

肥料研究報告

第14号

2021年

Research Report of Fertilizer

Vol. 14
2021



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

Saitama, Japan

はじめに

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

このうち、肥料及び土壌改良資材については、肥料の品質の確保等に関する法律(肥料法)に定められている肥料の登録及び仮登録の申請に関する業務、肥料事業者等への立入検査に関する業務、肥料公定規格の設定等に関する業務と、地力増進法に定められている土壌改良資材の立入検査業務等を行うことで、肥料等の品質の保全、公正な取引と安全な施用の確保に貢献しています。

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

令和2年度は、DMPP(硝酸化成抑制材)、クロピラリドなどの分析法の開発及び改良並びに性能評価を行うとともに、肥料中の有害物質の土壌中での挙動や作物への吸収、植害試験における過剰な肥料成分による症状などの調査研究に取り組みました。また、肥料分析事業者対象の外部精度管理試験を実施し、その結果の解析を行いました。これらの成果は「肥料等試験法」に反映させるとともに、得られた知見をこの「肥料研究報告(第14号)」に取りまとめました。

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

2021年10月

独立行政法人農林水産消費安全技術センター
理事長 木内 岳志

肥料研究報告 第14号

– 2021 –

目次

<試験法等の検討及び妥当性確認>

1 蒸留法におけるアンモニア性窒素の試料溶液の調製方法の改良 惠智正宏, 小林涼斗	1
2 フェノール硫酸法における硝酸性窒素の試料溶液調製方法の改良 白澤優子, 加藤公栄	12
3 加里, 苦土, マンガンのフレイム原子吸光法の測定波長の追加 宮野谷杏, 天野忠雄, 八木寿治	25
4 HPLC を用いた肥料中の DMPP (硝酸化成抑制材) の分析法の開発 船木紀夫	39
5 ICP-MS を用いた肥料中のひ素等の分析法の開発 山西正将, 沼寄佳奈子, 白井裕治	53
6 く溶性石灰の分析法の性能評価 – 室間共同試験による妥当性確認 – 松尾信吾, 八木啓二, 小堀拓也, 吉村英美	70
7 イオンクロマトグラフィーによる硫酸イオン分析における抽出方法の改良 平田絵理香	79
8 硫酸イオンの分析法の性能評価 – 室間共同試験による妥当性確認 – 平田絵理香, 野崎友春, 白井裕治	87
9 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた堆肥等中のクロピラリドの測定 – 精製操作の改良 – 加藤まどか, 白井裕治	99
10 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた堆肥等中のクロピラリドの分析 – 室間共同試験による妥当性確認 – 加藤まどか, 白井裕治	109

11	LC-MS/MSを用いた汚泥肥料中のPFOS及びPFOAの分析	白井裕治, 沼寄佳奈子	123
<調査・試験業務>			
12	汚泥肥料の連用によるカドミウム等の土壌への蓄積, 作物への吸収試験(継続) —2019年冬作・2020年夏作—	浅尾直紀, 村山和晃, 松尾信吾, 小塚健志, 阿部文浩	141
<試験成績の信頼性確保関連>			
13	2020年度 全国共通試料を用いた肥料の外部精度管理試験成績の解析	秋元里乃, 義本将之, 平原稔夫, 天野忠雄, 井上直, 小堀拓也, 沼寄佳奈子, 引地典雄	162
14	2020年度 肥料認証標準物質の開発 —高度化成肥料FAMIC-A-17, 普通化成肥料 FAMIC-B-14, 汚泥発酵肥料FAMIC-C-12-2及びFAMIC-C-18-2の長期安定性評価—	井上直, 青山恵介, 川口伸司, 船木紀夫, 秋元里乃	186
<ノート>			
15	肥料中のDMPP(硝酸化成抑制材)の安定性についての検証	船木紀夫	210
16	コマツナの生理障害確認試験(ほう素)	青山恵介	221

注：本研究報告における操作方法及び用語等は、肥料等試験法(2020)の「1.総則 1.1 共通事項 (2)共通する一般事項、操作方法及び用語」に従い記載している表現に基づく。

Research Report of Fertilizer Volume 14

– 2021–

Index

<Development and Validation for Determination Methods>

1	Improvement of Method for Preparing Sample Solution of Ammoniac Nitrogen by Distillation Method ECHI Masahiro, KOBAYASHI Ryoto	1
2	Improved Determination Shaking Method in Preparation the Solution for the Nitrate Nitrogen by Phenol Sulfuric AcidSHIRASAWA Yuko, KATO Kimie	12
3	Addition of Measurement Wavelength for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry of Potassium, Magnesium and Manganese MIYANOYA Kyo, AMANO Tadao, YAGI Toshiharu	25
4	Determination of 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in Fertilizers by High Performance Liquid Chromatography FUNAKI Norio	39
5	Development of Determination Method of Arsenic, etc. in Fertilizers by ICP-MS YAMANISHI Masayuki, NUMAZAKI Kanako , SHIRAI Yuji	53
6	Performance Evaluation of Determination Method for Citric acid-soluble Lime in Fertilizers: Harmonized Collaborative ValidationMATSUO Shingo, YAGI Keiji, KOBORI Takuya, YOSHIMURA Hidemi	70
7	Improvement of the Extraction method of Sulfate ion in Ion Chromatography HIRATA Erika	79
8	Performance Evaluation of Determination Method for Sulfate ion in Fertilizers : Harmonized Collaborative Validation HIRATA Erika, NOZAKI Tomoharu, SHIRAI Yuji	87
9	Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer using Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS): Improvement of Purification Operation KATO Madoka, SHIRAI Yuji	99

10	Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS): Harmonized Collaborative Validation KATO Madoka, SHIRAI Yuji	109
11	Determination of PFOS and PFOA in Sludge Fertilizer using Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) SHIRAI Yuji, NUMAZAKI Kanako	123
< Investigation and Research >		
12	Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued Report)-Winter 2019 and Summer 2020- ASAO Naoki, MURAYAMA Kazuaki, MATSUO Shingo, KOZUKA Kenji, ABE Fumihiro	141
< Assurance Practices for Reliable Analytical Data >		
13	Results of Proficiency Testing for Fertilizer Using National Samples in Fiscal Year 2020 AKIMOTO Satono, YOSHIMOTO Masayuki, HIRABARA Toshio, AMANO Tadao, INOUE Tadashi, KOBORI Takuya, NUMAZAKI Kanako, HIKICHI Norio	162
14	Long-term Stability Evaluation of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements: High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-17), Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-14) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-12-2 and FAMIC-C-18-2) INOUE Tadashi, AOYAMA Keisuke, KAWAGUCHI Shinji, FUNAKI Norio, AKIMOTO Satono	186
< Note >		
15	Verification of stability of 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in Fertilizers FUNAKI Norio	210
16	Physiological disorder of Komatsuna - Boron - AOYAMA Keisuke	221

Annotation: The operation methods and terms used in this research report are described in accordance with "1. General rule 1.1 Common items (2) General matters in common, procedures and terms " in Testing Methods for Fertilizers (2020)

1 蒸留法におけるアンモニア性窒素の試料溶液の調製方法の改良

惠智 正宏¹, 小林 涼斗²

キーワード 肥料, アンモニア性窒素, 蒸留法, ホルムアルデヒド法, 単一試験室による妥当性確認

1. はじめに

肥料中のアンモニア性窒素の分析法として、肥料等試験法¹⁾には蒸留法とホルムアルデヒド法が収載されており、主だった肥料に対しては蒸留法が常用されるが、石灰窒素や尿素のような加熱により分解する化合物を含有する場合にはホルムアルデヒド法が用いられる。今般、有機物を含まない化成肥料において、蒸留法の分析値がホルムアルデヒド法の分析値と比較して有意な差をもって低くなることが認められた^{2, 3)}。ホルムアルデヒド法はアンモニウムの対イオンの酸を滴定する分析法の特性上、有機物を多量に含む肥料は、含有するアミノ酸などが滴定されて誤差となることから適用できず⁴⁾、また、ホルムアルデヒドが労働安全衛生法の特定化学物質等障害予防規則で定める特別管理物質⁵⁾に指定されていることから、ホルムアルデヒド法を多用することは避けるべきである。

今回、蒸留法について試料液の抽出方法を検討した結果、塩酸で抽出した試料溶液を蒸留法に使用する事で改善が図られた。この改良した分析法について単一試験室における妥当性 (SLV: Single Laboratory Validation)を確認したので概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

(1) 流通肥料

肥料生産工場等で製造された流通肥料から、アンモニア性窒素を含有する肥料 13 種類 23 点を使用した (Table 1)。固形肥料については、目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉砕機 (ZM100; Retsch 製) によりローター回転数 12000 rpm 程度で粉砕したものを分析用試料とし、液状肥料についてはそのまま分析用試料とした。この中から、各妥当性の確認項目ごとに肥料を選択して使用した。

Table 1 Commercial fertilizers and others

Ammonium sulfate	1	By-product compound fertilizer	1
Ammonium nitrate	1	Liquid compound fertilizer	2
Ammonium nitrate lime fertilizer	1	Mixed compost compound fertilizer	1
Mixed nitrogen fertilizer	1	Mixed sludge compound fertilizer	1
By-product botanical fertilizer	1	Magnesium ammonium phosphate	1
Compost	2	Composted sludge fertilizer	1
Chemical fertilizer	9		

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) 肥飼料安全検査部

(2) 調製肥料

定量下限及び検出下限の推定には、適切な低濃度のアンモニア性窒素を含有する肥料の入手が困難であったため、主要な肥料原材料に対応する JIS 規格に規定される試薬特級等を用いて調製した肥料(調製肥料)を作成した。アンモニア性窒素が窒素(N)として 0.2%(質量分率)及び 0.02%(質量分率)となるように硫酸アンモニアの使用量を調整し、さらに流通肥料の配合割合等を参考に他の試薬を配合した(Table 2)。なお、アンモニア性窒素 0.02%(質量分率)は低濃度の液状肥料を想定しているため、試薬を水に溶解して調製した。

Table 2 The preparation of analytical samples

Materials	The mixing ratio of the materials (%) ^{a)}	
	AN-0.2 % ^{a)}	AN-0.02 % ^{a)}
Ammonium sulfate	0.94	0.094
Calcium Hydrogen Phosphate Dihydrate	25.00	
Potassium Dihydrogen Phosphate		2.500
Dipotassium Hydrogenphosphate	5.00	
Potassium sulfate	15.00	2.500
Potassium chloride	15.00	
Calcium Sulfate Dihydrate	39.06	
Water		94.906
Total (%)	100.00	100.000

a) Mass fraction

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: Metrohm 814 USB Sample Processor
- (3) 上下転倒式回転振り混ぜ機: アドバンテック東洋 THM062FA
- (4) 垂直往復振とう機: タイテック SR2-W

3) 試薬の調製

(1) 水: 水精製装置(メルク Milli-Q Advantage A10)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 水酸化ナトリウム溶液: ISO/IEC 17025 対応容量分析用 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液(関東化学)

(3) 0.25 mol/L 硫酸: ISO/IEC 17025 対応容量分析用 0.25 mol/L 硫酸(富士フィルム和光純薬)

(4) 塩酸: JIS K 8180 精密分析用(富士フィルム和光純薬)

(5) 塩酸(1+23): 塩酸の体積 1 と水の体積 23 とを混合したもの。

(6) 塩酸(1+20): 塩酸の体積 1 と水の体積 20 とを混合したもの。

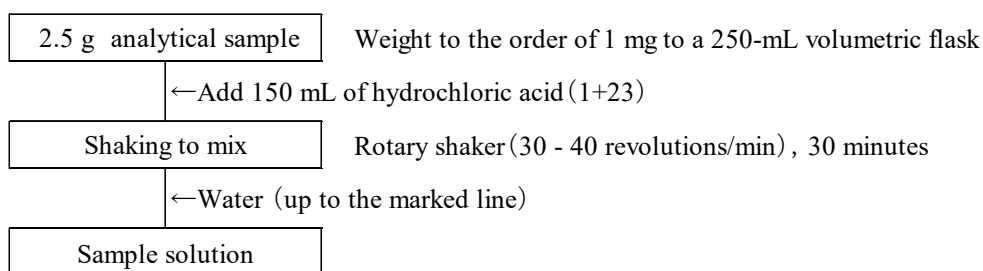
(7) くえん酸溶液: JIS K 8283 特級試薬 くえん酸一水和物(富士フィルム和光純薬) 20 g を水に溶かして 1000 mL とした。

(8) 水酸化ナトリウム溶液(200 g/L): JIS K 8576 特級試薬 水酸化ナトリウム(富士フィルム和光純薬) 100 g を水に溶かして 500 mL とした。

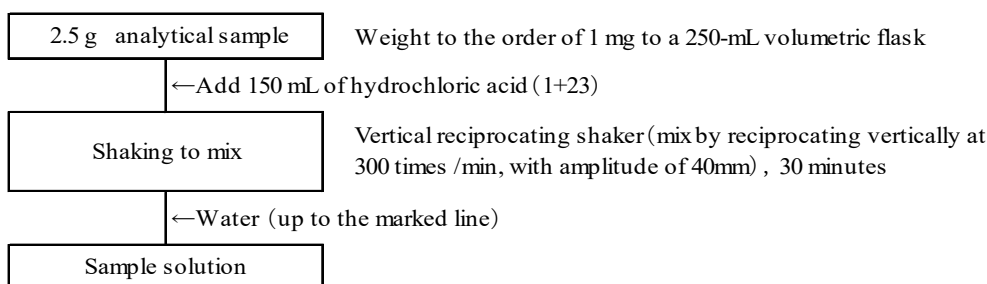
- (9) 酸化マグネシウム: JIS K 8432 特級試薬 (関東化学)
- (10) ホルムアルデヒド液: JIS K 8872 特級試薬 (富士フィルム和光純薬) 1 容量に対して水 1 容量を加えた。
- (11) 水酸化カリウム溶液: JIS K 8574 特級試薬 (関東化学) 170 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (12) 塩化アルミニウム(Ⅲ)六水和物: JIS K 8114 特級試薬 (関東化学)
- (13) メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL): JIS K 8896 特級試薬 メチルレッド(純正化学) 0.1 g を JIS K 8101 特級試薬 エタノール 99.5(関東化学) 100 mL に溶かした。
- (14) メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL): JIS K 8897 メチレンブルー(富士フィルム和光純薬) 0.1 g を JIS K 8102 特級試薬 エタノール 95(関東化学) 100 mL に溶かした。
- (15) 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。

4) 分析の方法

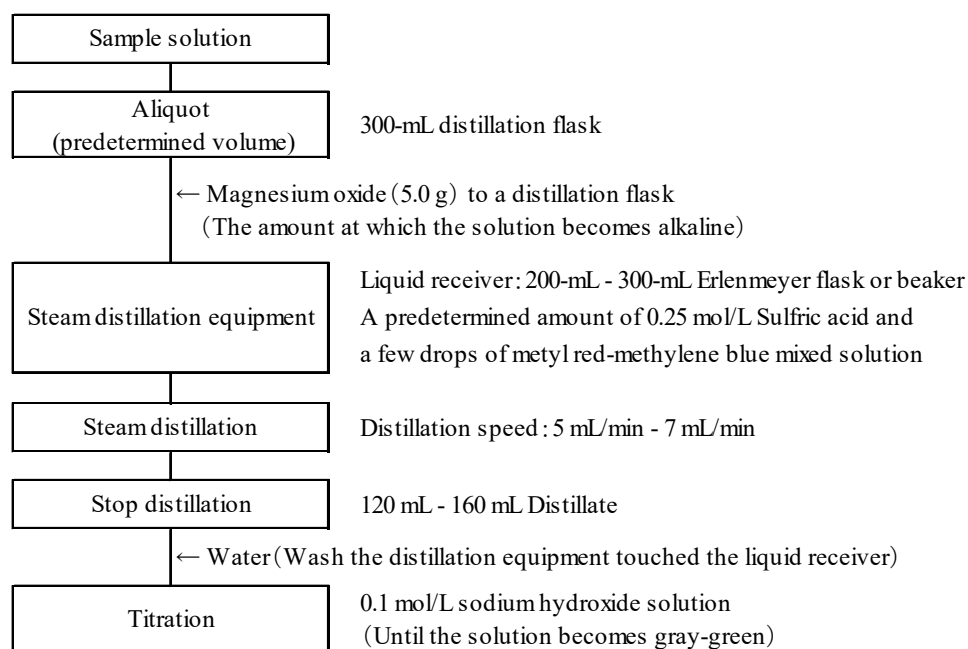
改良した蒸留法の測定フローを Scheme 1 に示した。試料の一定量(2.5 g)を全量フラスコ 250 mL にとり, 塩酸(1+23)を約 150 mL 加え, 上下転倒式回転振り混ぜ機(回転振とう機)(Scheme 1-1)又は垂直往復振とう機(縦型振とう機)(Scheme 1-2)で 30 分間抽出した後, 水を標線まで加えて試料溶液とした。試料溶液は蒸留フラスコに一定量採取し, 酸化マグネシウムを加えて蒸留を行い, 留出したアンモニアを 0.25 mol/L 硫酸で捕集した。この捕集液を電位差自動滴定装置により 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した(Scheme 1-3)。なお本報ではこれを塩酸抽出蒸留法と表記する。



