラミン及びシアヌル酸は乾作物に対する添加量
メラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$ 及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ は図2のとおりに添加した。

b) $n=3$ の平均回収率

4) 妨害物質の検討

各供試試料について、本法により調製した試料溶液を $5 \mu\text{L}$, LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

5) 添加回収試験

各供試試料に、乳児用調製乳以外の食品のメラミン基準値である $2,500 \mu\text{g}/\text{kg}$ を参考にし⁸⁾、当該濃度付近の $2,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ と $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量のメラミン及びシアヌル酸を添加し、本法に従って 3 点併行分析を行った。得られた平均回収率及び併行相対標準偏差を表 4 に、その際得られた内標準の平均回収率及び併行相対標準偏差を表 5 に示した。カブ中のシアヌル酸はピーク検出が困難であり定量することができなかった。また、チンゲンサイのシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ も回収率は 40 %を著しく下回った。これらは作物中の夾雑成分によるイオン化抑制が原因と考えられ、シアヌル酸はメラミンに比べて夾雑成分の影響を受けやすい可能性が示唆された。このため、内標準の回収率が 40 %以上得られ、本法による定量が可能な作物は、メラミンについては今回供試したすべての作物について適用可能であり、シアヌル酸についてはコマツナ及びニンジンであった。それらのメラミンの平均回収率は 78.2 %~109.7 %、相対標準偏差(RSD)は 1.1 %~11.3 % であり、シアヌル酸の平均回収率は 83.7 %~109.1 %、相対標準偏差(RSD)は 2.7~8.3 % と良好な回収率及び併行精度が得られた。また、参考として、当該添加回収試験で得られた併行 HorRat 値(HorRat_r)についても表 4 に示した。HorRat_rは分析方法の精度の評価をするために用いられており、HorRat_rは $\text{RSD}_r/\text{PRSD}_r$ により求められる。PRSD_Rは平均定量値から Horwitz の修正式⁹⁾より求め、PRSD_rは Horwitz の修正式に係数(5/8)を乗じて求めた^{10, 11)}。その結果、HorRat_rは 0.10~0.98 であり、いずれも 2 以下であった¹²⁾。

その他、標準液及び添加回収試験で得られたコマツナにおける選択反応検出クロマトグラムの一例を図 5 に示した。

表4 添加回収試験結果

作物種類	成分名	添加量 ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ^{b)} (%)	標準偏差 (%)	相対標準偏差 (%)	HorRat _r
コマツナ	メラミン	500	109.7	9.6	8.7	0.80
		2,000	92.3	2.0	2.2	0.24
	シアヌル酸	500	83.7	2.3	2.7	0.24
		2,000	88.7	7.3	8.3	0.90
チンゲンサイ	メラミン	500	78.2	8.9	11.3	0.98
		2,000	103.5	6.7	6.4	0.72
	シアヌル酸	500	106.5	3.8	3.5	—
		2,000	109.1	8.2	7.5	—
カブ	メラミン	500	85.6	7.6	8.9	0.78
		2,000	98.7	4.4	4.5	0.50
	シアヌル酸	500	N.D.	N.D.	N.D.	—
		2,000	N.D.	N.D.	N.D.	—
ニンジン	メラミン	500	99.5	1.1	1.1	0.10
		2,000	101.7	5.2	5.1	0.56
	シアヌル酸	500	88.0	5.2	5.9	0.52
		2,000	98.7	5.7	5.8	0.64

a) 乾燥作物に対する添加量

b) $n=3$ の平均回収率

表5 内標準の回収率

作物種類	成分名	添加量 ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ^{b)} (%)	標準偏差 (%)	相対標準偏差 (%)
コマツナ	メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	500	56.7	0.8	1.5
		2,000	54.6	0.8	1.6
	シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	500	44.4	1.8	4.1
		2,000	67.1	3.6	5.3
チンゲンサイ	メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	500	45.8	1.7	3.7
		2,000	49.8	3.0	6.1
	シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	500	8.2	0.0	0.5
		2,000	10.7	0.3	2.7
カブ	メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	500	50.8	2.2	4.3
		2,000	48.1	1.7	3.5
	シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	500	6.2	2.2	35.8
		2,000	5.4	1.8	32.8
ニンジン	メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	500	60.6	2.4	4.0
		2,000	59.9	3.5	5.8
	シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	500	44.3	2.4	5.4
		2,000	41.4	0.4	1.1

a) 乾燥作物に対するメラミンまたはシアヌル酸の添加量(表4に対応)

b) $n=3$ の平均回収率

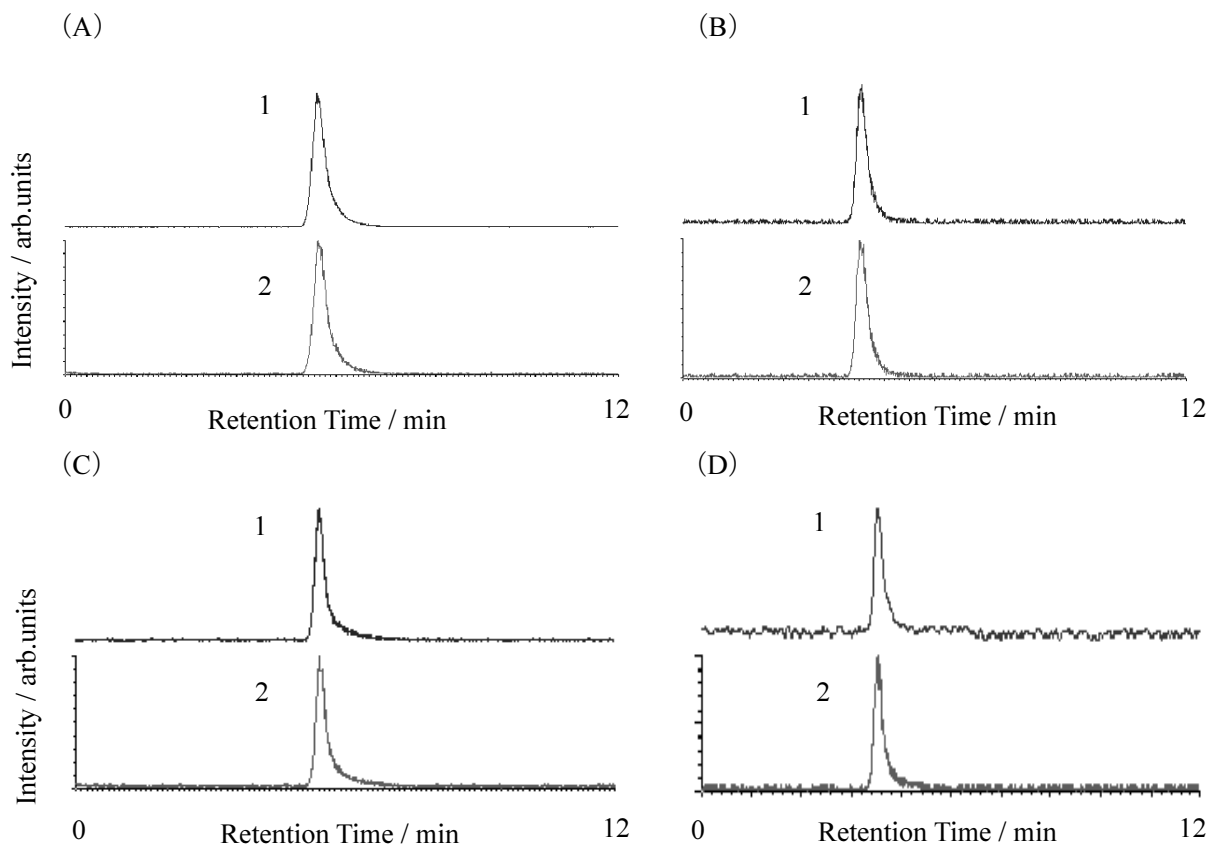


図5 添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例

- (A) 標準液 (1: メラミン 250 ng/mL, 2: 内標準, メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$)
 (B) 標準液 (1: シアヌル酸 200 ng/mL, 2: 内標準, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$)
 (C) 試料溶液 (コマツナ, 1: 試料中メラミン 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加, 2: 内標準, メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$)
 (D) 試料溶液 (コマツナ, 1: 試料中シアヌル酸 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加, 2: 内標準, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$)

6) 定量下限及び検出下限

コマツナ及びニンジンを用いて、分析試料中のメラミン及びシアヌル酸の含有量として各 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ になるようにそれぞれ添加して、7点併行試験を実施し、メラミン及びシアヌル酸の定量下限及び検出下限の確認試験を行った結果を表 6 に示した。定量下限は(標準偏差) $\times 10$ 、また、検出下限は(標準偏差) $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$ として示されるので、本法の定量下限及び検出下限はメラミンについては 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度、シアヌル酸については 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された。

なお、コマツナ及びニンジンの水分含有量は 90 %程度であるため、現物あたりの定量下限及び検出下限はメラミンについては 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度、シアヌル酸については 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された。

表6 定量下限等の確認試験結果

作物種類	成分名	含有量 ^{a)}	平均定量値 ^{b)}	標準偏差	(μg/kg)	
					定量下限 推定値 ^{c)}	検出下限 推定値 ^{d)}
コマツナ	メラミン	500	484.8	41.2	412	201
	シアヌル酸	500	433.2	26.8	268	131
ニンジン	メラミン	500	395.9	25.4	254	124
	シアヌル酸	500	469.1	30.8	308	151

- a) 各成分の含有量
 b) 7点併行試験の平均値
 c) 標準偏差×10
 d) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4. まとめ

作物中のメラミン及びシアヌル酸の同時測定法の妥当性確認のための試験を実施したところ、次の結果を得た。

- 1) 内標準法を用いてピーク面積により検量線を作成したところ、メラミン及びシアヌル酸とも 1 ng/mL ~1,000 ng/mL (注入量として 5 pg ~5,000 pg) の範囲で直線性を示した。
- 2) コマツナ、チンゲンサイ、カブ、ニンジンについて本法に従ってメラミン及びシアヌル酸の測定を実施した結果、定量を妨害する夾雑ピークはなかった。
- 3) コマツナ、チンゲンサイ、カブ、ニンジンについてメラミン及びシアヌル酸の含有量が 500 μg/kg 及び 2,000 μg/kg になるように添加し添加回収試験を実施した結果、各作物中のメラミンは良好な回収率が得られ、平均回収率は 78.2 %~109.7 %、その併行精度は相対標準偏差(RSD)として 11.3 %以下であった。また、チンゲンサイ及びカブ中のシアヌル酸は定量ができなかったが、コマツナ及びニンジンでは良好な回収率が得られ平均回収率は 83.7 %~109.1 %、その併行精度は相対標準偏差(RSD)として 8.3 %以下であった。
- 4) 本法のコマツナ及びニンジン中のメラミン及びシアヌル酸の定量下限及び検出下限はメラミンについては 500 μg/kg 程度及び 200 μg/kg 程度、シアヌル酸については 300 μg/kg 程度及び 150 μg/kg 程度と推定された。なお、コマツナ及びニンジンの水分含有量は 90 %程度であるため、現物あたりの定量下限及び検出下限はメラミンについては 50 μg/kg 程度及び 20 μg/kg 程度、シアヌル酸については 30 μg/kg 程度及び 15 μg/kg 程度と推定された。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知:石灰窒素の肥料登録に関する当面の取扱いについて、平成 23 年 4 月 15 日, 23 消安第 524 号 (2011)
- 2) 白井裕治, 大木純:ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定, 肥料研究報告, **1**, 114~121 (2008)
- 3) 田村勉, 水野和俊, 秋元里乃, 高橋佐貴子, 白井裕治:副産植物質肥料等中のメラミン及びシアヌル酸の定性試験法, 肥料研究報告, **1**, 168~172 (2008)
- 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 (2012)

<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>

- 5) Michael Smoker and Alexander J. Krynitsky: Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods using LC-MS/MS: Version1.0, U.S Food and Drug Administration, Laboratory Information Bulletin LIB 4422 (2008)
- 6) 大島 慎司: 飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法, 飼料研究報告, **36**, 1~12 (2011)
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知: 食品中のメラミンの試験法について, 平成 20 年 10 月 2 日, 食安監発第 1002003 号 (2008)
- 8) 食品安全委員会: メラミン等による健康影響について, 平成 20 年 10 月 9 日 (2008)
- 9) Thompson, M.: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385~386 (2000)
- 10) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix E: Laboratory Quality Assurance, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 11) Horwitz, W., Kamps, L.R., Boyer, K.W.: Quality control. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. AOAC Int.*, **63** (6), 1344~1354 (1980)
- 12) Codex Alimentarius: CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL Twentieth edition, p.66 (2011)

Simultaneous Determination of Melamine and Cyanuric acid in Crops by Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)

Toshiharu YAGI¹ and Yuji SHIRAI¹

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

An analytical method for simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in crops (qing-geng-cai, turnip, carrot and komatsuna) by liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) was inquired. After addition of 20 mL of acetonitrile-water (1+1), melamine-¹³C₃¹⁵N₃ and cyanuric acid-¹³C₃ to sample 0.50 g, they were shaken for extraction. The extract was centrifuged for 15 min at 1,300×g. The sample solution for melamine analysis was purified by strong acidic cation-exchange mini column (Waters, Oasis MCX) with 4 mL of diethylamine acetonitrile solution (2 v/v%). On the other hand, the sample solution for cyanuric acid analysis was purified by strong acidic anion-exchange mini column (Waters, Oasis MAX) with 2 mL of formic acid acetonitrile solution (4 v/v%). They were analyzed by LC-ESI-MS/MS in positive mode for melamine, or in negative mode for cyanuric acid. The LC separation was carried out on an hydrophilic interaction chromatography column (MERCK, SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm) using solvent gradient with ammonium acetate solution (10 mmol/L) – acetonitrile [5+95] and ammonium acetate solution (10 mmol/L) [acetonitrile solution (50 v/v%)] as a mobile phase. The determination was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode.

A spiked test was conducted with four kinds of crops spiked with 500 and 2,000 μg/kg of melamine or cyanuric acid. As a result, although melamine has been applied in four kinds of crops, cyanuric acid has been analyzed only two kinds of crops(carrot and komatsuna). The spike test of melamine resulted in recoveries ranging from 78.2 % to 109.7 % and in relative standard deviations (RSD) within 11.3 % respectively. And the spike test of cyanuric acid resulted in recoveries ranging from 83.7 % to 109.1 % and in relative standard deviations (RSD) within 8.3 % respectively. On the basis of 7 replicate measurements of spiked samples(carrot and komatsuna), the LOQ values were estimated melamine 500 μg/kg, cyanuric acid 300 μg/kg in dry crops and melamine 50 μg/kg, cyanuric acid 30 μg/kg in actual thing crops. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of melamine and cyanuric acid in crops.

Key words crops, melamine, cyanuric acid, simultaneous determination, liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS)

(Research Report of Fertilizer, **5**, 114~125, 2012)

12 牛糞堆肥及びその原料中の腸管出血性大腸菌 O157

—実態調査—

秋元里乃¹, 中村志野¹, 阿部文浩¹, 大木純²

キーワード 牛糞, 堆肥, O157, PCR, ベロ毒素産生遺伝子

1. はじめに

近年, 夏季に人への食中毒発症例が多発している腸管出血性(ベロ毒素産生性)大腸菌 O157 (Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157(以下 VTEC O157))は, 牛などの反芻動物の腸管内に存在する細菌で人への強い感染力と病原性を有しており, 他の食中毒原因菌が 1 万個体以上で発症するのに対してわずか 100 個体程度でも発症するといわれている^{1, 2)}. 牛糞便中で VTEC O157 は長期に生存可能であることも報告されている³⁾. また, 大腸菌 O26 及び O111 などの血清型の異なる大腸菌も食中毒原因菌として多く報告されている¹⁾. そのため, 牛糞を原料とした堆肥が VTEC O157 等に汚染されていた場合, 食品に付着し食中毒の原因となることと, 汚染肥料散布時の吸入により感染すること等が危惧される.

堆肥生産過程における大腸菌群の消長についての研究^{4, 5)}はこれまでも報告されており, 堆肥生産時に留意すべき病原菌として, 大腸菌, サルモネラ菌, リステリア・モノサイトゲネス等の細菌に対する対策⁶⁾が指針として出されている. しかし生産現場における牛糞堆肥中の VTEC O157 について全国的な実態調査が行われたことは無く, 牛糞堆肥がどれだけ汚染されているかについては十分には把握されていなかった.

この様な状況から, 2001 年から 2004 年にかけて独立行政法人肥飼料検査所(現在, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター)において検出感度試験を行うと共に, 牛糞堆肥中の VTEC O157 等の汚染状況について調査し, また牛糞に副資材(敷き藁・もみ殻等)が混ざり, まだ発酵していない段階で VTEC O157 等が含有されているかについても調べ, その現状を把握すると共に, 牛糞堆肥の生産方法について聞き取り調査をした.

その際, 感度試験方法及び同定方法については既往の方法^{7~10)}を参考にした.

なお, 本研究は独立行政法人肥飼料検査所中期計画における「病原性大腸菌 O-157 含有実態調査」として行われ, 既に概要を FAMIC ホームページ等で報告済みであるが, 近年においても食中毒事件が発生し, 牛糞堆肥中の O157 について注目を浴びていることから, 再度とりまとめ直して報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の収集

2001 年 7 月から 2004 年 8 月にかけて, 全国の 85 堆肥生産事業場より採取した牛糞堆肥及びその原料について調査を実施した(2001 年の調査は牛糞堆肥のみ). 夏季調査時期については 60 事業場を選定し, 冬季は 25 事業場を選定した.

各堆肥及びその原料について一事業場当たり堆積物の内部 3 ヶ所(2001 年については 5 ヶ所)から, アルコール消毒したスコップ及び滅菌済み手袋を用い, 滅菌済みサンプリングバックにサンプリングをした. 試料は冷

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

蔵状態で当検査所本部に送付し、実験に用いるまで冷蔵庫(4℃)で保管した。

VTEC O157, O26 及び O111 についての同定操作は、試料が当検査所に到着した後3日以内に開始し、それぞれのサンプリングバック毎に行った。

なお、2002年から2004年においては、試料を採取した各生産事業場の生産方法(原料の内容・発酵温度・切り返し方法等)についての聞き取り調査を実施した。

2) 試験方法の性能確認(牛糞堆肥及びその原料への適用)

VTEC O157 の同定は、「飼料分析基準^{7, 8, 10)}」及び「腸管出血性大腸菌 O157 の標準検査方法について⁹⁾」を参考に、一部変更して以下のとおり行った。

(1) 供試試料

国内の牛糞堆肥製造事業場の未発酵品(原料)から3)において分離した VTEC O157 菌株を 100 mL トリプトソイブイオン培地(栄研化学製)に 1 ユーゼ分添加し、37℃において18時間静置培養し、その後2時間振とう培養した。

牛糞堆肥中の VTEC O157 については、堆肥生産時に加温され損傷を受けており、増菌培養及び選択増菌培養時に損傷菌の増殖が抑制されている可能性が考えられたため、牛糞堆肥及びその原料に培養した VTEC O157 を添加するに当たり、牛糞堆肥に添加する VTEC O157 については加熱損傷菌を作成して使用することとし、培養液 1 mL を 1.5 mL 容プラスチック製遠心沈殿管に分取し、57℃の温浴上にて10分間加熱処理し、その後急冷した。培養菌液及び加熱損傷菌液は滅菌水に懸濁させた後、段階的に $\times 10^{10}$ まで滅菌水で希釈した。希釈した菌液の菌濃度は Heart Infusion 寒天培地(Becton Dickinson 製)を用いて3枚並行で培養を行い、計測値を平均して菌濃度を算出した。

PCR 法によりベロ毒素産生遺伝子(VT 遺伝子)陰性を確認している牛糞堆肥及びその原料 15 g を培養バックに取り、希釈菌液を約 1 CFU~10,000 CFU(colony forming unit) $\cdot g^{-1}$ となるように添加(牛糞堆肥については加熱損傷菌を添加)し、培養を行った。培養バックに緩衝ペプトン水⁷⁾ 150 mL を加えて 37℃で18~24時間前増菌培養した。この培養液 10 mL をノボビオシン添加 mEC 培地(栄研化学製) 100 mL に加え、42℃で18~24時間培養した。

なお、検出感度は試料の性状により異なってくると考えられたため、異なる3ヶ所の生産事業場からの牛糞堆肥及びその原料を用いて試験した。

(2) PCR 法における VTEC O157 の検出感度

各増菌培養液をプラスチック製遠心沈殿管(容量 1.5 mL)に入れ、 $9,000 \times g$ で5分間遠心分離し、上澄み液の除去と生理食塩水による洗浄の操作を2回繰り返す。滅菌水 1 mL で懸濁した後に 98℃の温浴上で5分間 DNA の熱抽出を行った。精製した液の 2 及び 10 μL を O157 PCR Screening Kit(宝酒造製)に加えて PCR 法を行った。反応条件は熱変性 94℃で1分、アニーリング 55℃で1分、伸長反応 72℃で1分の3ステップを1サイクルとして35サイクル行った。PCR 法の終了した反応液 10 μL に泳動用色素溶液を加えて2%アガロースゲルに負荷し、電気泳動後に臭化エチジウム溶液に浸漬し、UV 照射下で VT 遺伝子の有無を確認した。

(3) 免疫磁気ビーズ集菌法による VTEC O157 の検出感度

各培養液 1 mL をプラスチック製遠心沈殿管(容量 1.5 mL)に入れ、抗大腸菌 O157 ポリクロナール抗体で被覆された免疫磁気ビーズ(Dynabeads anti-E.coli O157, Dynal 製) 20 μL と穏やかに混合した後、磁性ラック

(MPC-M, Dynal 製)を用いて集菌し上澄み液を除去した。次に PBS による洗浄と磁性ラックによる集菌, 上澄み液除去の操作を 3 回行った。沈渣に PBS 200 μ L を加えて懸濁させた。

この集菌液 50 μ L ずつを, クロモアガーO157 寒天培地 (CHROMagar 製), BCM O157 寒天培地 (栄研化学製), 及びレインボーアガーO157 寒天培地 (Biolog 製) に画線塗抹し, 37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。これらの培地表面のいずれかにおいて VTEC O157 と疑われる集落を確認出来た場合, その集落について VT 遺伝子陽性であるかを PCR 法により確認し, 「検出可能」とした。

3) 実態調査のための試験方法

(1) VTEC O157, O26 及び O111 の分離

冷蔵保存していた原料及び牛糞堆肥試料 15 g を培養バックに取り, 緩衝ペプトン水 150 mL を加えて 37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間増菌培養した。この培養液 10 mL をノボピオシン添加 mEC 培地 100 mL に加え, 42 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。

この試料培養液について感度試験と同様の PCR 法操作により VT 遺伝子の有無を確認した。

PCR 法はスクリーニング手段として用い, VT 遺伝子を示すバンドが得られなかった場合には VT 遺伝子陰性, すなわち VTECO157 を含むベロ毒素産生大腸菌陰性 (VTEC 陰性) として試験を終了し, VT 遺伝子陽性であった場合のみ, 引き続き免疫磁気ビーズ法による VTEC O157 の選択的集菌と純粋分離を行った。

VT 遺伝子陽性であった試料培養液 1 mL をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ, 感度試験と同様に免疫磁気ビーズを用いて選択的に VTEC O157 を集菌し, クロモアガーO157 寒天培地, BCM O157 寒天培地及びレインボーアガーO157 寒天培地に画線塗抹し, 37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。更に VTEC O26 及び O111 を釣菌する目的で, 試料培養液をレインボーアガーO157 に直接塗抹して分離培養を行った。

これらの培地表面において VTEC O157, O26 及び O111 と疑われる集落を釣菌し, 同種の平板培地に画線塗抹し, 37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養して純粋分離した。

(2) VTEC O157, O26 及び O111 の確認

純粋分離した集落を, CLIG 寒天培地 (極東製薬工業製), SIM 寒天培地 (栄研化学製), 及びシモンズクエン酸ナトリウム培地 (栄研化学製) に接種し, 37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。VTEC O157 等の多くが示す生化学的性状¹⁰⁾をこれらの培地で確認し, CLIG 寒天培地において乳糖発酵 (+), セロビオース分解能 (-), β -グルクロニターゼ活性 (-) であり, SIM 寒天培地において硫化水素産生性 (-), インドール (+), IPA 反応 (-) であり, シモンズクエン酸ナトリウム培地においてクエン酸利用能 (-) の条件に合致した VTEC O157 及びその他の VTEC と疑われる菌株について, 抗原の確認を行った。

VTEC と疑われる菌株を Heart Infusion 寒天培地で 37 $^{\circ}$ C, 24 時間培養し, 1 mL の生理食塩水に 1 ユーゼ分の菌体を懸濁して 60 分間煮沸した。その加熱処理菌を, VTEC O157, O26, O111 血清 (デンカ生研) とそれぞれスライドガラス上で混合し, 1 分以内に強い凝集を示したものについて陽性とし, 更にこの菌株が VT 遺伝子陽性であるかを PCR 法により確認した。

4) 牛糞堆肥及びその原料の性状

VTEC O157 等の生存条件に関連するファクターとして, 堆肥及びその原料の性状を示すと考えられる水分活性, 含水率及び pH を測定した。水分活性はロトロニック水分活性測定装置で, 含水率はハロゲン水分計で, pH は試料の 5 倍量の水を加えて抽出し, ガラス電極法で測定した。

3. 結 果

1) 牛糞堆肥及びその原料中の VTEC O157 の検出感度

PCR 法においては UV 照射により VT 遺伝子のバンドが確認出来たものを「+」とし、免疫磁気ビーズ集菌法においては 3 種類の選択培地上のいずれかで VTEC O157 とと思われる集落が確認出来た場合に、釣菌可能と判断して「+」とした。使用する堆肥及びその原料の状態によって、PCR 法による感度は表 1 のとおり、免疫磁気ビーズ集菌法の感度は表 2 のとおりで異なった結果が得られた。事業場 B の原料では PCR 法でも免疫磁気ビーズ集菌法でも $1000 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 以上で「+」と感度が低く、事業場 A 及び C の原料では両方法とも $10 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 以上で「+」と感度が良かった。一方、牛糞堆肥については 3 ヶ所の事業場の試料でも大きな感度の差は認められなかった。

表1 PCR法における感度

添加菌濃度 ¹⁾ ($\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)	原料			牛糞堆肥		
	事業場A	事業場B	事業場C	事業場A	事業場B	事業場C
10^4	+ ²⁾			+		
10^3	+	+	+	+	+	+
10^2	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
1	+	-	-	-	+	-
無添加	-	-	-	-	-	-

1) PCR法によるスクリーニングにおいてVT遺伝子陰性が確認されている試料に添加したVTEC O157の菌濃度

なお、牛糞堆肥には加熱損傷菌を添加

2) PCR法の結果VT遺伝子のバンドを確認

表2 免疫磁気ビーズ集菌法における感度

添加菌濃度 ¹⁾ ($\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)	原料			牛糞堆肥		
	事業場A	事業場B	事業場C	事業場A	事業場B	事業場C
10^4	+ ²⁾			+		
10^3	+	+	+	+	+	+
10^2	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
1	+	-	-	+	+	+
無添加	-	-	-	-	-	-

1) PCR法によるスクリーニングにおいてVT遺伝子陰性が確認されている試料に添加したVTEC O157の菌濃度

なお、牛糞堆肥には加熱損傷菌を添加

2) レインボーアガー、BCM、クロモアガーのいずれかの培地でVTEC O157と疑われる集落を確認

原料についてはPCR法でも免疫磁気ビーズ集菌法でも $10,000 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 以上、牛糞堆肥についてはPCR法

では 100 CFU \cdot g⁻¹以上, 免疫磁気ビーズ集菌法では 10 CFU \cdot g⁻¹以上の菌量が試料中に存在すると, 本試験方法で検出可能であることが分かった。

事業場 B の原料における検出が困難であったのは, その内容がほとんど生糞で, 敷料に使用されていたもみ殻が少量混ざっているだけであり, もともと菌が多く存在したため, 添加した VTEC O157 以外の菌も培養時に増菌され, 培養液中の VTEC O157 の割合が低下し, 検出感度の低下につながったのではないかと考えられた。この様に大部分が生糞である試料の場合には, 加熱損傷菌を回復させ少ない菌数を増加させるために行っている緩衝ペプトン水での培養を省略することにより, VTEC O157 の感度を上げることは可能だと考えられるが, どの程度生糞に近ければ培養方法を変更するべきか, といった点については今回検討しなかった。

2) 牛糞堆肥及びその原料における VTEC O157 等の確認

調査の概要を夏季及び冬季に分け, 表 3 及び表 4 のとおりまとめた。その製造方法や期間, 昇温条件等もまちまちであった。これらの PCR 法の結果及び VTEC O157 の確認結果は表 5 及び表 6 のとおりであり, 検体中 1 つでも陽性となっていたらその事業場は「+」としている。表 3 の事業場 No. と表 5 の No. は対応して整理し, 表 4 及び表 6 についても同様に整理した。表 5 及び表 6 より, 原料においては多くの事業場 (43 %) の検体が VT 遺伝子陽性となったが, 牛糞堆肥については VT 遺伝子陽性となるものは少数 (10 %) であった。

2001 年には, 全国 25 の堆肥生産事業場からそれぞれ 5 サンプルずつ採取した 125 検体の牛糞堆肥のみについて VTEC O157 等の試験を実施しており, PCR 法において VT 遺伝子陽性が 7 検体 (5 事業場) あったが, 生化学的性状を調べたところ全てのサンプルが VTEC O157 陰性であった。この 2001 年の調査では製品しか検査しておらず, 製造方法や期間等についての聞き取り調査も行っていなかったため, 表 3 及び表 5 への記載を省略した。なお 2001 年分も含めた調査検体数中, VT 遺伝子陽性となった検体数は表 7 のとおりである。

夏季における調査では, 原料について PCR 法により VT 遺伝子陽性と判定された生産事業場は, 表 5 より 35 事業場中 20 事業場であった。また, このうち 5 検体 (2 事業場) から VTEC O157 を釣菌分離した。なお, これらから VTEC O26, O111 は分離されなかった。

牛糞堆肥について VT 遺伝子陽性となった検体はわずかに存在し, VT 遺伝子陽性となる生産事業場は, 表 5 の結果に平成 13 年調査分を含めて 60 事業場中 9 事業場となった。しかし, VTEC O157, O26, O111 のいずれも牛糞堆肥からは釣菌分離されなかった。

一方, 冬季における調査では VT 遺伝子陽性となる検体の存在はわずかであり, 表 6 より原料において 25 生産事業場中 6 事業場, 製品においては 25 生産事業場中 2 事業場のみであった。また, これらから VTEC O157, O26, O111 は分離されなかった。

表 3 及び表 4 より, 一部発酵温度が低く管理があまりされていない事業場が見受けられたが, ほとんどの事業場においては 60 °C ~ 70 °C 以上の温度で一次発酵が行われており, 特に原料段階で VT 遺伝子陽性となったが製品では VT 遺伝子陰性の結果が得られている事業場においては, 必ず 60 °C 以上まで昇温して発酵処理が行われていた (No.52 の事業場については温度非測定のため不明)。

表3 夏季:生産方法概要(2002年~2004年)