Scheme 1-1 Flow sheet of ammoniac nitrogen in fertilizer (Extraction)



Scheme 1-2 Flow sheet of ammoniac nitrogen in fertilizer (Extraction)



Scheme 1-3 Flow sheet of ammoniac nitrogen in fertilizers

3. 結果及び考察

1) 抽出方法の検討について

平成30年度全国共通試料手合わせ分析³⁾において、蒸留法とホルムアルデヒド法の測定値に有意な差が認められた肥料(化成肥料①)を使用して、試料の抽出方法の異なった蒸留法とホルムアルデヒド法の分析結果を比較することにより蒸留法における効果的な抽出方法を検討した。

まず、蒸留法の抽出方法の検討として、試料を直接蒸留フラスコにはかりとり蒸留を行う方法(直接蒸留法)、試料を水で抽出した試料溶液を蒸留フラスコに分取して蒸留を行う方法(水抽出蒸留法)、試料を塩酸で抽出した試料溶液を蒸留フラスコに分取して蒸留を行う方法(塩酸抽出蒸留法)及び試料をくえん酸溶液で抽出した試料溶液を蒸留フラスコに分取して蒸留を行う方法(くえん酸抽出蒸留法)の4方法で検討を行った。抽出に使用する塩酸の濃度は、ホルムアルデヒド法の抽出方法で使用する塩酸(1+20)及びけい酸・石灰・重金属等の多様な分析法で使用している塩酸(1+23)とした。くえん酸溶液のくえん酸濃度は、く溶性成分の抽出で使用される濃度と同じ2%(質量分率)とした。直接蒸留法は、試料0.5gを1mgの桁まではかりとり、蒸留フラスコ300mLに入れScheme 1-3により蒸留・滴定を行った。塩酸抽出蒸留法は、Scheme 1-1により抽出を行い、Scheme 1-3により蒸留・滴定を行った。くえん酸抽出蒸留法は、く溶性成分の抽出方法(試料量1.0gを全量フラスコにはかりとり、くえん酸溶液約150mLを加えて1時間30℃加温条件下で抽出後、水を標線まで加えて試料溶液とする)の他に、試料量により分析値に差が生じるかを確認するため、Scheme 1-1に準じて試料量を2.5gとして同様に抽出を行って試料溶液とし、Scheme 1-3により蒸留・滴定を行った。結果は、ホルムアルデヒド法に対して直接蒸留法及び水抽出蒸留法の分析値が低く、一方で塩酸抽出蒸留法及びくえん酸抽出蒸留法の分析値は8.83%(質量分率)~8.94%(質量分率)であり、直接蒸留法及び水抽出蒸留法と比較して、ホルムアルデヒド法の分析値8.68%(質量分率)に近い結果であった(Table 3)。塩酸、くえん酸ともに試薬コストや廃液処理の手間は同等であるが、塩酸の方がより多くの試験室に普及していると考えられる。また、既存のく溶性成分の抽出方法に分析法を揃えた場合、塩酸抽出蒸留法と比べて作業効率が劣る。従って抽出液を塩酸とし、濃度は肥料等試験法¹⁾で多く用いられている塩酸(1+23)とした。使用する抽出機器は回転振とう機の他、肥料以外の分

析で用いられている汎用的な機器として縦型振とう機への代替要望が寄せられており、他成分においても妥当性確認が行われている⁶⁾ことから、縦型振とう機も使用して同時に分析法の妥当性確認を行った。

Table 3 Comparison of values in various ammonia analysis methods

Measurement conditions and values	Distillation method					Formaldehyde method	
	Direct distillation	Water extraction	Hydrochloric acid(1+23) extraction	Hydrochloric acid(1+20) extraction	Critic acid extraction		
Sampling size (g)	0.5	2.5	2.5	2.5	1.0	2.5	5.0
Flask volume (ml)	-	250	250	250	250	250	500
Shaking time (min.)	-	30	30	30	60	60	30
Aliquot (ml)	-	50	50	50	100	50	10
Measured Values (%) ^{a)}	8.21	7.67	8.94	8.88	8.88	8.83	8.68

a) Mass fraction

2) 真度の評価

(1) 肥料認証標準物質による真度の確認

塩酸抽出蒸留法の真度を確認するため、肥料認証標準物質 A 高度化成肥料 (FAMIC-A-17) を使用して、回転振とう機による抽出及び縦型振とう機による抽出により 3 点併行でアンモニア性窒素を分析した (Table 4)。その分析値の平均値は、回転振とう機による抽出 11.68 % (質量分率)、縦型振とう機による抽出 11.81 % (質量分率) であり、FAMIC-A-17 の認証値の警戒限界の範囲以内 (11.36 % (質量分率) ~ 12.08 % (質量分率)) であり、肥料等試験法¹⁾における認証標準物質を用いた真度の規準を満たした。

Table 4 The estimation of trueness using certified reference material (FAMIC-A-17)

Sample	Rotary shaker extraction		Vertical shaker extraction		Certified value	Warning limit	
	Value ^{a)}	Relative standard deviation	Value ^{a)}	Relative standard deviation		lower limit	upper limit
	(%) ^{b)}	(%)	(%) ^{b)}	(%)		(%) ^{b)}	(%) ^{b)}
FAMIC-A-17	11.68	2.18	11.81	0.22	11.72	11.36	12.08

a) Mean (n=3)

b) Mass fraction

(2) 方法間比較による評価

Table 1 の肥料 23 点について、塩酸抽出蒸留法と既存法 (蒸留法及びホルムアルデヒド法) の分析値から得られた相関並びに回帰直線の周囲に 95 % 予測区間を描き Figure 1 に示した。なお、有機物を多量に含む肥料はホルムアルデヒド法の適用外であることから、ホルムアルデヒド法との比較では該当する肥料を評価から除外して 13 点を使用した。その結果は肥料等試験法¹⁾における推奨基準を満たしており、塩酸抽出蒸留法は既存法と同等の分析値を得られることが確認された。また、蒸留法の分析値がホルムアルデヒド法に対して低かった試料は、塩酸抽出蒸留法と蒸留法との比較においても蒸留法が有意に低い分析値となり、塩酸抽出蒸留法とホルムアルデヒド法との比較では同等の分析値となったことから、塩酸抽出蒸留法は一部の化成肥料で認められた分析法に起因する分析値の差異を解消すると考えられた (Table 5)。

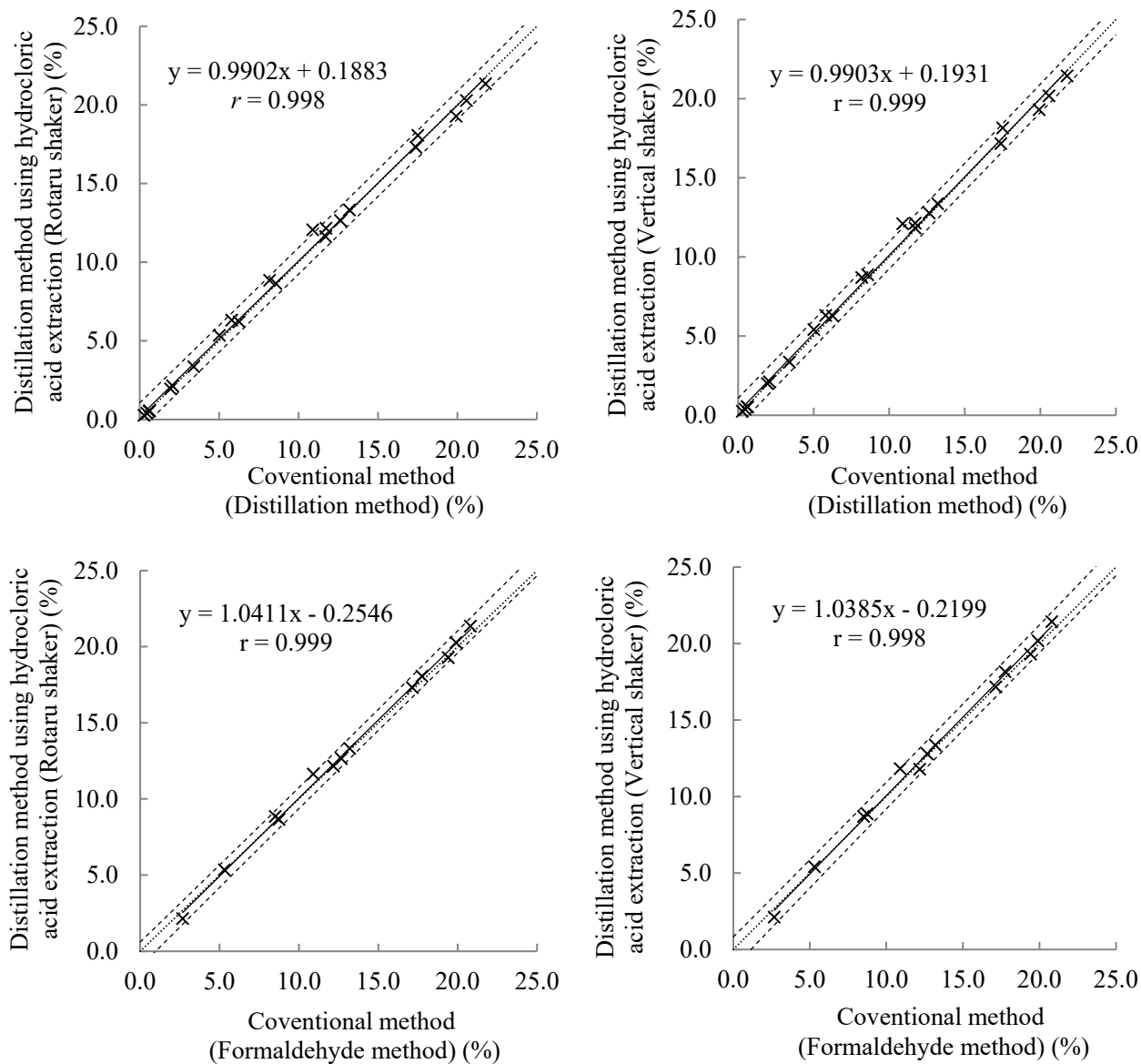


Figure 1 The comparison of analytical value by Distillation method using hydrochloric acid and Conventional method

Heavy line : Regression line

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

Thin line : $y=x$

% : Mass fraction

Table 5 The comparison of analytical values of ammonium methods (% (Mass fraction))

Sample	Conventional method		Distillation method using hydrochloric acid extraction	
	Distillation method	Formaldehyde method	Rotary shaker	Vertical shaker
Chemical fertilizer ① ^{a)}	8.18	8.51	8.85	8.70
Chemical fertilizer ② ^{b)}	17.51	18.05	18.07	18.15
Chemical fertilizer ③ ^{c)}	11.72	12.18	12.15	12.14

a) Proficiency testing sample of fertilizer in fiscal year 2018

b) Ammonium phosphate, the measured value of the Distillation method is lower than the Formaldehyde method

c) Proficiency testing sample of fertilizer in fiscal year 2016

3) 併行精度及び中間精度の評価

塩酸抽出蒸留法の併行精度及び中間精度を評価するため、9点の流通肥料を用いて各肥料2点併行で日を変えて5回分析を行った(Table 6)。その結果から、一元配置分散分析を行って算出した併行精度及び中間精度をTable 7に示した。いずれの相対標準偏差も肥料等試験法¹⁾に示される併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の許容範囲以内であり、十分な精度を有することが確認された。

なお、使用した肥料は、過去に方法間差が認められた肥料(化成肥料①及び化成肥料②)、ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む肥料(化成肥料④)、グルタミン酸製造工程から副産された肥料(副産複合肥料)及び鶏ふん堆肥を主要原料とする肥料(混合堆肥複合肥料)等、分析対象以外の物質(マトリックス)による影響を評価する観点から多様な原材料の肥料を選定した。汚泥発酵肥料は、法令上アンモニア性窒素の測定は必要ではないが、各種有機質資材は一定量の無機態窒素を含有しており⁷⁾、今後の肥料規制緩和による有機質資材の利用促進を想定して、より多様なマトリックスによる影響評価の観点から検討に使用した。

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

Test day	1		2		3		4		5	
(Rotary shaker extraction)										
Ammonium sulfate	20.87	20.43	20.90	20.53	20.35	20.90	19.94	20.47	20.04	20.81
By-product botanical fertilizer	0.52	0.54	0.52	0.50	0.57	0.56	0.52	0.51	0.54	0.53
Chemical fertilizer ① ^{a)}	8.81	8.78	8.84	8.92	8.86	8.96	8.81	8.80	8.87	8.81
Chemical fertilizer ② ^{b)}	17.21	17.57	17.70	17.74	17.69	17.55	17.68	17.62	17.60	17.57
Chemical fertilizer ④	2.14	2.15	2.23	2.18	2.17	2.20	2.13	2.19	2.13	2.18
Magnesium ammonium phosphate	5.43	5.45	5.18	5.34	5.35	5.35	5.29	5.42	5.35	5.37
Mixed compost compound fertilizer	11.79	11.47	12.07	11.79	11.76	11.86	11.73	11.75	11.69	11.70
By-product compound fertilizer	8.85	8.45	9.13	8.97	8.88	8.86	8.85	8.86	8.78	8.87
Composted sludge fertilizer	2.17	2.13	2.09	2.10	2.06	2.09	2.06	2.07	2.03	2.06
(Vertical shaker extraction)										
Ammonium sulfate	20.53	20.79	20.67	21.01	20.85	20.75	20.88	20.93	20.67	20.85
By-product botanical fertilizer	0.54	0.55	0.49	0.51	0.51	0.47	0.50	0.52	0.60	0.59
Chemical fertilizer ① ^{a)}	8.90	8.81	8.69	8.96	8.19	8.89	8.77	8.37	8.85	8.55
Chemical fertilizer ② ^{b)}	17.56	17.44	17.62	17.60	17.36	17.17	17.69	17.64	17.61	17.48
Chemical fertilizer ④	2.18	2.06	2.23	2.23	2.18	2.19	2.13	2.18	2.14	2.00
Magnesium ammonium phosphate	5.32	5.35	5.44	5.46	5.37	5.47	5.41	5.43	5.40	5.41
Mixed compost compound fertilizer	11.81	11.84	12.10	12.13	11.86	11.77	11.68	11.73	11.66	11.47
By-product compound fertilizer	8.83	8.92	9.16	9.03	8.80	8.76	8.64	8.85	8.83	8.87
Composted sludge fertilizer	2.12	2.12	2.10	2.01	2.08	2.06	2.07	2.09	2.06	2.05

a) A proficiency testing sample of fertilizer analytical laboratories in fiscal year 2018

b) Ammonium phosphate, the measured value of the Distillation method is lower than the Formaldehyde method

Table 7 Statistical analysis of repetition test result for evaluating precision

Sample	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability precision			Intermediate precision		
		s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	$s_{I(T)}$ ^{f)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)}	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(Rotary shaker extraction)							
Ammonium sulfate	20.52	0.388	1.9	1.5	0.388	1.9	2.5
By-product botanical fertilizer	0.53	0.008	1.4	3.0	0.023	4.3	4.5
Chemical fertilizer①	8.85	0.046	0.5	2.0	0.059	0.7	3.5
Chemical fertilizer②	17.59	0.125	0.7	1.5	0.152	0.9	2.5
Chemical fertilizer④	2.17	0.031	1.4	2.0	0.031	1.4	3.5
Magnesium ammonium phosphate	5.35	0.066	1.2	2.0	0.079	1.5	3.5
Mixed compost compound fertilizer	11.76	0.139	1.2	1.5	0.150	1.3	2.5
By-product compound fertilizer	8.85	0.140	1.6	2.0	0.174	2.0	3.5
Composted sludge fertilizer	2.09	0.019	0.9	2.0	0.042	2.0	3.5
(Vertical shaker extraction)							
Ammonium sulfate	20.79	0.151	0.7	1.5	0.151	0.7	2.5
By-product botanical fertilizer	0.53	0.018	3.4	3.0	0.044	8.4	4.5
Chemical fertilizer①	8.70	0.287	3.3	2.0	0.287	3.3	3.5
Chemical fertilizer②	17.52	0.084	0.5	1.5	0.165	0.9	2.5
Chemical fertilizer④	2.15	0.060	2.8	2.0	0.075	3.5	3.5
Magnesium ammonium phosphate	5.41	0.034	0.6	2.0	0.049	0.9	3.5
Mixed compost compound fertilizer	11.81	0.068	0.6	1.5	0.207	1.8	2.5
By-product compound fertilizer	8.87	0.085	1.0	2.0	0.149	1.7	3.5
Composted sludge fertilizer	2.08	0.030	1.4	2.0	0.034	1.6	3.5

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

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability precision (repeatability relative standard deviation)

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

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

4) 定量下限及び検出下限の推定

Table 2 の調製肥料を使用して、塩酸抽出蒸留法で 7 点併行分析を実施した (Table 8) . 定量下限は「(標準偏差)×10」式、検出下限は「(標準偏差)×2× $t(n-1,0.05)$ 」式を用いて算出した. その結果、固形の調製肥料 (AN-0.2 %) を使用した、回転振とう機による抽出の定量下限は 0.07 % (質量分率) 程度、検出下限は 0.03 % (質量分率) 程度、縦型振とう機による抽出の定量下限は 0.03 % (質量分率) 程度、検出下限は 0.01 % (質量分率) 程度であった. また、液状の調製肥料 (AN-0.02 %) における回転振とう機による抽出の定量下限は 0.003 % (質量分率) 程度、検出下限は 0.001 % (質量分率) 程度、縦型振とう機による抽出の定量下限は 0.005 % (質量分率) 程度、検出下限は 0.002 % (質量分率) 程度であった. 公定規格⁸⁾ において、普通肥料 (家庭園芸用複合肥料を除く) の含有すべき主成分及び肥料の品質の確保等に関する法律施行規則⁹⁾ に定める指定混合肥料 (家庭園芸用肥料を除く) の保証成分の最小量は、アンモニア性窒素として質量分率 1.0 % である. また、家庭園芸用複合肥料の含有すべき主成分及び指定混合肥料 (家庭園芸用肥料に限る) の保証成分の最小量は、アンモニア性窒素として質量分率 0.1 % である. 従って塩酸抽出蒸留法は、流通する肥料のアンモニア性窒素の含有量を確認するための分析法として十分な定量下限を有することを確認した.

Table 8 Calculated *LOQ* and *LOD* values

Sample	Design component (%) ^{d)}	Mean ^{a)} (%) ^{d)}	Standard deviation (%) ^{d)}	<i>LOQ</i> ^{b)} (%) ^{d)}	<i>LOD</i> ^{c)} (%) ^{d)}
(Rotary shaker extraction)					
Preparation sample AN-0.2 %	0.2	0.218	0.007	0.068	0.033
Preparation sample AN-0.02 %	0.02	0.019	0.0003	0.003	0.001
(Vertical shaker extraction)					
Preparation sample AN-0.2 %	0.2	0.200	0.003	0.027	0.013
Preparation sample AN-0.02 %	0.02	0.020	0.0005	0.005	0.002

a) Mean value (n=7)

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

d) Mass fraction

4. まとめ

肥料中のアンモニア性窒素の分析において、蒸留法がホルムアルデヒド法と比較して有意な差をもって分析値が低くなることが認められたことから、蒸留法の改良を行い、改良した分析法について単一試験室における妥当性確認を実施したところ、次のとおり分析法として十分な性能を有していることを確認した。

(1) 塩酸及びくえん酸抽出液を蒸留したところ、ホルムアルデヒド法と同等の分析値を得たことから、試験の効率性等を考慮して塩酸(1+23)を抽出液とした。

(2) 真度は認証標準物質を使用する方法と方法間比較による方法の 2 つの方法により確認し、評価を行った。FAMIC-A-17 を使用して真度を確認したところ、分析値の平均値 (n=3) は認証値の警戒限界範囲以内であり、肥料等試験法における認証標準物質を用いた真度の規準を満たした。また、流通肥料 23 点により、塩酸抽出蒸留法と既存法(蒸留法及びホルムアルデヒド法)の分析値を回帰分析したところ、肥料等試験法の推奨基準を満たしており、塩酸抽出蒸留法により既存法と同等の分析値を得られることが確認された。

(3) 中間精度及び併行精度を評価するため、流通肥料 9 点を各 2 点併行で日を変えて 5 回分析を行い、いずれも肥料等試験法が示す併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の許容範囲以内であり、塩酸抽出蒸留法は十分な精度を有することが確認された。

(4) 定量下限及び検出下限の推定用試料を調製し、塩酸抽出蒸留法により 7 点併行分析を実施したところ、定量下限は、回転振とう機による抽出液を用いる場合は固形肥料で 0.07 % (質量分率) 及び液状肥料で 0.003 % (質量分率) 程度であり、縦型振とう機による抽出液を用いる場合は固形肥料で 0.03 % (質量分率) 及び液状肥料で 0.005 % (質量分率) 程度と推定され、十分な定量下限を有することが確認された。

文 献

1) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法 (2020)

<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf>

2) 伊藤浩平, 藤田敏史, 千田正樹, 鈴木孝一郎, 筒井久司, 松尾信吾, 八木啓二, 五十嵐総一, 白井裕治, 今川俊明: 2016 年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **10**, 141~167 (2017)

- 3) 加藤まどか, 義本将之, 惠智正宏, 山岡孝生, 神川孝文, 平田絵理香, 白井裕治, 引地典雄: 2018 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, **12**, 136~159 (2019)
- 4) 佐藤内匠, 蜷木翠: Formol 法による肥料中のアンモニア性窒素の定量についての研究, 農業技術研究所報告. B, 土壤肥料, **7**, 1-29 (1957)
- 5) 厚生労働省令: 特定化学物質障害予防規則, 昭和 47 年 9 月 30 日労働省令第 39 号, 最終改正令和 3 年 1 月 26 日, 厚生労働省令第 12 号 (2021)
- 6) 川口伸司, 汎用的な機器を用いた固形肥料中の水溶性主成分の抽出方法, 肥料研究報告, **10**, 1~8 (2017)
- 7) 古賀伸久, 新美洋, 井原 啓貴, 山口典子, 山根剛, 草場敬: 各種有機質資材における酸性デタージェント可溶有機態窒素含量-資材ごとの特徴および C/N 比との関係-, 日本土壤肥料学雑誌, **90**, 107-115 (2019)
- 8) 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, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1010 号 (2021)
- 9) 農林水産省令: 肥料の品質の確保等に関する法律施行規則, 昭和 25 年 6 月 20 日, 農林省令第 64 号, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省令第 38 号 (2021)

Improvement of Method for Preparing Sample Solution of Ammoniac Nitrogen by Distillation Method

ECHI Masahiro¹, KOBAYASHI Ryoto²

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

² FAMIC, Sendai Regional Center

(Now) FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department

For some fertilizers, we confirmed that measured value of ammoniac nitrogen by distillation method had lower than that by formaldehyde method. Therefore, we improved the distillation method to an extraction process using hydrochloric acid. Considering efficiency of the test, we selected the extract solution mixed hydrochloric acid with water at a ratio of 1:23. As a single-laboratory, we validated the distillation method to extract by hydrochloric acid. We verified and evaluated the accuracy by two ways. The one was that we confirmed the mean of measured value within our management range using a certified reference material (CRM): high-analysis compound fertilizer (FAMIC-A-17). The other was that the measured value of distillation method equal to an existence method using 23 fertilizers, satisfying recommended reference by Testing Methods for Fertilizers. Repetition test was analyzed the 9 fertilizers. The reproducibility relative standard deviation (RSD_r) and the intermediate relative standard deviation ($RSD_{I(T)}$) indicated the method had acceptable precision for the analysis. The lower limit of quantitation and the lower limit of detection were estimated the 7 replicate measurements using of preparation samples. The limit of quantitative value (LOQ) for solid fertilizer were 0.07 % (by a rotary shaker) and 0.03 % (by a vertical shaker), respectively. This extraction method are valid for the determination of the ammoniac nitrogen in the fertilizers.

Key words fertilizer, ammoniac nitrogen, distillation method, formaldehyde method, single-laboratory method validation

(Research Report of Fertilizer, **14**, 1-11, 2021)

2 フェノール硫酸法における硝酸性窒素の試料溶液調製方法の改良

白澤 優子¹, 加藤 公栄¹

キーワード 上下転倒式回転振り混ぜ機, 垂直往復振とう機, 硝酸性窒素, 肥料, 単一試験室による妥当性確認

1. はじめに

肥料中の硝酸性窒素分析法は肥料等試験法¹⁾の中では上下転倒式回転振り混ぜ機を用いる方法が抽出操作方法として記載されている。肥料等試験法に収載のある恒温上下転倒式回転振り混ぜ機や上下転倒式回転振り混ぜ機による抽出方法は肥料以外の分析法には使用されていないこと, 更に当該装置が特注品であることから, 肥料業者や分析機関など各方面より, これらを使用しない抽出方法の確立について要望が寄せられている。

独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) では, 近年回転振り混ぜ機を用いない抽出方法の検討を進めており, 水溶性主成分の簡易抽出方法 (液状肥料に適用)²⁾, 同じく水溶性主成分の垂直往復振とう機を用いた抽出方法 (固形肥料に適用)³⁾, 水溶性主成分の水平往復振とう恒温水槽を用いた抽出方法⁴⁾, 可溶性けい酸の水平往復振とう恒温水槽を用いた抽出方法 (鉍さいけい酸質肥料に適用)⁵⁾, 及び水溶性けい酸の簡易抽出方法⁵⁾についての検討が行われ, いずれも分析法としての妥当性が確認された。本年は引き続き, 肥料等試験法に収載されている硝酸性窒素の抽出方法について上下転倒式回転振り混ぜ機を使用しない方法について検討したので, その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

本検討では今般の肥料法制度の改正見直し内容を踏まえ, 分析用試料として硝酸性窒素を保証している肥料の他, 硝酸性窒素を含有しているが保証しておらず比較的有機質の多い肥料を事前に分析して探索し, 該当した堆肥 1 銘柄を分析用試料に含めた。

固形肥料についてはいずれも肥料生産工場等で製造された流通している肥料 (流通肥料) として硝酸ソーダ, 硝酸石灰, 化成肥料, 被覆複合肥料, 配合肥料及び堆肥を, 目開き 500 μm のふるいを全通するまで粉碎 (ZM200; Retsch 製) したものをを用いた。また, 液状肥料については同様に流通している液状窒素肥料, 液状複合肥料, 家庭園芸用複合肥料 (液状肥料) をを用いた。

定量下限及び検出下限の推定には, 適切な低濃度の硝酸性窒素を含有する肥料の入手が困難であったため, 主要な肥料原材料に対応する JIS 規格に規定される試薬特級等を用い, 過去に実施した硝酸性窒素試験法の性能調査⁶⁾から, 流通肥料の配合割合を参考に Table 1 のとおり, 試薬を配合・混合して調製した肥料を用いた。

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

Table 1 The preparation of analytical samples

Materials	The mixing ratio of the materials (%) ^{a)}
	NN-0.02 % ^{a)}
Sodium nitrate	0.121
Potassium Dihydrogen Phosphate	2.500
Potassium sulfate	2.500
Water	94.879
Total (%)	100

a) Mass fraction

2) 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) 硝酸塩標準液(N-N 5 mg/mL)：硝酸カリウム(メルク, 試薬純度 99.995 %(質量分率))を 110 °C で 1 時間以上加熱し, デシケーター中で放冷した後, 36.09 g をひょう量皿にはかりとった。少量の水で溶かし, 全量フラスコ 1000 mL に移し入れ, 標線まで水を加えた。

(3) 硝酸塩標準液(N-N 0.01 mg/mL)：硝酸塩標準液(N-N 5 mg/mL)の一定量を水で希釈し, 硝酸塩標準液(N-N 0.01 mg/mL)を調製した。

(4) 硫酸銅－硫酸銀溶液：JIS K 8983 に規定する硫酸銅(II)五水和物(関東化学, 特級)5 g を水 900 mL に溶かし, JIS K 8965 に規定する硫酸銀(富士フィルム和光純薬, 特級)4 g を加えて溶かした後, 1000 mL とした。

(5) フェノール硫酸：JIS K 8798 に規定するフェノール(関東化学, 特級)15 g を JIS K 8951 に規定する硫酸(関東化学, 特級)100 mL に溶かし, 80 °C~100 °C の水浴中で 2 時間加熱し, 放冷した。

(6) アンモニア水：JIS K 8085 に規定する特級(関東化学, NH₃ 28 %(質量分率))。

(7) 水酸化カルシウム：JIS K 8575 に規定する特級(関東化学)。

(8) 塩基性炭酸マグネシウム：関東化学, 鹿特級。

3) 器具及び装置

(1) 電子天びん：エー・アンド・デイ GR-202, メラー・トレド MS303-S

(2) 上下転倒式回転振り混ぜ機：池田理化 EFN00-KT

(3) 垂直往復振とう機：タイテック SR-2DW

(4) 水浴槽：ヤマト科学 BM-41

(5) 分光光度計：島津製作所 UV-1800

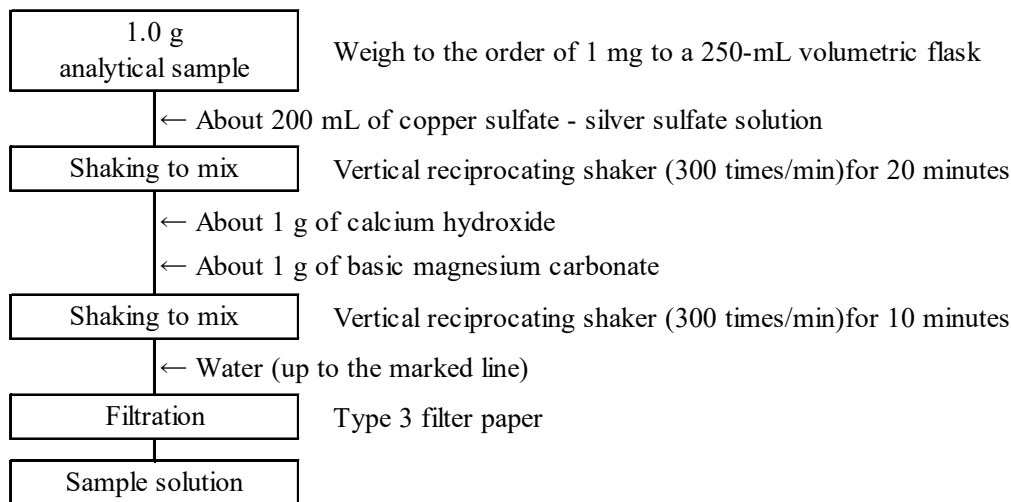
4) 分析操作

固形肥料と液状肥料については試料 1.0 g を 250 mL 全量フラスコにはかりとり, 硫酸銅－硫酸銀溶液約 200 mL を加え, 垂直往復振とう機で 20 分間振り混ぜ, 水酸化カルシウム約 1 g, 塩基性炭酸マグネシウム約 1 g を