事業場 No.	家畜の 種類	糞尿の処理	牛糞以外の原料	一次堆積発酵 ¹⁾					
				温度	期間	切り返し	切り返し方法	強制通気	製造期間
1	肉牛	固液混合 (全部)	おがくず, 戻し堆肥	80℃	1ヶ月	1回/週	ショベルローダー	ブローア	3ヶ月
2	肉牛	固液混合	おがくず	60℃	1ヶ月	1回/月	ショベルローダー	— ²⁾	3ヶ月
3	肉牛	固液混合	おがくず	60~70℃	5ヶ月	1回/月	ショベルローダー	—	5ヶ月
4	肉牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	50~70℃	9ヶ月	3回/月	ショベルローダー	—	10ヶ月
5	肉牛	固液混合	麦わら, 乾草	30~70℃	3ヶ月	2回/月	ショベルローダー	—	3ヶ月
6	肉牛	固液混合 (全部)	樹皮	不明	20~30日	2回/月	ショベルローダー	—	20~30日
7	肉牛	固液混合	麦わら, おがくず, パーク	70~85℃	14日	1回/週	ショベルローダー	ブローア	1.5ヶ月
8	肉牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	60℃	80日	40回/80日	スクープ式	ブローア 20分 間/1時間	2.5ヶ月
9	肉牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	60℃	80日	40回/80日	スクープ式	ブローア	2.5ヶ月
10	肉牛	固液混合	おがくず, もみ殻, 食品残渣	75~80℃	25日	1回/日	ロータリー式	ターボブローア	3ヶ月
11	肉牛	固液混合	稲わら, おがくず, 戻し堆肥	80℃	—	—	—	—	不明
12	肉牛	固液混合		80℃	1ヶ月	—	—	ブローア	6ヶ月
13	肉牛	固液混合	稲わら, おがくず, 戻し堆肥	70℃	1ヶ月	—	—	—	6ヶ月
14	肉牛+ 乳牛	固液混合	稲わら, もみ殻	75℃	1ヶ月	1回/週	ショベルローダー	ブローア	3ヶ月
15	肉牛+ 乳牛	固液混合 (一部)	おがくず, 乾草	70℃	2週	2回/週	スクープ式	ブローア	3ヶ月
16	肉牛+ 乳牛	固液混合	もみ殻	60℃	3週	2回/日	ロータリー式	—	6ヶ月
17	乳牛	固液分離	おがくず, 戻し堆肥	70℃	1.5~2ヶ月	3回/月	サイロクレーン	—	18~24ヶ月
18	乳牛	固液混合	おがくず	70~80℃	1ヶ月	1回/週	ショベルローダー	ブローア	1ヶ月
19	乳牛	固液混合	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	60~70℃	2~3ヶ月	1回/週	ショベルローダー	—	2~3ヶ月
20	乳牛	固液分離	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	60~70℃	3~4ヶ月	3日目, 1週間目, 2 週間目, 1ヶ月目	ショベルローダー	ブローア	3~4ヶ月
21	乳牛	固液混合 (一部)	おがくず, 戻し堆肥	50~80℃	4ヶ月	3回/週	ショベルローダー	ブローア	6ヶ月
22	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, 飼料残さ, ごま殻, 戻し堆肥	40℃	3日	2回/週	ショベルローダー	—	2ヶ月
23	乳牛	固液混合	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	80℃以上	2~3ヶ月	1回/週	ショベルローダー	—	2~3ヶ月
24	乳牛	固液混合	パーク, チップ, 生活 系・水産系廃棄物	80~85℃	10~14日	1回/5日	ショベルローダー	ブローア	1.5ヶ月
25	乳牛	固液分離		74℃	1ヶ月	約10回/月	ショベルローダー	—	12ヶ月
26	乳牛	固液分離	おがくず, 戻し堆肥	65~70℃	1~2ヶ月	2回/月	ショベルローダー	ブローア	3~6ヶ月
27	乳牛	固液混合 (一部)	おがくず, もみ殻, 鶏糞	60℃	3週	3回/月	ショベルローダー	—	6ヶ月
28	乳牛	固液分離	おがくず, 戻し堆肥	70℃	15~20日	—	ショベルローダー で移動	ブローア	2~2.5ヶ月
29	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, 戻し堆肥	70℃	1ヶ月	1回/日	スクープ式	ブローア	1ヶ月
30	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, 残飼料	60℃	2ヶ月	1.5回/日	スクープ式	—	2ヶ月
31	乳牛	固液混合	もみ殻	60℃	3週	1回/日	バドル式	—	1.3ヶ月
32	乳牛	固液混合	おがくず	70~80℃	1.5ヶ月	1回/日	ロータリー式	ブローア	1.5ヶ月
33	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, もみがら	70℃	40日	2回/日	ロータリー式	—	3ヶ月
34	乳牛	固液分離	麦わら, おがくず	70℃	1週	4回/日	ロータリー式	—	100日
35	乳牛	固液分離	おがくず, 戻し堆肥	35℃	40日	3回/日	ロータリー式	ブローア	7ヶ月

1) 2次発酵, 3次発酵方法は省略

2) 調査票に記載がなかった事項

表4 冬季:生産方法概要 (2003年)

事業場 No.	家畜の 種類	糞尿の処理	牛糞以外の原料	一次堆積発酵 ¹⁾					
				温度	期間	切り返し	切り返し方法	強制通気	製造期間
36	肉牛	固液混合	麦わら, 乾草	30~70℃	3ヶ月	2回/月	ショベルローダー	- ²⁾	3ヶ月
37	肉牛	固液混合	おがくず	75℃	1ヶ月	-	ショベルローダー	ブローア	2ヶ月
38	肉牛	固液混合	敷きわら, 赤土, 二酸化第二鉄	50℃以下	3週	2回/日	ショベルローダー	-	3週
39	肉牛	固液混合	麦わら, おがくず, パーク	70~80℃	0.5ヶ月	1回/週	ショベルローダー	ブローア	2.5ヶ月
40	肉牛	固液混合 (全部)	-	-	1ヶ月	1回/月	ショベルローダー	-	4ヶ月
41	肉牛	固液混合 (全部)	おがくず, もみ殻, 戻したい肥	70℃	2週	1回/週	ショベルローダー	ブローア	3.5ヶ月
42	肉牛	固液混合 (全部)	おがくずパーク	70~80℃	10日	1回/5日	ショベルローダー	ブローア	3~6ヶ月
43	肉牛	固液混合	おがくず, 鶏糞, 腐菌床	80℃	4週	1回/週	ショベルローダー	ブローア	8ヶ月
44	肉牛	固液分離	鶏糞	70~85℃	1ヶ月	1回/月	ショベルローダー	ブローア	3ヶ月
45	肉牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	70~75℃	約1週	1回/週	ショベルローダー	ブローア	6~7週
46	肉牛	固液混合	もみ殻, 鶏糞	60℃	2ヶ月	1回/週	ショベルローダー	-	2ヶ月
47	肉牛	固液混合	おがくず	80℃	2週	-	-	ブローア	4.5ヶ月
48	肉牛+ 乳牛	固液混合	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥, パーク	60℃	40日	1回/日	スクープ式	ブローア	6ヶ月
49	肉牛+ 乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, 戻し堆肥	70~80℃	45日	-	スクープ式	ブローア	3~6ヶ月
50	肉牛+ 乳牛	固液混合 (全部)	もみ殻, 戻し堆肥	80℃	2週	-	スクープ式	ブローア	2~3ヶ月
51	肉牛+ 乳牛	固液混合	稲わら, もみ殻, 米ぬか, 廃食用油	70~80℃	80日	1回/20日	ショベルローダー	-	3~6ヶ月
52	肉牛+ 乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, もみ殻	不明	2ヶ月	1回/週	ショベルローダー	-	3ヶ月
53	肉牛+ 乳牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	60℃	1ヶ月	-	-	ブローア	6ヶ月
54	肉牛+ 乳牛	固液混合 (全部)	稲わら, おがくず, もみ殻	70~80℃	1ヶ月	-	-	-	3~6ヶ月
55	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	60~80℃	2週	4回/日	ロータリー式	-	2週
56	乳牛	固液混合	おがくず, 鶏糞	75℃	40日	2回/日	スクープ式	ブローア	70日
57	乳牛	固液混合	稲わら, もみ殻	70℃	3ヶ月	2~3ヶ月	ショベルローダー	-	9ヶ月
58	乳牛	固液分離	おがくず, パーク	62℃	1年	1回/月	ショベルローダー	-	2年
59	乳牛	固液分離	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	70℃	6ヶ月	1回/週	ショベルローダー	-	6ヶ月
60	乳牛		麦わら, 戻し堆肥	60~70℃	12ヶ月	-	-	-	12~24ヶ月

* 脚注は表3を参照

表5 PCR法によるスクリーニング結果
及びVTEC O157分離結果(夏季)

No. ¹⁾	PCR結果		VTEC O157 釣菌分離
	原料	製品	
1	+ ²⁾	-	-
2	+	-	-
3	+	-	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	+	-	-
9	+	+	+ ³⁾
10	+	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	+	+	-
15	-	-	-
16	+	-	-
17	+	-	-
18	+	-	-
19	+	-	-
20	+	+	-
21	+	-	-
22	+	+	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	+	-	+
30	+	-	-
31	+	-	-
32	+	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	-

表6 PCR法によるスクリーニング結果
及びVTEC O157分離結果(冬季)

No. ¹⁾	PCR結果		VTEC O157 釣菌分離
	原料	製品	
36	+ ²⁾	-	-
37	+	+	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	-	-
46	-	-	-
47	-	-	-
48	-	-	-
49	-	+	-
50	-	-	-
51	+	-	-
52	+	-	-
53	+	-	-
54	-	-	-
55	-	-	-
56	-	-	-
57	+	-	-
58	-	-	-
59	-	-	-
60	-	-	-

1) No.は表4の事業場No.と対応

2) 3検体中1つでもVT遺伝子陽性の
結果が得られた事業場

1) No.は表3の事業場No.と対応

2) 3検体中1つでもVT遺伝子陽性の
結果が得られた事業場3) VTEC O157を釣菌分離された事
業場(原料のみから分離. 製品から
は分離されず.)

表7 調査件数及びVT遺伝子陽性件数

調査時期	調査事業場数	堆肥検体数	原料検体数
		(うちVT遺伝子陽性件数)	(うちVT遺伝子陽性件数)
2001年夏季	25	125 (7)	—
2002年夏季	25	75 (6)	75 (29)
2003年冬季	25	75 (2)	75 (7)
2003年夏季	7	21 (2)	21 (8)
2004年夏季	3	9 (0)	9 (0)

3) 牛糞堆肥及びその原料の性状

検体毎に含水率、pH 及び水分活性を測定したが、同じ事業場の牛糞堆肥及びその原料 3 検体毎のバラツキはほとんど見られなかった。含水率はバラツキが大きく、原料で夏季 47%～87% (平均 72%)、冬季 50%～86% (平均 69%)、製品で夏季 15%～75% (平均 51%)、冬季 23%～77% (平均 54%) だった。pH も広い範囲にバラツキが見られ、原料で夏季 pH 5.6～pH 8.8、冬季 pH 6.0～pH 9.5、製品で夏季 pH 6.6～pH 9.5、冬季 pH 6.7～pH 9.8 だった。水分活性 (製品のみ測定) については夏季 0.79～0.99 (平均 0.97)、冬季 0.86～0.99 (平均 0.98) であったが、ほとんどの事業場 (87%) については 0.97～0.99 であった。

VT 遺伝子陽性の結果が得られた事業場の牛糞堆肥及びその原料の性状は、陰性だった事業場と比べて特段の傾向は見いだされなかった。

4. 考 察

1) VT 遺伝子の確認と牛糞堆肥の生産方法

生産事業場毎の生産方法及び PCR 法の結果を表 3～表 6 に示した。調査は北海道から九州まで全国規模で行ったが、肉牛・乳牛の別、製造方法、製造期間等に特に地域性は認められなかった (調査を行った事業場の場所等については、生産事業場への配慮から記載を省略した)。

今回の調査では夏季に原料が VT 遺伝子陽性となる検出率は調査事業場あたり 57% で、牛糞堆肥における検出率は 11% であり、全国的に VTEC が広く分布していることが分かった。肥育牛糞便中における VT 遺伝子の検出割合は 29%¹¹⁾ と報告されているが、VTEC を保菌している牛からの糞も保菌していない牛の糞も一緒に集められ堆積されるため、堆肥生産事業場として考えるとその検出割合はかなり高いものとなった。

冬季に原料が VT 遺伝子陽性となる検出率は調査事業場あたり 24% で、牛糞堆肥においては検出率 8% であることから、夏季よりも冬季においては検出率が低いことが分かった。このことは、冬季には排出された VTEC の活性が低下し再度経口感染しにくくなり、牛の保菌率が低下したため¹²⁾ と考えられる。季節により VT 遺伝子の検出率に差があることから、地域差 (気温差) が予想されるが、地域的偏りは今回認められなかった。

2002～2004 年の調査で、原料から VT 遺伝子を検出した事業場 26 ヶ所のうち製品から検出されなかった事業場は 21 ヶ所 (81%) であった。花島の報告⁴⁾ によると、堆肥化の過程で 55℃ 以上の高温が 18 時間以上持続した場合、堆肥中の VTEC 数は検出出来ない程度まで減少する。今回の調査では VT 遺伝子が原料中から検出されたが、牛糞堆肥中からは検出されなかった 21 ヶ所の事業場では、一部 30℃～50℃ と低温で発酵を始めるところもあるが、必ず 70℃～80℃ まで昇温しており、60℃ 以上で一次発酵を行っていた (No.52 の事業場については温度非測定のため不明)。また更に切り返し及び又は通気を行うことにより全体の発酵の状態を均一にしていた。

原料及び牛糞堆肥共に VT 遺伝子を検出した事業場は 5 ヶ所(19 %)あった。そのうち、事業場 No.14, No.20 及び No.37 について聞き取り調査を更に行ったところ、いずれの事業場内でも、原料から製品に至るまでの繰り返し作業を 1 機のショベルローダーによって行っていた。

室内実験では、発酵温度の上昇により一旦検出出来ない程度に減少した VTEC 群が 40 °C 以下に温度が低下したときに再増殖することが報告⁵⁾されており、また VTEC を未熟堆肥に接種して 30 °C で 5 日間培養したところ、その菌数が接種時の 10 倍以上になったと報告⁴⁾されている。このことから、原料及び牛糞堆肥共に VT 遺伝子を検出した事業場では、原料に存在していた VTEC が繰り返しに使用されているショベルローダーに付着し、温度が低下した牛糞堆肥に混入して再増殖したのではないかと考えられた。

これらのことは、日本施設園芸協会が堆肥生産時に留意すべき病原菌対策^{5, 6)}として示している①原料区画と製品区画の物理的隔離、②作業機械の専用化、③60 °C 以上を 2 週間以上保持する等、推奨される堆肥化の要点と一致していた。

2) VT 遺伝子の確認と堆肥の性状

牛糞を堆肥化する過程により、含水率は 70 %程度から 50 %に低下し、pH は pH 5.6~pH 8.8 から pH 6.6~pH 9.5 へと若干上昇する傾向が見られた。しかし、水分活性も含め、VT 遺伝子の検出傾向と試験値とに有意差は認められなかったため、牛糞堆肥及びその原料の性状を示すファクターと VTEC O157 の消長の関係については把握出来なかった。

製品の含水率が 15~75 %と異なっても、その水分活性は 0.97~0.99 だった。VTEC の繁殖可能な水分活性は 0.94 以上とされている¹³⁾ことから、VTEC の堆肥中での繁殖が可能であることが推察された。

5. まとめ

牛糞堆肥中に VTEC O157 が生菌として残存した場合、食品に付着し食中毒の原因となること等が危惧されることから、2001 年 7 月から 2004 年 8 月にかけて牛糞堆肥生産施設 85 ヶ所において、牛糞堆肥及びその原料中の VTEC O157 について調べたところ、以下の結果を得た。

1) 感度試験の結果、一部の原料を除き牛糞堆肥及びその原料において VTEC O157 10 CFU・g⁻¹以上で VT 遺伝子の検出及び VTEC O157 の確認が出来た。

2) 調査した事業場中 2 事業場の原料から VTEC O157 を分離したが、牛糞堆肥からは分離されなかった。また、VTEC O26, O111 は原料及び牛糞堆肥共に分離されなかった。

3) 原料から VT 遺伝子を検出した 26 ヶ所の事業場のうち、21 ヶ所(81 %)の事業場の牛糞堆肥からは VT 遺伝子は検出されなかった。これらの事業場においては堆積発酵が 60 °C・1 ヶ月以上の条件で行われていた。

4) 原料及び牛糞堆肥共に VT 遺伝子を検出した事業場は 5 ヶ所(19 %)であった。これらの事業場では発酵温度が不十分であるか又は併用されていたショベルローダーを経由して原料中の病原性 VTEC が牛糞堆肥に混入し、再増殖したと考えられた。

5) 堆肥の性状を示す指標として含水率、pH 及び水分活性について調べたが、VT 遺伝子の検出結果との間に傾向は認められず、これらのファクターと VTEC O157 の消長の関係については把握出来なかった。

謝 辞

本研究は独立行政法人肥飼料検査所中期計画における「病原性大腸菌 O-157 含有実態調査」として行われ、その際とりまとめるに当たり、肥飼料検査所肥料等技術検討会検討委員として多大なる助言をいただきました、越野正義氏(元農業環境技術研究所)に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 伊藤 武, 甲斐明美, 尾畑浩魅: 病原大腸菌, 臨床栄養, **89**(7), 832~838 (1996)
- 2) 小檜山津, 佐々木一雅, 太田拔徳, 櫻林郁之介: Verotoxin 産生大腸菌(VTEC)と出血性大腸炎・溶血性尿毒症症候群, Medical Tecnology, **24**(10), 957~962 (1996)
- 3) 伊藤 武: 腸管出血性大腸菌の食品および環境中における抵抗性, 獣医畜産新報, **50**(3), 246~249 (1997)
- 4) 花島 大: 大腸菌を死滅させる堆肥化等安全な処理方法の改善, 農林水産物における病原性大腸菌等の汚染防除に関する研究(病原大腸菌), 独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所, 19~22 (2003)
- 5) 染谷孝, 井上興一: 堆肥施用と病原菌汚染, 農業技術体系 土壌施肥編, 追録第 14 号, 第 7-①, 資材 64 の 84~99, 農文協, 東京 (2003)
- 6) 社団法人日本施設園芸協会: 生鮮野菜衛生管理ガイドー生産から消費までー, 35~39 (2003)
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_yasai/pdf/guide.pdf#search=社団法人日本施設園芸協会%20生鮮野菜衛生管理ガイド>
- 7) 草間豊子, 杉中求: 飼料中の大腸菌 O157 の検出方法の検討, 飼料研究報告, **23**, 128~140 (1998)
- 8) 農林水産省畜産局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 7 年 11 月 15 日, 7 畜 B 第 1660 号, 最終改正平成 24 年 5 月 25 日, 農林水産省消費・安全局長通知 24 消安第 752 号 (2012)
- 9) 小沼博隆: 腸管出血性大腸菌 O157 の標準検査法について, 食品衛生管理技術セミナー, 日本食品微生物学会, 7~35 (1997)
- 10) 飼料分析基準研究会編: 飼料分析法・解説(2004), 財団法人日本科学飼料協会, 16-18~40, 東京 (2004)
- 11) 安岡富久, 松本紀子, 谷脇妙, 干場浩, 岡本周一, 長崎英二, 小松照子: 病原微生物環境汚染サーベランス, 高知県衛生研究所報, **47**, 31~39 (2001)
- 12) 小沢義博: 欧米の家畜における腸管出血性大腸菌 O157:H7 の研究と対策, 獣医畜産新報, **50**(9), 733~737 (1997)
- 13) 藤井建夫: 微生物制御の基礎知識ー食品衛生のための 90 のポイントー, 85~88, 中央法規出版, 東京 (1997)

Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Bovine Fecal Compost and Its Raw Material

Satono AKIMOTO¹, Shino NAKAMURA¹, Fumihiko ABE¹ and Jun OHKI²

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

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

(Now) Sapporo Regional Center

If Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) including O157 survived during composting, they can be attached to foods and be risk to the human health. We collected some bovine fecal composts and their raw material samples from 85 compost plants where bovin feces were used from July 2001 to August 2004, and surveyed verotoxin producing genes (VTgenes) and VTEC O157 in bovine fecal compost and its raw material. 1) Sensitivity of PCR for VTgenes detection and immunomagnetic method for VTEC O157 detection were estimated to be more than 10 CFU·g⁻¹ in bovine fecal composts. 2) We separated VTEC O157 from raw materials of 2 plants. But we did not separate VTEC O157 from bovine fecal composts made in those plants. Other VTEC O26 and O111 were not detected from both of them. 3) VTgenes were not detected from bovine fecal composts of 21 plants (81 %) among 26 plants where VTgenes were detected from raw materials. We found that these composts were made in conditions more than 1 month at over 60 °C in these plants. 4) VTgenes were detected from both bovine fecal composts and their raw materials from 5 plants (19 %). In these plants, composting temperature may be insufficient. Or composts may be contaminated by VTEC via a shovel loader that was also used for handling feces and VTEC multiplied again in these plants. 5) We examined bovine fecal composts and their raw materials about moisture content, pH and water activity for an index to show a property of compost, but the significant difference was not accepted by the result and a tendency to detection of a VTgene.

Key words bovine feces, compost, O157, PCR, verotoxin

(Research Report of Fertilizer, **5**, 126~137, 2012)

13 燃焼法による汚泥肥料及びたい肥中の有機炭素測定

—燃焼法全窒素全炭素測定装置の適用—

秋元里乃¹

キーワード 有機炭素, 汚泥肥料, たい肥, 燃焼法, ニクロム酸酸化法

1. はじめに

肥料取締法に基づき、たい肥等特殊肥料には品質表示制度が創設され¹⁾、また、汚泥肥料に対しては主要な成分の含有量(窒素全量, リン酸全量, 加里全量)等の他、腐熟度を表す炭素窒素比の表示が義務づけられている^{2, 3)}。

これらの汚泥肥料について主要な成分の含有量の定量法は農林水産省の告示により制定されており、炭素窒素比の公定法はニクロム酸酸化法により有機炭素を定量し、供試試料の重量に対する百分率を求め、窒素全量で除することと定められている^{4, 5)}。しかしながら、ニクロム酸酸化法では大量のニクロム酸カリウム及び硫酸を用いることから、試薬及び廃液の管理が求められる。それに対し、燃焼法は、純粋な酸素ガス中にて試料を高温で燃焼させ、遊離する窒素ガス及び炭酸ガスを熱伝導度検出器(TCD)で測定する方法であり、試薬をほとんど必要とせず、測定時間が短いことに特徴がある。

これまで、窒素全量の測定方法として燃焼法の適用の検討がされ、採用できることとなり、肥料等試験法(2011)⁶⁾に記載されている。このことから、有機炭素についても同様の分析方法を採用し、炭素窒素比を求める際に、燃焼法のみを採用することが可能になれば、分析の迅速化並びに試薬・廃液等の問題が減少することとなる。しかしながら、佐藤ら¹⁰⁾の報告において燃焼法による炭素全量とニクロム酸酸化法による有機炭素量に満足する相関が得られておらず、燃焼法を有機炭素の測定に適用するには改良が必要と考えられた。

そこで、今回、炭素全量(TC:Total Carbon) = 有機炭素(OC:Organic Carbon) + 無機炭素(IC:Inorganic Carbon)¹¹⁾の考えに基づき、また、堆肥等有機物分析法⁸⁾及び飼料分析法⁷⁾等における粗灰分の定量方法を参考にし、試料の前処理として電気炉で有機炭素を灰化させ、残った無機炭素を燃焼法により定量し、別試料で測定する炭素全量より差し引いて有機炭素量とする方法を検討することとした。

この手法を検討することにより分析時間の迅速化及び簡素化を目的とし、燃焼法とニクロム酸酸化法により測定された汚泥肥料及びたい肥中の有機炭素の定量値を比較したところ、改良の効果が認められた肥料があったので生産事業場における品質管理の方法としての性能の確認を行ったのでその概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

流通している汚泥発酵肥料 13 点, し尿汚泥肥料 10 点, 焼成汚泥肥料 4 点, 混合汚泥肥料 1 点, 工業汚泥肥料 6 点, 下水汚泥肥料 1 点及び牛ふんたい肥 6 点(計 41 点)を試験品として採取し、必要に応じて定温乾燥機により 40 °C で 60 時間~70 時間または 65 °C で 5 時間~24 時間乾燥し、超遠心粉砕機で粉砕し、目開き 500 µm のふるいを全通するように分析用試料を調製しよく混合した。

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) 装置及び器具

- (1) 定温乾燥機:ヤマト科学 DF62
- (2) 超遠心粉碎機:Retsch ZM100, Retsch ZM1
- (3) 電気炉:ADVANTEC KL-420 及び ヤマト科学 F0-810
- (4) 燃焼法全窒素全炭素測定装置:住化分析センターSUMIGRAPH NC-220F
- (5) ホットプレート:AS ONE THI-1000
- (6) 電位差自動滴定装置:京都電子 AT610
- (7) 石英ボート
- (8) 磁性皿
- (9) ニクロム酸酸化法用ガラス器具

3) 燃焼法による炭素量及び窒素全量の測定

(1) 検量線の作成

DL-アスパラギン酸標準品(純度99.0%以上)を用い, Table 1の条件で炭素量及び窒素全量を測定して関係線を作成した.

Table 1 Measurement conditions for total nitrogen and carbon analyzer by the combustion method

Combustion gas	Highly pure oxygen, purity not less than 99.99995 %, flow rate 200 mL/min
Carrier gas	Highly pure helium, purity not less than 99.9999 %, flow rate 80 mL/min
Separation column	Silica gel stainless column
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)
Measurement cycle	Purge time = 60 seconds, circulation combustion time = 300 seconds, measurement time = 270 seconds
Temperature conditions	Reaction furnace temperature: 870 °C, Reduction furnace temperature: 600 °C, Column oven temperature: 70 °C, Detector temperature: 100 °C

(2) 試料の前処理及び測定

分析試料 0.1 g~0.3 g を 0.1 mg の桁まで石英ボートに 2 つずつ量り取り, 一方を磁性皿に載せ 550 °C の電気炉で 2 時間灰化させた. Table 1 の条件に設定した装置を用いて分析試料中の炭素量及び窒素全量を測定した. 求められた炭素全量(TC)より無機炭素量(IC)を差し引き, 有機炭素量(TC-IC)とした (Fig. 1).

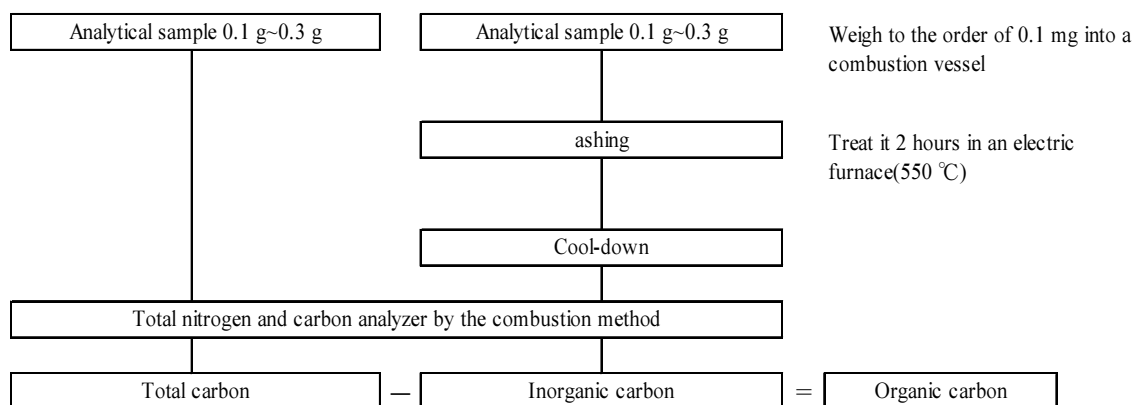


Fig. 1 Flow sheet for organic carbon in compost and sludge fertilizers by the combustion method

4) ニクロム酸酸化法による有機炭素量の測定

肥料等試験法(ニクロム酸酸化法)に従って分析試料中の有機炭素量を測定した⁶⁾。参考として、試験法のフローを Fig. 2 に示した。

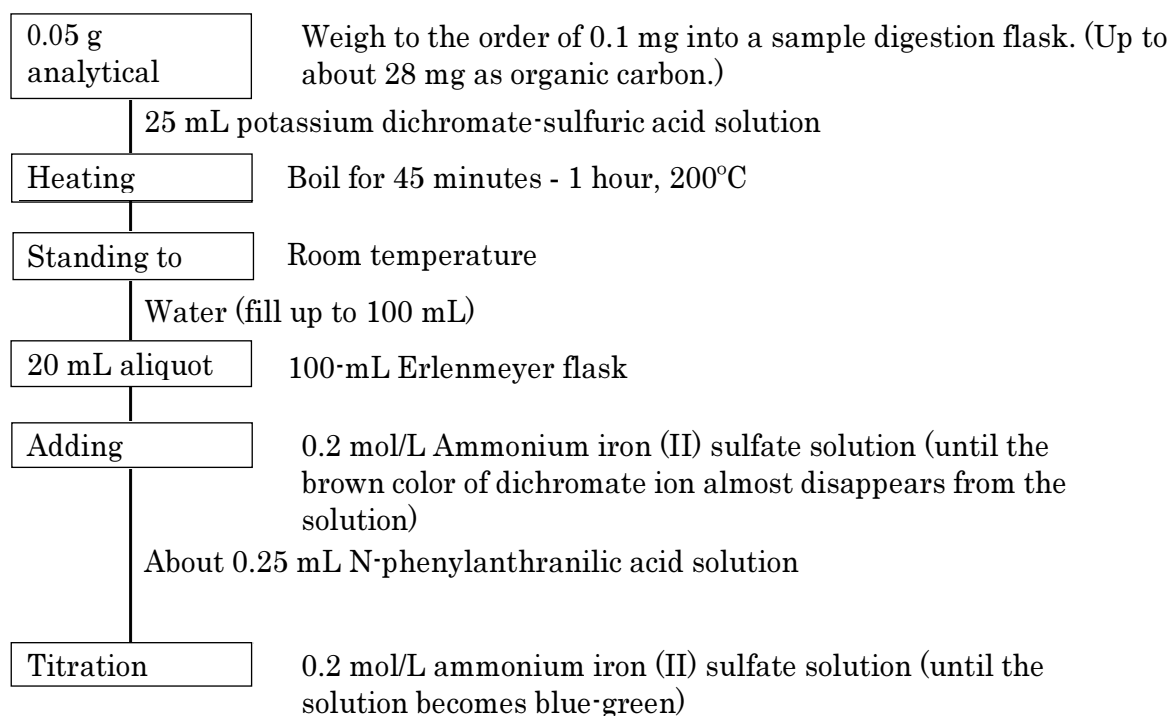


Fig. 2 Flow sheet for organic carbon in sludge fertilizers and composts, etc.

3. 結果及び考察

1) 前処理温度の検討

試料を電気炉において灰化させる処理条件について検討するにあたって、粗灰分の分析方法として、飼料分析法⁷⁾及び堆肥等有機物分析法⁸⁾、また、灰分の分析方法として下水汚泥分析方法⁹⁾及び肥料等試験法を

参考とした (Table 2). 分析試料量が 0.1 g~0.3 g であることから処理時間については 2 時間と決め、前処理温度の検討をした.

Table 2 Measurement methods of crude ash and ash

Component	Measurement methods	Sampling amount (g)	Temperature(°C)	Treatment time(h)
Crude ash	Methods of Analysis of Feeds	2 ~ 5	550~600	2
	Taihitouyuukibutubunnsekihohou	5	550	4
Ash	Gesuideibunsekihohou	2 ~ 5	600	1
	Testing Methods for Fertilizers	2	550	4

2.1)の分析用試料のうち、し尿汚泥肥料(1点)、工業汚泥肥料(2点)、汚泥発酵肥料(4点)、たい肥(1点)の試料を複数連で石英ボードに量り取り、1連ずつ 450 °C、500 °C、550 °C及び 600 °Cで 2 時間灰化した。残りの 1 連と同時に燃焼法で測定し、炭素全量(TC)から灰化残分となった無機炭素量(IC)を差し引いた物を有機炭素量(TC-IC)とし、二クロム酸酸化法で測定した有機炭素量(OC)と比較した。無機炭素量(IC)の定量値範囲は 550 °Cで 0.1 %~7.2 %であり、600 °Cで 0.0 %~6.4 %であった。有機炭素量(TC-IC)としての定量範囲 15.0 %~43.8 %、450 °C~600 °Cの範囲内であれば大きな変動は見られなかった (Fig. 3)。

また、無機炭素量(IC)が多く(7 %程度)含まれていた汚泥発酵肥料を用い、処理温度 350 °C~600 °Cでの有機炭素量(TC-IC)について測定したところ、450 °C~550 °Cの範囲で有機炭素量(OC)に近い値であることが分かった (Fig. 4)。

以上の結果を踏まえ、この後の検討では 550 °Cで 2 時間灰化することとした。

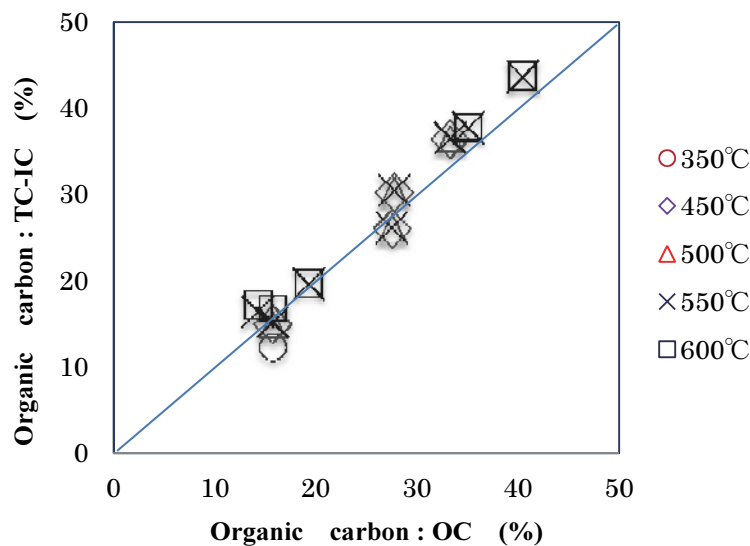


Fig. 3 Amount of organic carbon under different temperature pretreatment, comparison organic carbon between TC-IC and OC (n=8)

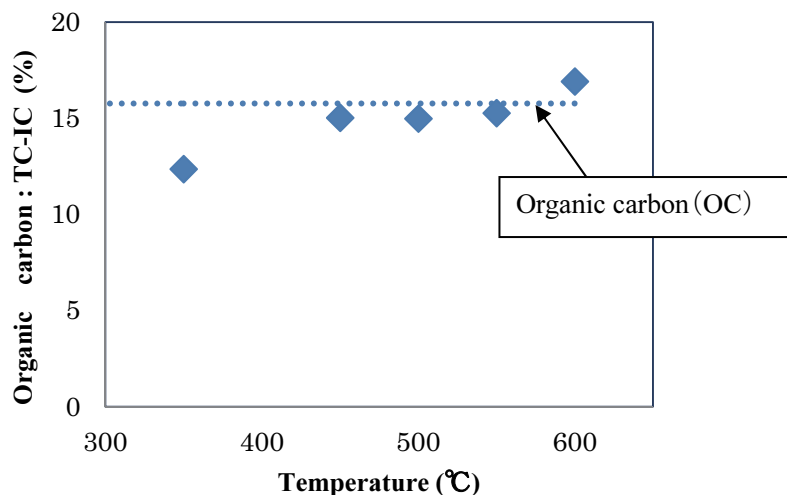


Fig. 4 Fluctuation of TC-IC in the composted sludge fertilizer affected by pretreatment temperature

2) 燃焼法とニクロム酸酸化法の比較

ニクロム酸酸化法による分析試料中の有機炭素量(OC)及び燃焼法による炭素全量(TC)の定量値の関係を Fig. 5 に、また、有機炭素量(OC)及び本法による有機炭素量(TC-IC)の定量値との関係を Fig. 6 に示した。これらの定量値の関係の回帰式を求めたところ、前者の回帰係数は 1.077 で相関係数は 0.978 であり、後者の回帰係数は 1.063 で相関係数は 0.989 であった。炭素全量から無機炭素量を差し引くことによって、有機炭素量 25 %以下の試料についてはニクロム酸酸化法の測定値と一致することが確認されたが、有機炭素量が 25 %以上の試料には無機炭素量を差し引く効果は認められないものがあった。このことから、燃焼法とニクロム酸酸化法との測定値を一致させるため、燃焼法の前処理方法の更なる改良が必要となった。しかしながら、炭素窒素比を迅速に把握することにおいて、一定の原料を使用する堆肥及び汚泥肥料の生産事業場の品質管理の方法としての適用が考えられた。このことから、本法の併行精度等の性能を調査することとした。

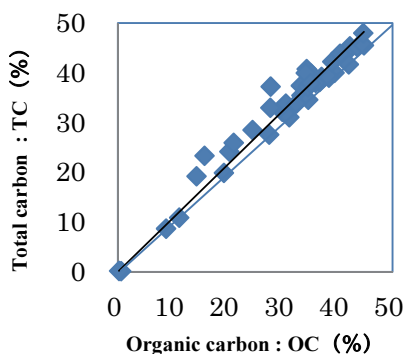


Fig. 5 Comparison OC with TC

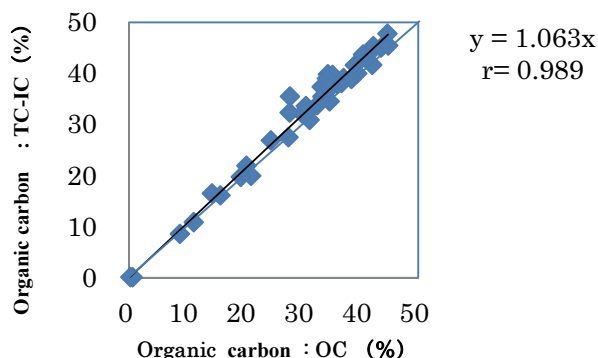


Fig. 6 Comparison OC with TC-IC

3) 燃焼法による有機炭素測定の併行試験

2.1)の分析用試料のうちたい肥, 下水汚泥肥料, し尿汚泥肥料, 工業汚泥肥料, 焼成汚泥肥料及び汚泥発酵肥料各1点について, 炭素全量(TC), 無機炭素量(IC)を3回繰返し測定して得られた併行試験結果をTable 3に示した. 炭素全量(TC)の標準偏差は0.01%~0.83%, 相対標準偏差は0.12%~3.35%, 無機炭素量(IC)の標準偏差は0.00%~0.08%, 相対標準偏差は0.75%~8.44%であった. 有機炭素量(TC-IC)について合成標準偏差を求め, それを元に合成相対標準偏差を求めたところ, 焼成汚泥肥料以外では0.53%~3.7%と良好な併行精度が得られた. 焼成汚泥肥料については有機炭素量(TC-IC)が0.13%と低いため, 合成相対標準偏差が7.7%と低い併行精度となった.

Table 3 Replicate testing on carbon in sludge fertilizers and compost by the combustion method.

Type of fertilizer	Total carbon(TC)			Inorganic carbon(IC)			Organic carbon(TC-IC)		
	Mean ¹⁾ (%) ²⁾	SD ³⁾ (%) ²⁾	RSD ⁴⁾ (%)	Mean ¹⁾ (%) ²⁾	SD ³⁾ (%) ²⁾	RSD ⁴⁾ (%)	Remainder ⁵⁾ (%) ²⁾	CSD ⁶⁾ (%) ²⁾	CRSD ⁷⁾ (%)
compost	24.6	0.83	3.4	2.35	0.06	2.5	22.3	0.83	3.7
Sewage sludge fertilizer	48.2	0.72	1.5	0.09	0.01	8.4	48.1	0.72	1.5
Human waste sludge fertilizer	37.0	0.73	2.0	0.10	0.00	3.7	36.9	0.73	2.0
Industrial sludge fertilizer	18.1	0.02	0.12	2.49	0.08	3.1	15.6	0.08	0.53
Calcined sludge fertilizer	0.21	0.01	3.4	0.08	0.00	1.9	0.13	0.01	7.7
Composted sludge fertilizer	22.8	0.24	1.1	7.44	0.06	0.75	15.3	0.25	1.6

1) Mean of triplicates

2) Mass fraction

3) Standard deviation

4) Relative standard deviation

5) Remainder of means

6) Combined standard deviation

7) Combined relative standard deviation

4) 定量下限の確認

定量下限を求めるのに適した試料として, 2.1)の分析用試料のうち窒素量(N)や有機炭素量(OC)を含む焼成汚泥肥料5gに炭酸カルシウム(CaCO₃)1gを良く混合し調製した.

燃焼法により炭素全量(TC), 無機炭素量(IC)を繰返し7回測定して得られた有機炭素量(TC-IC)の定量下限の確認試験結果をTable 4に示した. 有機炭素量(TC-IC)は7.36%であり, その合成相対標準偏差は0.05%であった. 定量下限値は(標準偏差)×10, また, 検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)として示される¹²⁾ので, 本法の定量下限値は0.5%程度, 検出下限値は0.1%程度と推定された.

これらの値は, ニクロム酸酸化法における有機炭素量(OC)の定量下限値及び検出下限値が下水汚泥肥料において1.5%程度及び0.8%程度と推定された¹³⁾ことと比較して, かなり低いものとなった.

Table 4 Method quantitation limit and method detection limit							(mass fraction %)	
Sample name	Total carbon (TC)		Inorganic carbon (IC)		Organic carbon(TC-IC)			
	Mean ¹⁾	SD ²⁾	Mean ¹⁾	SD ²⁾	Remainder ³⁾	CRSD ⁴⁾	estimate of the MQL ⁵⁾	estimate of the MDL ⁶⁾
Calcined sludge fertilizer +CaCO ₃	9.32	0.05	1.96	0.01	7.36	0.05	0.5	0.1

1) Mean obtained was repeatedly measured seven times

2) Repeatability standard deviation

3) Remainder of means

4) Combined relative standard deviation

5) Method quantitation limit

: repeatability standard deviation×10

6) Method detection limit

: repeatability standard deviation×2×t(n-1,0.05)

5) 無機炭素量(IC)と石灰含有率との関係

燃焼法と二クロム酸酸化法の差を検討した報告⁸⁾では、石灰含有率が高い肥料ほどこれら分析法による差が大きくなる傾向があることが指摘されている。そこで、今回の分析試料中の石灰全量(CaO)と無機炭素量(IC)との比較を行った。

その結果、石灰含有率の高い試料において無機炭素量(IC)との相関が見られた(Fig. 7)。このことから、石灰含有率の高い試料においては無機炭素量(IC)が高いと推測され、今回の報告で行っている前処理によって無機炭素量(IC)を求め、TC-ICを有機炭素量とすることがより望ましいと考えられた。

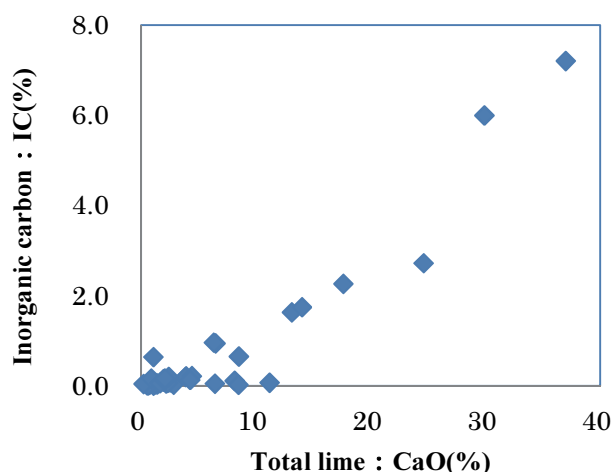


Fig. 7 Relation total lime and inorganic carbon (IC)

4. まとめ

普通肥料の汚泥肥料及び特殊肥料の動物の排泄物、たい肥に成分表示義務が課せられているが、肥料取締法上で示されている公定法である二クロム酸酸化法では多量の濃い酸・アルカリ等の試薬を必要としている。それに対し、燃焼法では酸化窒素を還元する還元銅などの廃棄物は発生するが少量であり、酸・アルカリ等の試薬を必要としない。これまで窒素全量を測定する方法として燃焼法について検討され、その妥当性が確認されているため、有機炭素の測定にも同様に安全で簡易な方法の適用が求められている。

粗灰分を求める飼料分析法を参考にし、電気炉で試料を灰化させて残存する炭素を無機炭素量とする方法を提示した。すなわち、原試料より炭素全量を求め、無機炭素量を差し引いて得られた測定値を有機炭素量とし、二クロム酸酸化法の定量値と比較した結果、有機炭素含有量が低い(25%以下)の試料について2方法の

測定値が一致する傾向が認められた。併行試験を実施したところ、満足する併行精度が得られた。また、定量下限は0.5%程度と推定された。

二クロム酸酸化法は試料調製及び滴定に数時間程度必要とし、その間、作業者は拘束される。また、炭素窒素比を求める際に窒素全量を他方法により測定する必要がある。

一方、今回の燃焼法では、試料量の分取操作を行った後、無機炭素量測定用試料を電気炉で灰化・放冷等に2時間程度要するが、その後は全窒素全炭素測定装置により自動的に測定される。検量線の作成を含めた装置の調整に1時間～1.5時間程度必要とするが、1分析試料につき数分で測定が出来る。作業者が拘束されることなく一度に大量の試料を測定し、また同時に窒素全量も測定することが可能である。

よって、当該前処理方法を用いた有機炭素量を求める燃焼法は、生産事業場における有機炭素量の推移を管理していく分析方法として有効であり、迅速化及び簡素化に有用な手法と考えられる。なお、有機炭素量25%以上の試料について二クロム酸酸化法との測定値の差が改善されなかったことから、前処理方法の改良を今後検討することとした。

文 献

- 1) 肥料取締法:昭和25年5月1日,法律第127号,最終改正平成23年8月30日,法律第105号(2011)
- 2) 農林水産省告示:特殊肥料の品質表示基準,農林水産省告示第1163号,最終改正平成17年2月28日,農林水産省告示第364号(2005)
- 3) 農林水産省告示:肥料取締法第十七条第一項第三号の規定に基づき,肥料取締法第四条第一項第三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,最終改正平成13年3月15日,農林水産省告示第337号(2001)
- 4) 農林水産省告示:肥料取締法施行規則第十一条の二第一項及び第二項の規定に基づき原料及び材料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,最終改正平成16年1月15日,農林水産省告示第74号(2004)
- 5) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法,p.11~13,財団法人日本肥糧検定協会,東京(1992)
- 6) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2012)
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html> >
- 7) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター飼料分析基準検討会編:飼料分析法・解説,p.33~35,(2009)
- 8) 財団法人日本土壌協会:堆肥等有機物分析法(2010年版)p.71~72(2010)
- 9) 社団法人日本下水道協会:下水汚泥分析方法,p.7~8,(2007)
- 10) 佐藤一弘,柳川道夫,田中耕一,田島美代子:乾式燃焼法およびチューリン法による堆肥等の有機質資材中の炭素含有率分析の差異,日本土壌肥料学雑誌,72(6),780~782,(2001)
- 11) 地盤工学会基準:土の有機炭素含有量試験方法,JGS 0231-2000
- 12) 環境省水・大気環境局水環境課:要調査項目等調査マニュアル(水質,底質,水生生物),p.8~11,(2008)
- 13) 白井裕治,関根優子,廣井利明:肥料研究報告,3,117~122,(2010)

Measurement of organic carbon in sludge fertilizer and compost by combustion method

Satono AKIMOTO¹

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

About the amount of organic carbon involved in the sludge fertilizer and compost, official method (dichromate acid oxidation method) is in need of a large amount of reagents such as dense acid and alkali. The safe and simple method for measurement of organic carbon is required. The amount of inorganic carbon is crude ash by the feed analysis. And organic carbon was measured quantity of residuals obtained by subtracting from the total amount of carbon the amount of inorganic carbon in an electric furnace of ash sample was obtained by combustion method. I compared the organic carbon with the quantitative value of the dichromate acid oxidation method. As a result, it has been confirmed that you can have a certain correlation, obtain a measure of the amount of organic carbon between both methods ($r=0.989$) were present. In the sample of the organic carbon content less than 25 %, the measurements by the combustion method were agreed with the measurements by the dichromate acid oxidation method. In addition, the lower limit of quantification was estimated to be approximately 0.5 %. Dichromate acid oxidation method requires technique for sample preparation and titration, during which the worker is restrained. In addition, it is necessary to measure the total amount of nitrogen by the other method when determining the carbon-nitrogen ratio. On the other hand, this method does not need technique, and measuring device can be measured automatically. The total amount of nitrogen being measured at the same time is also possible. Therefore, determine the amount of organic carbon combustion method using the pretreatment method is valid as analytical methods continue to manage the organic carbon content in manufacturing facilities of compost and sludge fertilizer, is considered a useful technique to simplify and accelerate. It should be noted, from the fact that difference between the measurements by two methods of organic carbon of the samples more than 25 % was not improved; further study of pretreatment was required.

Key words organic carbon, sludge fertilizer, compost, combustion method,
dichromate acid oxidation method

(Research Report of Fertilizer, 5, 138~146 2012)

14 コマツナの生理障害

- 窒素 -

阿部文浩¹, 恵智正宏¹

キーワード 欠乏症状, 過剰症状, 発芽障害, 窒素飢餓, 窒素転流

1. はじめに

植物に対する害に関する栽培試験(以下, 植害試験という)は農林水産省農蚕園芸局長通知¹⁾により実施方法が定められている. 供試作物は原則としてコマツナを用い, その生育状況から肥料中の植物に有害な成分の有無を判定する. しかし, 植害試験を実施する過程で, 一般に生理障害と言われる必須成分の欠乏又は過剰に起因する症状が発現することがある. 植害試験中に何らかの症状が現れた場合, それが有害物質による症状なのか, 生理障害なのかを判断することは難しい. また, コマツナを対象とした生理障害について詳細を記した文献は少ない.

そこで, 植物に対する害を評価するための基礎的な資料作成を目的として, 意図的に生理障害を発現させてその症状の経過を記録した. 同時に植害試験法の詳細な手順を構築する際の基礎データ蓄積を目的とした. 今回は窒素について試験を実施したので報告する.

2. 材料及び方法

供試植物としてコマツナ(品種名:夏楽天)を用いた. 栽培条件は, 人工気象装置(小糸工業製 コイトロン KG50-HLA 型)内で照度約 30000 lx, 照明時間 12 時間, 気温昼間 25 °C, 夜間 15 °C, 湿度 70 %一定の条件下で, 21 日間栽培を行った. 灌水は最大容水量の 60 %を目安に管理し, ローラーポンプ式自動給水装置(古江サイエンス製 RP-MRF-1)を併用した. 栽培条件を均一にするため, 人工気象装置内でのポットの配置は休日を除く毎日, 無作為に換えた. 栽培は 1/10000 a ノイバウエルポットに, 供試土壌として旧東京肥飼料検査所浜田山圃場にて採取した黒ボク土(pH 5.7, EC 11 mS/m)を, ポット底から約 5 cmまで充填して供試した.

試験は欠乏症状及び過剰症状について確認試験を実施した. 欠乏症状確認試験は供試肥料に硫酸アンモニア, 過りん酸石灰及び塩化加里を用い, N, P₂O₅, K₂Oとして 25 mg, 100 mg, 100 mg となるよう施用したのち播種した. また, 窒素飢餓症状を観察するために, 供試肥料として硫酸アンモニア, 過りん酸石灰及び塩化加里を用い N, P₂O₅, K₂O としてそれぞれ 100 mg になるよう施用した供試土壌に, 添加材料としてコーヒーかすを 0 g, 5 g, 10 g, 15 g 及び 20 g 添加した計 5 区の試験区を設けた. 添加材料の選定理由として, コーヒーかすを原料に使用したい肥等を供試肥料とした植害試験の結果の中に, 生育量が対照肥料と比べて小さいものが散見されることから, 窒素飢餓症状を容易に確認できる材料と考えた. 播種は供試肥料とコーヒーかすの施用後 8 日目とした. 過剰症状確認試験は, 硫酸アンモニア, 塩化アンモニア及び尿素の 3 種類を用い, N として 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg 及び 600 mg の計 5 試験区を設け, P₂O₅ 及び K₂O は, 過りん酸石灰及び塩化加里を用いて各ポット 100 mg となるように施用した.

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

3. 結果及び考察

3.1 窒素の生理作用

窒素は植物にとって多量必須要素であり、主に硝酸態窒素として吸収されるが、水稻やサトイモ等はアンモニア態窒素を好み、その利用形態は様々である。吸収された窒素は同化され亜硝酸、アンモニアへ還元され、アミノ酸の合成が起こり植物体内ではタンパク質、アミノ酸、核酸、クロロフィルなどとして存在する²⁾。窒素の典型的な過剰症状は、葉の緑色が濃くなり、生育が全体的に旺盛になるが、光合成で生成した炭水化物はタンパク合成への利用が多くなり繊維質を作る割合が減り作物は全体に軟弱化する³⁾。植害試験においては光量が確保されていれば軟弱徒長という表現が当てはまることが少なく、比較的しっかりと生育し葉色が濃くなるのが一般的である。窒素が不足した時の葉の黄化は植物体内の窒素の移動に関わり、その移動は次のように考えられている。窒素の不足や器官の老化によりタンパク質や核酸はアミノ酸や尿酸に分解される。アミノ酸は酸化的分解によりアミノ基からアンモニウムイオンとなる。尿酸は尿素となりウレアーゼにより二酸化炭素とアンモニウムイオンに分解される。下位葉でアンモニウムイオンはグルタミンやアスパラギンに合成され篩管を通り上位葉等に輸送される⁴⁾。このようにタンパク質等が移動に適した物質にまで分解され細胞分裂の激しい生長点へ窒素転流される。

3.2 生理障害の症状

3.2.1 欠乏症状

コマツナは無胚乳種子であり種子は子葉中に養分を蓄えている。発芽から子葉が展開する頃までは、その蓄えた養分により生長する。子葉では葉緑素が生成され葉は緑色になり、ある程度まで大きくなるが、スターターとしての子葉の役割はこのあたりまでで、その後は土壤中の養分を吸収し生長する。窒素とりん酸は初期生育には特に必要な成分であり不足すると正常に生育しない。

生育途中で窒素が欠乏した場合、症状は下葉から現れ、葉色は緑色、淡黄色、そして黄色に変色する。窒素は植物体内で転流しやすいが、葉が黄色に変化したときは窒素欠乏が推察される。個の様子は、特に子葉で確認され、欠乏の有無判別は比較的容易である(写真 1~3)。植害試験中に黄変症状が本葉に現れる場合は、ある時点まで順調に生長したものが、ポット内の窒素を吸収し尽くした時に発現することが多い(写真 4, 5, 11)。特に、生育が活発になる試験終盤などで比較的急に窒素が消費されて欠乏した状態では、生長が停滞し新葉の展開と同時に下葉は黄変して落葉する。このような場合は各個体の本葉の数はほぼ一定となり生長する(この症状を確認するためには栽培期間を延長する必要がある)。このことは植物体内の窒素の再利用を示している。窒素は転流しやすいことを先に述べたが、窒素欠乏症状が現れているポットに硫酸アンモニアを添加すると、数日後には葉の縁辺から緑色が濃くなり、葉は元の緑色に回復する様子が確認された(写真 6)。たい肥などの植害試験を実施したときに窒素飢餓症状が見られるときがある。子葉展開時から極端に窒素が不足すると子葉の生長は緩慢になり子葉は黄化していく(写真 7~9)。易分解性炭素が多い未熟な有機物の施用により起こる窒素飢餓という症状である。未熟な有機物の分解時に微生物が土壤中の窒素を取り込むため植物は窒素が利用できなくなり窒素欠乏症状となる。植害試験において発芽はするものの子葉は黄色く全く生長しない症状は窒素飢餓の疑いがある(写真 12)。

また、窒素欠乏を示す指標として土壌の表面に根が露出することが挙げられる(写真 10)。これは、仮に有害物質による害が発現した場合、根の伸長が抑制されることから、十分に伸長することは、根の生

長を阻害する物質は土壌中にあることを示すものと考えられる。



(写真 1) 窒素が不足し始めた黄緑色の子葉. 植害試験の場合, 窒素が過剰にある時は収穫時でも子葉は緑色をしているが, 標準区など窒素の施用量が少ないポットは試験途中でも子葉の葉色変化が確認された. 以下, 写真 1~3 は同じ個体を撮影したものではないが, その経過が観察された.



(写真 2) 窒素欠乏が進行した子葉. 色は殆ど黄色となっている.



(写真 3) 写真 2 の状態が進行すると, 窒素不足が進み葉は枯死した. この後, 子葉は脱落した.



(写真 4) 本葉の第一葉に発現した初期の窒素欠乏症状。子葉と同様に葉色が黄色を帯びている様子が確認され、若い葉が展開する際には急速に黄色に変色する。また、この頃から新たに伸長してきた若い葉の大きさは、その前に出た葉とほぼ同等の大きさになる傾向も観察された。

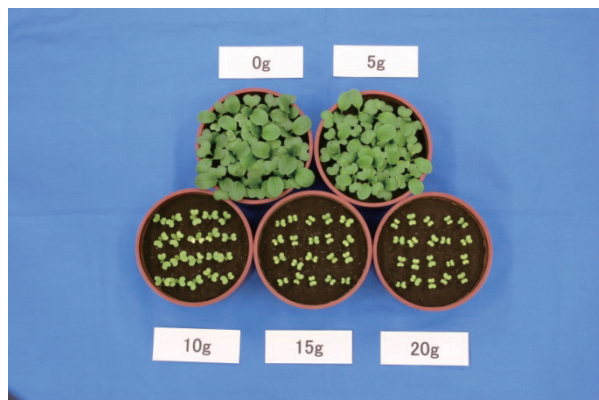


(写真 5) 本葉第一葉がほぼ黄色く変色した様子。個体全体の色は当初の緑から黄緑色へと変化している。展開していない小さい葉は緑色がやや濃い様子が観察された。



(写真 6) 窒素欠乏症状で葉が黄化したポットに硫酸アンモニアを添加して数日後の様子。葉の周辺部から緑色が濃くなる様子が確認された。中心部はまだ色が薄いですが、窒素は移動しやすい成分だとわかる。

その右側の黄色の葉は、窒素欠乏により黄変したものと考えられる葉だが、ここまで進行したものは窒素を添加しても回復せずに萎凋した。



(写真 7) 窒素飢餓試験、播種 10 日後の様子。三要素肥料は全てのポットにそれぞれ 100 mg 施用し、さらにコーヒーかすをポット当たり 0 g~20 g 添加した。コーヒーかすの添加量が多くなるに従い生育の抑制が認められた。子葉の色はやや黄色い。



(写真 8) 播種 16 日後の様子。0 g と比較して葉色の差がはっきり現れた。葉色からみて 5 g 区はポット内の窒素が不足し始めていると推察される。コーヒーかすの添加量が多くなるに従い生育が停滞し 20 g 区は停止している。



(写真 9) 播種 22 日後の様子。5 g 区は黄色い葉が目立ってきた。10 g 区は子葉が黄色くなり小さな黄緑色の本葉が現れた。15 g 区及び 20 g 区は子葉のまま生育が停止しており葉色が黄色くなった。



(写真 10) 播種 10 日後の 15 g 区の様子。通常この時期に土壌表面に根を確認することはまれである。養分を求めて根の伸長が活発化している様子が見える。土壌中に有害物質が存在する場合には根の伸長は抑制されるので、この場合はそうではないと推察できる。



(写真 11) 播種 16 日後の 5 g 区の様子。この頃から急速に葉色が黄色みを帯びた。その症状は子葉と古い本葉が同時に現れているが、若い本葉には現れていない。



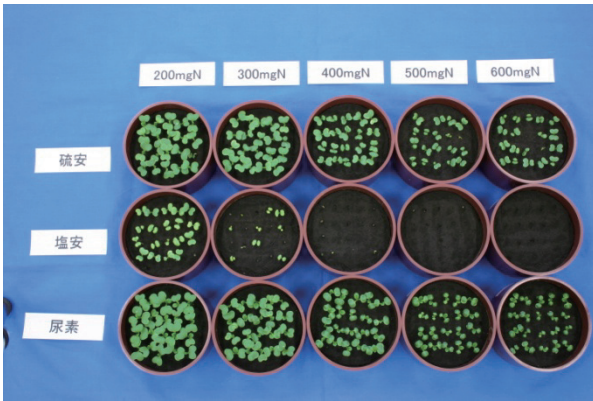
(写真 12) 播種 22 日後の 10 g の様子. 子葉は黄色く変色し, 本葉は 2 枚目まで出ているがとても小さく, この 2 枚の本葉の大きさはほぼ同じであった. 通常の植害試験期間の終了時の姿である.

3.2.2 過剰症状

発芽時は, 硫酸アンモニア, 塩化アンモニア及び尿素でそれぞれ違う症状が現れた. 硫酸アンモニアは施用量が多くなるに従い発芽遅延及び発芽率の低下が認められた. 400 mg 以上の施用量で子葉が外側に巻く症状が確認された. 塩化アンモニアで発芽が確認できたポットは 200 mg と 300 mg であったが発芽遅延は顕著であり, 子葉の葉色は黄色く弱々しい状態であった. 300 mg では種皮に包まれた子葉は展開せず胚軸を伸ばしている状態が確認された. これは塩素過剰症状であり窒素の過剰症状とは違うものと考えられる. 尿素は 200 mg~600 mg の間では発芽の遅延はなかったが, 発芽後の生長は施用量が多くなるに従い抑制が認められた. 600 mg は発芽後に子葉の変化が認められた. 子葉の大きさは通常より小さく, 外側に反ったカップ状でつやがある子葉に変化し, 葉の先に枯れ症状が確認された(写真 13, 14).

肥料を多量に添加すると塩類濃度を高めるため発芽が遅れるのが一般的である. この試験では硫酸アンモニアは硫酸イオン, 塩化アンモニアは塩化物イオンの影響と思われる症状が現れた. 尿素については土壤中でアンモニアと炭酸に変化するためアンモニアの過剰症状が現れていると考えられることから発芽時の窒素過剰症状としては尿素を添加した時の症状が一般的である(写真 14).

窒素を過剰施用した土壌で栽培を続け生長を観察した(写真 15). 硫酸アンモニア 400 mg, 塩化アンモニア 300 mg より施用量が多いポットでは本葉が黄色くなった個体が目立っている. ある時期に一斉に枯れかかり急激に黄色く変化する. 一度黄色くなった葉は元には戻らず生長は鈍化する. 葉色が黄色くなる直接の原因については不明なことがあるため追試験が必要である. 一方, 発芽時またはそれ以降に障害を受けていない健全な個体は葉が大きく生長し葉色も緑色が濃くなる. 尿素は硫酸アンモニアや塩化アンモニアよりも速く硝酸化成することが知られている⁵⁾. 一般に窒素が過剰にあるときのポット全体の姿としては尿素を 200 mg~300 mg 施用したものに酷似する(写真 15, 16). 尿素 600 mg は発芽後に子葉に萎凋症状が認められたが, は種 12 日後にはその個体から本葉が展開しているのが確認されている(写真 17). このことは萎凋症状を起こした原因物質がポット内から減少したことが推測され, 硫酸アンモニアの 200 mg などの葉の先端部や縁辺部が枯れる症状はアンモニア過剰によるもの, または塩類濃度が原因と考えられる.



(写真 13) 硫酸アンモニア, 塩化アンモニア及び尿素をポット当たり 100 mg~600 mg 施用し 7 日後の様子. 施用量の増加に伴い発芽の遅延が認められる. 塩化アンモニアは 200 mg 施用区のポットから塩素による発芽障害が認められた.



(写真 14) 施用 7 日後に尿素 600 mg 施用区に現れた発芽時の窒素過剰症状. 子葉が外側に反ったカップ状になる. 葉の縁が若干枯れている.



(写真 15) 播種 21 日後の様子. 硫酸アンモニア 200 mg 施用区, 塩化アンモニア 100 mg 施用区のポットから萎凋症状が認められ施用量の増加に伴いその程度が強い. 尿素では萎凋症状が少ない. 施用量の増加に伴い生育量が減少した.



(写真 16) コマツナの正常な色合い(左)と窒素が過剰な状態(右). 窒素過剰であると葉が大きく生育し緑色が濃くなる.



(写真 17) 尿素 600 mg の播種 12 日後の様子. は発芽後に子葉に枯れ症状が認められたが, その個体から本葉が展開しているのが確認できる. 過剰に存在するアンモニアが減少したためと考えられる.

4. まとめ

コマツナを用いて, 窒素飢餓症状を含む窒素の欠乏症状及び過剰症状を発現させたところ, 一般に言われる症状の発現を確認した. また, 過剰症の試験においては, 肥料の種類によっては適正施肥量に差異が認められ, 窒素の過剰症状を確認するときは尿素を用いると他の塩類の影響を受けずに確認できることが明らかとなった. 窒素飢餓症状確認にコーヒーかすを用いたが, 植物に対して生育阻害物質を含む可能性が疑われることから稲わら等を用いて再度試験を実施したい. また, 硫酸アンモニア等の施用で葉の先端部や縁辺部が枯れる症状と葉が黄化する症状は別々の原因であることも考えられ今後も調査が必要である. 今後はそのようなことも含め, 他の元素についても同様に検討を行いたい.

なお, 植害試験は窒素量を 100 mg~400 mg に設定している. この量はほ場の作土層を 15 cm と仮定した場合, 窒素施用量は 10 a 当たり 30 kg~120 kg になる. このことから植害試験はかなりの多肥条件の試験であるといえる. 植害試験において, 特に無機質肥料を施用する試験では何らかの過剰障害が現れることがあるため本来の植害試験目的である有害物質による害と区別する必要がある.

文 献

- 1) 農林水産省農蚕園芸局長通知: 肥料取締法の一部改正に伴う今後の肥料取締りについて, 別添 1, 植物に対する害に関する栽培試験, 昭和 59 年 4 月 18 日, 59 農蚕第 1943 号 (1984)
- 2) 植物栄養・肥料の事典編集委員会編: 植物栄養・肥料の事典, p.72~74, 朝倉書店, 東京(2002)
- 3) 渡辺和彦: 原色 野菜の要素欠乏・過剰症, p.51~53, 農山漁村文化協会, 東京 (2002)
- 4) 米山忠克, 長谷川功, 関本均, 牧野周, 間籐徹, 河合成直, 森田明雄: 新植物栄養・肥料学, p.98 朝倉書店, 東京 (2010)
- 5) 尾和尚人, 木村真人, 越野正義, 三枝正彦, 但野利秋, 長谷川功, 吉羽雅昭: 肥料の事典, p.82~83, 朝倉書店, 東京 (2006)

Physiological disorder of Komatsuna — Nitrogen —

Fumihiro ABE¹ and Masahiro ECHI¹

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

This study was intended to observe the nitrogen deficiency symptoms, nitrogen excess symptoms and condition of nitrogen starvation about Komatsuna (*Brassica rapa var. perviridis*). The nitrogen deficiency symptoms were to observe the leaves turn yellow. There is a possibility of nitrogen starvation if slower growth and the leaves become yellow. Coffee dregs was used for the reproduction of nitrogen starvation. The coffee dregs might contain substances that are harmful to plants. So, the next test will consider the use of rice straw. The nitrogen excess symptoms were tested using ammonium sulfate, ammonium chloride and urea. The results will be larger leaves, darker green could be observed. These results must be careful to distinguish the symptoms of toxic substances in the fertilizer. I would like to consider the other elements in the future.