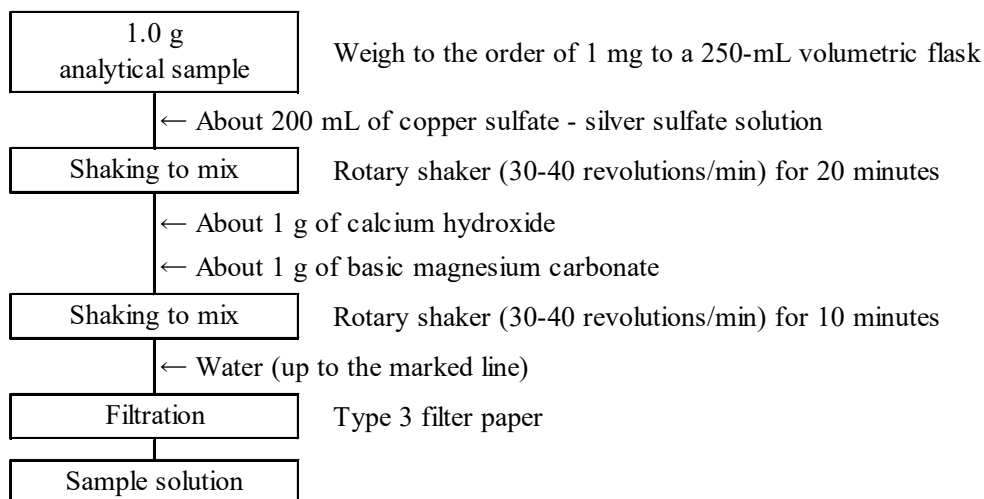
加え垂直往復振とう機で 10 分間振り混ぜた後、水で定容し、ろ紙 3 種でろ過し試料溶液とした (Scheme 1)。また、方法間比較による真度の評価に使用した従来の上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出手順を Scheme 2 に示した。

一方、液状肥料の試料液調製については試料 0.4 g を 100 mL 全量フラスコにはかりとり、硫酸銅－硫酸銀溶液約 80 mL を加え振り混ぜた後、水酸化カルシウム約 0.4 g, 塩基性水酸化マグネシウム約 0.4 g を加え、振り混ぜた後水で定容し、ろ紙 3 種でろ過し、簡易抽出(手振り混ぜ)についても検討した (Scheme 3)。

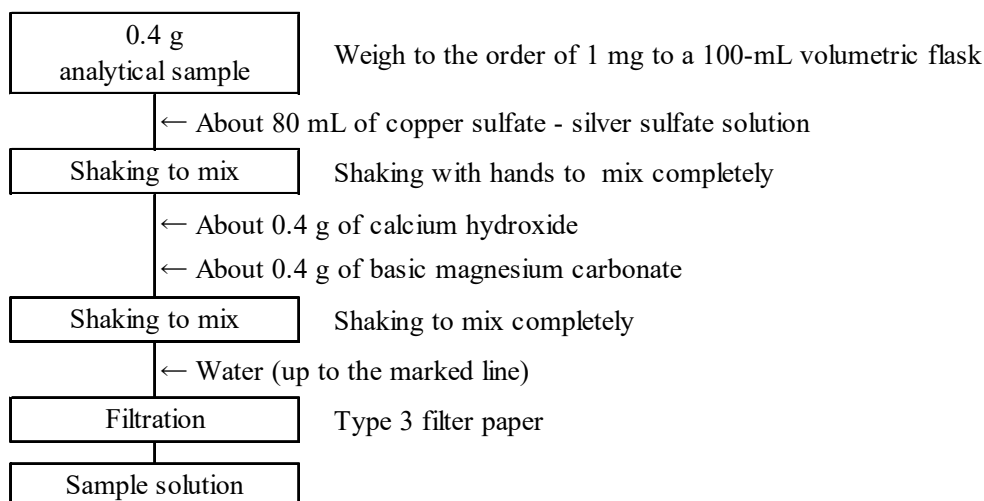
これらの試料溶液について、硝酸性窒素 (N-N) は Scheme 4 の手順でそれぞれ測定した。



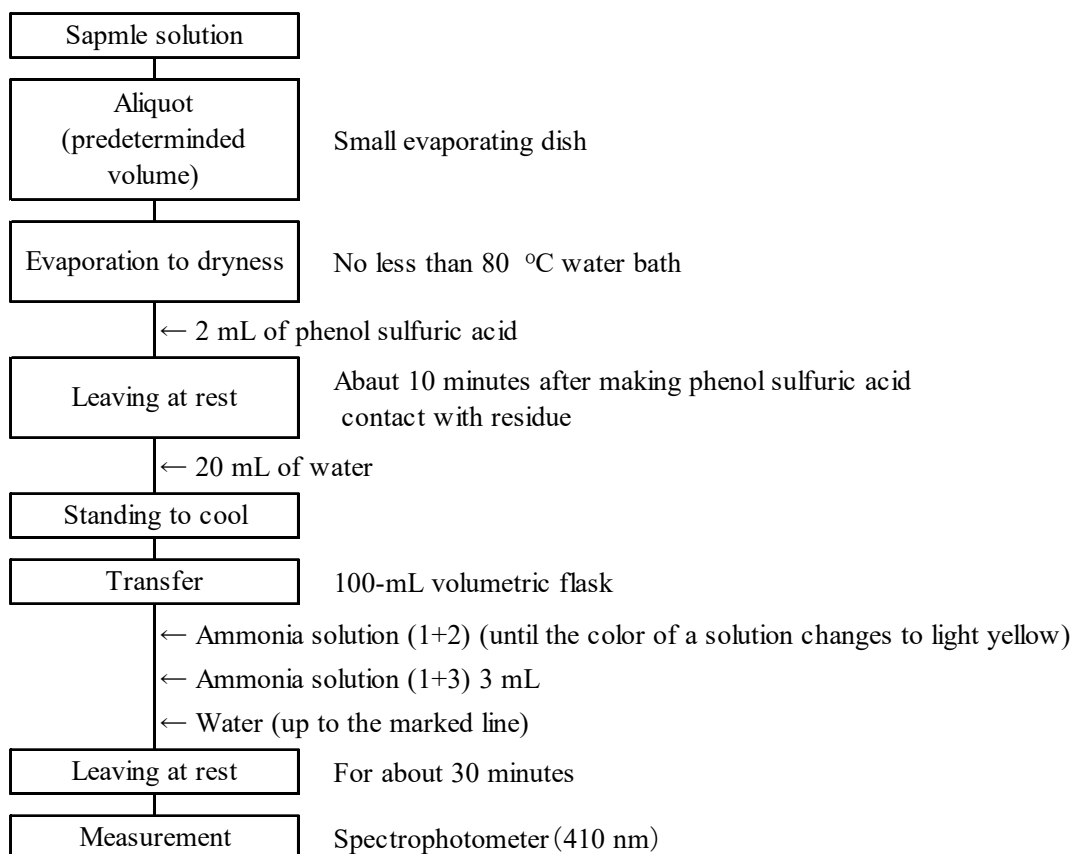
Scheme 1 The flow sheet of extraction procedure using vertical reciprocating shaker



Scheme 2 The flow sheet of extraction procedure using rotary shaker that can a 250-mL volumetric flask upside down



Scheme 3 Simple extraction procedure (Shaking to mix completely)



Scheme 4 Flow sheet for nitrate nitrogen in fertilizers

3. 結 果

1) 垂直往復振とう機の機器条件の確認

硝酸性窒素 (N-N) の抽出に使用する垂直往復振とう機の機器条件を検討した。往復回数, 振り幅が分析試料の沈殿・フラスコへの固着に影響を与えることは, 今回の検討と抽出溶媒や試薬及び測定対象成分は異なる

が、過去に杉村⁴⁾や八木ら⁵⁾により確認されていることから、機器条件の分析結果への影響を確認した。

現行の肥料等試験法¹⁾では、抽出時に分析試料、硫酸銀－硫酸銅溶液、水酸化カルシウム及び塩基性炭酸マグネシウムを順に全量フラスコへ添加していき上下転倒式回転振り混ぜ機により振り混ぜることによって、その中身を混合している。今回の検討では、垂直往復振とう機を用いて 1 分あたりの往復回数が全量フラスコ内の混合や分析試料・抽出溶媒・各試薬に由来する沈殿物の生成状況を確認し、分析結果へ影響を与えるか確認を行った。化成肥料、家庭園芸用複合肥料、液状窒素肥料を用いて、1 分あたりの往復回数を 225 回～300 回までの幅で変更し、硝酸性窒素について定量した結果を Table 2 に示した。1 分あたりの往復回数が 275 回～300 回では全量フラスコへの沈殿物生成が認められず、分析結果への影響がなかった。

この結果から水溶性成分と同時に抽出操作が行われることも想定し、今回の検討においても垂直往復振とう機の往復回数を水溶性成分の抽出操作と同様に 300 回/分とすることとした。

Table 2 Relation between the precipitated situation in test sample and reagent chemicals, quantitative value and shaking frequency

Shaking frequency (times/min)	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2	
	Quantitative value of N-N (%)	precipitated situation ^{d)}	Quantitative value of N-N (%)	precipitated situation
300	16.17 (100.9) ^{c)}	unformed	4.71 (101.7)	unformed
275	15.76 (98.3)	unformed	4.76 (102.7)	unformed
250	16.00 (99.8)	formed	4.77 (102.9)	formed
225	15.77 (98.4)	formed	4.58 (98.8)	formed

a) Mean value (n=3)

b) Mass fraction (%)

c) The comparison of recovery rate, the validated test method with new one (%)

d) By visual check

Table 2 Continue

Shaking frequency (times/min)	Home garden-use mixed fertilizer		Liquid nitrogen fertilizer	
	Quantitative value of N-N (%)	precipitated situation	Quantitative value of N-N (%)	precipitated situation
300	1.02 (105.0)	unformed	7.58 (100.1)	unformed
275	0.98 (100.9)	unformed	7.63 (100.7)	unformed
250	1.00 (103.6)	formed	7.59 (100.2)	formed
225	0.98 (101.6)	formed	7.57 (100.0)	formed

2) 簡易抽出(手振り混ぜ)の条件の確認

1)と同様に液状の肥料について、他の成分(液状肥料を対象)分析における検討と同様に、簡易抽出(手振り混ぜ)方法の適用を確認するため、簡易抽出(手振り混ぜ)による全量フラスコへの沈殿物の生成状況及び分析値への影響を確認した。液状窒素肥料、液状複合肥料、家庭園芸用複合肥料を用いて抽出操作を行い検討した結果を Table 3 に示した。分析試料、硫酸銅-硫酸銀溶液、水酸化カルシウム、塩基性炭酸マグネシウム由来の沈殿がなく完全に分散している状態まで、少なくとも5回程度振り混ぜた後に一度上下に転倒させて、その操作を10回程度繰り返して目視で完全に混ざるまで振り混ぜて簡易抽出を行った結果、全量フラスコへの沈殿物の生成は認められず、分析結果に影響はなかった。

さらに、垂直往復振とう機の機器条件及び簡易抽出による抽出状況を確認するため、液状複合肥料(外部精度管理試験試料)⁷⁾を用いて、硝酸性窒素(N-N)について定量した結果を Table 4 に示した。いずれもzスコアの絶対値が2以下であったことから、これらの抽出条件を用いて妥当性確認を行うこととした。

Table 3 Relation between the precipitated situation in test sample and reagent chemicals, and quantitative value

Liquid nitrogen fertilizer		Liquid compound fertilizer 1	
Quantitative value of N-N ^{a)} (%) ^{b)}	precipitated situation ^{d)}	Quantitative value of N-N (%)	precipitated situation
7.40 (97.7) ^{c)}	unformed	3.70 (99.4)	unformed

a) Mean value (n=3)

b) Mass fraction (%)

c) The comparison of recovery rate, the validated test method with new one (%)

d) By visual check

Table 3 Continue

Liquid compound fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer	
Quantitative value of N-N (%)	precipitated situation	Quantitative value of N-N (%)	precipitated situation
1.34 (96.6)	unformed	0.96 (99.0)	unformed

Table 4 Aptitude test result for equipment condition

Sample	Quantitative value of N-N ^{a)} (%) ^{b)}	Standard deviation (%) ^{b)}	Median (%) ^{b)}	z-score
Liquid mixed fertilizer ^{c)}	1.28 ^{d)}	0.02	1.29 ^{e)}	-0.51
	1.29 ^{f)}	0.01		0.14

a) Mean value (n=3)

b) Mass fraction

c) Proficiency testing sample of fertilizer in fiscal year 2015

d) Extraction method: using vertical reciprocating shaker at 300 times/min

e) Extraction method: using an upside down rotary shaker at 30-40 revolutions/min (Validated test method)

f) Extraction method: simple extraction method (Shaking to mix completely)

3) 方法間比較による真度の評価

硝酸性窒素(N-N)について、試料 21 点(固形肥料と液状肥料)を用いて、上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出法と垂直往復振とう機を用いた本法との分析値の相関並びに本法の 95 %予測区間を回帰直線の周囲に描き Figure 1 に示した。

硝酸性窒素(N-N) ($y=0.9995x+0.0059$, $r=1.000$)の傾きの 95 %信頼区間は 0.992~1.007, 切片の 95 %信頼区間は-0.060~0.072 であった。

また、試料 14 点(液状肥料のみ)を用いて、上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出法と簡易抽出法との分析値の相関並びに本法の 95 %予測区間を回帰直線の周囲に描き Figure 2 に示した。

硝酸性窒素(N-N) ($y=0.9967x-0.0098$, $r=1.000$)の傾きの 95 %信頼区間は 0.992~1.001, 切片の 95 %信頼区間は-0.030~0.010 であった。

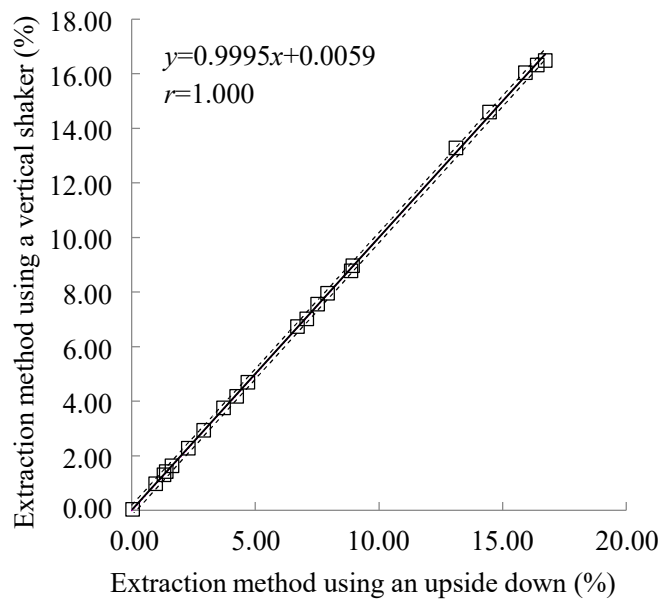


Figure 1 Comparison of extraction method using an upside down rotary shaker and a reciprocating one
 Heavy line: Regression line
 Dotted lines: Upper and lower limit of 95 % prediction interval
 Thin line: $y=x$
 % : Mass fraction

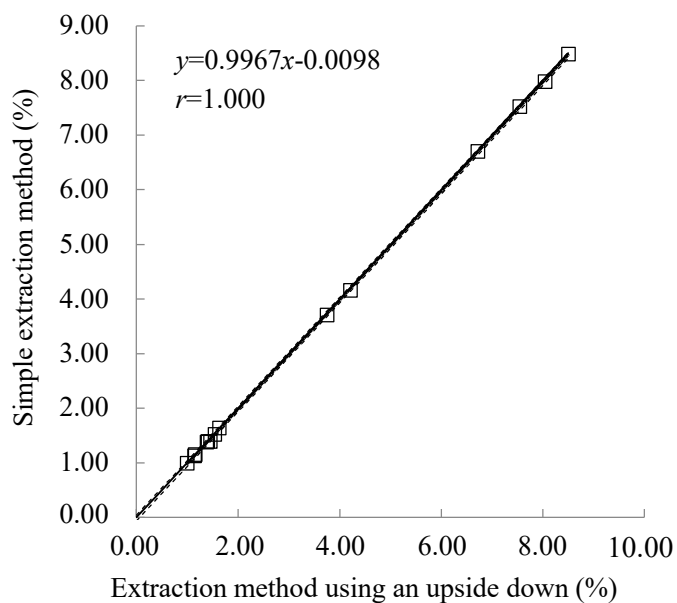


Figure 2 Comparison of extraction method using an upside down rotary shaker and simple one
 Heavy line: Regression line
 Dotted lines: Upper and lower limit of 95 % prediction interval
 Thin line: $y=x$
 % : Mass fraction