Key words nitrogen deficiency symptoms, nitrogen excess symptoms, germination injury, nitrogen starvation, nitrogen uptake and assimilation

(Research Report of Fertilizer, **5**, 147~155, 2012)

15 窒素全量試験法の性能調査

—ケルダール法—

加藤公栄¹, 千田正樹¹, 渡部絵里菜¹

キーワード クライテリア・アプローチ, 窒素全量, ケルダール法, 肥料等試験法

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中, 我が国においても ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2005)¹⁾の要求事項を参考にした試験成績の信頼性確保の考え方が重要視されている. 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. 一方, 品質の評価に用いる分析法を規格, 公定法等で指定するのではなく, 一定の規準(criteria)を満たす分析法ならば, 適用可能としている. この考え方はクライテリア・アプローチ(Criteria Approach)と呼ばれており, 化学物質を客観的に測定する分析法の評価に適用できることがコーデックス委員会において合意されている. 食品を対象としているコーデックス分析法の性能規準に関する数値設定のためのガイドライン²⁾には適用範囲, 真度, 精度, 定量下限等が設定されている.

しかしながら, 肥料の試験法に要求される性能規準は, 食品とは異なるため, 新たに設定する必要がある. 近年, 新たに開発された方法についてはこれらの性能を調査して肥料等試験法³⁾に順次収載している. ただし, 肥料分析法(1992年版)⁴⁾の記載様式を書き替えた試験法には定量下限等が記載されていないため, それらの性能を調査する必要がある. このことから, 筆者らは肥料等試験法に収載されている試験法のうち, 主成分として規定されている^{5, 6)}窒素(N)について, 窒素全量のケルダール法の精確さ等の性能を調査したので報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

流通している肥料原料の中には窒素が含まれているおそれがあることから, 試料の調製にあたっては表 1 のとおり出来る限り各肥料原料の主成分に対応する JIS 規格に規定されている試薬特級を用い, 流通している肥料の配合割合を参考に表 2 のとおり試薬を混合し, 窒素(N)として質量分率 0.2%~20%含有する試料を調製した. また, 試薬を水に溶かして窒素(N)として質量分率 0.02%含有する試料を調製した.

2) 装置及び器具

- (1) 水蒸気蒸留装置
- (2) 電位差自動滴定装置: 京都電子工業 AT510
- (3) ケルダール法用ガラス器具

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

表1 試料の調製に使用する試薬

使用する試薬		対応する原材料名	
名称	規格	名称又は種類名(材料)	慣用名
尿素	JIS K8731 特級	尿素	尿素
りん酸水素カルシウム二水和物	特級	重過りん酸石灰	重過石
りん酸二水素カリウム	JIS K9007 特級	りん酸一加里	
りん酸水素二カリウム	JIS K9017 特級	りん酸二加里	
硫酸カリウム	JIS K8962 特級	硫酸加里	硫加
塩化カリウム	JIS K8121 特級	塩化加里	塩加
グルコース	JIS K8824 特級		

表2 試験に用いた試料の配合割合

(質量分率:%)

使用する試薬	真度評価用試料					定量下限確認用試料	
	N-20	N-15	N-10	N-5	N-1	N-0.2	N-0.02
尿素	43.30	32.48	21.66	10.83	2.17	0.433	0.043
りん酸水素カルシウム二水和物	35	15	30	25	20	35	
りん酸二水素カリウム			10	20	20	15	2.5
りん酸水素二カリウム		5	10	5			
硫酸カリウム		10	10	5	15		2.5
塩化カリウム	15	10	5		5	35	
グルコース	6.70	27.52	13.34	34.17	37.83	14.567	
水							94.96
N含有量	20	15	10	5	1	0.2	0.02

3) 試薬の調製

(1) 水: 水精製装置(日本ミリポア Milli-Q DIRECT8)を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 相当の水を使用した。

(2) 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり, 冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし, 密栓して 4~5 日間放置した後, その上澄み液 5.5 mL~11 mL を共栓保存容器にとり, 炭酸を含まない水 1,000 mL を加えた。

標定: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後, 約 2.5 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg のけたまで測定. 少量の水で溶かし, 全量フラスコ 250 mL に移し入れ, 標線まで水を加えた. この液一定量を三角フラスコ 200 mL にとり, 指示薬としてブロモチモールブルー溶液 (0.1 mg/100 mL) 数滴を加え, 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定し, 次の式によって 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出した。

$$0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ = (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1,000/V_3) \times (1/C_1)$$

W_1 : 採取したアミド硫酸の質量(g)

A : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

- V_1 : 分取したアミド硫酸溶液の容量 (mL)
 V_2 : アミド硫酸溶液の定容量 (250 mL)
 V_3 : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量 (mL)
 C_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度 (mol/L)

(3) 0.25 mol/L 硫酸: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1,000mL とした。

標定: 0.25 mol/L 硫酸一定量を三角フラスコ 200 mL にとり、メチルレッド-メチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色になるまで滴定し、次の式によって 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を算出した。

$$\begin{aligned}
 &0.25 \text{ mol/L 硫酸 } 1 \text{ mL に相当する } 0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量 (B)} \\
 &= V_4/V_5
 \end{aligned}$$

- V_4 : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量 (mL)
 V_5 : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量 (mL)

(4) プロモチモールブルー溶液 (0.1 mg/100 mL): JIS K 8842 に規定するプロモチモールブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール (95) 20 mL で溶かし、水で 100 mL とした。

(5) メチルレッド溶液 (0.1 g/100 mL): JIS K 8896 に規定するメチルレッド 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール (95) 100 mL に溶した。

(6) メチレンブルー溶液 (0.1 g/100 mL): JIS K 8897 に規定するメチレンブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール (95) 100 mL に溶した。

(7) メチルレッド-メチレンブルー混合溶液: メチルレッド溶液 (0.1 g/100 mL) 2 容量に対し、メチレンブルー溶液 (0.1 g/100 mL) 1 容量を加えた。

(8) その他の試薬: 肥料等試験法³⁾に従った。

4) 試験成分及び試験方法

窒素全量 (T-N) の抽出及び測定は表 3 のとおり肥料等試験法³⁾の試験方法を用いた。なお、参考のため、試験法のフローシート(図 1, 2)を示した。

表3 試験成分及び試験方法

試験成分	肥料等試験法の項目	試料溶液の調製方法
窒素全量 (TN)	4.1.1.a ケルダール法	(4.1)ケルダール分解, (4.2)水蒸気蒸留

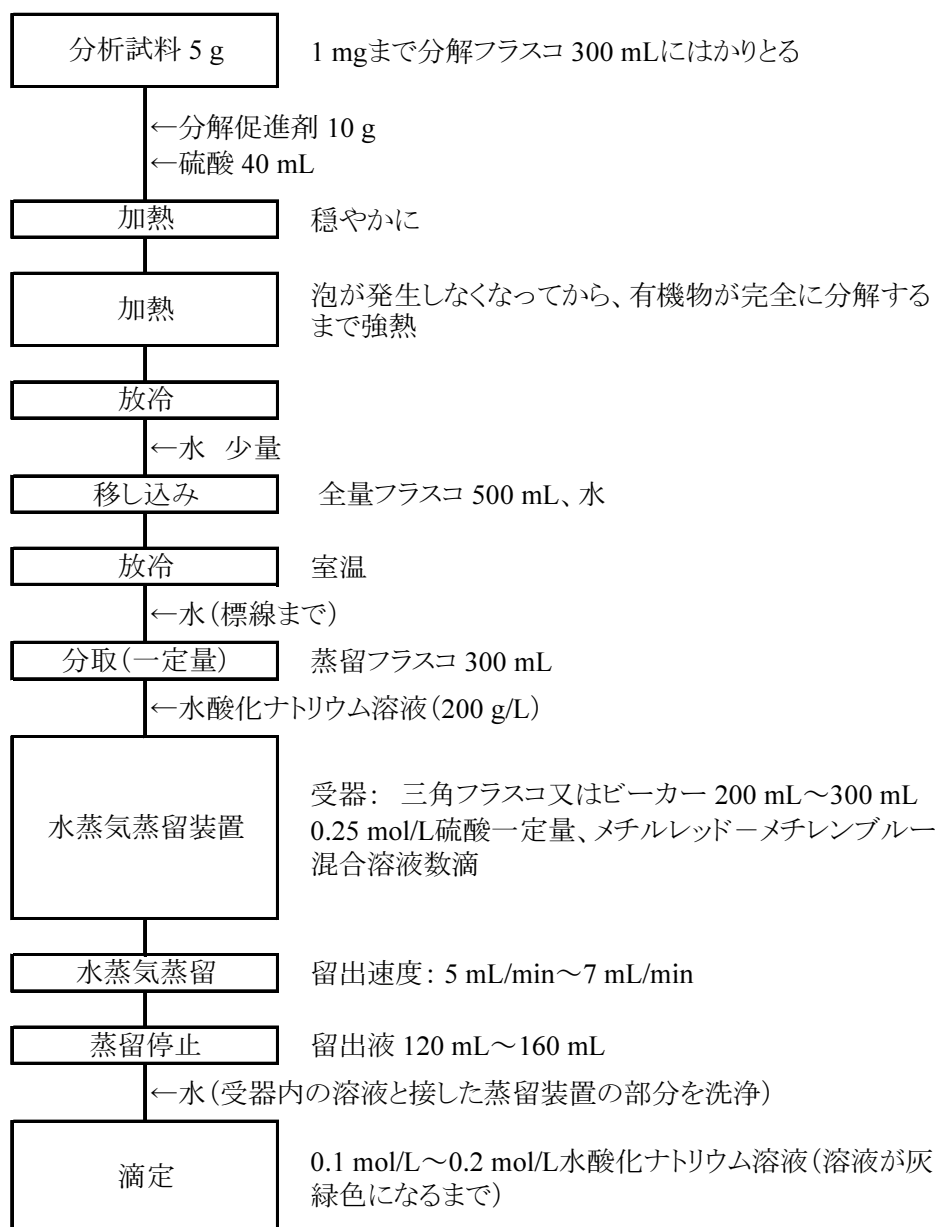


図1 肥料中の窒素全量試験法フローシート(N-20、N-15、N-10、N-5、N-1、N-0.2)

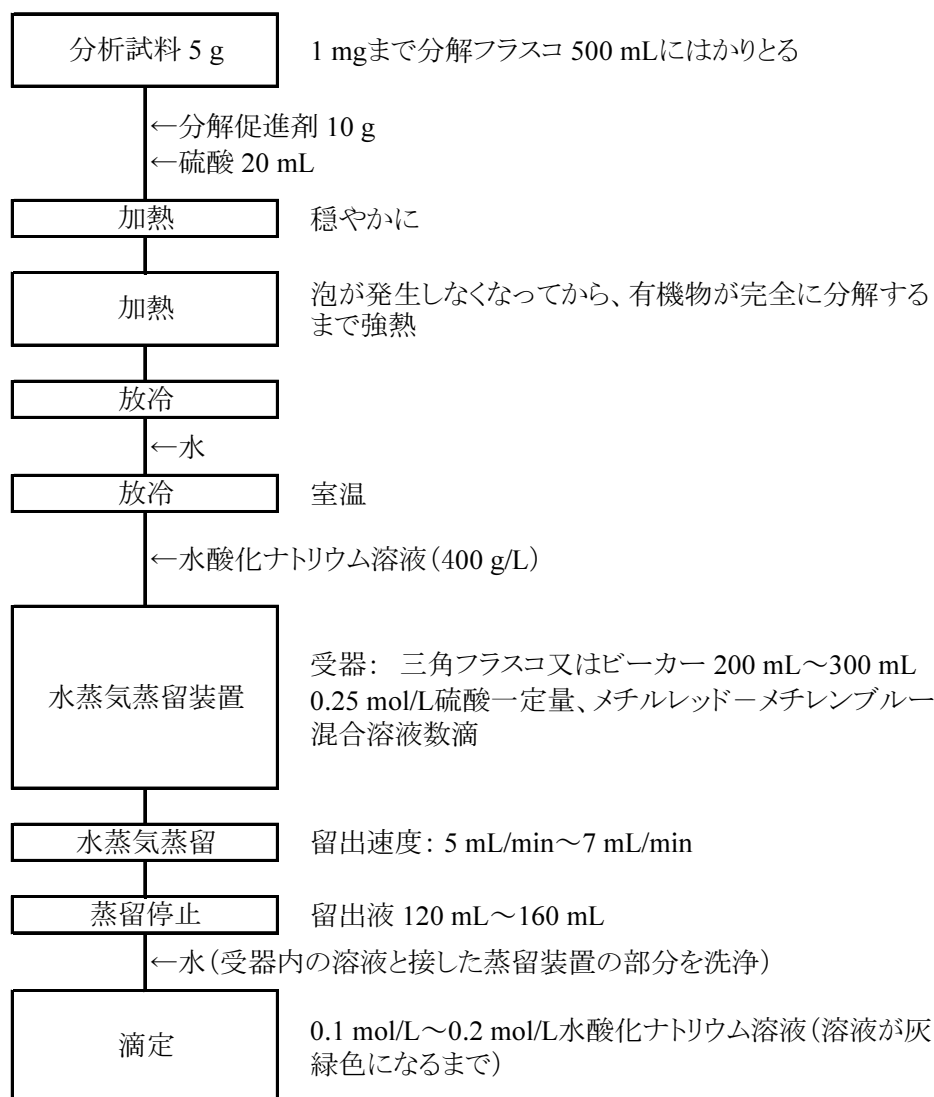


図2 肥料中の窒素全量試験法フローシート(N-0.02)

3. 結果及び考察

1) 試料の調製に用いた尿素中の窒素の含有量

試料の調製に用いた尿素中の窒素の含有量を肥料等試験法(窒素全量)により 3 点併行で測定した結果を表 4 に示した. 平均値より算出した純度は質量分率 99.3 %と試薬の表示値 (min. 99 %)を満たしており, その相対標準偏差は質量分率 0.2 % と小さかった. なお, 試料の調製では理論値を用いて配合設計を行った.

表4 試料の調製に用いた尿素中の窒素の測定値

試料	理論値 ¹⁾ (%) ⁴⁾	平均値 ²⁾ (%) ⁴⁾	標準偏差 (%) ⁴⁾	純度 ³⁾ (%) ⁴⁾	相対標準偏差 (%)
尿素	46.65	46.33	0.08	99.3	0.2

1) 尿素中の窒素(T)理論値

2) 窒素全量(T-N)の3点併行試験の平均値

3) (平均値/理論値)×100

4) 質量分率

2) 真度評価結果

真度評価用試料を用いて3点併行で窒素全量(T-N)の試験を実施した成績を表5に示した。

肥料取締法⁷⁾において、保証成分量(含有する主成分の最小量)を生産業者保証票又は輸入業者保証票(以下、「保証票」という)に記載することを普通肥料(汚泥肥料等を除く)の生産又は輸入した業者(以下、「生産業者等」という)に義務づけている。よって、窒素全量(T-N)の設計値と試験法の測定値の差について算出した。窒素全量(T-N)の設計値と測定値との差及びその設計値に対する割合は、窒素(N)含有量の少ない試料(N-5及びN-1)で質量分率-0.04%~-0.03%及び-2.9%~-0.8%であり、窒素(N)含有量の多い試料(N-20, N-15及びN-10)では質量分率-0.15%~-0.11%及び-1.5%~-0.6%であった。このことから、この試験法は、普通肥料(指定配合肥料を含む)の窒素全量(T-N)の保証成分量の評価を得るに十分な正確さを有していたことが確認された。

また、肥料取締法において、主要な成分の含有量(窒素全量(T-N))を保証票又は表示に記載することを汚泥肥料等又はたい肥等の生産業者等に義務づけている。特殊肥料の品質表示基準⁸⁾において、表示値に対する許容誤差(表示値が質量分率3%以上の場合は表示値の±10%、表示値が質量分率3%未満の場合は質量分率±0.3%)を定めている。よって、窒素全量(T-N)の設計値と測定値の差及び回収率について算出した。N-20, N-15, N-10, N-5及びN-1の回収率は質量分率97.1%~100.6%であり、N-1の設計値と測定値との差は、質量分率-0.03%であった。このことから、この試験法は、汚泥肥料等又はたい肥等の窒素全量(T-N)の表示値の評価を得るに十分な正確さを有していることが確認された。

なお、AOAC⁹⁾における濃度レベルにおける回収率の許容範囲は質量分率100%で98%~101%、質量分率10%で95%~102%及び質量分率1%で92%~105%であり、窒素全量(T-N)のいずれの回収率もこれらの許容範囲内であった。

表5 試料中の窒素(N)の試験成績

試験成分	試料	設計値	測定値	設計値と の差	差の割合	回収率	標準偏差	相対 標準偏差
		A ¹⁾ (%) ²⁾	B ³⁾ (%) ²⁾	C ⁴⁾ (%) ²⁾	D ⁵⁾ (%)	E ⁶⁾ (%)	F ⁷⁾ (%) ²⁾	G ⁸⁾ (%)
T-N	N-20	20	20.11	0.11	0.6	100.6	0.01	0.1
	N-15	15	14.93	-0.07	-0.5	99.5	0.10	0.6
	N-10	10	9.85	-0.15	-1.5	98.5	0.04	0.5
	N-5	5	4.96	-0.04	-0.8	99.2	0.07	1.5
	N-1	1	0.97	-0.03	-2.9	97.1	0.02	2.1

1) 試料中の窒素(N)の含有量(設計値)

2) 質量分率

3) 3点併行試験の平均値

4) $C=B-A$

5) $D=(C/A) \times 100$

6) $E=(B/A) \times 100$

7) 3点併行試験の標準偏差

8) $G=(F/B) \times 100$

3) 検出下限及び定量下限

普通肥料の公定規格¹¹⁾においては、普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く。以下同じ。)の含有すべき主成分の最小量は窒素全量(T-N)として 1.0 %と、家庭園芸用複合肥料の含有すべき主成分の最小量は窒素全量(T-N)として質量分率 0.1 %と、肥料取締法施行規則¹²⁾においては、指定配合肥料(家庭園芸用肥料を除く。)の保証成分量の最小値は窒素(N)として質量分率 1.0 %と、指定配合肥料(家庭園芸用肥料に限る。)の保証成分量の最小値は窒素(N)として質量分率 0.1 %とそれぞれ規定されている。また、下水汚泥肥料等の主要な成分の指定¹³⁾及び特殊肥料の品質表示基準⁸⁾においては、窒素全量(T-N)の含有量が質量分率 0.5 %未満の場合は「0.5 %未満」と記載することができると規定されている。さらに、窒素全量(T-N)の保証成分量が質量分率 0.1 %~0.5 %として登録されている家庭園芸用複合肥料の多くが液状肥料である。

そこで、表 3 に記載した試験法の定量範囲を確認するため、定量下限確認用試料を用いて 7 点併行で窒素全量(T-N)の試験を実施し、その成績を表 6 に示した。なお、定量下限は(標準偏差)×10 式、また、検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)式を用いて算出した¹⁰⁾。

N-0.2%の推定定量下限値は質量分率 0.09 %、推定検出下限値は質量分率 0.04 %であることから、表 3 に記載した試験法は、公定規格における普通肥料、指定配合肥料(家庭園芸用肥料を除く。)、汚泥肥料等及びたい肥等の窒素全量(T-N)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していることが確認された。

また、N-0.02 %の推定定量下限値は質量分率 0.016 %、推定検出下限値は質量分率 0.006 %であることから、表 3 に記載した試験法は、家庭園芸用複合肥料及び指定配合肥料(家庭園芸用肥料に限る。)の窒素全量(T-N)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していることが確認された。

表6 定量下限確認試験の成績

(質量分率:%)

試験成分	試料	設計値 ¹⁾	平均値 ²⁾	標準偏差	推定定量下限値 ³⁾	推定検出下限値 ⁴⁾
T-N	N-0.2	0.2	0.206	0.009	0.09	0.04
T-N	N-0.02	0.02	0.0215	0.0016	0.016	0.006

1) 試料中の窒素(N)の含有量(設計値)

2) 7点併行試験の平均値

3) 標準偏差×10

4) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4) 室間再現精度

クライテリア・アプローチにおける性能規準では室間再現精度が要求されるが、試験法の妥当性確認のための共同試験の実施には大きな労力がかかる。このことから、該当する試験法で実施された既報の外部精度管理試験¹⁴⁾及び認証標準物質の値付けのための共同試験¹⁵⁾の成績^{16~21)}を適用することとし、それらの成績を表 7 及び表 8 に示した。なお、外部精度管理試験では、ロバスト法を用いて報告値の中央値及び標準化された四分位範囲(NIQR)が算出されている。中央値及び NIQR は正規分布において平均値及び標準偏差に一致する。

窒素全量(T-N)の中央値又は平均値が質量分率 8.74 %~14.76 %の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.07 %~0.13 %、その相対標準偏差は 0.6 %~0.9 %であった。また、窒素全量(T-N)の試験成績の HorRat 値は 0.25~0.32 であった。

なお、AOAC(OMA)⁹⁾における濃度レベルにおける室間再現精度の目安は質量分率 100 %で 2 %、質量分率 10 %で 3 %、質量分率 1 %で 4 %及び質量分率 0.1 %で 6 %であり、窒素全量(T-N)の室間再現標準偏差

はこれらの目安を下回った。

表7 外部精度管理試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	中央値 A ¹⁾ (%) ²⁾	NIQR B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	SD(P) D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
T-N	普通化成肥料	2006	158	14.60	0.13	0.9	0.39	0.32
	有機入り化成肥料	2007	145	8.74	0.07	0.8	0.25	0.26
	高度化成肥料	2010	132	14.11	0.11	0.8	0.38	0.29

- 1) ロバスト法により求めた中央値(正規分布において平均値と一致する)
- 2) 質量分率
- 3) ロバスト法により求めた標準化された四分位範囲(正規分布において標準偏差と一致する)
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = B/D$

表8 肥料認証標準物質の値付けのための共同試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	平均値 A ¹⁾ (%) ²⁾	SD _R B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	SD(P) D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
T-N	高度化成肥料	2008	14	14.76	0.09	0.6	0.38	0.25

- 1) 認証値
- 2) 質量分率
- 3) 室間再現標準偏差
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = B/D$

4. まとめ

窒素全量(T-N)のケルダール法の真度、定量・検出下限及び室間再現精度を調査したところ、次の結果を得た。

(1) 窒素全量(T-N)として 1 %～20 %含有する試料についてそれぞれの試験方法で測定したところ、設計値と測定値との差は試料(Nとして質量分率 1 %～5%)で質量分率-0.04 %～-0.03 %であり、窒素(N)含有量の多い試料(Nとして質量分率 10 %～20 %)では質量分率-0.15 %～-0.11 %であった。また、設計値に対する回収率は 97.1 %～100.6 %であった。

(2) 粉状試料(Nとして質量分率 0.2 %)及び液状試料(Nとして質量分率 0.02 %)を用いて定量下限及び検出下限を確認したところ、前者の試料で質量分率 0.09 %及び 0.04 %, また、後者の試料で質量分率 0.016 %及び 0.006 %程度と推定された。

(3) 外部精度管理試験及び肥料認証標準物質の値付けのための共同試験より室間再現精度を調査したところ、窒素全量(T-N)は、中央値又は平均値が質量分率 8.74 %～14.76 %の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.07 %～0.13 %, その相対標準偏差は 0.6 %～0.9 %であった。

(1)～(3)の成績は、肥料等試験法に記載された試験法が主要な成分としての窒素全量の含有量を評価することができる性能を有していると示しており、クライテリア・アプローチにおける試験法の性能規準の資料に適

用できると考えられた。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition, (2011)
<ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>
- 3) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法 (2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 4) 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)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 5) 肥料取締法施行令, 昭和 25 年 6 月 20 日, 政令第 198 号, 最終改正平成 18 年 3 月 23 日, 政令第 51 号 (2006)
- 6) 農林水産省告示: 肥料取締法施行令第一条の二の規定に基づき農林水産大臣の指定する有効石灰等を指定する件, 昭和 59 年 3 月 16 日, 農林水産省告示第 695 号, 最終改正平成 11 年 5 月 13 日, 農林水産省告示第 704 号 (1999)
- 7) 肥料取締法: 昭和 25 年 5 月 1 日, 法律第 127 号, 最終改正平成 23 年 8 月 30 日, 法律第 105 号 (2011)
- 8) 農林水産省告示: 特殊肥料の品質表示基準, 平成 12 年 8 月 31 日, 農林水産省告示第 1163 号, 最終改正平成 17 年 2 月 28 日, 農林水産省告示第 364 号 (2005)
- 9) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002)
- 10) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
<www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>
- 11) 農林水産省告示: 肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日, 農林水産省告示第 284 号, 最終改正平成 22 年 4 月 9 日, 農林省告示第 589 号 (2010)
- 12) 農林水産省令: 肥料取締法施行規則, 昭和 25 年 6 月 20 日, 農林水産省令第 64 号, 最終改正平成 20 年 2 月 29 日, 農林水産省令第 11 号 (2008)
- 13) 農林水産省告示: 肥料取締法第十七条第一項第三号の規定に基づき, 肥料取締法第四条第一項第三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, 最終改正平成 13 年 3 月 15 日, 農林水産省告示第 337 号 (2001)
- 14) ISO/IEC Guide 43-1 (1997): “Proficiency testing by interlaboratory comparisons—Part 1 : Development and operation of proficiency testing schemes” (JIS Q 0043-1 : 1998, 「試験所間比較による技能試験 第 1 部: 技能試験の開発及び運営」)
- 15) 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」)
- 16) 杉村 靖, 加藤公栄, 齊木雅一, 阿部文浩, 伊藤 潤, 内山 丈, 白井裕治, 引地典雄, 杉原 進: 2006 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, 1, 138~151 (2008)
- 17) 高橋雄一, 加藤公栄, 井塚進次郎, 清水 昭, 松崎 学, 井上智江, 内山 丈, 白井裕治, 杉原 進: 2007

- 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **1**, 152~167 (2008)
- 18) 高橋雄一, 廣井利明, 秋元里乃, 添田英雄, 高橋佐貴子, 相澤真理子, 加藤公栄, 義本将之, 白澤優子, 白井裕治, 柴田政人:2008 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **2**, 116~129 (2009)
- 19) 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 関根優子, 及川裕美, 添田英雄, 白井裕治, 柴田政人:2009 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **3**, 95~106 (2010)
- 20) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 福中理絵, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2010 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **4**, 85~106 (2011)

Verification of Performance Characteristics of Testing Method for Total Nitrogen Content in Fertilizer by Kjeldahl method

Kimie KATO¹, Masaki CHIDA¹ and Erina WATANABE¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

We verified performance characteristics of testing methods for total nitrogen (T-N) by Kjeldahl method described in Testing Methods for Fertilizers. The accuracy of testing methods for total nitrogen was assured from 3 replicate determinations of 5 fertilizer samples containing 1 % ~ 20 % total nitrogen which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 97.1 % to 103.6 %. On the basis of 10 replicate measurements of each testing method of a solid sample and a liquid sample, the limit of quantitative value (LOQ) was estimated at 0.09 % and 0.016 %, respectively. Reported in Research Report of Fertilizer, medians, normalize interquartile ranges (NIQR) and relative standard deviations (RSD_R) for reproducibility of total nitrogen obtained by proficiency testings were 8.74 % ~ 14.60 %, 0.07 % ~ 0.13 % and 0.8 % ~ 0.9 %, respectively. And mean values, standard deviations (RSD_R) for reproducibility and RSD_R of total nitrogen obtained by collaborative studies were 14.76 %, 0.09 % and 0.6 %, respectively. These results indicated that these methods performance characteristics were available in establishing criteria for a determination method of total nitrogen.

Key words criteria approach, total nitrogen, Kjeldahl method, Testing Methods for Fertilizers

(Research Report of Fertilizer, **5**, 156~166, 2012)

16 りん酸試験法の性能調査

— バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法 —

須永善行¹, 杉村靖¹, 吉田一郎², 小西範英¹

キーワード クライテリア・アプローチ, りん酸, バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法, 肥料等試験法

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中, 我が国においても ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2005)¹⁾の要求事項を参考にした試験成績の信頼性確保の考え方が重要視されている. 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. 一方, 品質の評価に用いる分析法を規格, 公定法等で指定するのではなく, 一定の規準 (criteria) を満たす分析法ならば, 適用可能としている. この考え方はクライテリア・アプローチ (Criteria Approach) と呼ばれており, 化学物質を客観的に測定する分析法の評価に適用できることがコーデックス委員会において合意されている. 食品を対象としているコーデックス分析法の性能規準に関する数値設定のためのガイドライン²⁾には適用範囲, 真度, 精度, 定量下限等が設定されている.

しかしながら, 肥料の試験法に要求される性能規準は, 食品とは異なるため, 新たに設定する必要がある. 近年, 新たに開発された方法についてはこれらの性能を調査して肥料等試験法³⁾に順次収載している. ただし, 肥料分析法 (1992 年版)⁴⁾の記載様式を書き替えた試験法には定量下限等が記載されていないため, それらの性能を調査する必要がある. このことから, 筆者らは肥料等試験法に収載されている試験法のうち, 主要な成分のりん酸 (P_2O_5) として規定^{5, 6)}されているりん酸全量 (T- P_2O_5), く溶性りん酸 (C- P_2O_5) 及び水溶性りん酸 (W- P_2O_5) の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真度, 定量下限等の性能を調査したので報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

流通している肥料原料の中にはりん酸が含まれているおそれがあることから, 試料の調製にあたっては表 1 のとおり出来る限り各肥料原料の主成分に対応する JIS 規格に規定されている試薬特級を用いた. これらの試薬は, 混合前に粉砕機を用いて粉砕した. また, りん酸全量及びく溶性りん酸のりん酸源であるりん酸二水素カルシウム一水和物については, 結晶が湿潤で粉砕が行えなかったことから, 65 °C で一晚乾燥した後に粉砕機を用いて粉砕した. 配合設計の作成に当たっては, りん酸二水素カルシウム及びりん酸二水素カリウムの純度を 99 % と仮定してりん酸の量が 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0.2 % 及び 0.02 % となるように表 2-1 から表 2-3 のとおり各試薬の量を決定し, これらの表に基づき粉砕した試薬を混合し, りん酸として約 0.2 % ~ 20 % 含有する試料を調製した. さらに, 試薬を水に溶かしてりん酸として約 0.02 % 含有する試料を調製した.

なお, 分析の結果, TP 20 % 及び CP 20 % の試料において混合操作に起因すると思われるバラツキが認められたこと, TP 0.02 % の試料の平均値が理論値と比較して高かったこと及び 65 °C で乾燥したりん酸二水素カル

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター (現) 名古屋センター

シウムの純度試験の結果が低かったことから、りん酸二水素カルシウム一水和物を 105 °C で一晩乾燥した後に粉砕機を用いて粉砕したものをを用いてこれらの試料の再分析を行った。

2) 装置及び器具

- (1) 分光光度計: 島津製作所 紫外可視分光光度計 UV-1800
- (2) 分解フラスコ: ケルダールフラスコ
- (3) ホットプレート: 松村電熱機器製作所 電熱器
- (4) 上下転倒式恒温回転振り混ぜ機: ADVANTEC 東洋 恒温回転振とう機 THM062FA

表1 試料の調製に使用した試薬

使用する試薬		対応する原材料名	
名称	規格	名称又は種類名(材料)	慣用名
尿素	JIS K8731 特級	尿素	尿素
硫酸アンモニウム	JIS K8960 特級	硫酸アンモニウム	硫安
塩化アンモニウム	JIS K8116 特級	塩化アンモニウム	塩安
りん酸二水素カルシウム一水和物	特級	重過りん酸石灰	重過石
りん酸二水素カリウム	JIS K9007 特級		
硫酸カリウム	JIS K8962 特級	硫酸加里	硫加
塩化カリウム	JIS K8121 特級	塩化加里	塩加
D(+)-グルコース	JIS K8824 特級	グルコース	
硫酸カルシウム二水和物	JIS K8963 特級	組成均一化促進材	石膏

表2-1 試験に用いた試料の配合割合(りん酸全量)

(質量分率:%)

使用する試薬	真度評価用試料					定量下限確認用試料	
	TP 20 %	TP 15 %	TP 10 %	TP 5 %	TP 1 %	TP 0.2 %	TP 0.02 %
尿素	25.0000		20.0000				
硫酸アンモニウム				25.0000	6.0000		
塩化アンモニウム		20.0000	30.0000			25.0000	10.0000
りん酸二水素カルシウム	35.8764	26.9073	17.9382	8.9691	1.7938	0.3588	0.0359
硫酸カリウム				10.0000	3.0000		
塩化カリウム		20.0000	10.0000			10.0000	4.0000
D (+) -グルコース	39.1236	33.0927	22.0618	56.0309	89.2062	64.6412	5.0000
水							80.9641
P ₂ O ₅ 含有量	20	15	10	5	1	0.2	0.02

表2-2 試験に用いた試料の配合割合(く溶性りん酸)

(質量分率:%)

使用する試薬	真度評価用試料					定量下限確認用試料	
	CP 20 %	CP 15 %	CP 10 %	CP 5 %	CP 1 %	CP 0.2 %	CP 0.02 %
硫酸アンモニウム	10.0000		40.0000		6.0000	70.0000	10.0000
塩化アンモニウム		30.0000		25.0000			
りん酸二水素カルシウム	35.8764	26.9073	17.9382	8.9691	1.7938	0.3588	0.0359
硫酸カリウム	10.0000		20.0000		2.0000	15.0000	
塩化カリウム		10.0000		10.0000		10.0000	4.0000
硫酸カルシウム二水和物	44.1236	33.0927	22.0618	56.0309	90.2062	4.6412	0.0000
水							85.9641
P ₂ O ₅ 含有量	20	15	10	5	1	0.2	0.02

表2-3 試験に用いた試料の配合割合(水溶性りん酸)

(質量分率:%)

使用する試薬	真度評価用試料					定量下限確認用試料	
	WP 20 %	WP 15 %	WP 10 %	WP 5 %	WP 1 %	WP 0.2 %	WP 0.02 %
硫酸アンモニウム	50.0000			35.0000	5.0000		15.0000
塩化アンモニウム		50.0000	40.0000			30.0000	
りん酸二水素カリウム	38.7383	29.0537	19.3691	9.6846	1.9369	0.3874	0.0387
硫酸カリウム	10.0000			4.0000	1.0000		5.0000
塩化カリウム		10.0000	10.0000			10.0000	
硫酸カルシウム二水和物	1.2617	10.9463	30.6309	51.3154	92.0631	59.6126	
水							79.9613
P ₂ O ₅ 含有量	20	15	10	5	1	0.2	0.02

3) 試薬の調製

(1) 水: 水精製装置 (ADVANTEC RDF240NA) を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 相当の水を使用した。

(2) りん酸標準液 (P₂O₅ 10 mg/mL): JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウムを 105 ± 2 °C で約 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、19.17 g をひょう量皿にはかりとる。少量の水で溶かし、全量フラスコ 1,000 mL に移し入れ、硝酸 2 mL ~ 3 mL を加え、標線まで水を加えた。

(3) りん酸標準液 (P₂O₅ 0.5 mg/mL): りん酸標準液 (P₂O₅ 10 mg/mL) 50 mL を全量フラスコ 1,000 mL にとり、硝酸 2 mL ~ 3 mL を加え、標線まで水を加えた。

(4) 発色試薬溶液 a: JIS K 8747 に規定するバナジン (V) 酸アンモニウム 1.12 g を水に溶かし、硝酸 250 mL を加えた後、JIS K 8905 に規定する七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 27 g を水に溶かして加え、更に水を加えて 1,000 mL とした。

(5) 発色試薬溶液 b: JIS K 8747 に規定するバナジン (V) 酸アンモニウム 1.12 g を水に溶かし、硝酸 150 mL を加えた後、JIS K 8905 に規定する七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 50 g を水に溶かして加え、更に水を加えて 1,000 mL とした。

(6) くえん酸溶液 (20 mg/mL): JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 20 g を水に溶かして 1,000 mL とした。

(7) その他の試薬: 肥料等試験法³⁾に従った。

4) 試験成分及び試験方法

りん酸全量、く溶性りん酸及び水溶性りん酸の抽出及び測定は表3のとおり肥料等試験法³⁾の各試験方法を用いた。なお、参考のため、各試験法のフローシート(図1~3)を示した。

表3 試験成分及び試験方法

試験成分	肥料等試験法の項目	試料溶液の調製方法
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	4.2.1.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法	(4.1.1) ケルダール分解
く溶性りん酸(C-P ₂ O ₅)	4.2.3.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法	(4.1) くえん酸溶液(20 mg/mL)回転振とう(30℃)
水溶性りん酸(W-P ₂ O ₅)	4.2.4.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法	(4.1) 水回転振とう

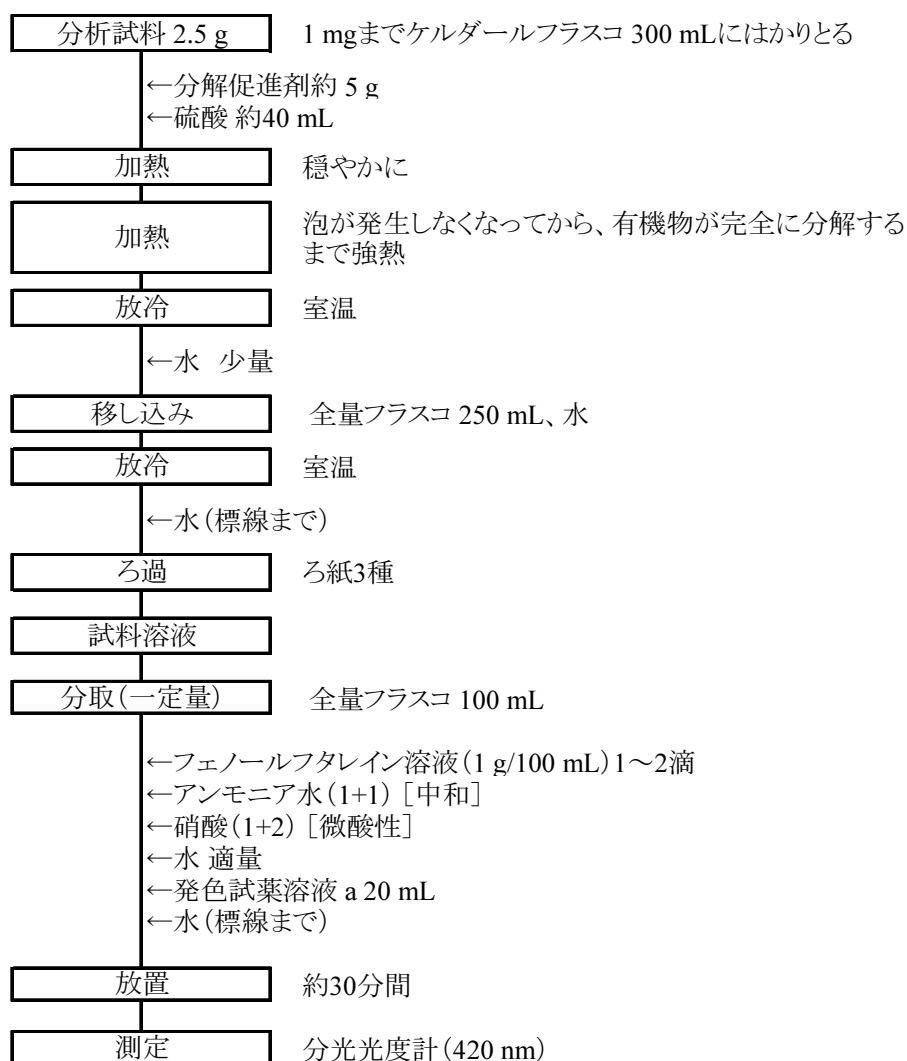


図1 肥料中のりん酸全量試験法フローシート

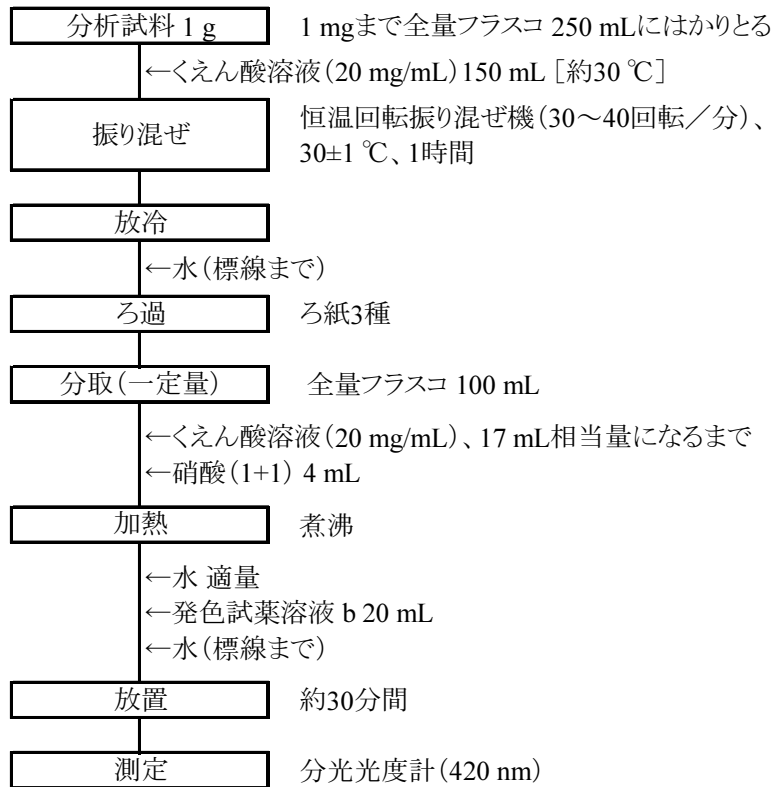


図2 肥料中のく溶性りん酸試験法フローシート

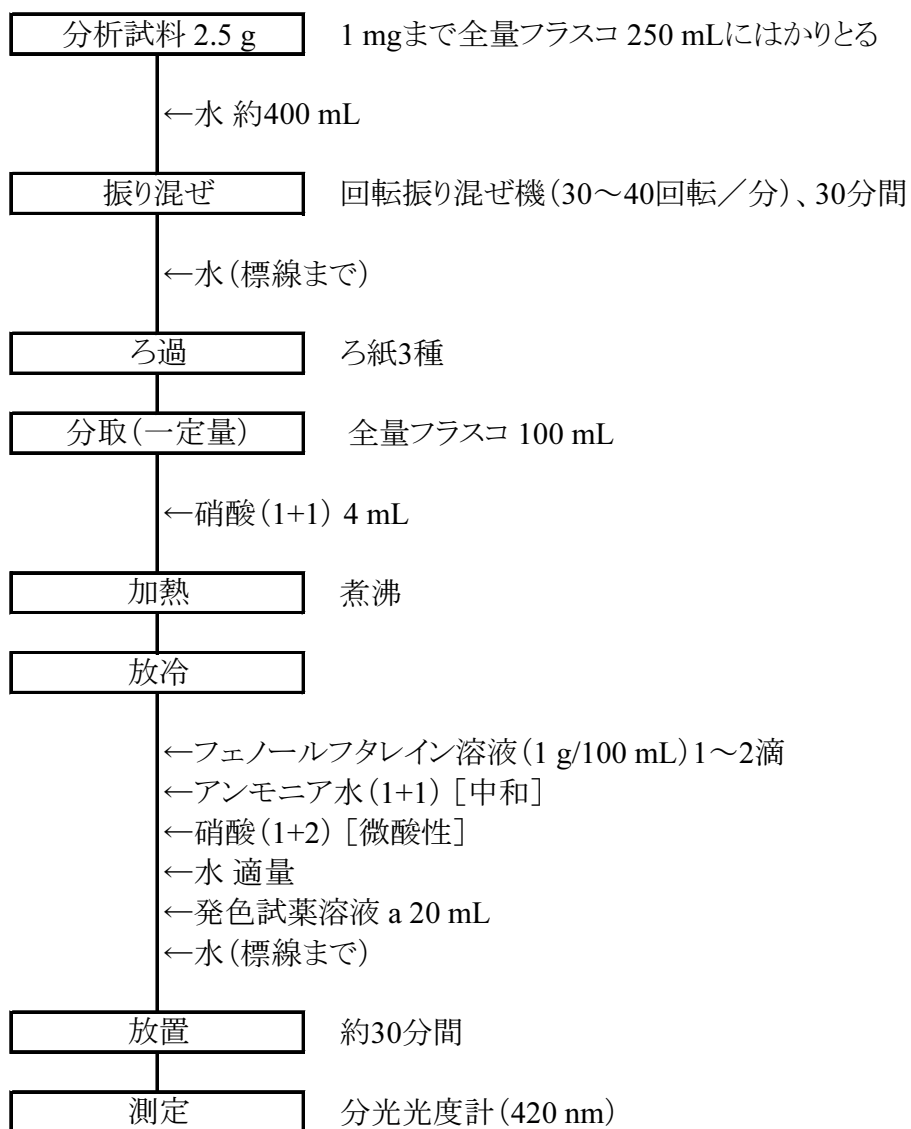


図3 肥料中の水溶性りん酸試験法フローシート

3. 結果及び考察

1) 試料の調製に用いたりん酸二水素カルシウム及びりん酸二水素カリウム中のりん酸の含有量

試料の調製に用いたりん酸二水素カルシウム及びりん酸二水素カリウム中のりん酸の含有量を肥料等試験法(りん酸全量及び水溶性りん酸)により3点併行で測定した結果を表4に示した。平均値より算出した純度は96.7%, 93.6%, 100.2%及び100.3%であり, その相対標準偏差は0.12%~0.32%と小さかったことから, これらの値を用いて試料に含まれるりん酸の理論値の算出を行った。

表4 試料の調製に用いたりん酸二水素カルシウム又はりん酸二水素カリウム中のりん酸の測定値

試料	理論値 ¹⁾ (%) ⁴⁾	平均値 ²⁾ (%) ⁴⁾	標準偏差 (%) ⁴⁾	純度 ³⁾ (%) ⁴⁾	相対標準偏差 (%)
りん酸二水素カルシウム一水和物	56.31	54.45	0.06	96.7	0.12
りん酸二水素カルシウム(無水)	60.65	56.79	0.09	93.6	0.16
りん酸二水素カルシウム(無水 再分析)	60.65	60.77	0.19	100.2	0.32
りん酸二水素カリウム	52.15	52.31	0.01	100.3	0.02

1) りん酸二水素カルシウム又はりん酸二水素カリウム中のりん酸(P₂O₅)理論値

2) りん酸全量(T-P₂O₅)又は水溶性りん酸(W-P₂O₅)の3点併行試験の平均値

3) (平均値/理論値)×100

4) 質量分率

2) 真度評価結果

肥料取締法⁷⁾においては、保証成分量(含有を保証する主成分の最小量)又は主要な成分の含有量を生産業者保証票又は輸入業者保証票(以下「保証票」という。)に記載することを普通肥料の生産業者又は輸入業者に義務づけている。また、同法においては、主要な成分の含有量を表示に記載することをたい肥等の生産業者又は輸入業者に義務付けている。さらに、特殊肥料の品質表示基準⁸⁾においては、表示値に対する許容誤差(表示値が3%以上の場合は表示値の±10%、表示値が3%未満の場合は±0.3%)を定めている。保証成分量又は主要な成分の含有量の評価を行うためには、含有する成分について正確な値を測定する必要がある。

そこで、表3に記載した試験法の真度を確認するため、真度評価用試料を用いて3点併行でりん酸全量、く溶性りん酸及び水溶性りん酸の試験を実施し、その成績を表5に示した。TP 20%及びCP 20%の試料に係る理論値はりん酸二水素カルシウム(無水 再分析)の純度試験の結果を、その他のりん酸全量及びく溶性りん酸の試料に係る理論値はりん酸二水素カルシウム(無水)の純度試験の結果を、水溶性りん酸の試料に係る理論値はりん酸二水素カリウムの純度試験の結果を用いてそれぞれ計算した。

各試料に含まれるりん酸の理論値と測定値の差及びその理論値に対する割合について算出したところ、りん酸含有量の少ない試料(1%及び5%)で質量分率-0.01%~0.19%及び-1.0%~5.7%であり、りん酸含有量の多い試料(10%、15%及び20%)では質量分率-0.75%~0.43%及び-3.4%~3.4%であった。このことから、表3に記載した試験法は、普通肥料のりん酸の保証成分量又は主要な成分の含有量の評価を得るに十分な正確さを有していることが確認された。

また、りん酸全量の理論値と測定値の差及び回収率について算出したところ、TP 20%、TP 15%、TP 10%、TP 5%及びTP 1%の回収率は99.4%~105.7%であり、TP 1%の理論値と測定値との差は、0.06%であった。このことから、表3に記載した試験法は、たい肥等のりん酸全量の表示値の評価を得るに十分な正確さを有していることが確認された。

なお、AOAC⁹⁾における濃度レベルにおける回収率の許容範囲は質量分率100%で98%~101%、質量分率10%で95%~102%及び質量分率1%で92%~105%であり、TP 1%を除き、りん酸全量(T-P₂O₅)のいずれの回収率もこれらの許容範囲内であった。

表5 試料中のりん酸(P₂O₅)の試験成績

(質量分率:%)

試験成分	試料	理論値	測定値	理論値との差	差の割合	回収率	標準偏差	相対標準偏差
		A ¹⁾ (%) ²⁾	B ³⁾ (%) ²⁾	C ⁴⁾ (%) ²⁾	D ⁵⁾ (%)	E ⁶⁾ (%)	F ⁷⁾ (%) ²⁾	G ⁸⁾ (%)
T- P ₂ O ₅	TP 20 %	21.80	21.83	0.03	0.1	100.1	0.02	0.1
	TP 15 %	15.28	15.32	0.04	0.2	100.2	0.02	0.1
	TP 10 %	10.19	10.13	-0.06	-0.6	99.4	0.06	0.5
	TP 5 %	5.09	5.15	0.05	1.0	101.0	0.04	0.8
	TP 1 %	1.02	1.08	0.06	5.7	105.7	0.02	1.4
C- P ₂ O ₅	CP 20 %	21.80	21.05	-0.75	-3.4	96.6	0.08	0.4
	CP 15 %	15.28	15.71	0.43	2.8	102.8	0.09	0.6
	CP 10 %	10.19	10.54	0.35	3.4	103.4	0.11	1.0
	CP 5 %	5.09	5.29	0.19	3.8	103.8	0.08	1.5
	CP 1 %	1.02	1.04	0.02	2.0	102.0	0.01	0.7
W- P ₂ O ₅	WP 20 %	20.26	20.50	0.23	1.2	101.2	0.04	0.2
	WP 15 %	15.20	15.32	0.12	0.8	100.8	0.12	0.8
	WP 10 %	10.13	10.18	0.05	0.5	100.5	0.11	1.1
	WP 5 %	5.07	5.15	0.09	1.7	101.7	0.05	1.0
	WP 1 %	1.01	1.00	-0.01	-1.0	99.0	0.01	1.2

1) 試料中のりん酸(P₂O₅)の含有量(理論値)

2) 質量分率

3) 3点併行試験の平均値

4) C=B-A

5) D=(C/A)×100

6) E=(B/A)×100

7) 3点併行試験の標準偏差

8) G=(F/B)×100

3) 検出下限及び定量下限

普通肥料の公定規格¹¹⁾においては、普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く。以下同じ。)の含有すべき主成分の最小量はりん酸として質量分率 1.0 %と、家庭園芸用複合肥料の含有すべき主成分の最小量はりん酸として質量分率 0.1 %と、肥料取締法施行規則¹²⁾においては、指定複合肥料(家庭園芸用肥料を除く。)の保証成分量の最小値はりん酸として質量分率 1.0 %と、指定複合肥料(家庭園芸用肥料に限る。)の保証成分量の最小値はりん酸として質量分率 0.1 %とそれぞれ規定されている。また、下水汚泥肥料等の主要な成分の指定¹³⁾及び特殊肥料の品質表示基準⁸⁾においては、りん酸全量の含有量が質量分率 0.5 %未満の場合は「0.5 %未満」と記載することができると規定されている。さらに、りん酸の保証成分量が質量分率 0.1 %～0.5 %として登録されている家庭園芸用複合肥料の多くが液状肥料である。

そこで、表3に記載した試験法の定量範囲を確認するため、定量下限確認用試料を用いて7点併行でりん酸全量、く溶性りん酸及び水溶性りん酸の試験を実施し、その成績を表6に示した。なお、定量下限は(標準偏差)×10式、また、検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)式を用いて算出した¹⁰⁾。CP 0.02 %の試料に係る理論値はりん酸二水素カルシウム一水和物の純度試験の結果を、TP 0.02 %の試料に係る理論値はりん酸二水素カル

シウム(無水 再分析)の純度試験の結果を, TP 0.2 %及び CP 0.2 %の試料に係る理論値はりん酸二水素カルシウム(無水)の純度試験の結果を, WP 0.2 %及び WP 0.02 %の試料に係る理論値はりん酸二水素カリウムの純度試験の結果を用いてそれぞれ計算した。

TP 0.2 %, CP 0.2 %及び WP 0.2 %の推定定量下限値は質量分率 0.03 %~0.04 %, 推定検出下限値は質量分率 0.01 %~0.02 %であることから, 表 3 に記載した試験法は, 公定規格における普通肥料, 指定配合肥料(家庭園芸用肥料を除く.), 汚泥肥料等及びたい肥等のりん酸の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していることが確認された。

また, TP 0.02 %, CP 0.02 %及び WP 0.02 %の推定定量下限値は質量分率 0.004 %~0.012 %, 推定検出下限値は質量分率 0.001 %~0.004 %であることから, 表 3 に記載した試験法は, 家庭園芸用複合肥料及び指定配合肥料(家庭園芸用肥料に限る.) のりん酸の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していることが確認された。

表6 定量下限確認試験の成績 (質量分率:%)

試験成分	試料	理論値 ¹⁾	平均値 ²⁾	標準偏差	推定定量下限値 ³⁾	推定検出下限値 ⁴⁾
T- P ₂ O ₅	TP 0.2 %	0.204	0.215	0.004	0.04	0.02
C- P ₂ O ₅	CP 0.2 %	0.204	0.204	0.003	0.03	0.01
W- P ₂ O ₅	WP 0.2 %	0.203	0.208	0.003	0.03	0.01
T- P ₂ O ₅	TP 0.02 %	0.0218	0.0314	0.0011	0.011	0.004
C- P ₂ O ₅	CP 0.02 %	0.0195	0.0190	0.0012	0.012	0.004
W- P ₂ O ₅	WP 0.02 %	0.0203	0.0209	0.0004	0.004	0.001

1) 試料中のりん酸(P₂O₅)の含有量(理論値)

2) 7点併行試験の平均値

3) 標準偏差×10

4) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4) 室間再現精度

クライテリア・アプローチにおける性能規準では室間再現精度が要求されるが, 試験法の妥当性確認のための共同試験の実施には大きな労力がかかる。このことから, 該当する試験法で実施された既報の外部精度管理試験¹⁴⁾及び認証標準物質の値付けのための共同試験¹⁵⁾の成績^{16~21)}を適用することとし, それらの成績を表 7 及び表 8 に示した。なお, 外部精度管理試験では, ロバスト法を用いて報告値の中央値及び標準化された四分位範囲(NIQR)が算出されている。中央値及び NIQR は正規分布において平均値及び標準偏差に一致する。

く溶性りん酸(C-P₂O₅)及び水溶性りん酸(W-P₂O₅)の中央値又は平均値が質量分率 4.57 %~15.82 %の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.07 %~0.52 %, その相対標準偏差は 0.8 %~4.5 %であった。また, く溶性りん酸(C-P₂O₅)及び水溶性りん酸(W-P₂O₅)の試験成績の HorRat 値は 0.28~1.63 であった。

なお, AOAC(OMA)⁹⁾における濃度レベルにおける室間再現精度の目安は質量分率 100 %で 2 %, 質量分率 10 %で 3 %, 質量分率 1 %で 4 %及び質量分率 0.1 %で 6 %であり, く溶性りん酸(C-P₂O₅)及び水溶性りん酸(W-P₂O₅)の室間再現標準偏差はこれらの目安をほぼ下回った。

表7 外部精度管理試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	中央値 A ¹⁾ (%) ²⁾	NIQR B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	SD(P) D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
C-P ₂ O ₅	高度化成肥料	2008	144	15.82	0.13	0.8	0.40	0.32
	高度化成肥料	2010	140	14.59	0.18	1.2	0.38	0.47
W-P ₂ O ₅	高度化成肥料	2008	146	9.16	0.24	2.7	0.26	0.93
	普通化成肥料	2009	142	4.57	0.08	1.7	0.15	0.55
	高度化成肥料	2010	143	11.56	0.52	4.5	0.32	1.63
	高度化成肥料	2011	132	14.51	0.19	1.3	0.39	0.50

- 1) ロバスト法により求めた中央値(正規分布において平均値と一致する)
- 2) 質量分率
- 3) ロバスト法により求めた標準化された四分位範囲(正規分布において標準偏差と一致する)
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = C/D$

表8 肥料認証標準物質の値付けのための共同試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	平均値 A ¹⁾ (%) ²⁾	SD _R B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	SD(P) D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
C-P ₂ O ₅	高度化成肥料	2008	13	10.15	0.08	0.8	0.29	0.28
	高度化成肥料	2010	11	10.05	0.13	1.3	0.28	0.46
W-P ₂ O ₅	普通化成肥料	2008	15	6.96	0.11	1.6	0.21	0.53
	普通化成肥料	2010	9	7.00	0.07	1.0	0.21	0.32

- 1) 認証値
- 2) 質量分率
- 3) 室間再現標準偏差
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = C/D$

4. まとめ

りん酸全量、く溶性りん酸及び水溶性りん酸について、バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法の真度、定量・検出下限及び室間再現精度を調査したところ、次の結果を得た。

(1) りん酸として質量分率約 1 %～20 %含有する試料についてそれぞれの試験方法で測定したところ、理論値と測定値との差は試料(1 %及び 5 %)で質量分率-0.01 %～0.19 %であり、りん酸含有量の多い試料(10 %, 15 %及び 20 %)では質量分率-0.75 %～0.43 %であった。また、理論値に対する回収率は 96.6 %～105.7 %であった。

(2) 粉状試料(P₂O₅ 0.2 %)及び液状試料(P₂O₅ 0.02 %)を用いて定量下限及び検出下限を確認したところ、前者の試料で質量分率 0.03 %～0.04 %及び質量分率 0.01 %～0.02 %, 後者の試料で質量分率 0.004 %～0.012 %及び質量分率 0.001 %～0.004 %程度と推定された。

(3) 外部精度管理試験及び肥料認証標準物質の値付けのための共同試験より室間再現精度を調査したところ、く溶性りん酸(C-P₂O₅)及び水溶性りん酸(W-P₂O₅)は、中央値又は平均値が質量分率 4.57 %～15.82 %

の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.07 %～0.52 %，その相対標準偏差は 0.8 %～4.5 %であった。

(1)～(3)の成績は、肥料等試験法に記載された試験法が主要な成分としてのりん酸の含有量を評価することができる性能を有しているとしており、クライテリア・アプローチにおける試験法の性能規準の資料に適用できると考えられた。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition, (2011)
<ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>
- 3) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC) : 肥料等試験法 (2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 4) 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)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 5) 肥料取締法施行令, 昭和 25 年 6 月 20 日, 政令第 198 号, 最終改正平成 18 年 3 月 23 日, 政令第 51 号 (2006)
- 6) 農林水産省告示: 肥料取締法施行令第一条の二の規定に基づき農林水産大臣の指定する有効石灰等を指定する件, 昭和 59 年 3 月 16 日, 農林水産省告示第 695 号, 最終改正平成 11 年 5 月 13 日, 農林水産省告示第 704 号 (1999)
- 7) 肥料取締法: 昭和 25 年 5 月 1 日, 法律第 127 号, 最終改正平成 23 年 8 月 30 日, 法律第 105 号 (2011)
- 8) 農林水産省告示: 特殊肥料の品質表示基準, 平成 12 年 8 月 31 日, 農林水産省告示第 1163 号, 最終改正平成 17 年 2 月 28 日, 農林水産省告示第 364 号 (2005)
- 9) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002)
- 10) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
<www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>
- 11) 農林水産省告示: 肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日, 農林水産省告示第 284 号, 最終改正平成 22 年 4 月 9 日, 農林省告示第 589 号 (2010)
- 12) 農林水産省令: 肥料取締法施行規則, 昭和 25 年 6 月 20 日, 農林水産省令第 64 号, 最終改正平成 20 年 2 月 29 日, 農林水産省令第 11 号 (2008)
- 13) 農林水産省告示: 肥料取締法第十七条第一項第三号の規定に基づき, 肥料取締法第四条第一項第三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, 最終改正平成 13 年 3 月 15 日, 農林水産省告示第 337 号 (2001)
- 14) ISO/IEC Guide 43-1 (1997): “Proficiency testing by interlaboratory comparisons—Part 1 : Development and operation of proficiency testing schemes” (JIS Q 0043-1 : 1998, 「試験所間比較による技能試験 第 1 部: 技能試験の開発及び運営」)
- 15) 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」)

- 16) 高橋雄一, 白澤優子, 井塚進次郎, 清水 昭, 井上智江, 内山 丈, 白井裕治, 上沢正志:2008 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **2**, 97~115 (2009)
- 17) 高橋雄一, 廣井利明, 秋元里乃, 添田英雄, 高橋佐貴子, 相澤真理子, 加藤公栄, 義本将之, 白澤優子, 白井裕治, 柴田政人:2008 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **2**, 116~129 (2009)
- 18) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 井上智江, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2009 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **3**, 73~94 (2010)
- 19) 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 関根優子, 及川裕美, 添田英雄, 白井裕治, 柴田政人:2009 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **3**, 95~106 (2010)
- 20) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 福中理絵, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2010 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **4**, 85~106 (2011)
- 21) 高橋佐貴子, 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 山西正将, 秋元里乃, 白井裕治, 柴田政人:2010 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **4**, 107~106 (2011)

Verification of Performance Characteristics of Testing Methods for Phosphorus Content in Fertilizer by Ammonium Vanadomolybdate Absorption Photometry

Yoshiyuki SUNAGA¹, Yasushi SUGIMURA¹, Ichiro YOSHIDA² and Hidenori KONISHI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

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

We investigated the performance (trueness, limit of quantitation, limit of detection, reproducibility) of ammonium vanadomolybdate absorption photometry which is analytical method of water-soluble phosphoric acid, citric acid soluble phosphoric acid, total amount of phosphoric acid. This method is included in the Testing Method for Fertilizers. The difference between the theoretical value and measured value of the content of phosphate are -0.01 %~0.19 % at samples which contain 1 % and 5 % phosphate, -0.75 %~0.43 % at samples which contain 10 %, 15 % and 20 % phosphate. The recovery rate of these samples are 96.6~105.7 %. The limit of quantitation are estimated to 0.03 %~0.04% at powdered sample which contain 0.2 % phosphate, 0.004 %~0.012 % at liquid sample which contain 0.02 % phosphate. The limit of detection are estimated to 0.01 %~0.02 % at powdered sample which contain 0.2 % phosphate, 0.001 %~0.004 % at liquid sample which contain 0.02 % phosphate. Concerning the inter-laboratory reproducibility about citric acid soluble phosphoric acid and water-soluble phosphoric acid, we investigated the inter-laboratory reproducibility from the external quality control test and the collaborative test for a reference material for fertilizer authentication in the past, the median or the mean value are 4.57 %~15.82 %, and its normalized interquartile range or standard deviation of reproducibility are 0.07 %~0.52 %, and its relative standard deviation are 0.8 %~4.5 %. These results indicated that this method has a sufficient performance to evaluate the content of phosphate in fertilizer, and these results can use as data for setting the performance criteria for analytical methods.

Key words criteria approach, investigation of the performance criteria, analytical method for determination of phosphate, ammonium vanadomolybdate absorption photometry

(Research Report of Fertilizer, **5**, 167~179, 2012)

17 可溶性りん酸試験法の性能調査

—バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法—

清水 昭¹, 阿部 進²

キーワード クライテリア・アプローチ, りん酸, バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法, 肥料等試験法

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中, 我が国においても ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2005)¹⁾の要求事項を参考にした試験成績の信頼性確保の考え方が重要視されている. 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. 一方, 品質の評価に用いる分析法を規格, 公定法等で指定するのではなく, 一定の規準 (criteria) を満たす分析法ならば, 適用可能としている. この考え方はクライテリア・アプローチ (Criteria Approach) と呼ばれており, 化学物質を客観的に測定する分析法の評価に適用できることがコーデックス委員会において合意されている. 食品を対象としているコーデックス分析法の性能規準に関する数値設定のためのガイドライン²⁾には適用範囲, 真度, 精度, 定量下限等が設定されている.