4) 併行精度及び中間精度の評価

併行精度及び中間精度を算出するため、化成肥料、家庭園芸用複合肥料、堆肥を分析用試料として垂直往復振とう機を用いて、2濃度の硝酸性窒素(N-N)を2点併行で日を変えて5回分析を実施して得られた結果及び液状窒素肥料、液状複合肥料を分析用試料として簡易抽出を行い同様に得られた結果をTable 5に示した。また、この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度をTable 6に示した。

化成肥料の硝酸性窒素(N-N)の平均値は質量分率15.89%で、併行相対標準偏差は0.46%、中間相対標準偏差は0.79%、家庭園芸用複合肥料の平均値は質量分率4.23%で、併行相対標準偏差は0.29%、中間相対標準偏差は0.29%、液状窒素肥料の平均値は質量分率1.62%で、併行相対標準偏差は0.55%、中間相対標準偏差は1.02%、液状複合肥料の平均値は質量分率8.43%で、併行相対標準偏差は0.63%、中間相対標準偏差は0.67%であった。

いずれの相対標準偏差も肥料等試験法¹⁾に示される併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の許容範囲内であり、十分な精度を有することが確認された。なお、堆肥については調査継続中である。

Table 5 Individual results of repetition test of changing the date for accuracy estimation (mass fraction(%))

Test Day	Extraction method using vertical reciprocating shaker					Simple extraction method (Shaking to mix completely)			
	Compound fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer		Compost	Liquid nitrogen fertilizer		Liquid mixed fertilizer	
1	15.80	15.68	4.25	4.22		1.60	1.59	8.32	8.40
2	16.00	16.00	4.21	4.22		1.60	1.61	8.38	8.52
3	16.00	15.92	4.23	4.23	under research	1.63	1.62	8.48	8.46
4	16.04	15.88	4.24	4.22		1.62	1.63	8.44	8.44
5	15.76	15.84	4.23	4.22		1.62	1.64	8.46	8.42

Table 6 Statistical analysis of repetition test result for estimating precision

Extraction method	Sample	Quantitative value of N-N ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
			s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)
	Compound fertilizer	15.89	0.073	0.46	1.5	0.13	0.79	2.5
Extraction method using vertical reciprocating shaker	Home garden-use mixed fertilizer	4.23	0.012	0.29	2.0	0.01	0.29	3.5
	Compost		under research					
Simple extraction method (Shaking to mix completely)	Liquid nitrogen fertilizer	1.62	0.009	0.55	2.0	0.02	1.02	3.5
	Liquid mixed fertilizer	8.43	0.053	0.63	2.0	0.06	0.67	3.5

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

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

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

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

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

5) 定量下限及び検出下限の推定

Table 1 の調製肥料を使用して、簡易抽出(手振り混ぜ)により7点併行分析を行った(Table 7)。定量下限は「(標準偏差) $\times 10$ 」式、検出下限は「(標準偏差) $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$ 」式を用いて算出した。その結果、液状の調製肥料(NN-0.02%)を使用した定量下限は0.003%(質量分率)程度、検出下限は0.001%(質量分率)程度であった。公定規格⁸⁾における普通肥料(家庭園芸用複合肥料を除く)の含有すべき主成分及び肥料の品質の確保等に関する法律施行規則⁹⁾に定める指定混合肥料(家庭園芸用を除く)の最小量は硝酸性窒素として質量分率1.0%である。また、家庭園芸用複合肥料の含有すべき主成分及び指定混合肥料(家庭園芸用に限る)の保証成分の最小量は、硝酸性窒素として質量分率0.1%である。したがって簡易抽出法(手振り混ぜ)は、流通肥料の硝酸性窒素の含有量を確認するための分析法として十分な定量下限を有していることを確認した。

なお、今後、本法について室間共同試験による評価(HCV: Harmonized collaborative validation)を行うにあたり、硝酸性窒素を含有しているが保証をしていない肥料についても共同試験用試料として使用することを検討するために、本検討中で用いた堆肥に準ずる分析用試料を継続して探索していくことが必要であると考えられる。

Table 7 Calculated *LOQ* and *LOD* values

Sample ^{a)}	Design component (%) ^{e)}	Quantitative value of N-N ^{b)} (%)	Standard deviation (%)	<i>LOQ</i> ^{c)} (%)	<i>LOD</i> ^{d)} (%)
Preparation sample NN-0.02 %	0.02	0.020	0.0003	0.003	0.001

a) Extraction method: simple extraction method

b) Mean value (n=7)

c) Standard deviation $\times 10$

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

e) Mass fraction

4. まとめ

肥料中の硝酸性窒素 (N-N) について試料溶液の調製方法の改良を目的とし、垂直往復振とう機を用いた抽出方法及び簡易抽出 (手振り混ぜ) 方法の適用について検討を行い、単一試験室における分析法の妥当性を確認したところ、次のとおり分析法として十分な性能を有していることを確認した。

(1) 固体肥料及び液状肥料中の硝酸性窒素 (N-N) について、上下転倒式回転振り混ぜ機を用いない抽出方法として、垂直往復振とう機を用いての機器条件を確認したところ、往復回数 275～300 往復/分 (振幅 40 mm) 以上の機器条件であれば、既存の抽出方法と同程度の抽出性能であることを確認した。また、同様に液状肥料についての簡易抽出 (手振り混ぜ) 方法についても、既存の抽出方法と同程度の抽出性能であることを確認した。

(2) 硝酸性窒素 (N-N) について分析用試料 21 点 (固体肥料と液状肥料) を用いて、上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出方法と垂直往復振とう機を用いて得られた分析値の回帰分析を行ったところ、相関係数は $r=1.000$ を示した。また、分析用試料 14 点 (液状肥料のみ) を用いて、上下転倒式回転振り混ぜ機を用いた抽出方法と簡易抽出 (手振り混ぜ) で得られた分析値の回帰分析を行ったところ、相関係数は $r=1.000$ を示し、いずれも肥料等試験法に示す妥当性確認の方法の推奨基準を満たしており、垂直往復振とう機による抽出法と簡易抽出 (手振り混ぜ) 法の 2 つの抽出方法について、上下転倒式回転振り混ぜ機による抽出方法と同等の性能を有していることを確認した。

(3) 硝酸性窒素 (N-N) について、併行精度及び中間精度の評価を行った結果、1.62 % (質量分率) ～ 15.89 % (質量分率) の範囲において、垂直往復振とう機を用いた方法についての併行相対標準偏差は 0.29 % ～ 0.46 %、中間相対標準偏差は 0.29 % ～ 0.79 % であり、簡易抽出を行った方法についての併行相対標準偏差は 0.55 % ～ 0.63 %、中間相対標準偏差は 0.67 % ～ 1.02 % であった。これらはいずれも肥料等試験法に示されている精度の目安を満たしていた。

(4) 定量下限及び検出下限の推定用試料 (液状肥料) を調製し、簡易抽出 (手振り混ぜ) により 7 点併行分析を行ったところ、定量下限は 0.003 % (質量分率) 程度、検出下限は 0.001 % (質量分率) 程度と推定された。

文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf>
- 2) 川口伸司, 液状肥料中の水溶性成分の簡易抽出方法, 肥料研究報告, **9**, 10-20(2016)
- 3) 川口伸司, 汎用的な機器を用いた固形肥料中の水溶性成分の抽出方法, 肥料研究報告, **10**, 1-8(2017)
- 4) 杉村靖, 汎用的な機器を用いた固形肥料中の水溶性主成分の抽出方法, 肥料研究報告, **11**, 1-13(2018)
- 5) 八木寿治ら, 汎用的な機器を用いた肥料中のけい酸の抽出方法, 肥料研究報告, **11**, 1-9(2019)
- 6) 加藤公栄ら, 硝酸性窒素試験法の性能評価ーフェノール硫酸法ー, **6**, 148-154(2013)
- 7) 伊藤浩平ら, 2015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, **9**, 110-135(2016)
- 8) 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, 最終改正令和3年6月14日, 農林水産省告示第1010号(2021)
- 9) 農林水産省令:肥料の品質の確保等に関する法律施行規則, 昭和25年6月20日, 農林水産省第64号, 最終改正令和3年6月14日, 農林水産省令第38号(2021)

Improved Determination Shaking Method in Preparation the Solution for the Nitrate Nitrogen by Phenol Sulfuric Acid

SHIRASAWA Yuko¹, KATO Kimie¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

The Japanese Official Methods of Analysis of Fertilizer provides several determination methods using the (constant-temperature) upside down rotary shaker (hereinafter referred to as rotary shaker) as the extractor. However, the rotary shaker is a custom order apparatus. This study describes development and validation of extraction method for the nitrate nitrogen by phenol sulfuric acid in the fertilizer using commercially vertical reciprocating shaker or simple extraction procedure shaking with hand (hereinafter : simple extraction method). We measured the values of N-N in 21 analytical samples (including solid and liquid one) by extraction method using a vertical reciprocating shaker to compare with ones using a rotary shaker. The former values were achieved and correlated highly with the latter values (Line of regression and correlation coefficient ($r = 1.000$, $y = 0.9995x + 0.0059$)). We also measured the values of N-N in 14 analytical samples (only liquid one) by simple extraction method to compare with ones using a rotary shaker. The former values were achieved and correlated highly with the latter values (Line of regression and correlation coefficient ($r = 1.000$, $y = 0.9967x - 0.0098$)). In using vertical reciprocating shaker, N-N were conducted a duplicate test per 5 test days using two analytical samples, respectively. As the result, total mean values (mass fraction) of N-N were 15.89 % and 4.23 %, repeatability relative standard deviation (RSD_r) were 0.46 % and 0.29 %, and intermediate relative standard deviation (RSD_I) 0.79 % and 0.29 %, respectively. Repeatability and intermediate precision of compost are under research. In simple extraction method, N-N were conducted a duplicate test per 5 test days using two analytical samples, respectively. As the result, total mean values (mass fraction) of N-N were 1.62 % and 8.43 %, repeatability relative standard deviation (RSD_r) were 0.55 % and 0.63 %, and intermediate relative standard deviation (RSD_I) 1.02 % and 0.67 %, respectively. The limit of quantitative and detection value for liquid fertilizer were estimated 0.003 % and 0.001 %, respectively (by simple extraction method). These extraction methods are valid for the determination of the nitrate nitrogen in the fertilizer.

Key words upside down rotary shaker, vertical reciprocating shaker, nitrate nitrogen, fertilizer, single-laboratory method validation

(Research Report of Fertilizer, 14, 12-24, 2021)

3 加里, 苦土, マンガンのフレイム原子吸光法の測定波長の追加

宮野谷杏¹, 天野忠雄¹, 八木寿治¹

キーワード 加里, 苦土, マンガン, 原子吸光法, 測定波長

1. はじめに

現在, フレイム原子吸光法において加里, 苦土を測定する際の測定波長は, 加里で 766.5 nm 及び 769.9 nm, 苦土で 285.2 nm が肥料等試験法¹⁾に記載されている. 加里や苦土は肥料中の有効成分として数%~数十%と多量に含まれることがあり, 現行の波長で高濃度領域を測定した場合には, 応答が検量線の直線範囲外になることがある. また, 原子吸光分析装置の補正方法によって感度が異なり, 所有する機器の最適な検量線測定範囲で測定ができるように試料液を調製する必要性が生じ, 高濃度の成分を含有する試料を測定する場合, 2 段階希釈操作を行うことがある. それに伴い, 希釈誤差やコンタミネーションが懸念され, さらに, 操作が煩雑になることにより分析結果を得るまでに時間を要している.

フレイム原子吸光法で測定可能なほとんどの元素は数種類の分析線を有しており, 分析線によって吸収感度が異なるため, 感度の低い波長を選択することにより, より高濃度の領域に検量線の直線範囲を得て測定することが可能となる. 肥料等試験法に未記載の測定波長としては, 加里で 404.4 nm, 苦土で 202.5 nm が原子吸光分析装置で設定可能である. いずれの波長においても, 現行の波長に比べ感度が低く高濃度試料であっても, 希釈倍率を低く抑えた測定が可能であると考えられる. また, 当該波長については他分野の分析法においても高濃度試料分析時の波長として掲載されている^{2, 3)}. さらに, 原子吸光分析装置の機種によっては, パーナ一角度を調節することにより感度を低減しての分析ができないことから, このような機種には低感度の波長を選択することは有効であると考えられた.

そこで今回は, 現行の測定波長及び肥料等試験法に未記載の測定波長について, その検量線の直線領域を確認し, 各波長の分析法への適用性について判断するため, 単一試験室での妥当性確認を実施した. また, マンガンについても, 肥料等試験法に未記載の 403.1 nm は感度が低く, 他分野の分析法にも掲載されており^{4, 5)}同様の傾向があると考えられたため, マンガンも対象に追加し検討を行ったので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

市場に流通している肥料について, 今回の検討成分を含有するのべ 32 種類合計 114 点を用いた. 試料については, 目開き 500 μm (熔成りん肥及び鉍さいけい酸質肥料等については 212 μm) のふるいを通すまで粉碎したものを分析に使用した. なお, 分析に用いた肥料は以下のとおりである.

(1) 加里: 化成肥料 10 点, 堆肥 3 点 (鶏糞, 豚糞, 馬糞), 下水汚泥肥料 2 点, し尿汚泥肥料 2 点, 汚泥発酵肥料 2 点, 乾燥菌体肥料 1 点, なたね油かす及びその粉末 1 点, 副産複合肥料 3 点, 配合肥料 7 点, 混合加里肥料 1 点, けい酸加里肥料 1 点, 液状複合肥料 1 点, 塩化加里 1 点, 硫酸加里 1 点, 重炭酸加里 1 点, 硫酸加里苦土 1 点及び指定配合肥料 1 点.

(2) 苦土: 化成肥料 9 点, 堆肥 4 点 (鶏糞, 豚糞, 馬糞, 牛糞), 加工家きんふん肥料 1 点, 下水汚泥肥料

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点, し尿汚泥肥料2点, 汚泥発酵肥料1点, 副産複合肥料3点, 配合肥料6点, 混合加里肥料2点, けい酸加里肥料1点, 液状複合肥料2点, 硫酸加里苦土1点, 家庭園芸用複合肥料1点, 液状窒素肥料1点, 加工ほう素肥料1点, 硫酸苦土肥料1点, 腐植酸苦土肥料1点, 鉍さいけい酸質肥料4点, 混合りん酸肥料3点, 熔成けい酸りん肥2点, 加工鉍さいりん酸肥料1点, 熔成りん肥1点及び副産苦土肥料1点.

(3) マンガン: 化成肥料7点, 配合肥料4点, 液状複合肥料2点, 鉍さいけい酸質肥料1点, 混合りん酸肥料1点, 熔成けい酸りん肥1点, 加工鉍さいりん酸肥料1点, 鉍さいマンガン肥料1点, 混合微量要素肥料5点及び硫酸マンガン肥料1点.

2) 試薬等の調製

(1) カリウム標準液(K:1000 mg/L): 富士フィルム和光純薬 JCSS

(2) マグネシウム標準液(Mg:1000 mg/L): 富士フィルム和光純薬 JCSS

(3) マンガン標準液(Mn:100 mg/L): 富士フィルム和光純薬 JCSS

(4) 水: 水精製装置(Merck Millipore Elix Advantage 5)を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 の水.

(5) 塩酸(JIS K 8180 に規定する試薬): 富士フィルム和光純薬 精密分析用

(6) 硝酸(JIS K 8541 に規定する試薬): 富士フィルム和光純薬 精密分析用

(7) 干渉抑制剤溶液 1: JIS K 8617 に規定する炭酸カルシウム 12.5 g をビーカー2000 mL にはかりとり, 少量の水を加え, 塩酸 105 mL を徐々に加え, 少時加熱し, 放冷後, 水を加えて 1000 mL とした. 加里の分析に用いた.

(8) 干渉抑制剤溶液 2: JIS K 8132 に規定する塩化ストロンチウム六水和物 152.1 g をビーカー2000 mL にはかりとり, 少量の水を加えた後, 塩酸 420 mL を徐々に加えて溶かし, 更に水を加えて 1000 mL とした. 苦土及びマンガンの分析に用いた.