しかしながら, 肥料の試験法に要求される性能規準は, 食品とは異なるため, 新たに設定する必要がある. 近年, 新たに開発された方法についてはこれらの性能を調査して肥料等試験法³⁾に順次収載している. ただし, 肥料分析法 (1992 年版)⁴⁾の記載様式を書き替えた試験法には定量下限等が記載されていないため, それらの性能を調査する必要がある. このことから, 筆者らは肥料等試験法に収載されている試験法のうち, 主要な成分のりん酸 (P_2O_5) として規定^{5, 6)}されているうち, 可溶性りん酸 (S- P_2O_5) のバナドモリブデン酸アンモニウム法の精確さ等の性能を調査したので報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

流通している肥料原料の中にはりん酸が含まれているおそれがあることから, 試料の調製にあたっては表 1 のとおり出来る限り各肥料原料の主成分に対応する JIS 規格に規定されている試薬特級を用いた. なお, 使用した試薬のうちりん酸二水素カルシウム一水和物は JIS 規格に規定されている試薬がなかったため, JIS 規格に規定されていない試薬特級を用いた. 流通している肥料の配合割合を参考に表 2 のとおり試薬を混合し, りん酸 (P_2O_5) として 0.02 % ~ 20 % (表示値 90 % を用いた) 含有する試料を調製した.

2) 装置及び器具

- (1) 紫外可視吸光光度計: 島津製作所 UVmini-1240
- (2) ウォーターバス: (ヤマト科学 BM 200, アズワン KS-1)

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

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター (現仙台センター)

表1 試料の調製に使用する試薬

使用する試薬		対応する原材料名	
名称	規格	名称又は種類名(材料)	慣用名
硫酸アンモニウム	JIS K8960 特級	硫酸アンモニア	硫安
硝酸ナトリウム	JIS K8562 特級	硝酸ソーダ	硝酸ソーダ
尿素	JIS K8731 特級	尿素	尿素
りん酸水素カルシウム一水和物	特級	重過りん酸石灰	重過石
硫酸カリウム	JIS K8962 特級	硫酸加里	硫加
塩化カリウム	JIS K8121 特級	塩化加里	塩加
エチレンジアミン四酢酸二水素 二ナトリウム二水和物	JIS K8107 特級	組成均一化促進材	EDTA-Na

表2 試験に用いた試料の配合割合

(質量分率:%)

使用する試薬						定量下限確認用試料	
	P ₂ O ₅ -20	P ₂ O ₅ -15	P ₂ O ₅ -10	P ₂ O ₅ -5	P ₂ O ₅ -1	P ₂ O ₅ -0.2	P ₂ O ₅ -0.02
硫酸アンモニウム	5.51	20	20	20	25	20	20
硝酸ナトリウム		5		5			
尿素	25	10	25	15	25	20	20
りん酸水素カルシウム一水和物	39.46	29.6	19.73	9.87	1.97	0.39	0.04
硫酸カリウム	10	15		5	15	15	15
塩化カリウム	10	10	25	25	5	15	15
EDTA-Na ¹⁾	10.03	10.4	10.27	20.13	28.03	29.61	29.96
P ₂ O ₅ 含有量(表示90%)	20	15	10	5	1	0.2	0.02
P ₂ O ₅ 含有量(純度98.9%)	22	16.5	11	5.5	1.1	0.2	0.02

1) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物

3) 試薬の調製

(1) 水: 水精製装置(Merck Millipore Elix Advantage5)を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 相当の水を使用した。

(2) アンモニア水: JIS K 8085 に規定する特級(NH₃ 28%)を使用した。

(3) ペーテルマンくえん酸溶液: JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 173 g を水に溶かして、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放冷した後、1 mL 当たりの窒素量が 42 mg になるように調製した。

(4) 発色試薬溶液: JIS K 8747 に規定するバナジン(V)酸アンモニウム 1.12 g を水に溶かし、硝酸 150 mL を加えた後、JIS K 8905 に規定する七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 50 g を水に溶かして加え、更に水を加えて 1,000 mL とした。

(5) りん酸標準液(P₂O₅ 10 mg/mL): JIS K9007 に規定するりん酸二水素カリウムを 105±2 °C で約 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、19.17 g をひょう量皿にはかりとる。少量の水で溶かし、全量フラスコ 1,000 mL に移し入れ、硝酸 2 mL~3 mL を加え、標線まで水を加えた。

(6) りん酸標準液(P₂O₅ 0.5 mg/mL): りん酸標準液(P₂O₅ 10 mg/mL) 50 mL を全量フラスコ 1,000 mL にとり、硝酸 2 mL~3 mL を加え、標線まで水を加えた。

(7) 検量線用りん酸標準液: りん酸標準液(P₂O₅ 0.5 mg/mL) を全量フラスコ 100 mL に段階的にとり、ペー

テルマンくえん酸溶液 2 mL, 硝酸(1+1) 4mL を加え加熱し煮沸した. 放冷後発色試薬溶液 20 mL を加え, 標線まで水を加えて検量線用りん酸標準液 (P_2O_5 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$) を調製した.

- (8) 別の全量フラスコ 100 mL に(7)と同様に操作を行い, 検量線用空試験液を調製した.
- (9) その他の試薬: 肥料等試験法³⁾に従った.

4) 試験成分及び試験方法

可溶性りん酸(S- P_2O_5)の抽出及び測定は表3のとおり肥料等試験法³⁾の試験方法を用いた. なお, 参考のため, 試験法のフローシート(図 1)を示した.

表3 試験成分及び試験方法

試験成分	肥料等試験法の項目	試料溶液の調製方法
可溶性りん酸(S- P_2O_5)	4.2.2.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法	(4.1) 水抽出後ペーテルマンくえん酸溶液加温(65℃)

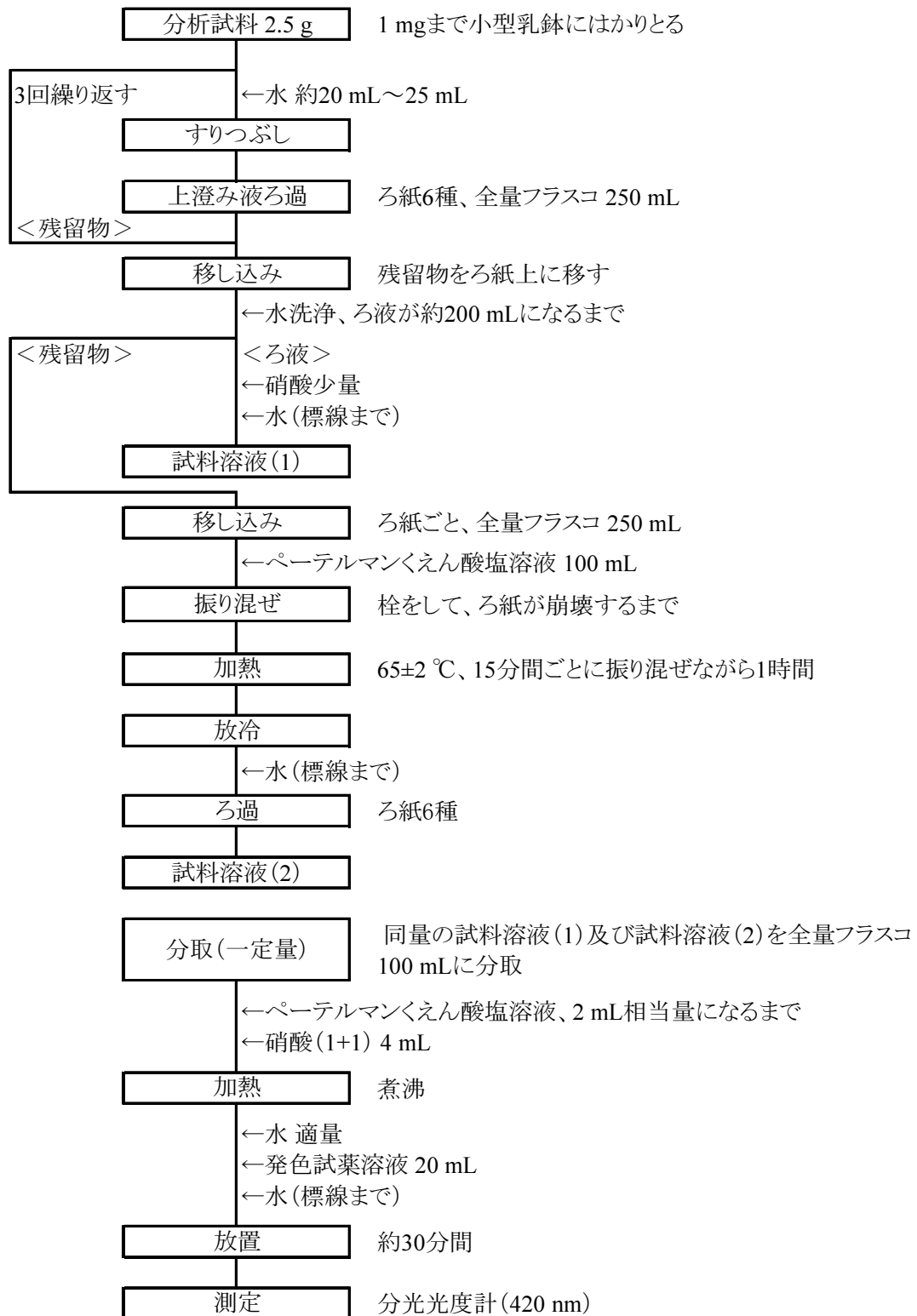


図1 肥料中の可溶性りん酸試験法フローシート

3. 結果及び考察

1) 試料の調製に用いたりん酸水素カルシウム一水和物中のりん酸の含有量

試料の調製に用いたりん酸水素カルシウム一水和物中のりん酸の含有量を肥料等試験法(可溶性りん酸)により3点併行で測定した結果を表4に示した. 平均値より算出した純度は98.9%と試薬の表示値(min. 90%)を満たしており, その相対標準偏差は0.2%と小さかった. 試料の調製では表示値90%を基に配合設計を行ったが, りん酸の含有量は算出した純度98.9%を用いることとした.

表4 試料の調製に用いた りん酸水素カルシウム一水和物中のりん酸の測定値

試料	理論値 ¹⁾ (%) ⁴⁾	平均値 ²⁾ (%) ⁴⁾	標準偏差 (%) ⁴⁾	純度 ³⁾ (%) ⁴⁾	相対標準偏差 (%)
りん酸水素カルシウム一水和物	56.31	55.70	0.10	98.9	0.2

1) りん酸水素カルシウム一水和物中のりん酸(P₂O₅)理論値

2) 可溶性りん酸(S-P₂O₅)の3点併行試験の平均値

3) (平均値/理論値)×100

4) 質量分率

2) 真度評価結果

真度評価用試料を用いて3点併行で可溶性りん酸(S-P₂O₅)の試験を実施した成績を表5に示した.

肥料取締法⁷⁾において, 保証成分量(含有する主成分の最小量)を生産業者保証票又は輸入業者保証票(以下,「保証票」という)に記載することを普通肥料(汚泥肥料等を除く)の生産又は輸入した業者(以下,「生産業者等」という)に義務づけている. よって, 可溶性りん酸(S-P₂O₅)の設計値と試験法の測定値の差について算出した. 可溶性りん酸(S-P₂O₅)の設計値と測定値との差及びその設計値に対する割合は, 可溶性りん酸(S-P₂O₅)含有量の少ない試料(P₂O₅-5及びP₂O₅-1)で質量分率-0.02%~0.02%及び質量分率-1.4%~0.3%であり, 可溶性りん酸(S-P₂O₅)含有量の多い試料(P₂O₅-20, P₂O₅-15及びP₂O₅-10)では質量分率-0.09%~0.13%及び質量分率-0.6%~0.6%であった. このことから, これらの試験法は, 普通肥料(指定配合肥料を含む)の可溶性りん酸(S-P₂O₅)の保証成分量の評価を得るに十分な正確さを有していることが確認された.

表5 試料中のりん酸(P₂O₅)の試験成績

試験成分	試料	設計値	測定値	設計値との差	差の割合	回収率	標準偏差	相対標準偏差
		A ¹⁾ (%) ²⁾	B ³⁾ (%) ²⁾	C ⁴⁾ (%) ²⁾	D ⁵⁾ (%)	E ⁶⁾ (%)	F ⁷⁾ (%) ²⁾	G ⁸⁾ (%)
S-P ₂ O ₅	P ₂ O ₅ -20	22	22.13	0.13	0.6	100.6	0.22	1.0
	P ₂ O ₅ -15	16.5	16.41	-0.09	-0.6	99.4	0.14	0.9
	P ₂ O ₅ -10	11	11.00	0.00	0.0	100.0	0.22	2.0
	P ₂ O ₅ -5	5.5	5.52	0.02	0.3	100.3	0.12	2.3
	P ₂ O ₅ -1	1.1	1.08	-0.02	-1.4	98.6	0.04	3.2

1) 試料中のりん酸(P₂O₅)の含有量(設計値)

2) 質量分率

3) 3点併行試験の平均値

4) C=B-A

5) D=(C/A)×100

6) E=(B/A)×100

7) 3点併行試験の標準偏差

8) G=(F/B)×100

3) 検出下限及び定量下限

定量下限確認用試料を用いて7点併行で可溶性りん酸(S-P₂O₅)の試験を実施した結果を表6に示した。

なお、定量下限は(標準偏差)×10式、また、検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)式を用いて算出した⁸⁾。

普通肥料の公定規格⁹⁾において普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く)のりん酸(P₂O₅)の含有すべき主成分の最小量並びに肥料取締法施行規則¹⁰⁾において指定複合肥料(家庭園芸用肥料を除く)のりん酸(P₂O₅)の保証できる最小量は質量分率1.0%と規定されている。このことから、これらの試験法は、公定規格における普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く)、指定複合肥料(家庭園芸用肥料を除く)の可溶性りん酸(S-P₂O₅)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していたことが確認された。

また、普通肥料の公定規格において家庭園芸用複合肥料のりん酸(P₂O₅)の含有すべき主成分の最小量並びに肥料取締法施行規則において指定複合肥料の家庭園芸用肥料のりん酸(P₂O₅)の保証できる最小量は質量分率0.1%と規定されている。このことから、これらの試験法は、公定規格における家庭園芸用複合肥料、指定複合肥料(家庭園芸用肥料に限る)の可溶性りん酸(S-P₂O₅)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していることが確認された。

表6 定量下限確認試験の成績

(質量分率:%)

試験成分	試料	設計値 ¹⁾	平均値 ²⁾	標準偏差	推定定量 下限値 ³⁾	推定検出 下限値 ⁴⁾
S-P ₂ O ₅	P ₂ O ₅ -0.2	0.2	0.209	0.024	0.24	0.09
	P ₂ O ₅ -0.02	0.02	0.0166	0.0079	0.079	0.031

1) 試料中の加里(K₂O)の含有量(設計値)

2) 7点併行試験の平均値

3) 標準偏差×10

4) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4) 室間再現精度

クライテリア・アプローチにおける性能規準では室間再現精度が要求されるが、試験法の妥当性確認のための共同試験の実施には大きな労力がかかる。このことから、該当する試験法で実施された既報の外部精度管理試験¹⁴⁾及び認証標準物質の値付けのための共同試験¹⁵⁾の成績^{16~21)}を適用することとし、それらの成績を表7及び表8に示した。なお、外部精度管理試験では、ロバスト法を用いて報告値の中央値及び標準化された四分位範囲(NIQR)が算出されている。中央値及びNIQRは正規分布において平均値及び標準偏差に一致する。

可溶性りん酸(S-P₂O₅)の中央値又は平均値質量分率 6.37 %~17.44 %の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.06 %~0.23 %、その相対標準偏差は 0.8 %~1.9 %であった。また、可溶性りん酸(S-P₂O₅)の試験成績の HorRat 値は 0.26~0.63 であった。

なお、AOAC(OMA)⁹⁾における濃度レベルにおける室間再現精度の目安は質量分率 100 %で 2 %、質量分率 10 %で 3 %、質量分率 1 %で 4 %及び質量分率 0.1 %で 6 %であり、可溶性りん酸(S-P₂O₅)の室間再現標準偏差はこれらの目安を下回った。

表7 外部精度管理試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	中央値 A ¹⁾ (%) ²⁾	NIQR B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	SD(P) D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
S-P ₂ O ₅	普通化成肥料	2009	124	6.37	0.12	1.9	0.19	0.63
	高度化成肥料	2011	114	17.44	0.23	1.3	0.42	0.56

- 1) ロバスト法により求めた中央値(正規分布において平均値と一致する)
- 2) 質量分率
- 3) ロバスト法により求めた標準化された四分位範囲(正規分布において標準偏差と一致する)
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = B/D$

表8 肥料認証標準物質の値付けのための共同試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	平均値 A ¹⁾ (%) ²⁾	SD _R B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	SD(P) D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
S-P ₂ O ₅	普通化成肥料	2008	13	8.15	0.07	0.8	0.24	0.28
	普通化成肥料	2010	10	8.10	0.06	0.8	0.24	0.26

- 1) 認証値
- 2) 質量分率
- 3) 室間再現標準偏差
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = B/D$

4. まとめ

可溶性りん酸(S-P₂O₅)のバナドモリブデン酸アンモニウム法の真度及び定量・検出下限を調査したところ、次の結果を得た。

(1) 可溶性りん酸(S-P₂O₅)として質量分率1%~20%含有する試料について測定したところ、設計値と測定値との差はりん酸(P₂O₅)含有量の少ない試料(P₂O₅ 5%及び1%)で質量分率-0.02%~0.02%であり、りん酸(P₂O₅)含有量の多い試料(P₂O₅ 20%, 15%及び10%)では質量分率-0.09%~0.13%であった。また、設計値に対する回収率は98.6%~100.6%であった。

(2) りん酸(P₂O₅)含有量(P₂O₅ 0.2%及び0.02%)を用いて定量下限及び検出下限を確認したところ、質量分率0.24%, 0.079%及び質量分率0.09%, 0.031%程度と推定された。

(3) 外部精度管理試験及び肥料認証標準物質の値付けのための共同試験より室間再現精度を調査したところ、可溶性りん酸(S-P₂O₅)は、中央値又は平均値が質量分率6.37%~17.44%の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率0.06%~0.23%, その相対標準偏差は0.8%~1.9%であった。

(1)~(3)の成績は、肥料等試験法に記載された試験法が主要な成分としての可溶性りん酸(S-P₂O₅)の含有量を評価することができる性能を有していると示しており、クライテリア・アプローチにおける試験法の性能規準の資料に適用できると考えられた。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition, (2011)
<ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>
- 3) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法 (2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 4) 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)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 5) 肥料取締法施行令, 昭和25年6月20日, 政令第198号, 最終改正平成18年3月23日, 政令第51号 (2006)
- 6) 農林水産省告示: 肥料取締法施行令第一条の二の規定に基づき農林水産大臣の指定する有効石灰等を指定する件, 昭和59年3月16日, 農林水産省告示第695号, 最終改正平成11年5月13日, 農林水産省告示第704号 (1999)
- 7) 肥料取締法: 昭和25年5月1日, 法律第127号, 最終改正平成23年8月30日, 法律第105号 (2011)
- 8) 農林水産省告示: 特殊肥料の品質表示基準, 平成12年8月31日, 農林水産省告示第1163号, 最終改正平成17年2月28日, 農林水産省告示第364号 (2005)
- 9) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002)
- 10) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
<www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>
- 11) 農林水産省告示: 肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和61年2月22日, 農林水産省告示第284号, 最終改正平成22年4月9日, 農林省告示第589号 (2010)
- 12) 農林水産省令: 肥料取締法施行規則, 昭和25年6月20日, 農林水産省令第64号, 最終改正平成20年2月29日, 農林水産省令第11号 (2008)

- 13) 農林水産省告示:肥料取締法第十七条第一項第三号の規定に基づき, 肥料取締法第四条第一項第三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, 最終改正平成13年3月15日, 農林水産省告示第337号 (2001)
- 14) ISO/IEC Guide 43-1 (1997): “Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1 : Development and operation of proficiency testing schemes” (JIS Q 0043-1 : 1998, 「試験所間比較による技能試験 第1部:技能試験の開発及び運営」)
- 15) 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」)
- 16) 高橋雄一, 白澤優子, 井塚進次郎, 清水 昭, 井上智江, 内山 丈, 白井裕治, 上沢正志:2008年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **2**, 97~115 (2009)
- 17) 高橋雄一, 廣井利明, 秋元里乃, 添田英雄, 高橋佐貴子, 相澤真理子, 加藤公栄, 義本将之, 白澤優子, 白井裕治, 柴田政人:2008年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **2**, 116~129 (2009)
- 18) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 井上智江, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2009年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **3**, 73~94 (2010)
- 19) 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 関根優子, 及川裕美, 添田英雄, 白井裕治, 柴田政人:2009年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **3**, 95~106 (2010)
- 20) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 福中理絵, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2010年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **4**, 85~106 (2011)
- 21) 高橋佐貴子, 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 山西正将, 秋元里乃, 白井裕治, 柴田政人:2010年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **4**, 107~106 (2011)

Verification of Performance Characteristics of Testing Method for Citrate-Soluble Phosphorus Content by Ammonium Vanadomolybdate Absorption Photometry

Akira SHIMIZU¹ and Shin ABE²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

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

We verified performance characteristics of testing method for citrate-soluble phosphorus (S-P₂O₅) by ammonium vanadomolybdate absorption photometry described in Testing Method for Fertilizers. The accuracy testing method for the citrate-soluble phosphorus was assured from 3 replicate determinations of 5 fertilizer samples containing 1 % ~ 20 % phosphorus (as P₂O₅) which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 98.6 % ~ 100.6 %. On the basis of 10 replicate measurements of each testing method of a solid sample, the limit of quantitative value (LOQ) was estimated at 0.079 % and 0.24 %, respectively. Reported in Research Report of Fertilizer, medians, normalize ranges (NIQR) and relative standard deviations (RSD_R) for reproducibility of S-P₂O₅ obtained by proficiency testings were 6.37 % ~ 17.44 %, 0.06 % ~ 0.23 % and 0.8 % ~ 1.9 %, respectively. And mean values, standard deviations(RSD_R) for reproducibility and RSD_R of S-P₂O₅ obtained by collaborative studies were 8.10 % ~ 8.15 %, 0.06 % ~ 0.07 % and 0.8 %, respectively. These results indicated that the method performance characteristic was available in establishing criteria for a determination method of citrate-soluble phosphorus.

Key words criteria approach, phosphorus, ammonium vanadomolybdate method, Testing Methods of Fertilizers

(Reserch Report of Fertilizer, **5**, 180~189, 2012)

18 加里試験法の性能調査

—原子吸光光度法—

木村康晴¹, 顯谷久典²

キーワード クライテリア・アプローチ, 加里, 原子吸光光度計法, 肥料等試験法

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中, 我が国においても ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2005)¹⁾の要求事項を参考にした試験成績の信頼性確保の考え方が重要視されている. 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. 一方, 品質の評価に用いる分析法を規格, 公定法等で指定するのではなく, 一定の規準(criteria)を満たす分析法ならば, 適用可能としている. この考え方はクライテリア・アプローチ(Criteria Approach)と呼ばれており, 化学物質を客観的に測定する分析法の評価に適用できることがコーデックス委員会において合意されている. 食品を対象としているコーデックス分析法の性能規準に関する数値設定のためのガイドライン²⁾には適用範囲, 真度, 精度, 定量下限等が設定されている.

しかしながら, 肥料の試験法に要求される性能規準は, 食品とは異なるため, 新たに設定する必要がある. 近年, 新たに開発された方法についてはこれらの性能を調査して肥料等試験法³⁾に順次収載している. ただし, 肥料分析法(1992年版)⁴⁾の記載様式を書き替えた試験法には定量下限等が記載されていないため, それらの性能を調査する必要がある. このことから, 筆者らは肥料等試験法に収載されている試験法のうち, 主要な成分の加里(K_2O)として規定^{5, 6)}されている加里全量(T- K_2O), く溶性加里(C- K_2O)及び水溶性加里(W- K_2O)のフレイム原子吸光光度法の精確さ等の性能を調査したので報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

流通している肥料原料の中にはカリウムが含まれているおそれがあることから, 試料の調製にあたっては表 1 のとおり出来る限り各肥料原料の主成分に対応する JIS 規格に規定されている試薬特級を用いた. なお, 粒状の試薬は乳鉢を用いて粉碎した. 流通している肥料の配合割合を参考に表 2 のとおり試薬を混合し, 加里(K_2O)として質量分率 0.2 %~20 %含有する試料を調製した. また, 試薬を水に溶解して加里(K_2O)として質量分率 0.02 %含有する試料を調製した.

但し, 水溶性加里(煮沸法)に用いる硫酸加里苦土は試薬が販売されていないため, 市場流通肥料(langbanite)を用い, 加里(K_2O)として質量分率 0.02 %含有する試料調製は省略した.

2) 装置及び器具

- (1) 原子吸光分析装置: 日本ジャーレル・アッシュ SOLAAR S4
- (2) マップル: (ヤマト科学 FO610)
- (3) ホットプレート: (柴田科学 NP-6)

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター (現)肥飼料安全検査部

- (4) 上下転倒式恒温回転振り混ぜ機：(別注品)
 (5) 上下転倒式回転振り混ぜ機：(増田理化工業 MK-41)

表1 試料の調製に使用する試薬

使用する試薬		対応する原材料名	
名称	規格	名称又は種類名(材料)	慣用名
硫酸アンモニウム	JIS K8960 特級	硫酸アンモニア	硫安
硝酸ナトリウム	JIS K8562 特級	硝酸ソーダ	硝酸ソーダ
尿素	JIS K8731 特級	尿素	尿素
りん酸水素二アンモニウム	JIS K9016 特級	りん酸アンモニア	DAP
りん酸水素カルシウム一水和物	特級	過りん酸石灰	過石
硫酸カリウム	JIS K8962 特級	硫酸加里	硫加
グルコース	JIS K8824 特級		
硫酸カルシウム二水和物	JIS K8963 特級	組成均一促進材	石膏
エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物	JIS K8107 特級	沈殿防止材	EDTA-Na

表2 試験に用いた試料の配合割合

(質量分率:%)

使用する試薬	真度評価用試料					定量下限確認用試料	
	K ₂ O-20	K ₂ O-15	K ₂ O-10	K ₂ O-5	K ₂ O-1	K ₂ O-0.2	K ₂ O-0.02
硫酸アンモニウム	5	20	20		15	5	0.5
硝酸ナトリウム		5		10		5	0.5
尿素	20	10	5	10	5		0.5
りん酸水素二アンモニウム	10	15	8	10	1	5	0.5
りん酸水素カルシウム一水和物	20	10	12	5	2	5	0.5
硫酸カリウム ¹⁾	37.38	28.03	18.69	9.34	1.87	0.37	0.0374
グルコース	5	5	10	20	10	20	1
硫酸カルシウム二水和物	2.62	4.97	21.31	25.66	60.13	49.63	
EDTA-Na ²⁾		2	5	10	5	10	1
水							95.46
K ₂ O含有量	20	15	10	5	1	0.2	0.02

1) 水溶性加里測定法(煮沸法)の場合は硫酸加里苦土を使用

2) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物

3) 試薬の調製

- (1) 水：水精製装置(ADVANTEC RDF240NA)を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 相当の水を使用した。
- (2) カリウム標準液(K: 1 mg/mL)：カリウム標準液(K: 1,000 mg/L)(和光純薬工業;JCSS)を使用した。
- (3) 検量線用カリウム標準液：カリウム標準液(K: 1 mg/mL)を段階的にとり、最終希釈液に調製する容量の 1/10 容量の干渉抑制剤溶液をそれぞれ加え、水で希釈して検量線用カリウム標準液(K 1, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 40 µg/mL)を調製した。
- (4) 検量線用空試験液：干渉抑制剤溶液一定量をと、水で 10 倍に希釈した。
- (5) くえん酸溶液(20 mg/mL)：JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 20 g を水に溶かして 1,000 mL と

した。

(6) 干渉抑制剤溶液: JIS K 8617 に規定する炭酸カルシウム 12.5 g をビーカー 2,000 mL にはかりとり, 少量の水を加え, 塩酸 105 mL を徐々に加え, 少時加熱した。放冷後, 水を加えて 1,000 mL とした。

(7) その他の試薬: 肥料等試験法³⁾に従った。

4) 試験成分及び試験方法

加里全量 (T-K₂O), <溶性加里 (C-K₂O) 及び水溶性加里 (W-K₂O) の抽出及び測定は表 3 のとおり肥料等試験法³⁾の各試験方法を用いた。なお, 参考のため, 各試験法のフローシート(図 1~3)を示した。

表3 試験成分及び試験方法

試験成分	肥料等試験法の項目	試料溶液の調製方法
加里全量(T-K ₂ O)	4.3.1.a フレーム原子吸光光度法	(4.1) 灰化、塩酸煮沸
<溶性加里(C-K ₂ O)	4.3.2.a フレーム原子吸光光度法	(4.1) くえん酸溶液(20 mg/mL)回転振とう(30℃)
水溶性加里(W-K ₂ O)	4.3.3.a フレーム原子吸光光度法	(4.1.2) 水回転振とう(30℃)及び煮沸(15分)

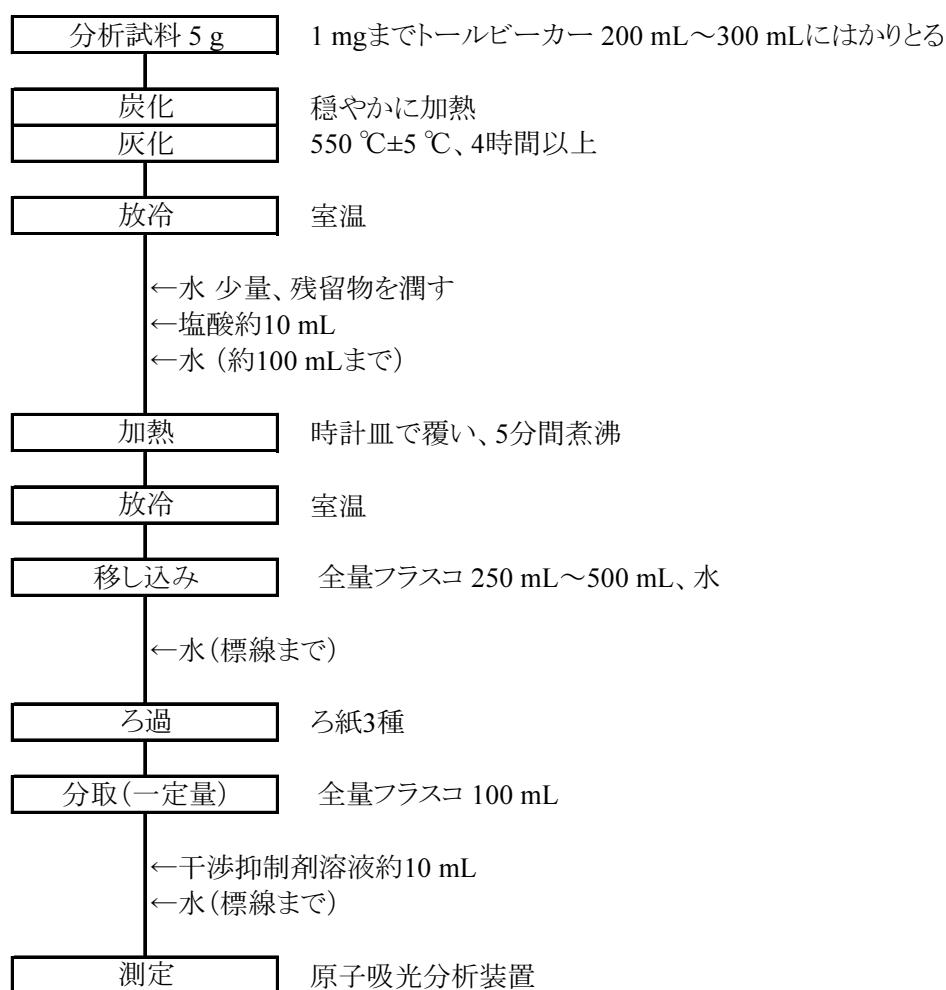


図1 肥料中の加里全量試験法フローシート

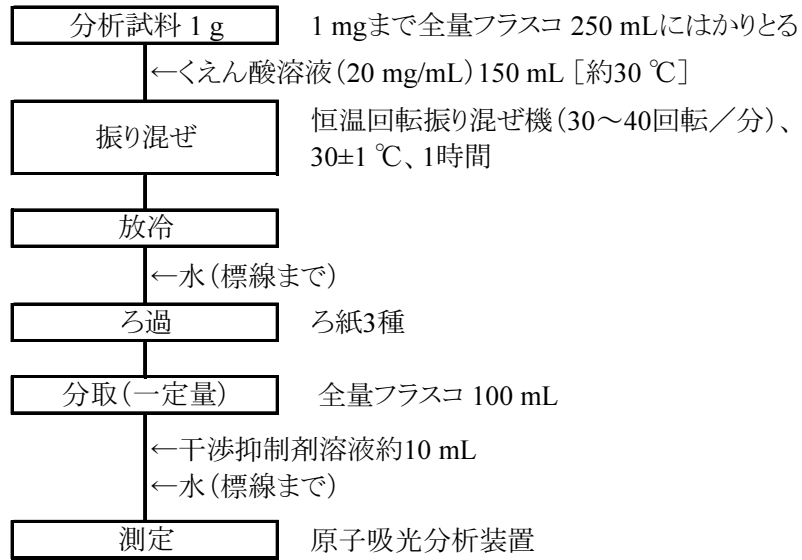


図2 肥料中のく溶性加里試験法フローシート

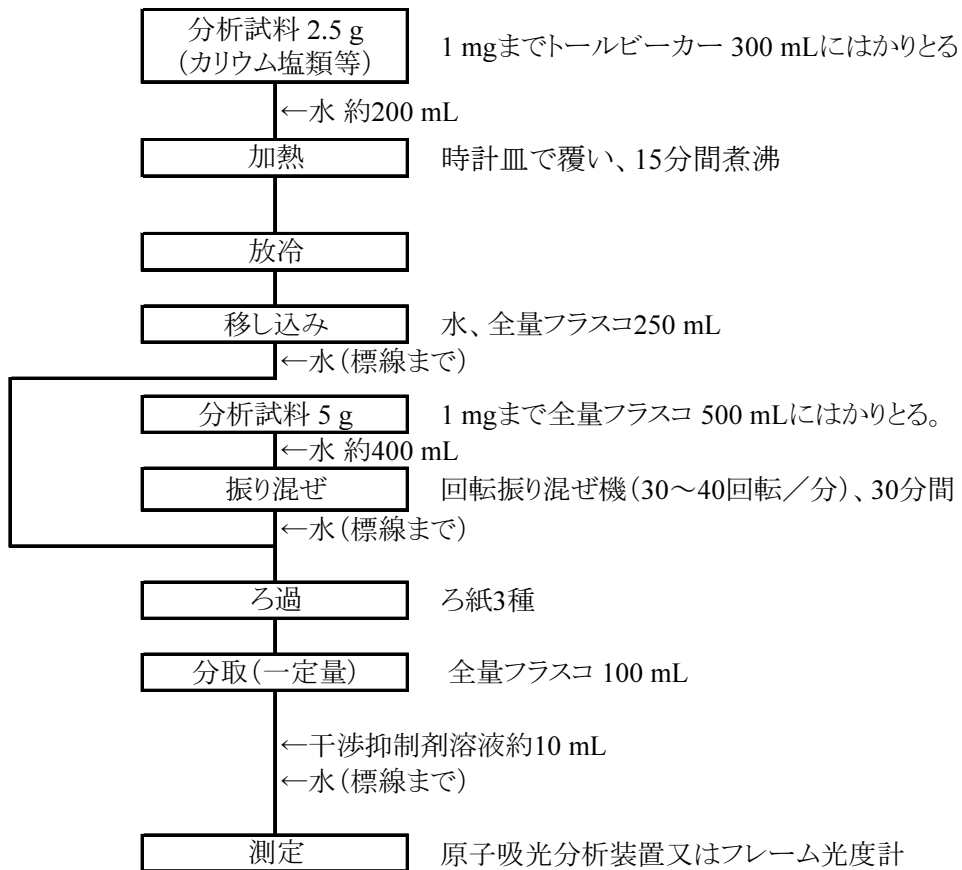


図3 肥料中の水溶性加里試験法フローシート

3. 結果及び考察

1) 試料の調製に用いた硫酸カリウム中のカリウムの含有量

試料の調製に用いた硫酸カリウム中のカリウムの含有量を肥料等試験法(加里全量)により3点併行で測定した結果を表4に示した. 平均値より算出した純度は質量分率 100.8 %と試薬の表示値(min. 99.0 %)を満たしており, その相対標準偏差は質量分率 0.3 % と小さかった. このことから, 試料の調製では理論値を用いて配合設計を行った.