3) 装置及び器具

(1) 原子吸光分析装置: 日立ハイテクノロジーズ Z-2310 (偏光ゼーマン補正法, バックグラウンド補正有)

(2) 超遠心粉碎機: Retsch ZM-200

(3) 電子天びん: Sartorius CPA423S

(4) ホットプレート: 柴田科学 NP-6

(5) 上下転倒式恒温回転振り混ぜ機: 三喜製作所 RS-12

(6) 全量フラスコ: クラス A

(7) 全量ピペット: クラス A

(8) ろ紙3種

4) 分析方法

肥料等試験法¹⁾に記載されているフレイム原子吸光法による肥料中の加里, 苦土及びマンガンの測定波長のほか, 測定波長を変えた分析の実施にあたって, 試料溶液及び測定溶液の調製を肥料等試験法により行った. それぞれの成分に対する分析項目は Table 1 のとおりである. 測定は原子吸光分析装置により行い, 各成分における分析波長は Table 2 のとおりとした.

また, 本検討で用いた原子吸光分析装置の機種において推奨されている測定上限濃度を大幅に超える濃度では, キャピラリーチューブからバーナーヘッドまでの試料導入部・燃焼経路に塩が付着・残留することによる

吸光度の低下が認められたことから、連続測定時に影響を与えない濃度で測定を実施した。なお、**3.3)** 測定波長間比較による真度の評価においては試料溶液分取量の違いから起因する吸光度への影響を避けるため、同一の測定溶液を用い、それぞれの波長で測定した。その際、波長間で感度差があることから、肥料等試験法に記載されている現行の測定波長において、測定溶液濃度が検量線の直線領域外となった高濃度試料については、認証標準物質や外部精度管理試料を用いて検量線の適正性を確認しつつ二次曲線を用いて測定して比較することとした。

Table 1 Component and measurement

Component	Testing Methods for Fertilizers	The extraction method
Total potassium (T-K ₂ O)	4.3.1.a AAS ^{a)}	Incineration-aqua regia digestion
Citric acid-soluble potassium (C-K ₂ O)	4.3.2.a AAS	Citric acid solution - Rotational shaking (30 °C)
Water-soluble potassium (W-K ₂ O)	4.3.3.a AAS	Water - Rotational shaking
Total magnesium (T-MgO)	4.6.1.a AAS	Incineration-aqua regia digestion
Soluble magnesium (S-MgO)	4.6.2.a AAS	Hydrochloric acid (1+23) solution - Boiling
Citric acid-soluble magnesium (C-MgO)	4.6.3.a AAS	Citric acid solution - Rotational shaking (30 °C)
Water-soluble magnesium (W-MgO)	4.6.4.a AAS	Water - Boiling
Citric acid-soluble manganese (C-MnO)	4.7.2.a AAS	Citric acid solution - Rotational shaking (30 °C)
Water-soluble manganese (W-MnO)	4.7.3.a AAS	Water - Rotational shaking

a) Flame atomic absorption spectrometry

Table 2 Measurement wavelength of each element

Element	Measurement wavelength (nm)		
	1	2	3
K	766.5 ^{a)}	769.9 ^{a)}	404.4 ^{b)}
Mg	285.2 ^{a)}	202.5 ^{b)}	-
Mn	279.5 ^{a)}	280.1	403.1 ^{b)}

a) Measurement wavelength listed on Testing Methods for Fertilizers

b) Examined measurement wavelength

3. 結果及び考察

1) 検量線の直線性等の確認

肥料等試験法¹⁾では、決定係数(r^2)が 0.99 以上であれば、その検量線を使用可能としているが、精密な分析には 0.999 以上であることを推奨している。

各成分の測定波長における試料導入・燃焼経路への負担を考慮した検量線濃度範囲を Table 3 に示した。それぞれ検量線は上記の推奨基準を満たし、いずれも良好な直線性を示した (Figure 1~3)。

肥料等試験法の別添、試験法の妥当性確認手順には、検量線を用いて定量下限を推定する方法が記載されている。そこで、肥料等試験法に未記載の測定波長における検量線を用い、回帰直線から推定した濃度ゼロ

におけるシグナルの標準偏差と検量線の傾きを用いて、定量下限の推定を行ったところ、加里(404.4 nm)は 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度、苦土(202.5 nm)は 0.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度、マンガン(403.1 nm)は 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度であった。

なお、D2 補正型のようにバーナーヘッド周りに補正機構がない原子吸光分析装置では、バーナー角度が可変であることによる感度調整が可能なため、それらの機種における検量線濃度範囲はこの限りではないと考えられた。

Table 3 Concentration range of culibration curve

Measurement Wavelength (nm)	Element or component	Concentration range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
766.5	K	0 ~ 4
	K ₂ O	0 ~ 4.8
769.9	K	0 ~ 40
	K ₂ O	0 ~ 48
404.4	K	0 ~ 80
	K ₂ O	0 ~ 96
285.2	Mg	0 ~ 0.4
	MgO	0 ~ 0.6
202.5	Mg	0 ~ 3.2
	MgO	0 ~ 5.3
279.5	Mn	0 ~ 5
	MnO	0 ~ 6.4
403.1	Mn	0 ~ 15
	MnO	0 ~ 19

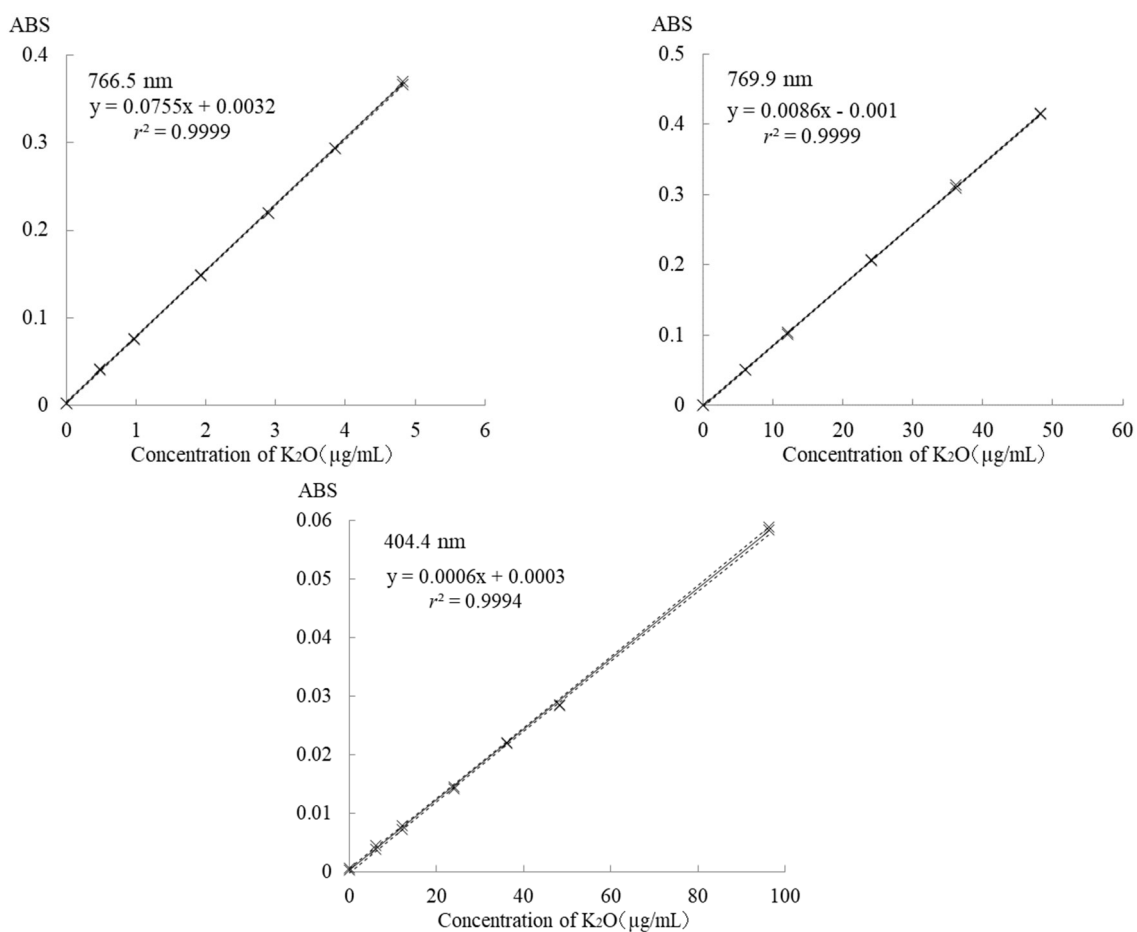


Figure 1 Example of calibration curve for potassium

Full line: Regression line

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

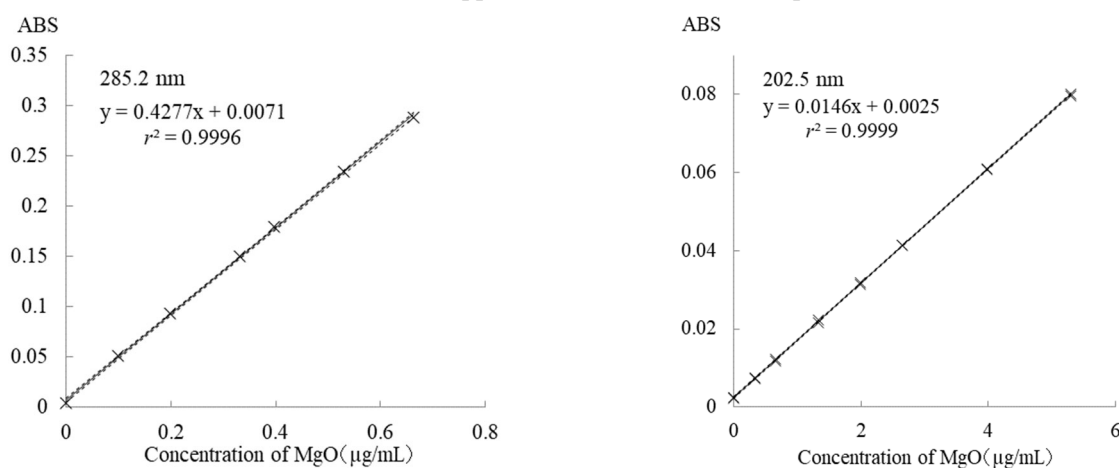


Figure 2 Example of calibration curve for magnesium

Full line: Regression line

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

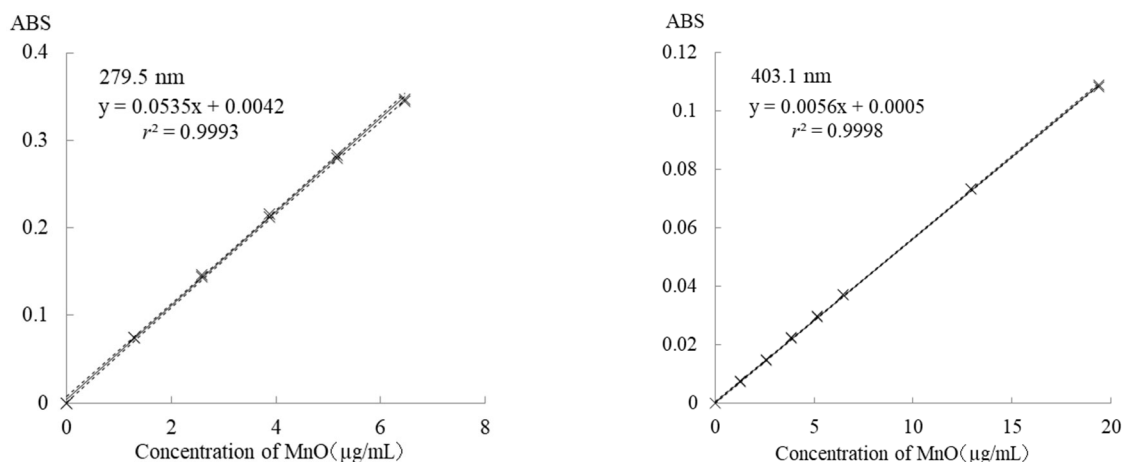


Figure 3 Example of calibration curve for manganese

Full line: Regression line

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

2) 認証標準物質等による真度の評価

肥料等試験法¹⁾に未記載の測定波長における定量値の適正性を確認するため、測定波長を K₂O は 404.4 nm, MgO は 202.5 nm, MnO は 403.1 nm とし、T-K₂O, C-K₂O, W-K₂O, C-MgO, C-MnO について肥料認証標準物質⁶⁾を用いて、3 点併行により分析を実施した。得られた結果を Table 4 に示した。いずれも平均値は認証値に対する警戒限界の範囲内であり、肥料等試験法に示されている真度評価基準を満たしていた。

また、適切な肥料認証標準物質がない S-MgO, W-MgO, W-MnO については参考として外部精度管理試料^{7, 8)}を用いて、2 点併行により試験を実施した。得られた結果を Table 5 に示した。いずれも平均値は外部精度管理試験において満足と判定される範囲内であった。

Table 4 The estimation of trueness using certified reference materials

Component	Certified reference material	Type of fertilizer	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Certified value (%) ^{b)}	Warning limit range for the certified value (%) ^{b)}
T-K ₂ O	FAMIC-C-12-2	Composted sludge fertilizer	0.56	0.58	0.50 ~ 0.66
C-K ₂ O	FAMIC-A-17	Chemical fertilizer	13.75	13.96	13.53 ~ 14.39
W-K ₂ O	FAMIC-B-14	Chemical fertilizer	8.17	8.32	8.08 ~ 8.56
C-MgO	FAMIC-A-17	Chemical fertilizer	3.48	3.54	3.39 ~ 3.69
C-MnO	FAMIC-A-17	Chemical fertilizer	0.33	0.31	0.29 ~ 0.34

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

b) Mass fraction

Table 5 The estimation of trueness using proficiency test samples

Component	sample	Type of fertilizer	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Median (%) ^{b)}	Range evaluated as satisfaction (%) ^{b)}
S-MgO	Proficiency test sample in 2019	Silicate slug fertilizer	7.28	7.43	7.13 ~ 7.73
W-MgO	Proficiency test sample in 2015	Liquid compound fertilizer	1.20	1.15	1.07 ~ 1.23
W-MnO	Proficiency test sample in 2015	Liquid compound fertilizer	0.09	0.09	0.09 ~ 0.10

a) Mean value of parallel test ($n = 2$)

b) Mass fraction

3) 測定波長間比較による真度の評価

T-K₂O については試料 12 点, C-K₂O については試料 12 点, W-K₂O については試料 15 点, T-MgO については試料 12 点, S-MgO については試料 13 点, C-MgO については試料 12 点, W-MgO については試料 14 点, C-MnO については試料 12 点, W-MnO については試料 12 点を用いて, 肥料等試験法¹⁾に記載されている現行の測定波長を用いた分析値と, 未記載の測定波長を用いた分析値との相関及び本法の 95 %予測区間を回帰直線の周囲に描き Figure 4~6 に示した. また, 95 %信頼区間の傾き (b), 切片 (a) 及び回帰直線の相関係数 (r) を Table 6 に示した. 肥料等試験法では, 傾き (b) の 95 %信頼区間に 1 が含まれ, 切片 (a) の 95 %信頼区間に原点 (0) が含まれ, 相関係数 (r) が 0.99 以上を推奨している. Table 6 に示した結果のとおりすべての分析項目において推奨基準の範囲内であった. なお, それぞれの測定波長で測定した試料の測定溶液中濃度は加里で 9.37 $\mu\text{g/mL}$ ~61.9 $\mu\text{g/mL}$, 苦土で 0.84 $\mu\text{g/mL}$ ~2.41 $\mu\text{g/mL}$, マンガンで 1.24 $\mu\text{g/mL}$ ~8.45 $\mu\text{g/mL}$ であった.

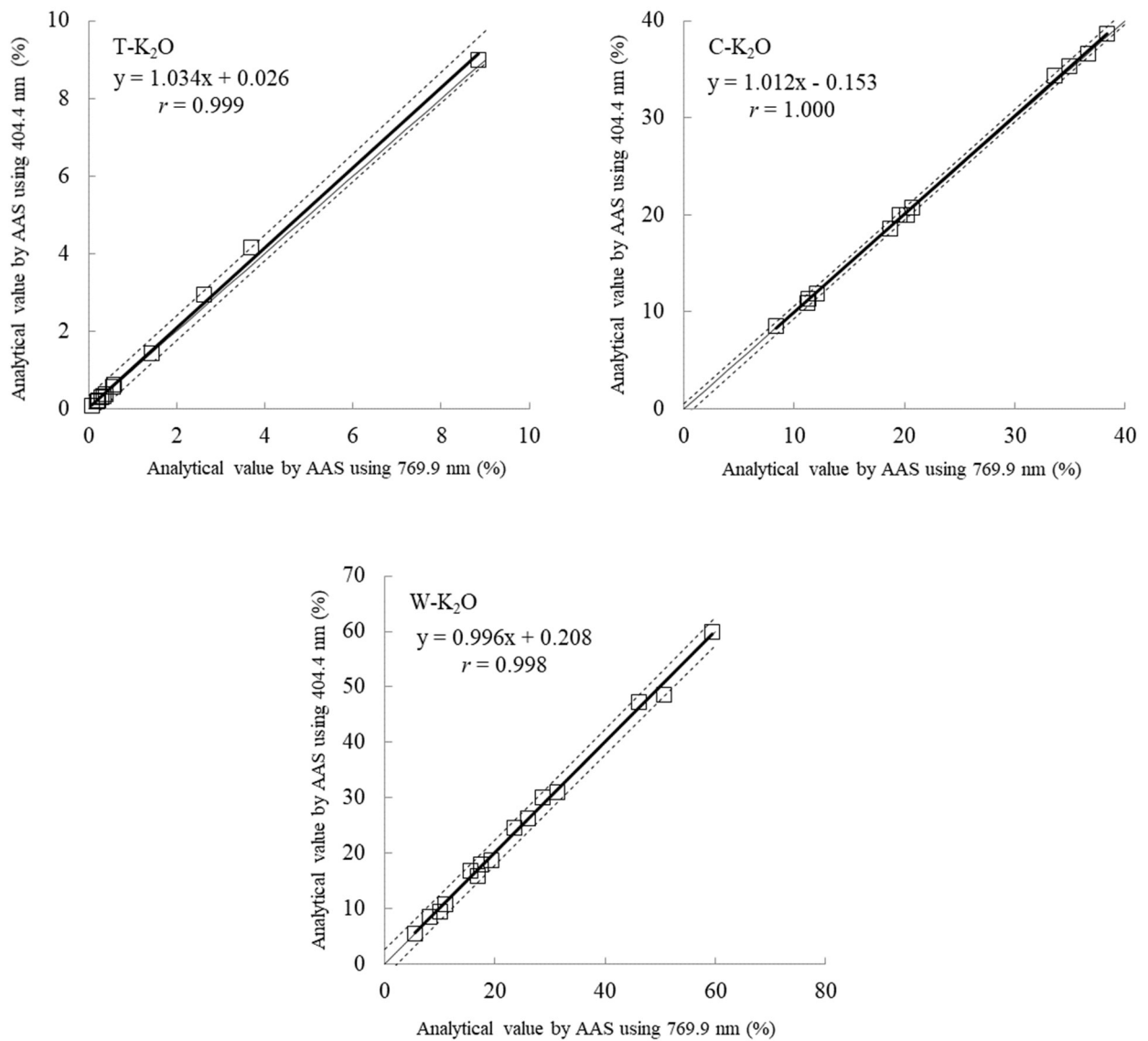


Figure 4 Comparison of analytical values by AAS using different measurement wavelengths for potassium

%: Mass fraction

Full line: Regression line

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

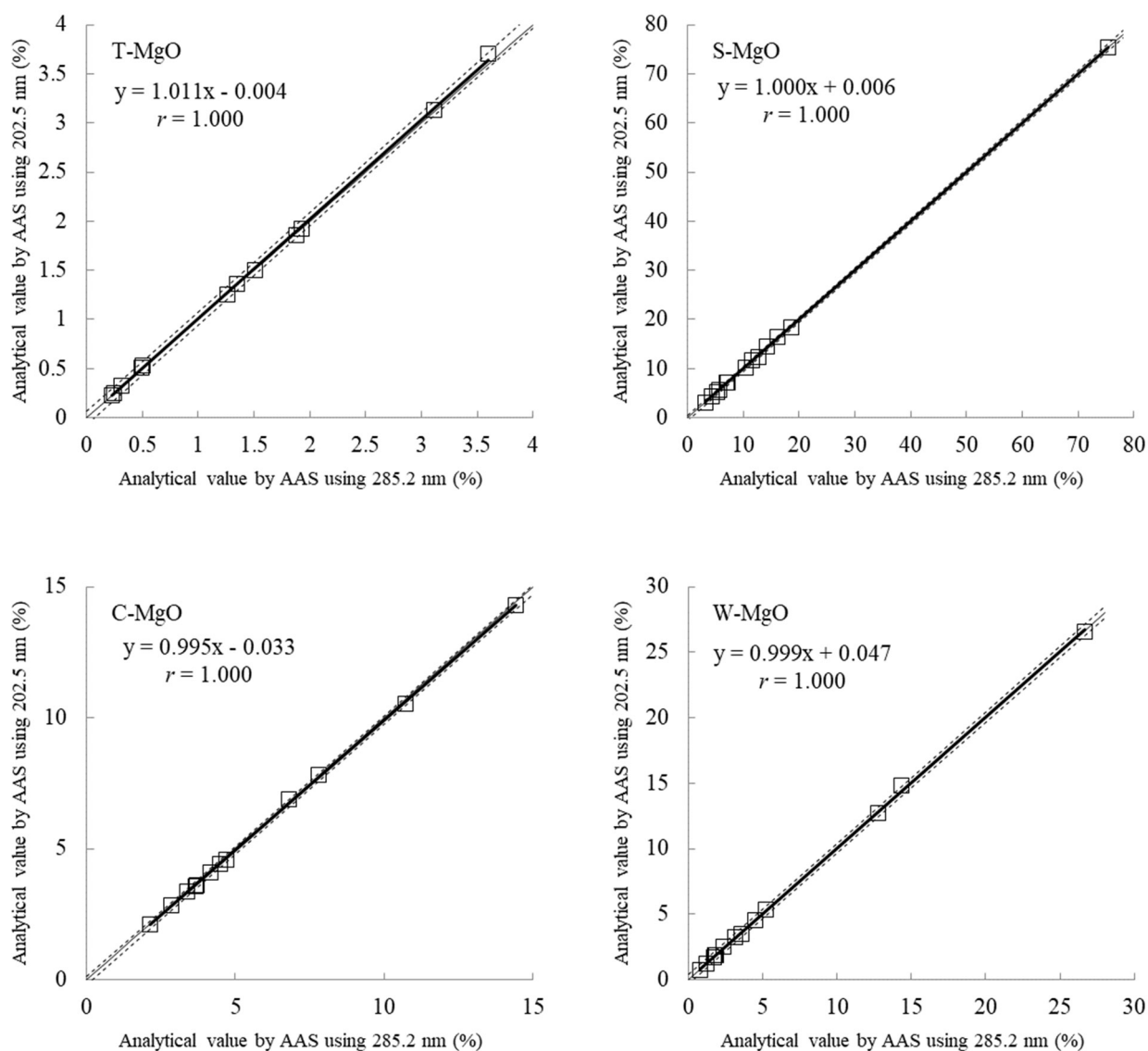


Figure 5 Comparison of analytical values by AAS using different measurement wavelengths for magnesium

%: Mass fraction

Full line: Regression line

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

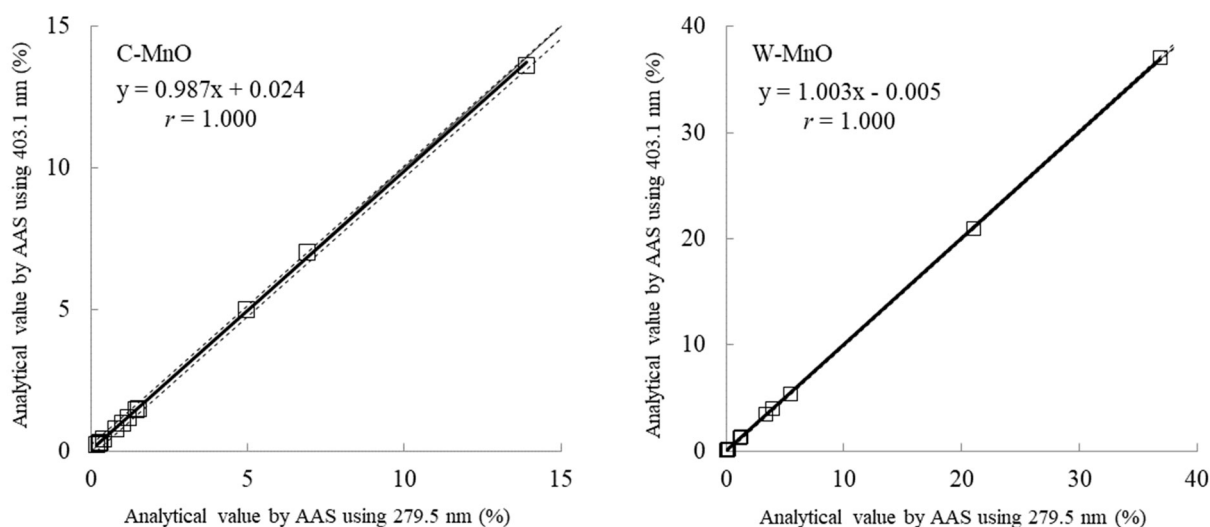


Figure 6 Comparison of analytical values by AAS using different measurement wavelengths for manganese
 %: Mass fraction
 Full line: Regression line
 Dotted lines: Upper and lower of limit 95 % prediction interval

Table 6 The 95 % confidence interval and correlation coefficient of the regression line in between measurement wavelength

Component	95 % confidence interval		Correlation coefficient (r)
	Inclination (b)	Intercept (a)	
T-K ₂ O	0.9980 ~ 1.069	-0.078 ~ 0.130	0.999
C-K ₂ O	0.9960 ~ 1.028	-0.546 ~ 0.239	1.000
W-K ₂ O	0.9609 ~ 1.032	-0.832 ~ 1.247	0.998
T-MgO	0.9942 ~ 1.029	-0.034 ~ 0.026	1.000
S-MgO	0.9924 ~ 1.008	-0.173 ~ 0.185	1.000
C-MgO	0.9829 ~ 1.007	-0.113 ~ 0.048	1.000
W-MgO	0.9865 ~ 1.012	-0.071 ~ 0.165	1.000
C-MnO	0.9735 ~ 1.000	-0.040 ~ 0.088	1.000
W-MnO	0.9997 ~ 1.007	-0.051 ~ 0.040	1.000

4) 併行精度及び中間精度の確認

2) 及び 3) において肥料等試験法¹⁾に定められた基準を満たした各波長について、本法の併行精度及び中間精度を確認するために、下水汚泥肥料, 化成肥料, 配合肥料, 塩化加里, 混合加里肥料, 混合りん酸肥料, 副産複合肥料, 液状複合肥料, 硫酸苦土肥料, 鉍さいマンガン肥料, 硫酸マンガン肥料を用いて各成分 2 濃度 2 点併行で 5 日間の反復分析を行った結果を Table 7 に, それらを基に一元配置分散分析を行って得られた統計解析結果を Table 8 に, それぞれ示した。

いずれの相対標準偏差も肥料等試験法に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安の許容範囲内であったことから, 本法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 7 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation
(%(mass fraction))

Component	Sample	Test day				
		1	2	3	4	5
T-K ₂ O	Sewage sludge fertilizer	0.380	0.373	0.397	0.396	0.376
		0.368	0.362	0.372	0.377	0.372
	Chemical fertilizer	11.6	11.4	11.4	11.8	11.3
		11.2	11.1	11.5	11.7	11.6
C-K ₂ O	Chemical fertilizer	8.23	8.61	8.23	8.53	8.19
		8.39	8.65	8.13	8.65	7.99
	Chemical fertilizer	36.0	38.2	34.5	37.9	36.4
		36.5	38.1	35.1	37.7	35.8
W-K ₂ O	Compound fertilizer	9.74	10.8	9.82	10.8	10.3
		10.0	11.0	9.95	10.8	10.1
	Potassium chloride	60.7	63.1	60.1	62.6	58.8
		60.1	62.8	57.7	63.9	58.8
T-MgO	Sewage sludge fertilizer	0.235	0.216	0.223	0.208	0.225
		0.233	0.221	0.239	0.192	0.224
	Chemical fertilizer	3.17	3.08	3.20	2.89	3.14
		3.21	3.08	3.27	2.98	3.13
S-MgO	Potassium fertilizer mixture	4.13	4.11	4.53	4.10	4.18
		4.44	4.05	4.36	4.02	4.33
	Phosphate fertilizer mixture	18.3	17.4	18.9	17.5	18.4
		18.4	17.3	19.5	17.3	18.5
C-MgO	Chemical fertilizer	2.89	2.88	2.96	2.67	2.68
		2.88	2.87	2.88	2.69	2.71
	Byproduct compound fertilizer	14.3	14.4	14.9	13.8	13.8
		14.4	14.2	15.3	13.9	14.6
W-MgO	Liquid compound fertilizer	1.59	1.65	1.64	1.58	1.64
		1.54	1.61	1.64	1.58	1.63
	Magnesium sulfate fertilizer	26.9	25.6	27.1	25.4	26.4
		25.7	25.2	27.3	24.6	26.7
C-MnO	Chemical fertilizer	0.826	0.689	0.780	0.796	0.798
		0.826	0.681	0.787	0.802	0.800
	Slag manganese fertilizer	15.0	14.7	14.5	14.4	14.4
		14.8	14.6	14.3	14.2	14.3
W-MnO	Chemical fertilizer	0.146	0.132	0.138	0.143	0.144
		0.145	0.130	0.140	0.144	0.144
	Manganese sulfate fertilizer	39.5	35.7	38.5	37.3	38.0
		39.5	36.4	38.9	39.3	37.1

Table 8 Statistical analysis of repeatability test

Component	Sample	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability precision			Intermediate precision		
			s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$2*CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%) ^{b)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$2*CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)
T-K ₂ O	Sewage sludge fertilizer	0.377	0.011	3.0	6	0.011	3.0	9
	Chemical fertilizer	11.5	0.196	1.7	3	0.229	2.0	5
C-K ₂ O	Chemical fertilizer	8.36	0.097	1.2	4	0.252	3.0	7
	Chemical fertilizer	36.6	0.326	0.9	2	1.376	3.8	4
W-K ₂ O	Compound fertilizer	10.3	0.111	1.1	3	0.492	4.8	5
	Potassium chloride	60.9	0.886	1.5	2	2.223	3.7	4
T-MgO	Sewage sludge fertilizer	0.222	0.007	3.4	6	0.015	6.6	9
	Chemical fertilizer	3.12	0.036	1.2	4	0.119	3.8	7
S-MgO	Potassium fertilizer mixture	4.22	0.125	3.0	4	0.182	4.3	7
	Phosphate fertilizer mixture	18.1	0.201	1.1	3	0.798	4.4	5
C-MgO	Chemical fertilizer	2.81	0.027	1.0	4	0.117	4.2	7
	Byproduct compound fertilizer	14.4	0.283	2.0	3	0.506	3.5	5
W-MgO	Liquid compound fertilizer	1.61	0.021	1.3	4	0.038	2.4	7
	Magnesium sulfate fertilizer	26.1	0.489	1.9	2	0.953	3.7	4
C-MnO	Chemical fertilizer	0.779	0.004	0.5	6	0.055	7.0	9
	Slag manganese fertilizer	14.5	0.093	0.6	3	0.254	1.8	5
W-MnO	Chemical fertilizer	0.141	0.001	0.7	6	0.006	4.4	9
	Manganese sulfate fertilizer	38.0	0.734	1.9	2	1.407	3.7	4

a) Total average (test-days (5)×parallel test (2))

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

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

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

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

4. まとめ

加里、苦土及びマンガンのフレイム原子吸光法の測定条件について、肥料等試験法¹⁾に未記載の測定波長の分析法への適用の可能性を検討するため、検量線の直線範囲の確認及び単一試験室における分析法の妥当性確認を実施したところ、次の結果を得た。

(1) 検量線を作成したところ、直線性については、加里の 766.5 nm は K₂O として 0 μg/mL ~4.8 μg/mL, 769.9 nm は 0 μg/mL ~48 μg/mL, 404.4 nm は 0 μg/mL ~96 μg/mL の範囲、苦土の 285.2 nm は MgO として 0 μg/mL ~0.6 μg/mL, 202.5 nm は 0 μg/mL ~5.3 μg/mL の範囲、マンガンの 279.5 nm は MnO として 0 μg/mL ~6.4 μg/mL, 403.1 nm は 0 μg/mL ~19 μg/mL の範囲において確認され、いずれも決定係数(r^2)が 0.999 以上であった。