また, 硫酸加里苦土については, 理論値が存在しないため平均値を用いて配合設計を行った.

表4 試料の調製に用いた硫酸カリウム中のカリウムの測定値

試料	測定値			(質量分率: %)	
	理論値 ¹⁾	平均値 ²⁾	標準偏差	純度 ³⁾	相対標準偏差
硫酸カリウム(水溶性)	54.05	54.46	0.17	100.8	0.3
硫酸カリウム(灰化法)	54.05	53.45	0.35		
硫酸カリウム(く溶性法)	54.05	54.38	0.19		
硫酸カリウム(煮沸法)	54.05	53.58	0.12		

1) 硫酸カリウム中の加里(K₂O)理論値

2) 加里全量(K₂O)の3点併行試験の平均値

3) (平均値/理論値)×100

2) 真度評価結果

真度評価用試料を用いて3点併行で加里全量(T-K₂O), く溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)の試験を実施した成績を表5に示した.

肥料取締法⁷⁾において, 保証成分量(含有する主成分の最小量)を生産業者保証票又は輸入業者保証票(以下, 「保証票」という)に記載することを普通肥料(汚泥肥料等を除く)の生産又は輸入した業者(以下, 「生産業者等」という)に義務づけている. よって, 加里(K₂O)の設計値と各試験法の測定値の差について算出した. 各加里(K₂O)の設計値と測定値との差及びその設計値に対する割合は, 加里(K₂O)含有量の少ない試料(K₂O-5及びK₂O-1)で質量分率0%~0.09%及び0%~3.1%であり, 加里(K₂O)含有量の多い試料(K₂O-20, K₂O-15及びK₂O-10)では質量分率-0.22%~0.26%及び-2.2%~1.7%であった. このことから, これらの試験法は, 普通肥料(指定配合肥料を含む)の加里(K₂O)の保証成分量の評価を得るに十分な正確さを有していたことが確認された.

また, 肥料取締法において, 主要な成分の含有量(加里全量(T-K₂O))を保証票又は表示に記載することを汚泥肥料等又はたい肥等の生産業者等に義務づけている. 特殊肥料の品質表示基準⁸⁾において, 表示値に対する許容誤差(表示値が質量分率3%以上の場合は表示値の±10%, 表示値が質量分率3%未満の場合は質量分率±0.3%)を定めている. よって, 加里全量(T-K₂O)の設計値と測定値の差及び回収率について算出した. K₂O-20, K₂O-15, K₂O-10, K₂O-5及びK₂O-1の回収率は97.8%~103.1%であり, K₂O-1の設計値と測定値との差は, 質量分率0.03%であった. このことから, これらの試験法は, 汚泥肥料等又はたい肥等の加里全量(T-K₂O)の表示値の評価を得るに十分な正確さを有していることが確認された.

なお, AOAC⁹⁾における濃度レベルにおける回収率の許容範囲は質量分率100%で98%~101%, 質量分率10%で95%~102%及び質量分率1%で92%~105%であり, 加里全量(T-K₂O)のいずれの回収率もこれらの許容範囲内であった.

表5 試料中の加里 (K₂O) の試験成績

試験成分	試料	設計値	測定値	設計値と の差	差の割合	回収率	標準偏差	相対 標準偏差
		A ¹⁾ (%) ²⁾	B ³⁾ (%) ²⁾	C ⁴⁾ (%) ²⁾	D ⁵⁾ (%)	E ⁶⁾ (%)	F ⁷⁾ (%) ²⁾	G ⁸⁾ (%)
T-K ₂ O	K ₂ O-20	20	20.01	0.01	0.1	100.1	0.13	0.7
	K ₂ O-15	15	14.99	-0.01	-0.1	99.9	0.06	0.4
	K ₂ O-10	10	9.78	-0.22	-2.2	97.8	0.34	3.5
	K ₂ O-5	5	5.04	0.04	0.9	100.9	0.18	3.6
	K ₂ O-1	1	1.03	0.03	3.1	103.1	0.08	7.7
C-K ₂ O	K ₂ O-20	20	20.21	0.21	1.1	101.1	0.32	1.6
	K ₂ O-15	15	15.26	0.26	1.7	101.7	0.38	2.5
	K ₂ O-10	10	10.02	0.02	0.2	100.2	0.41	4.1
	K ₂ O-5	5	5.09	0.09	1.8	101.8	0.25	4.9
	K ₂ O-1	1	1.00	0	0.4	100.4	0.04	3.9
W-K ₂ O	K ₂ O-20	20	19.89	-0.11	-0.6	99.4	0.44	2.2
	K ₂ O-15	15	15.04	0.04	0.2	100.2	0.14	0.9
	K ₂ O-10	10	10.00	0	0	100.0	0.13	1.3
	K ₂ O-5	5	5.03	0.03	0.6	100.6	0.06	1.3
	K ₂ O-1	1	1.01	0.01	0.5	100.5	0.03	2.6
	煮沸法 K ₂ O-15	15	14.99	-0.01	0.0	100.0	0.12	0.8
	煮沸法 K ₂ O-10	10	9.79	-0.21	-2.1	97.9	0.14	1.5
	煮沸法 K ₂ O-5	5	4.91	-0.09	-1.7	98.3	0.07	1.4
	煮沸法 K ₂ O-1	1	0.97	-0.03	-2.7	97.3	0.03	3.5

1) 試料中の加里 (K₂O) の含有量 (設計値)

2) 質量分率

3) 3点併行試験の平均値

4) $C=B-A$

5) $D=(C/A) \times 100$

6) $E=(B/A) \times 100$

7) 3点併行試験の標準偏差

8) $G=(F/B) \times 100$

3) 検出下限及び定量下限

定量下限確認用試料を用いて7点併行で加里全量(T-K₂O), <溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)の試験を実施した結果を表6に示した. なお, 定量下限は(標準偏差)×10式, また, 検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)式を用いて算出した¹⁰⁾.

普通肥料の公定規格¹¹⁾において普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く)の加里(K₂O)の含有すべき主成分の最小量並びに肥料取締法施行規則¹²⁾において指定配合肥料(家庭園芸用肥料を除く)の加里(K₂O)の保証できる最小量は質量分率1.0%と規定されている. また, 下水汚泥肥料等の主要な成分の指定¹³⁾及び特殊肥料の品質表示基準⁸⁾において加里全量(T-K₂O)の含有量が質量分率0.5%未満の場合は「0.5%未満」と記載することができると規定されている. このことから, これらの試験法は, 公定規格における普通

肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く), 指定複合肥料(家庭園芸用肥料を除く), 汚泥肥料等, たい肥等の加里(K_2O)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していたことが確認された。

また, 普通肥料の公定規格において家庭園芸用複合肥料の加里(K_2O)の含有すべき主成分の最小量並びに肥料取締法施行規則において指定複合肥料の家庭園芸用肥料の加里(K_2O)の保証できる最小量は質量分率 0.1 %と規定されている。加里(K_2O)保証成分量が質量分率 0.1 %~0.5 %の登録されている家庭園芸用複合肥料の多くが液状肥料である。このことから, これらの試験法は, 公定規格における家庭園芸用複合肥料, 指定複合肥料(家庭園芸用肥料)の加里(K_2O)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していたことが確認された。

表6 定量下限確認試験の成績 (質量分率:%)

試験成分	試料	設計値 ¹⁾	平均値 ²⁾	標準偏差	推定定量 下限値 ³⁾	推定検出 下限値 ⁴⁾
T- K_2O	K_2O -0.2	0.2	0.203	0.008	0.08	0.03
C- K_2O	K_2O -0.2	0.2	0.209	0.005	0.05	0.02
W- K_2O	K_2O -0.2	0.2	0.212	0.003	0.03	0.01
W- K_2O (煮沸法)	K_2O -0.2	0.2	0.206	0.004	0.04	0.02
T- K_2O	K_2O -0.02	0.02	0.0191	0.0025	0.025	0.010
C- K_2O	K_2O -0.02	0.02	0.0201	0.0056	0.056	0.022
W- K_2O	K_2O -0.02	0.02	0.0194	0.0007	0.007	0.003

1) 試料中の加里(K_2O)の含有量(設計値)

2) 7点併行試験の平均値

3) 標準偏差×10

4) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4) 室間再現精度

クライテリア・アプローチにおける性能規準では室間再現精度が要求されるが, 試験法の妥当性確認のための共同試験の実施には大きな労力がかかる。このことから, 該当する試験法で実施された既報の外部精度管理試験¹⁴⁾及び認証標準物質の値付けのための共同試験¹⁵⁾の成績^{16~21)}を適用することとし, それらの成績を表 7 及び表 8 に示した。なお, 外部精度管理試験では, ロバスト法を用いて報告値の中央値及び標準化された四分位範囲(NIQR)が算出されている。中央値及びNIQRは正規分布において平均値及び標準偏差に一致する。

く溶性加里(C- K_2O)及び水溶性加里(W- K_2O)の中央値又は平均値が質量分率 8.36 %~14.70 %の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.12 %~0.33 %, その相対標準偏差は 1.1 %~3.7 %であった。汚泥肥料中の加里全量(T- K_2O)の平均値は質量分率 0.168 %で, その室間再現標準偏差は質量分率 0.009 %, その相対標準偏差は 9.8 %であった。また, く溶性加里(C- K_2O)及び水溶性加里(W- K_2O)の試験成績のHorRat値は0.38~1.30であったが, 加里全量(T- K_2O)の試験成績のHorRat値は1.87であった。この原因を考察⁹⁾したところ, 試料中の加里全量(T- K_2O)の含有量が定量下限付近であり, 室間再現標準偏差が定量下限を大幅に下回っていたことが影響したと考えられた。

なお, AOAC(OMA)⁹⁾における濃度レベルにおける室間再現精度の目安は質量分率 100 %で 2 %, 質量分率 10 %で 3 %, 質量分率 1 %で 4 %及び質量分率 0.1 %で 6 %であり, く溶性加里(C- K_2O)及び水溶性加里(W- K_2O)の室間再現標準偏差はこれらの目安をほぼ下回った。

表7 外部精度管理試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	中央値 A ¹⁾ (%) ²⁾	NIQR B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C (%)	PSD D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
C-K ₂ O	高度化成肥料	2011	68	10.45	0.22	2.1	0.29	0.76
W-K ₂ O	高度化成肥料	2008	75	11.38	0.13	1.1	0.32	0.41
	普通化成肥料	2009	78	8.36	0.13	1.6	0.24	0.54
	高度化成肥料	2010	84	14.70	0.21	1.4	0.38	0.55
	高度化成肥料	2011	75	10.20	0.17	1.6	0.29	0.58

- 1) ロバスト法により求めた中央値(正規分布において平均値と一致する)
- 2) 質量分率
- 3) ロバスト法により求めた標準化された四分位範囲(正規分布において標準偏差と一致する)
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = B/D$

表8 肥料認証標準物質の値付けのための共同試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	平均値 A ¹⁾ (%) ²⁾	SD _R B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C (%)	PSD D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
T-K ₂ O	汚泥発酵肥料	2009	11	0.168	0.016	9.8	0.009	1.87
W-K ₂ O	高度化成肥料	2008	14	13.76	0.21	1.5	0.37	0.57
	普通化成肥料	2008	13	8.87	0.33	3.7	0.26	1.30
	高度化成肥料	2010	11	13.59	0.16	1.2	0.37	0.44
	普通化成肥料	2010	9	8.85	0.12	1.4	0.25	0.47

- 1) 認証値
- 2) 質量分率
- 3) 室間再現標準偏差
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = B/D$

4. まとめ

加里全量(T-K₂O), <溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)のフレイム原子吸光光度法の真度, 定量・検出下限及び室間再現精度を調査したところ, 次の結果を得た.

(1) 加里(K₂O)として質量分率 1 %~20 %含有する試料についてそれぞれの試験方法で測定したところ, 設計値と測定値との差は試料(K₂Oとして質量分率 1 %~5 %)で質量分率 0 %~0.09 %であり, 加里(K₂O)含有量の多い試料(K₂Oとして質量分率 10 %~20 %)では質量分率-0.22 %~0.26 %であった. また, 設計値に対する回収率は 97.8 %~103.1 %であった.

(2) 粉状試料(K₂Oとして質量分率 0.2 %)及び液状試料(K₂Oとして質量分率 0.02 %)を用いて定量下限及び検出下限を確認したところ, 前者の試料で質量分率 0.03 %~0.08 %及び質量分率 0.01 %~0.03 %, また, 後者の試料で質量分率 0.007 %~0.056 %及び質量分率 0.003 %~0.022 %程度と推定された.

(3) 外部精度管理試験及び肥料認証標準物質の値付けのための共同試験より室間再現精度を調査したところ, <溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)は, 中央値又は平均値が質量分率 8.36 %~14.70 %の範

(3) 外部精度管理試験及び肥料認証標準物質の値付けのための共同試験より室間再現精度を調査したところ、く溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)は、中央値又は平均値が質量分率 8.36 %~14.70 %の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.12 %~0.33 %、その相対標準偏差は 1.1 %~3.7 %であった。また、加里全量(T-K₂O)の平均値は質量分率 0.168 %でその室間再現標準偏差は質量分率 0.016 %、その相対標準偏差は 9.8 %であった。

(1)~(3)の成績は、肥料等試験法に記載された試験法が主要な成分としての加里(K₂O)の含有量を評価することができる性能を有していると示しており、クライテリア・アプローチにおける試験法の性能規準の資料に適用できると考えられた。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition, (2011)
<ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>
- 3) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 4) 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)
- 5) 肥料取締法施行令,昭和25年6月20日,政令第198号,最終改平成18年3月23日,政令第51号(2006)
- 6) 農林水産省告示:肥料取締法施行令第一条の二の規定に基づき農林水産大臣の指定する有効石灰等を指定する件,昭和59年3月16日,農林水産省告示第695号,最終改正平成11年5月13日,農林水産省告示第704号(1999)
- 7) 肥料取締法:昭和25年5月1日,法律第127号,最終改平成23年8月30日,法律第105号(2011)
- 8) 農林水産省告示:特殊肥料の品質表示基準,平成12年8月31日,農林水産省告示第1163号,最終改正平成17年2月28日,農林水産省告示第364号(2005)
- 9) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002)
<http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf>
- 10) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
<www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>
- 11) 農林水産省告示:肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件,昭和61年2月22日,農林水産省告示第284号,最終改正平成22年4月9日,農林省告示第589号(2010)
- 12) 農林水産省令:肥料取締法施行規則,昭和25年6月20日,農林水産省令第64号,最終改正平成20年2月29日,農林水産省令第11号(2008)
- 13) 農林水産省告示:肥料取締法第十七条第一項第三号の規定に基づき,肥料取締法第四条第一項第三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,最終改正平成13年3月15日,農林水産省告示第337号(2001)
- 14) ISO/IEC Guide 43-1 (1997): “Proficiency testing by interlaboratory comparisons—Part 1 : Development and operation of proficiency testing schemes” (JIS Q 0043-1 : 1998, 「試験所間比較による技能試験 第1部:技

0035 : 2008, 「標準物質—認証のための一般的及び統計学的な原則」)

- 16) 高橋雄一, 白澤優子, 井塚進次郎, 清水 昭, 井上智江, 内山 丈, 白井裕治, 上沢正志:2008 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **2**, 97~115 (2009)
- 17) 高橋雄一, 廣井利明, 秋元里乃, 添田英雄, 高橋佐貴子, 相澤真理子, 加藤公栄, 義本将之, 白澤優子, 白井裕治, 柴田政人:2008 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **2**, 116~129 (2009)
- 18) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 井上智江, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2009 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **3**, 73~94 (2010)
- 19) 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 関根優子, 及川裕美, 添田英雄, 白井裕治, 柴田政人:2009 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **3**, 95~106 (2010)
- 20) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 福中理絵, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2010 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **4**, 85~106 (2011)
- 21) 高橋佐貴子, 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 山西正将, 秋元里乃, 白井裕治, 柴田政人:2010 年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **4**, 107~106 (2011)

Verification of Performance Characteristics of Testing Methods for Potassium Content in Fertilizer by Atomic Absorption Spectrometry

Yasuharu KIMURA¹ and Hisanori ARAYA²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now) Fertilizer and Feed Inspection Department

We verified performance characteristics of testing methods for total potassium (T-K₂O), citric acid-soluble potassium (C-K₂O) and water-soluble potassium (W-K₂O) by atomic absorption spectrometry described in Testing Methods for Fertilizers. The accuracy of testing methods for the several form of potassium was assured from 3 replicate determinations of 5 fertilizer samples containing 1 % ~ 20 % potassium (as K₂O) which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 97.8 % to 103.1 %. On the basis of 10 replicate measurements of each testing method of a solid sample and a liquid sample, the limit of quantitative value (LOQ) was estimated at 0.03 % ~ 0.08 % and 0.007 % ~ 0.056 %, respectively. Reported in Research Report of Fertilizer, medians, normalize interquartile ranges (NIQR) and relative standard deviations (RSD_R) for reproducibility of C-K₂O and W-K₂O obtained by proficiency testings were 8.36 % ~ 14.70 %, 0.13 % ~ 0.22 % and 1.1 % ~ 2.1 %, respectively. And mean values, standard deviations (RSD_R) for reproducibility and RSD_R of C-K₂O and W-K₂O obtained by collaborative studies were 9.85 % ~ 13.76 %, 0.12 % ~ 0.33 % and 1.2 % ~ 3.7 %, respectively. These results indicated that these methods performance characteristics were available in establishing criteria for a determination method of potassium.

Key words criteria approach, potassium, atomic absorption spectrometry, Testing Methods for Fertilizers

(Research Report of Fertilizer, **5**, 190~200, 2012)

19 加里試験法の性能調査

—テトラフェニルほう酸ナトリウム重量法—

八木啓二¹, 矢野愛子², 添田英雄¹

キーワード クライテリア・アプローチ, 加里, テトラフェニルほう酸ナトリウム重量法, 肥料等試験法

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中, 我が国においても ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2005)¹⁾の要求事項を参考にした試験成績の信頼性確保の考え方が重要視されている. 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. 一方, 品質の評価に用いる分析法を規格, 公定法等で指定するのではなく, 一定の規準(criteria)を満たす分析法ならば, 適用可能としている. この考え方はクライテリア・アプローチ(Criteria Approach)と呼ばれており, 化学物質を客観的に測定する分析法の評価に適用できることがコーデックス委員会において合意されている. 食品を対象としているコーデックス分析法の性能規準に関する数値設定のためのガイドライン²⁾には適用範囲, 真度, 精度, 定量下限等が設定されている.

しかしながら, 肥料の試験法に要求される性能規準は, 食品とは異なるため, 新たに設定する必要がある. 近年, 新たに開発された方法についてはこれらの性能を調査して肥料等試験法³⁾に順次収載している. ただし, 肥料分析法(1992年版)⁴⁾の記載様式を書き替えた試験法には定量下限等が記載されていないため, それらの性能を調査する必要がある. このことから, 筆者らは肥料等試験法に収載されている試験法のうち, 主要な成分の加里(K_2O)として規定^{5, 6)}されている加里全量(T- K_2O), く溶性加里(C- K_2O)及び水溶性加里(W- K_2O)のテトラフェニルほう酸ナトリウム重量法の精確さ等の性能を調査したので報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

流通している肥料原料の中にはカリウムが含まれているおそれがあることから, 試料の調製にあたっては表 1 のとおり出来る限り各肥料原料の主成分に対応する JIS 規格に規定されている試薬特級を用いた. なお, 粒状の試薬は乳鉢を用いて粉碎した. 流通している肥料の配合割合を参考に表 2-1, 表 2-2 及び表 2-3 表のとおり試薬を混合し, 加里(K_2O)として 2%~50%含有する試料を調製した.

2) 装置及び器具

- (1) 電子天びん: (エー・アンド・デイ GR200 最小表示 0.1mg)
- (2) 電気炉: (ADVANTEC KL-600)
- (3) 乾燥器: (ヤマト科学 DKN602)
- (4) ホットプレート: (柴田科学 NP-6)
- (5) るつぼ形ガラスろ過器: (JIS R 3503 に規定するるつぼ形ガラスろ過器 1G4 を乾燥器に入れ, 120 °C

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福岡センター (現)肥飼料安全検査部

±2 °Cで加熱した後、デシケーター中で、放冷し、質量を 0.1 mg のけたまで測定したるつぼ形ガラスろ過器)

(6) 上下転倒式恒温回転振り混ぜ機: (ADVANTEC DGX-226)

(7) 上下転倒式回転振り混ぜ機: (いすゞ製作所)

表1 試料の調製に使用する試薬

使用する試薬		対応する原材料名	
名称	規格	名称又は種類名(材料)	慣用名
硫酸アンモニウム	JIS K8960 特級	硫酸アンモニア	硫安
尿素	JIS K8731 特級	尿素	尿素
りん酸水素二アンモニウム	JIS K9016 特級	りん酸アンモニア	DAP
りん酸一水素カルシウム二水和物	特級	過りん酸石灰	過石
塩化カリウム	JIS K8121 特級	塩化加里	塩加
グルコース	JIS K8824 特級		
硫酸カルシウム二水和物	JIS K8963 特級	組成均一促進材	石膏

表2-1 試験に用いた加里全量試料の配合割合

(質量分率(%))

使用する試薬	真度評価用試料					定量下限確認用試料
	K ₂ O-30	K ₂ O-25	K ₂ O-20	K ₂ O-15	K ₂ O-10	K ₂ O-2
硫酸アンモニウム			10	10	10	10
尿素		20	20	10		5
りん酸水素二アンモニウム	20	15	20	10	25	
りん酸一水素カルシウム二水和物		11		10	20	11
塩化カリウム	47.48	39.57	31.66	23.74	15.83	3.17
グルコース	32.52	14.43	18.34	36.26	29.17	70.83
K ₂ O含有量	30	25	20	15	10	2

表2-2 試験に用いたく溶性加里試料の配合割合

(質量分率(%))

使用する試薬	真度評価用試料					定量下限確認用試料
	K ₂ O-30	K ₂ O-25	K ₂ O-20	K ₂ O-15	K ₂ O-10	K ₂ O-2
硫酸アンモニウム	6			14	21	26.83
尿素	11	13	16	14		25
りん酸水素二アンモニウム		14.43	32.34	14.26	22.17	
りん酸一水素カルシウム二水和物	15.52	13		14	21	25
塩化カリウム	47.48	39.57	31.66	23.74	15.83	3.17
硫酸カルシウム二水和物	20	20	20	20	20	20
K ₂ O含有量	30	25	20	15	10	2

表2-3 試験に用いた水溶性加里試料の配合割合 (質量分率(%))

使用する試薬	真度評価用試料					定量下限確認用試料
	K ₂ O-50	K ₂ O-30	K ₂ O-20	K ₂ O-15	K ₂ O-10	K ₂ O-2
硫酸アンモニウム			20	15	16.17	9.83
尿素		20	23	23		38
りん酸水素二アンモニウム		15	25.34	20.26	33	
りん酸一水素カルシウム二水和物	20.86	17.52		18	35	49
塩化カリウム	79.14	47.48	31.66	23.74	15.83	3.17
K ₂ O含有量	50	30	20	15	10	2

3) 試薬の調製

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

(2) 塩酸：JIS K 8180 に規定する同等の品質の試薬(和光純薬工業;有害金属測定用)を使用した。

(3) くえん酸溶液(20 mg/mL)：JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 20 g を水に溶かして 1,000 mL とした。

(4) ホルムアルデヒド液：JIS K 8872 に規定する特級の試薬を使用した。

(5) 水酸化ナトリウム溶液(200 mg/L)：JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 200 g を水に溶かして 1,000 mL とした。

(6) 塩化アルミニウム溶液(12 g/100 mL)：JIS K 8114 に規定する塩化アルミニウム(Ⅲ)六水和物 12 g を水に溶かして 100 mL とした。

(7) テトラフェニルほう酸塩溶液：JIS K 9521 に規定するテトラフェニルほう酸ナトリウム 6.1 g を全量フラスコ 250 mL にとり、水約 200 mL を加えて溶かし、塩化アルミニウム溶液(12 g/100 mL) 10 mL を加え、メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)を指示薬として加え、水酸化ナトリウム溶液(200 g/L)で溶液の色が黄色になるまで中和した後、標線まで水を加え、ろ紙 3 種でろ過し、ろ液の全量に水酸化ナトリウム溶液(200 g/L)0.5 mL を加え、使用時にろ紙 3 種でろ過をした。

(8) テトラフェニルほう酸塩洗浄溶液：テトラフェニルほう酸塩溶液 40 mL を水で希釈して 1,000 mL とした。

(9) エチレンジアミン四酢酸塩-水酸化ナトリウム溶液：JIS K 8107 に規定するエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 10 g 及び JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 8 g を水適量に溶かし、放冷後不純物として混在するカリウム量に応じて、テトラフェニルほう酸塩溶液 6 mL～10 mL をかき混ぜながら加え、水を加えて 100 mL とし、ときどき混合しながら約 30 分間放置した後、ろ紙 3 種でろ過をした。

(10) メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)：JIS K 8896 に規定するメチルレッド 0.10 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かした。

(11) その他の試薬：肥料等試験法³⁾に従った。

4) 試験成分及び試験方法

加里全量(T-K₂O)、く溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)の抽出及び測定は表3のとおり肥料等試験法³⁾の各試験方法を用いた。なお、参考のため、各試験法のフローシート(図 1～3)を示した。

表3 試験成分及び試験方法

試験成分	肥料等試験法の項目	試料溶液の調製方法
加里全量(T-K ₂ O)	4.3.1.b	テトラフェニルほう酸ナトリウム重量法 (4.1) 灰化、塩酸煮沸
く溶性加里(C-K ₂ O)	4.3.2.b	テトラフェニルほう酸ナトリウム重量法 (4.1) くえん酸溶液(20 mg/mL)回転振とう(30 °C)
水溶性加里(W-K ₂ O)	4.3.3.b	テトラフェニルほう酸ナトリウム重量法 (4.1.1) 15分間煮沸 純度試験
水溶性加里(W-K ₂ O)	4.3.3.b	テトラフェニルほう酸ナトリウム重量法 (4.1.2) 水回転振とう 真度評価試験

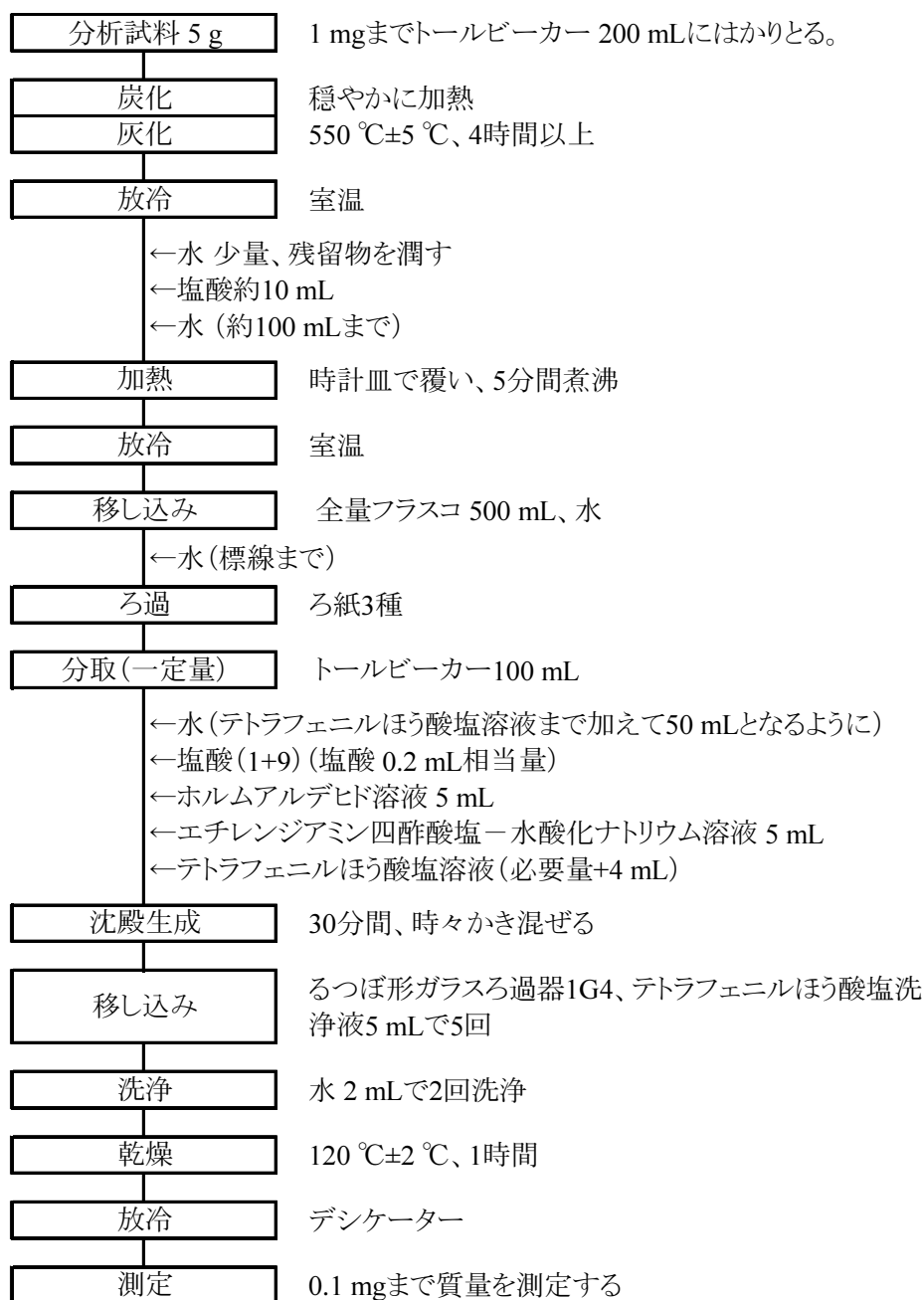


図1 肥料中の加里全量試験法フローシート

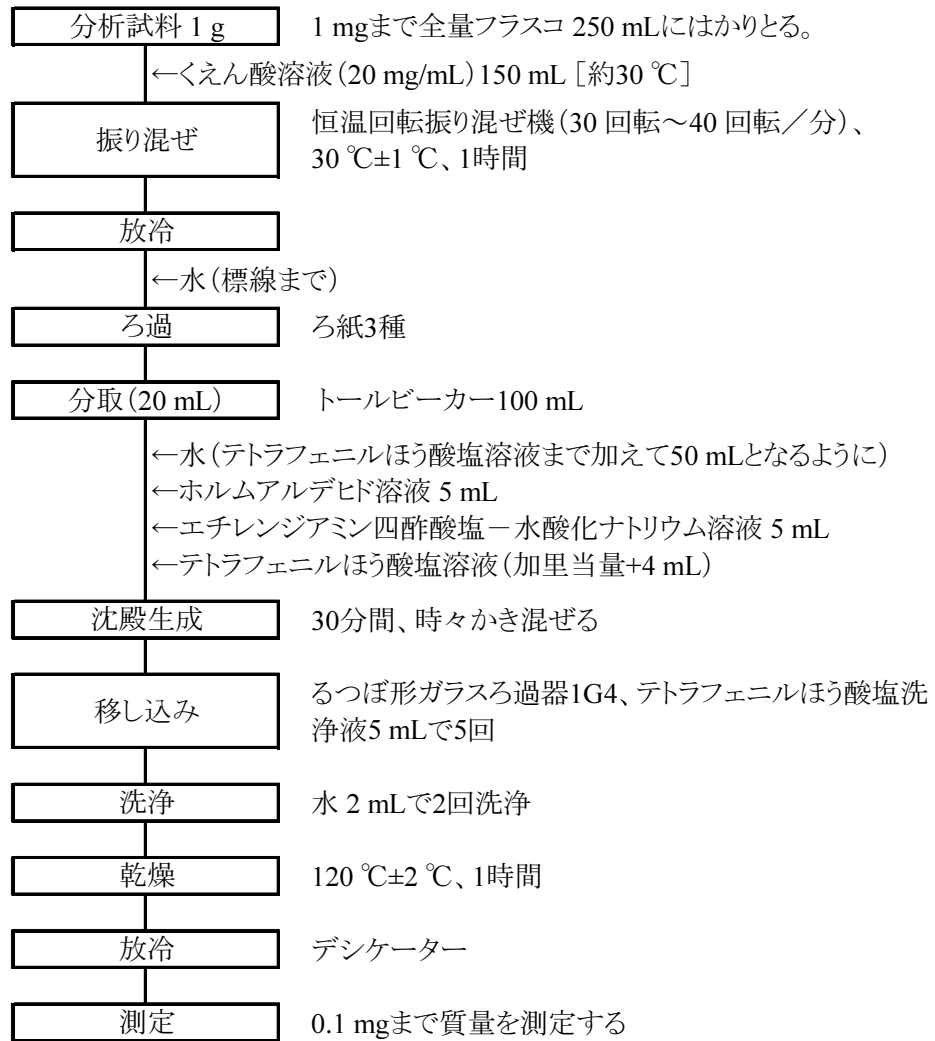


図2 肥料中のく溶性加里試験法フローシート

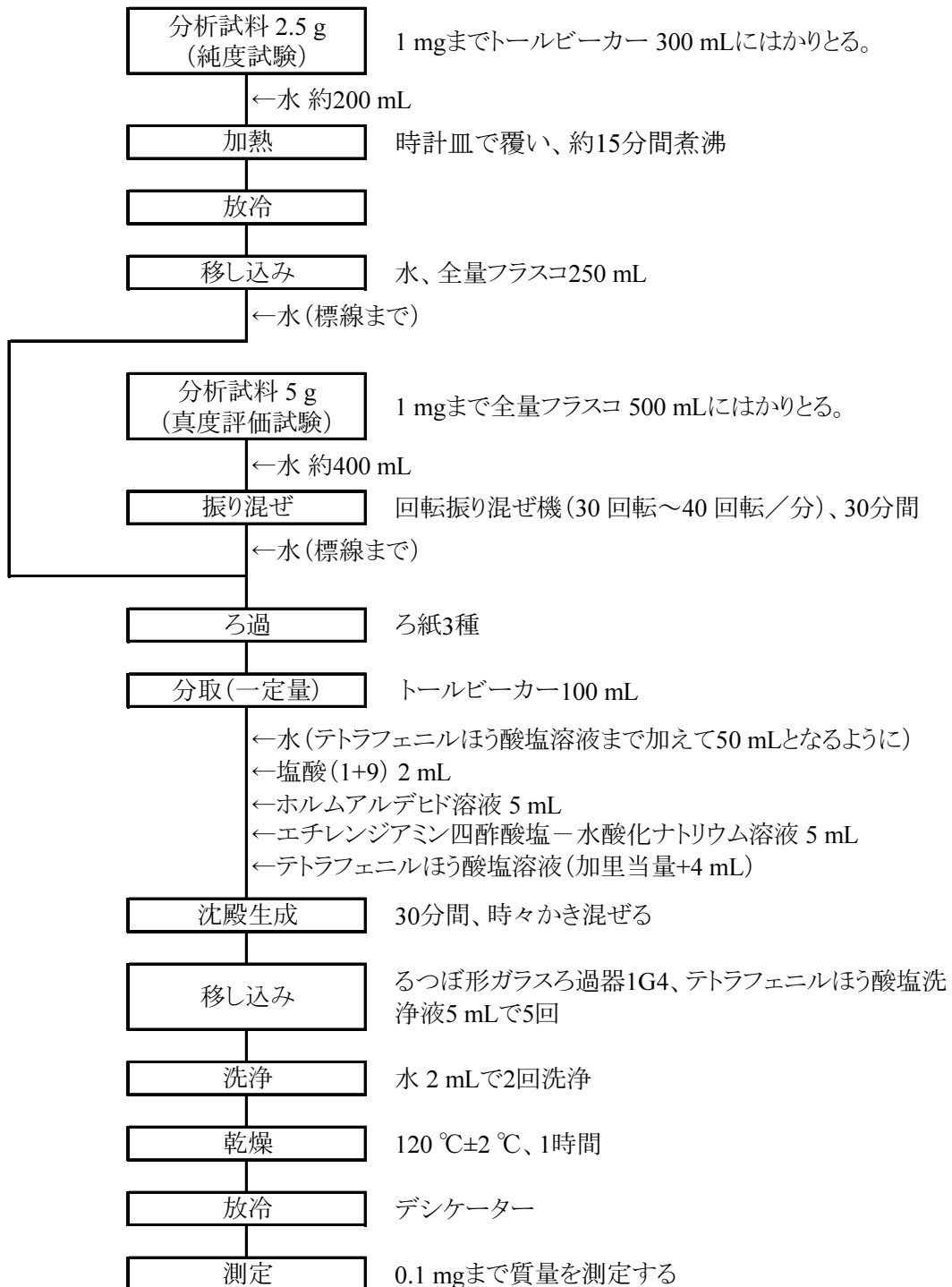


図3 肥料中の水溶性加里試験法フローシート

3. 結果及び考察

1) 試料の調製に用いた塩化カリウム中のカリウムの含有量

試料の調製に用いた塩化カリウム中のカリウムの含有量を肥料等試験法(水溶性加里)により 3 点併行で測定した結果を表 4 に示した. 平均値より算出した純度は質量分率 100.2 %と試薬の表示値(min. 99.5 %)を満たしており, その相対標準偏差は 0.2 % と小さかった. このことから, 試料の調製では理論値を用いて配合設計を

行った。

表4 試料の調製に用いた塩化カリウム中のカリウムの測定値

試料	理論値 ¹⁾ (%) ⁴⁾	平均値 ²⁾ (%) ⁴⁾	標準偏差 (%) ⁴⁾	純度 ³⁾ (%) ⁴⁾	相対標準偏差 (%)
塩化カリウム	63.18	63.33	0.10	100.2	0.2

- 1) 塩化カリウム中の加里 (K₂O) 理論値
- 2) 加里全量 (K₂O) の3点併行試験の平均値
- 3) (平均値/理論値)×100
- 4) 質量分率

2) 真度評価結果

真度評価用試料を用いて 3 点併行で加里全量 (T-K₂O), <溶性加里 (C-K₂O) 及び水溶性加里 (W-K₂O) の試験を実施した成績を表 5 に示した。

肥料取締法⁷⁾において, 保証成分量(含有する主成分の最小量)を生産業者保証票又は輸入業者保証票(以下,「保証票」という)に記載することを普通肥料(污泥肥料等を除く)の生産又は輸入した業者(以下,「生産業者等」という)に義務づけている。よって, 加里 (K₂O) の設計値と各試験法の測定値の差について算出した。各加里 (K₂O) の設計値と測定値との差及びその設計値に対する割合は, 加里全量 (T-K₂O), <溶性加里 (C-K₂O) 及び水溶性加里 (W-K₂O) の含有量の少ない試料 (K₂O-15 及び K₂O-10) では質量分率-0.38 %~0.22 %及び-3.8 %~2.2 %であり, 加里全量 (T-K₂O), <溶性加里 (C-K₂O) の含有量の多い試料 (K₂O-30, K₂O-25 及び K₂O-20) では-0.27 %~0.24 %及び-0.7 %~0.8 %であり, 水溶性加里 (W-K₂O) の含有量の多い試料 (K₂O-50, K₂O-30 及び K₂O-20) では質量分率-0.14 %~0.40 %及び-0.7 %~0.8 %であった。このことから, これらの試験法は, 普通肥料(指定配合肥料を含む)の加里 (K₂O) の保証成分量の評価を得るに十分な正確さを有していたことが確認された。

また, 肥料取締法において, 主要な成分の含有量(加里全量 (T-K₂O))を保証票又は表示に記載することを污泥肥料等又はたい肥等の生産業者等に義務づけている。特殊肥料の品質表示基準⁸⁾において, 表示値に対する許容誤差(表示値が 3 %以上の場合には表示値の±10 %, 表示値が 3 %未満の場合には±0.3 %)を定めている。よって, 加里全量 (T-K₂O) の設計値と測定値の差及び回収率について算出した。K₂O-30, K₂O-25, K₂O-20, K₂O-15 及び K₂O-10 の回収率は 99.5 %~100.8 %であり, K₂O-10 の設計値と測定値との差は, 0.07 %であった。このことから, これらの試験法は, 污泥肥料等又はたい肥等の加里全量 (T-K₂O) の表示値の評価を得るに十分な正確さを有していたことが確認された。

なお, AOAC⁹⁾における濃度レベルにおける回収率の許容範囲は質量分率 100 %で 98 %~101 %, 質量分率 10 %で 95 %~102 %及び質量分率 1 %で 92 %~105 %であり, 加里全量 (T-K₂O) のいずれの回収率もこれらの許容範囲内であった。

表5 試料中の加里 (K₂O) の試験成績 (%)

試験成分	試料	設計値	測定値	設計値との差	差の割合	回収率	標準偏差	相対標準偏差
		A ¹⁾ (%) ²⁾	B ³⁾ (%) ²⁾	C ⁴⁾ (%) ²⁾	D ⁵⁾ (%)	E ⁶⁾ (%)	F ⁷⁾ (%) ²⁾	G ⁸⁾ (%)
T-K ₂ O	K ₂ O-30	30	30.24	0.24	0.8	100.8	0.16	0.5
	K ₂ O-25	25	24.97	-0.03	-0.1	99.9	0.14	0.6
	K ₂ O-20	20	19.91	-0.09	-0.5	99.5	0.17	0.9
	K ₂ O-15	15	15.09	0.09	0.6	100.6	0.09	0.6
	K ₂ O-10	10	10.07	0.07	0.7	100.7	0.03	0.3
C-K ₂ O	K ₂ O-30	30	30.17	0.17	0.6	100.6	0.39	1.3
	K ₂ O-25	25	24.86	-0.14	-0.6	99.4	0.11	0.5
	K ₂ O-20	20	19.73	-0.27	-1.4	98.6	0.08	0.4
	K ₂ O-15	15	14.70	-0.31	-2.0	98.0	0.14	1.0
	K ₂ O-10	10	9.62	-0.38	-3.8	96.2	0.23	2.3
W-K ₂ O	K ₂ O-50	50	50.40	0.40	0.8	100.8	0.09	0.2
	K ₂ O-30	30	30.06	0.06	0.2	100.2	0.24	0.8
	K ₂ O-20	20	19.86	-0.14	-0.7	99.3	0.13	0.7
	K ₂ O-15	15	15.06	0.05	0.4	100.4	0.06	0.4
	K ₂ O-10	10	10.22	0.22	2.2	102.2	0.13	1.3

1) 試料中の加里 (K₂O) の含有量 (設計値)

2) 質量分率

3) 3点併行試験の平均値

4) C=B-A

5) D=(C/A)×100

6) E=(B/A)×100

7) 3点併行試験の標準偏差

8) G=(F/B)×100

3) 検出下限及び定量下限

定量下限確認用試料を用いて7点併行で加里全量(T-K₂O)、く溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)の試験を実施した結果を表6に示した。なお、定量下限は(標準偏差)×10式、また、検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)式を用いて算出¹⁰⁾したが、AOAC⁹⁾における濃度レベルにおける回収率の許容範囲は質量分率1%で92%~105%であり、く溶性加里(C-K₂O)の回収率が89.5%であったため、定量下限及び検出限界は推定できなかったが、参考として表6に示した。

普通肥料の公定規格¹¹⁾において普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く)の加里(K₂O)の含有すべき主成分の最小量並びに肥料取締法施行規則¹²⁾において指定配合肥料(家庭園芸用肥料を除く)の加里(K₂O)の保証できる最小量は質量分率1.0%と規定されている。また、下水汚泥肥料等の主要な成分の指定¹³⁾及び特殊肥料の品質表示基準⁸⁾において加里全量(T-K₂O)の含有量が質量分率0.5%未満の場合は「0.5%未満」と記載することができると規定されている。このことから、これらの試験法は、公定規格における普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く)、指定配合肥料(家庭園芸用肥料を除く)、汚泥肥料等、たい肥等の加里(K₂O)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していないことが確認された。

表6 定量下限確認試験の成績 (質量分率(%))

試験成分	試料	設計値 ¹⁾	平均値 ²⁾	回収率 ³⁾	標準偏差	推定定量 下限値 ⁴⁾	推定検出 下限値 ⁵⁾
T-K ₂ O	K ₂ O-2	2	1.936	96.8	0.023	0.23	0.09
C-K ₂ O	K ₂ O-2	2	1.781	89.5	0.058	0.58	0.22
W-K ₂ O	K ₂ O-2	2	1.986	99.3	0.063	0.63	0.25

1) 試料中の加里(K₂O)の含有量(設計値)

2) 7点併行試験の平均値

3) 回収率=(平均値/設計値)×100

4) 標準偏差×10

5) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4. まとめ

加里全量(T-K₂O), <溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)のテトラフェニルほう酸ナトリウム重量法の真度及び定量・検出下限を調査したところ, 次の結果を得た。

(1) 加里全量(T-K₂O), <溶性加里(C-K₂O)及び水溶性加里(W-K₂O)の含有量の少ない試料(K₂Oとして質量分率15%及び10%)では質量分率-0.38%~0.22%及び-3.8%~2.2%であり, 加里全量(T-K₂O), <溶性加里(C-K₂O)の含有量の多い試料(K₂Oとして質量分率20%~30%)では質量分率-0.27%~0.24%及び-0.7%~0.8%であり, 水溶性加里(W-K₂O)の含有量の多い試料(K₂Oとして質量分率20%~50%)では質量分率-0.14%~0.40%及び-0.7%~0.8%であった。

(2) 定量下限確認用試料(K₂Oとして質量分率2%)を用いて定量下限及び検出下限を確認したところ, 加里全量(T-K₂O)で質量分率0.23%及び0.09%, であり, 水溶性加里(W-K₂O)で質量分率0.63%及び0.25%程度と推定されたが, <溶性加里(C-K₂O)の回収率が89.5%であったため, 定量下限及び検出限界は推定できなかった。

(1)及び(2)の成績は, 肥料等試験法に記載された試験法が主要な成分としての加里(K₂O)の含有量を評価することができる性能は, 加里(K₂O)が質量分率10%以上含有量する肥料について示しており, クライテリア・アプローチにおける試験法の性能規準の資料に適用するには, この条件が必要と考えられた。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition (2011)
<ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>
- 3) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC): 肥料等試験法 (2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 4) 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)
- 5) 肥料取締法施行令, 昭和25年6月20日, 政令第198号, 最終改正平成18年3月23日, 政令第51

号 (2006)

- 6) 農林水産省告示:肥料取締法施行令第一条の二の規定に基づき農林水産大臣の指定する有効石灰等を指定する件, 昭和 59 年 3 月 16 日, 農林水産省告示第 695 号, 最終改正平成 11 年 5 月 13 日, 農林水産省告示第 704 号 (1999)
- 7) 肥料取締法:昭和 25 年 5 月 1 日, 法律第 127 号, 最終改正平成 23 年 8 月 30 日, 法律第 105 号 (2011)
- 8) 農林水産省告示:特殊肥料の品質表示基準, 平成 12 年 8 月 31 日, 農林水産省告示第 1163 号, 最終改正平成 17 年 2 月 28 日, 農林水産省告示第 364 号 (2005)
- 9) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002)
<http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf>
- 10) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
<www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>
- 11) 農林水産省告示:肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日, 農林水産省告示第 284 号, 最終改正平成 22 年 4 月 9 日, 農林省告示第 589 号 (2010)
- 12) 農林水産省令:肥料取締法施行規則, 昭和 25 年 6 月 20 日, 農林水産省令第 64 号, 最終改正平成 20 年 2 月 29 日, 農林水産省令第 11 号 (2008)
- 13) 農林水産省告示:肥料取締法第十七条第一項第三号の規定に基づき, 肥料取締法第四条第一項第三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, 最終改正平成 13 年 3 月 15 日, 農林水産省告示第 337 号 (2001)

Verification of Performance Characteristics of Testing Methods for Potassium Content in Fertilizer by Gravimetric Sodium Tetraphenylborate analysis

Keiji YAGI¹, Aiko YANO² and Hideo SOETA¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center

(Now) Fertilizer and Feed Inspection Department

We verified performance characteristics of testing methods for total potassium (T-K₂O), citric acid-soluble potassium (C-K₂O) and water-soluble potassium (W-K₂O) by gravimetric sodium tetraphenylborate analysis described in Testing Methods for Fertilizers. The accuracy of testing methods for the several form of potassium was assured from 3 replicate determinations of 5 fertilizer samples containing 1 % ~ 50 % potassium (as K₂O) which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 96.2 % to 102.2 %. On the basis of 10 replicate measurements of each testing method of a solid sample, the limit of quantitative value (LOQ) was estimated at 0.23 % ~ 0.63 %, respectively. Couldn't even estimate the detection limit and determination of minimum recovery rate of at citric acid-soluble potassium (C-K₂O) by 89.5 %. These results indicated that these methods performance characteristics were available in establishing criteria for a determination method of potassium (Applicable to samples containing K₂O at least 10 %).

Key words criteria approach, potassium, gravimetric sodium tetraphenylborate, Testing Methods for Fertilizers

(Research Report of Fertilizer, **5**, 201~211, 2012)

20 2011 年度輸入肥料等の品質調査結果について

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 調整指導官及び肥料管理課

1. はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) では、肥料の品質保全等を図るため、農林水産大臣が定めた中期目標 (2011 年度からの 5 年間の目標) を実現するために、この目標に対応した中期計画及び各年度の実行計画を策定することにより、確実な肥料の品質保全等の実施に努めているところである。2011 年度からの中期計画では、FAMIC の立入検査を肥料生産事業場が行う品質管理状況の確認に重点化するとともに、輸入肥料も重点的に監視するため、その流通経路、輸入時期、輸入量等を把握することにより効率的な検査を行い、また、品質に関する情報も適宜得ることとしているところである。2011 年度からは、これらのデータは品質管理に重要と考えられるため、肥料品質のモニタリング・サーベイランスと位置づけ、生産業者等へも適宜情報提供を行うこととされた。

さらに、近年、メラミン等の異物が混入された肥料が輸入された事例を受け、メラミン試験法を確立し、検査においても確認しているところである。

また、重金属の含有のおそれのある汚泥肥料については、特に品質管理の実施を求めているところであるが、その原料汚泥についても、肥料の公定規格において「金属等を含む産業廃棄物に係る判定基準を定める省令別表第一の基準」¹⁾ (以下、「判定基準」という) が設けられており、FAMIC の検査においても必要に応じ適合調査を行っているところである。

2011 年度については、東日本大震災や福島第一原子力発電所事故の影響等により検査数が予定数に届かなかったが、生産業者等の御協力により輸入された肥料や原料を数点調査できたのでその内容を報告する。

2. 調査項目及び調査方法

1) 輸入肥料の重金属含有量調査

(1) 調査対象

(輸入量の多い肥料)

りん源は輸出国政策等により「りん鉱石」からりん鉱石を原料として生産された「りん酸アンモニウム」として輸入されることが多く、輸入される化成肥料のほとんどを占めることから選定された。

- ・ 化成肥料 (りん酸アンモニウムを原料とするもの)
- ・ 指定配合肥料 (輸入登録されたりん酸アンモニウムや有機質肥料を原料として配合した肥料)

(過去に異常が認められた肥料)

登録された肥料のうち輸入肥料の占める割合が高く、過去に重金属やメラミンの混入があったことや、品質が不安定と考えられることから選定された。

- ・ 副産肥料 (肥料の種類に「副産」の字句が冠されている肥料)
- ・ 有機質肥料

- ・ 指定配合肥料(輸入登録されたりん酸アンモニウムや有機質肥料を原料として配合した肥料)

(2) 調査項目

ひ素, カドミウム, 水銀, ニッケル, クロム及び鉛の 6 項目.

(3) 調査方法

FAMIC における検査品の収去規定により, 対象品の袋在庫数量に応じてランダムに数袋を抽出し, 各袋から数インクリメントを採取し, 全インクリメントを混合, 混合品から再度数インクリメントを採取し, ビニール袋に詰め密封する等により分析用試料とした.

分析方法は, 肥料等試験法²⁾によった.

分析成績について, FAMIC における肥料分析検査成績(検出されたものの平均値)と比較した.

2) 有機質肥料の異物(メラミンを含む)調査

(1) 調査対象

輸入された植物質の有機質肥料.

(2) 調査項目

メラミン, アンモニア性窒素及び尿素性窒素.

(3) 調査方法

メラミン, アンモニア性窒素及び尿素性窒素について定性試験³⁾を実施し, 検出された場合には肥料等試験法²⁾により定量試験を実施して含有量を求めた.

3) 原料汚泥の溶出試験調査

(1) 調査対象

農林水産省の指示による汚泥肥料生産事業場への立入検査において, 汚泥肥料等の原料として使用される下水汚泥, し尿汚泥等.

(2) 調査項目

「判定基準¹⁾」にある項目のうち, アルキル水銀, 有機燐化合物, ポリ塩化ビフェニル, シマジン, チオベンカルブ及びダイオキシン類以外の項目.

(3) 調査方法

環境庁告示「産業廃棄物に含まれる金属等の検定方法」⁴⁾に準拠した.

3. 調査結果

1) 輸入肥料の重金属含有量調査

(1) 化成肥料, 副産肥料

化成肥料 4 点, 副産複合肥料 1 点, 副産りん酸肥料 1 点の試料についての調査結果を表 1 に, また, 2003

年度から2011年度の9年間の化成肥料及び複合肥料の検査成績を表2に示した。

FAMICにおける化成肥料の9年間で検出された検査成績の平均値と比較して高いものが、化成肥料において、ひ素(3点)、カドミウム(1点)、水銀(1点)及び鉛(1点)が見受けられた。この化成肥料のうち1試料はひ素、カドミウム、水銀及び鉛のいずれも高かった。

また、FAMICにおける複合肥料全体(液状複合肥料を除く)の検出された検査成績の平均値(ひ素 5.0 mg/kg, カドミウム 1.7 mg/kg, 水銀 0.18 mg/kg, ニッケル 21 mg/kg, クロム 257 mg/kg 及び 5 mg/kg)と同様に比較した。

2011年度の結果では、重金属含有量が検査成績より高いものが認められたものの、いずれも化成肥料の公定規格に定める許容値以下であり、異常と判断されるものはなかったが、調査点数が少なく、引き続きデータの集積が必要と考えられた。

(2) 有機質肥料

甲殻類質肥料粉末1点、干蚕蛹粉末1点、とうもろこしはい芽油かす及びその粉末1点、ひまし油かす及びその粉末1点の試料についての調査結果を表1に、また、2003年度から2011年度の9年間の有機質肥料の検査成績を表2に示した。

FAMICにおける有機質肥料の9年間で検出された有機質肥料の検査成績の平均値と比較して高いものが、甲殻類質肥料粉末においてひ素(1点)及びカドミウム(1点)、干蚕蛹粉末においてニッケル(1点)、クロム(1点)及び鉛(1点)が見受けられた。

2011年度の結果では、重金属含有量が検査成績より高いものが認められたものの、いずれも化成肥料の公定規格の許容値に比較して十分低い値であり、異常と判断されるものはなかったが、調査点数が少なく、引き続きデータの集積が必要と考えられた。

(3) 指定配合肥料

調査した指定配合肥料(13点)の結果を表1に示した。

FAMICにおける化成肥料の9年間の検出された検査成績の平均値と比較して高いものが、ひ素(8点)、カドミウム(3点)、ニッケル(2点)、クロム(1点)、鉛(3点)が見受けられた。水銀についてはいずれも低かった。

原料に使用したりん酸アンモニウムの使用量との関連性は統計的に認められないが、ひ素及びカドミウムの含有量が高いものは使用量が多いものが多い傾向が窺えた。なお、原料に蒸製皮革粉を使用した指定配合肥料は他の肥料に比較しクロムがかなり高い傾向があることが窺えた。

2011年度の結果では、重金属含有量が検査成績より高いものが認められたものの、いずれも化成肥料の公定規格に定める許容値以下であり、異常と判断されるものはなかったが、調査点数が少なく、引き続きデータの集積が必要と考えられた。

2) 有機質肥料の異物(メラミンを含む)調査

植物質の有機質肥料(3点)の結果を表3に示した。

メラミン及び尿素性窒素が検出されたものはなかった。また、とうもろこしはい芽及びその粉末からアンモニア性窒素が微量検出されたが、肥料の品質を低下させる異物の混入によるものとは考えられなかった。

3) 汚泥肥料の溶出試験調査

下水汚泥肥料(2点)及びし尿汚泥肥料(2点)の原料汚泥の調査結果を表4に示した。

いずれの原料汚泥も判定基準に適合していた。

なお、FAMICにおいて当該調査は2006年度から開始しているが、これまでに判定基準を超えたものはなかった。

表1 2011年度輸入肥料中の重金属含有量の調査結果

肥料の種類	重金属含有量						使用原料	
	ひ素 (mg/kg)	カドミウム (mg/kg)	水銀 (mg/kg)	ニッケル (mg/kg)	クロム (mg/kg)	鉛 (mg/kg)	りん安 ¹⁾ (%)	蒸製皮 草粉 ²⁾
副産りん酸肥料	1.0	N.D. ³⁾	N.D.	16	27	5		
副産複合肥料	N.D.	N.D.	0.01	2	N.D.	N.D.		
化成肥料	8.9	0.2	0.06	11	28	1		
化成肥料	17	3.4	0.24	15	45	7		
化成肥料	14	N.D.	0.02	9	30	1		
化成肥料	4.1	N.D.	N.D.	5	30	N.D.		
甲殻類質肥料粉末	4.9	0.8	0.03	N.D.	3	N.D.		
干蚕蛹粉末	0.4	N.D.	0.04	14	30	10		
とうもろこしはい芽 及びその粉末	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.		
ひまし油かす 及びその粉末	0.4	N.D.	0.01	4	3	N.D.		
指定配合肥料	6.6	1.2	— ⁴⁾	—	—	—	14.4	無
指定配合肥料	7.8	1.6	—	—	—	—	33.5	無
指定配合肥料	10	1.7	0.02	7	28	7	48.0	無
指定配合肥料	8.3	2.7	0.03	15	70	N.D.	68.5	無
指定配合肥料	4.7	1.8	0.01	6	38	3	52.6	無
指定配合肥料	11	9.3	0.01	20	68	2	25.7	無
指定配合肥料	1.1	0.5	0.03	73	1,860	N.D.	7.2	有
指定配合肥料	1.4	0.1	0.03	1	0	N.D.	5.0	無
指定配合肥料	13	1.0	0.06	9	25	31	17.0	無
指定配合肥料	3.6	5.8	0.05	3	37	N.D.	60.3	無
指定配合肥料	6.1	1.5	N.D.	34	48	13	17.0	無
指定配合肥料	0.7	N.D.	N.D.	2	11	N.D.	25.0	無
指定配合肥料	4.5	0.3	0.08	9	1,460	5	0.0	有

1) りん酸アンモニウムの使用量

2) 蒸製皮革粉の使用の有無

3) 定量下限未満

4) 調査未実施

表2 2003年度～2011年度 FAMICの検査肥料中の重金属含有量の検査成績の基本統計量

重金属	統計量	単位	化成肥料	配合肥料	その他の 複合肥料 ¹⁾	有機質肥料
ひ素	標本数		1,879	176	137	36
	平均値	mg/kg	5.0	6.0	3.6	2.7
	中央値	mg/kg	3.8	4.6	3.0	1.7
	最低値	mg/kg	0.1	0.1	0.1	0.1
	最高値	mg/kg	250	39	14	8.1
カドミウム	標本数		1,827	143	122	32
	平均値	mg/kg	1.7	1.8	1.3	0.7
	中央値	mg/kg	1.4	1.7	1.0	0.4
	最低値	mg/kg	0.1	0.1	0.1	0.1
	最高値	mg/kg	35	5.4	4.9	6.2
水銀	標本数		131	14	15	30
	平均値	mg/kg	0.14	0.55	0.17	0.18
	中央値	mg/kg	0.07	0.07	0.10	0.07
	最低値	mg/kg	0.01	0.01	0.03	0.01
	最高値	mg/kg	1.7	3.1	0.52	1.5
ニッケル	標本数		1,014	63	75	20
	平均値	mg/kg	21	25	14	8
	中央値	mg/kg	9	9	11	6
	最低値	mg/kg	1	1	3	2
	最高値	mg/kg	580	420	76	32
クロム	標本数		1,048	65	74	21
	平均値	mg/kg	280	95	49	10
	中央値	mg/kg	38	41	30	8
	最低値	mg/kg	1	1	5	3
	最高値	mg/kg	6,300	1,900	850	27
鉛	標本数		198	16	22	29
	平均値	mg/kg	6	3	4	7
	中央値	mg/kg	3	3	5	3
	最低値	mg/kg	1	1	1	1
	最高値	mg/kg	340	11	7	70

1) 液状複合肥料を除く。

表3 2011年度 輸入肥料(有機質肥料)中の異物の調査結果¹⁾

肥料の種類	メラミン	AN ²⁾	UN ³⁾
とうもろこしはい芽及びその粉末	不検出	検出(0.1% ⁴⁾)	不検出
ひまし油かす及びその粉末	不検出	不検出	不検出
ひまし油かす及びその粉末	不検出	不検出	不検出

1) 定性試験

2) アンモニア性窒素

3) 尿素性窒素

4) 定性試験で検出されたため、定量試験を実施した。

表4 2011年度 原料汚泥の溶出試験¹⁾結果

原料汚泥の種類	試験結果
下水汚泥	適合 ²⁾
下水汚泥	適合
し尿汚泥	適合
し尿汚泥	適合

- 1) 産業廃棄物に含まれる金属等の検定方法(昭和48年2月17日環境庁告示第13号)に準拠
 2) 金属等を含む産業廃棄物に係る判定基準を定める省令の別表第1の基準(昭和48年2月17日総理府令第5号)により判定

文 献

- 1) 総理府令:金属等を含む産業廃棄物に係る判定基準を定める省令, 昭和48年2月17日総理府令第5号, 最終改正平成18年12月15日環境省令第36号(2006)
- 2) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 3) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):副産植物質肥料等中のメラミン及びシアヌル酸の定性試験法(2012) <<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 4) 環境庁告示:産業廃棄物に含まれる金属等の検定方法, 昭和48年2月17日環境庁告示第13号, 最終改正平成12年1月14日環境庁告示1号(2000)