(2) 真度確認のため、T-K₂O, C-K₂O, W-K₂O, C-MgO, C-MnO について肥料認証標準物質⁶⁾を用いて、3点併行により分析を実施した。いずれも平均値は認証値に対する警戒限界の範囲内であり、肥料等試験法に示されている真度評価基準を満たしていた。

また、肥料認証標準物質がない S-MgO, W-MgO, W-MnO については参考として外部精度管理試料^{6, 7)}を用いて、2点併行により分析を実施した。いずれも平均値は外部精度管理試験において満足と判定される範囲内であった。

(3) 真度確認のため、肥料等試験法に記載されている現行の測定波長と未記載の測定波長により、流通肥料で T-K₂O を含有する肥料 12 点、以下同様に C-K₂O 12 点、W-K₂O 15 点、T-MgO 12 点、S-MgO 13 点、C-MgO 12 点、W-MgO 14 点、C-MnO 12 点及び W-MnO 12 点をそれぞれ分析し、回帰分析による方法間比較を実施した。すべての成分において、回帰直線の傾きは 95 %信頼区間に 1 が含まれ、切片の 95 %信頼区間に 0 が含まれ、相関係数が 0.99 以上であり、肥料等試験法に示されている推奨基準を満たしていた。

(4) 中間精度及び併行精度を推定するため、各 2 種類の試料を用い、2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った結果、肥料等試験法に示されている併行精度及び中間精度の目安の許容範囲内であった。

以上の妥当性確認の結果から、肥料等試験法に現在記載されている原子吸光法(加里, 苦土及びマンガン)に、今回検討した測定波長の適用は可能であることを確認した。

文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) : 肥料等試験法 (2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf >
- 2) 文部科学省: 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂)分析マニュアル(2015)
< https://www.mext.go.jp/component/a_menu/science/detail/_icsFiles/afieldfile/2016/03/25/1368932_02_1.pdf >
- 3) 地方独立行政法人北海道立総合研究機構 農業研究本部: 土壌・作物栄養診断のための分析法 2012 (2012)
< <https://www.hro.or.jp/list/agricultural/center/bunseki2012/4.pdf> >
- 4) JIS H 1055 銅及び銅合金中のマンガ定量方法 (2003)
- 5) JIS G 1257-1 鉄及び鋼—原子吸光分析方法—第 1 部: マンガン定量方法—酸分解フレイム法 (2013)
- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) : 肥料認証標準物質の配布申請手続き
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6.html> >
- 7) 伊藤浩平, 長谷川正憲, 藤田敏史, 千田正樹, 平原稔夫, 筒井久司, 神川孝文, 八木啓二, 白井裕治, 今川俊明: 2015 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, **9**, 110-135 (2016)
- 8) 秋元里乃, 白澤優子, 恵智正宏, 白井小枝, 井上直, 小堀拓也, 加藤まどか, 引地典雄: 2019 年度 全国共通試料を用いた肥料の外部精度管理試験成績の解析, 肥料研究報告, **13**, 168-187 (2020)

Addition of Measurement Wavelength for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry of Potassium, Magnesium and Manganese

MIYANOYA Kyo¹, AMANO Tadao¹, YAGI Toshiharu¹

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

For the flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) of potassium, magnesium and manganese using the current measurement wavelengths (K 766.5 nm and 769.9 nm, Mg 285.2 nm and Mn 279.5 nm) listed on the Testing Methods of Fertilizers. We examined multiple new measurement wavelengths (K 404.4 nm, Mg 202.5 nm and Mn 403.1 nm) not listed on that. We confirmed the linear region of the calibration curve, and validated the analytical method in a single laboratory. The concentration range of the calibration curve for potassium (as K₂O) was 0 µg/mL to 4.8 µg/mL at 766.5 nm, 0 µg/mL to 48 µg/mL at 769.9 nm and 0 µg/mL to 96 µg/mL at 404.4 nm. The concentration range of the calibration curve for magnesium (as MgO) was 0 µg/mL to 0.6 µg/mL at 285.2 nm and 0 µg/mL to 5.3 µg/mL at 202.5nm. The concentration range of the calibration curve for manganese (as MnO) was 0 µg/mL to 6.4 µg/mL at 279.5 nm and 0 µg/mL to 19 µg/mL at 403.1 nm. All calibration curve had a coefficient of determination (r^2) of 0.999 or higher. In order to confirm the accuracy, parallel tests ($n=3$) were conducted on T-K₂O, C-K₂O, W-K₂O, C-MgO and C-MnO using certified reference materials. In all cases, the mean values were within warning limit range for the certified value. For S-MgO, W-MgO and W-MnO, which do not have certified reference materials, parallel tests ($n=2$) were conducted using proficiency test samples. In all cases, the mean values were within the range evaluated as satisfaction. In order to confirm the accuracy, 12-15 samples that contain T-K₂O, C-K₂O, W-K₂O, T-MgO, S-MgO, C-MgO, W-MgO, C-MnO and W-MnO respectively were analyzed using the current measurement wavelength and the new measurement wavelength, the analytical value were compared. As a result, we confirmed the equivalence between the analytical values of the two measurement wavelengths. Line of regression and correlation coefficient; T-K₂O ($r = 0.999, y = 0.026 + 1.034x$), C-K₂O ($r = 1.000, y = -0.153 + 1.012x$), W-K₂O ($r = 0.998, y = 0.208 + 0.996x$), T-MgO ($r = 1.000, y = -0.004 + 1.011x$), S-MgO ($r = 1.000, y = 0.006 + 1.000x$), C-MgO ($r = 1.000, y = -0.033 + 0.995x$), W-MgO ($r = 1.000, y = 0.047 + 0.999x$), C-MnO ($r = 1.000, y = 0.024 + 0.987x$), W-MnO ($r = 1.000, y = -0.005 + 1.003x$). Intermediate precision and repeatability were estimated by duplicate test per 5 tests on different days using two analytical samples of different concentration respectively. As a result, repeatability relative standard deviations (RSD_r) and intermediate relative standard deviations ($RSD_{I(T)}$) were within the tolerance of repeatability and intermediate precision of the Testing Methods for Fertilizers. Those results indicated that AAS using the new measurement wavelength was valid for the determination of potassium, magnesium and manganese in fertilizers.

Key words Potassium, Magnesium, Manganese, Flame atomic absorption spectrometry, Measurement wavelength

(Research Report of Fertilizer, **14**, 25-38, 2021)

4 HPLCを用いた肥料中のDMPP(硝酸化成抑制材)の分析法の開発

船木紀夫¹

キーワード DMPP, 硝酸化成抑制材, HPLC, 肥料

1. はじめに

近年, 硝酸化成抑制効果が報告されている¹⁾²⁾3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(以下「DMPP」という。)を含む肥料の登録例が見られる。硝酸化成抑制材を配合された肥料には, 農林水産省告示³⁾でその種類及び量の表示が義務づけられているが, DMPP については肥料等試験法(2020)⁴⁾に分析方法が記載されていない。

欧州規格では高速液体クロマトグラフ(以下「HPLC」という。)を用いた肥料中の DMPP 分析方法が記載されていることから⁵⁾, この方法について肥料等試験法における他の硝酸化成抑制材の分析法とリンクするよう試料溶液調製における抽出方法を検討し, 測定条件についてはマトリックスの影響及び溶液 pH の影響等を調査し, 単一試験室における分析法の妥当性(SLV: Single Laboratory Validation)を確認したので, 概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

市場に流通している固形肥料について, DMPP を配合されたもの 4 種類合計 7 点(尿素, 混合窒素肥料, 化成肥料及び配合肥料)を用いた。また, 添加回収試験用及び定量下限等推定用として, DMPP 非配合の尿素, 化成肥料及び配合肥料を用いた。

各試料については, 目開き 500 μm のふるいを通すまで超遠心粉砕機にて粉砕したものを分析した。

2) 試薬等の調製

(1) DMPP 標準液(2 mg/L): 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩[$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$](東京化成工業, 試薬純度 98.0% (質量分率))を 0.20 g はかりとり, 超音波処理しながら水に溶かして 100 mL とした。

(2) 検量線用標準液(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): DMPP 標準液の一定量を混合し, 水で適宜希釈して 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の検量線用標準液をそれぞれ調製した。

(3) 10 mmol/L りん酸二水素ナトリウム溶液: りん酸二水素ナトリウム二水和物[$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$](富士フィルム和光純薬製, 特級)を 1.56 g はかりとり, 水に溶かして 1000 mL とした。

(4) 水: 超純水製造装置(MILLIPORE 製 Milli-Q Element A10)を用いて精製した超純水(比抵抗値 18 $\text{M}\Omega\text{cm}$ 以上)を使用した。

(5) アセトニトリル: 富士フィルム和光純薬 HPLC 用

(6) りん酸二水素ナトリウム二水和物: 富士フィルム和光純薬 特級

3) 装置及び器具

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)名古屋センター

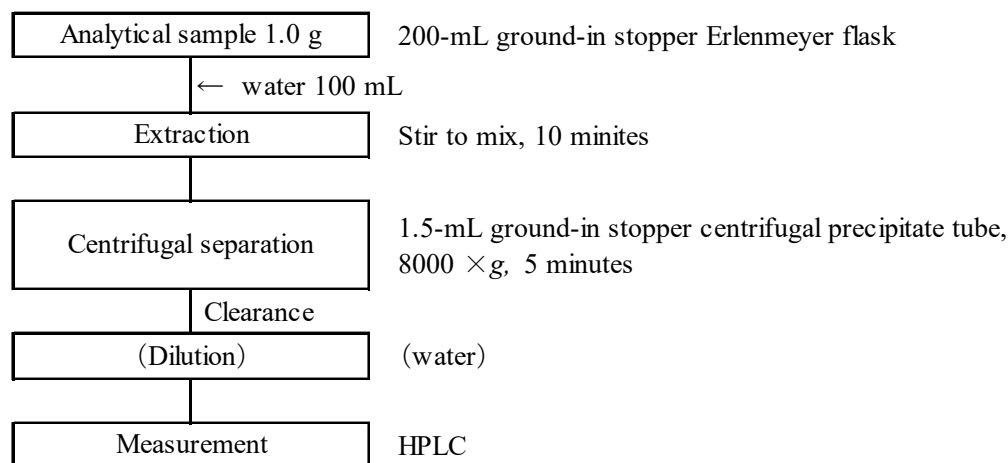
- (1) 高速液体クロマトグラフ: Waters 2695 Separation module, 2996 photo diode Array Detector
- (2) カラム: Supelco Discovery C18: 長さ 150 mm L×内径 4.6 mm I.D., 粒径 5 μ m
- (3) マグネチックスターラー: 東京硝子器械 F-626N
- (4) 超遠心分離機: HITACHI himac CT15E
- (5) 超遠心粉碎機: ZM-200 Retsch
- (6) 超音波発生装置: SND US-4
- (7) 超純水製造装置: MILLIPORE Milli-Q Element A10
- (8) 全量フラスコ: クラス A
- (9) 全量ピペット: クラス A

4) 分析方法

(1) 抽出

分析試料 1.0 g を 1 mg の桁まではかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れ、水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 10 分間かき混ぜを行った。さらに 8000 \times g で 5 分間遠心分離したものを、HPLC 測定用試料溶液とした。

分析フローシートは Scheme 1 のとおりである。



Scheme 1 Method flow sheet of measuring DMPP in fertilizers

(2) HPLC による測定

検量線用 DMPP 標準液 10 μ L を HPLC に注入し、既報^{2,5)}を参考に設定した Table 1 の測定条件で UV-Vis 吸収による吸光度を測定して得られたピーク面積から検量線を作成した。試料溶液 10 μ L を HPLC に注入し、ピーク面積から検量線により試料溶液中の DMPP の量を求め、分析試料中の濃度を算出した。測定時間については、DMPP 配合の流通肥料では妨害ピークが 2~7 分頃に出る試料があったことと、DMPP のピークが概ね 8~10 分頃に現れることから、12 分とした。

なお、流量については、既報⁵⁾では 1.5 mL/min とされているが、この流量では今回の検討にて使用した機器において、流路内圧力が許容値より高くなることから、約半分の 0.7 mL/min とした。同様にカラム槽温度については、既報⁵⁾では常温とされているが、常温レベルの温度では機器によっては安定し難いと考え、HPLC 法において一般的な設定温度である 40 $^{\circ}$ C に変更した。

クロマトグラム及び吸光度曲線の一例を Fig. 1 に示す.

Table 1 HPLC condition

HPLC	Waters 2695 separation module
Detector system	2996 photo diode array detector
Wavelength	224 nm
Column	Discovery C18 (150 mm L×4.6 mm I.D., 5 μm particle size)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	10 mmol/L Sodium dihydrogen phosphate - Acetonitrile (40+7)
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	10 μL
Measurement time	12 minutes

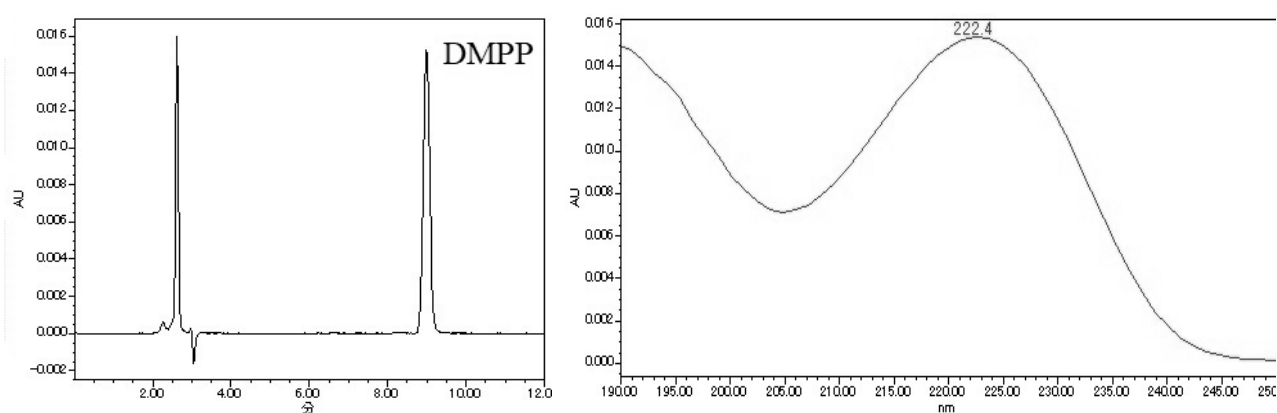


Fig. 1 HPLC chromatogram of standard solution and absorbance curves of DMPP (10 μg/mL) using Discovery C18 (Wavelength: 224 nm)

3. 結果

1) 検量線の直線性の確認

0.5 μg/mL～100 μg/mL の範囲でピーク面積を元に検量線を作成した. DMPP の検量線の決定係数(r^2)は 0.999 以上を示し, この範囲における検量線の直線性が確認できた (Fig. 2).

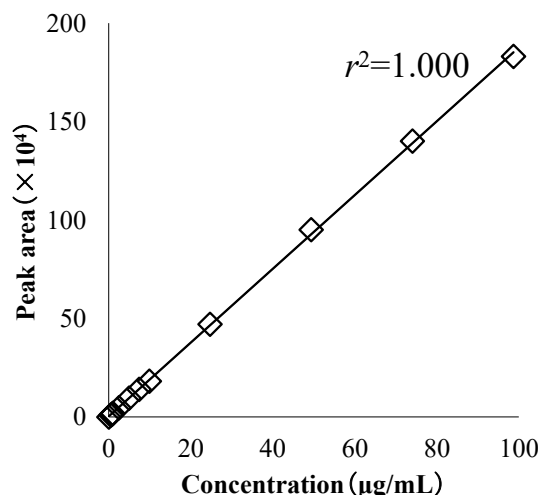


Fig. 2 Calibration curves of DMPP using Discovery C18 (0.5 µg/mL~100 µg/mL)

2) 抽出条件の検討: 希釈倍率及び抽出方法

肥料中における DMPP 測定方法の既報⁵⁾では, ①試料 30 g を 1000 mL 全量フラスコにはかりとり, 水 900 mL を加えて約 15 分間超音波処理をする, とされている(以下「A 法」とする.)。これに対し, ②試料 1 g を全量フラスコ 100 mL にはかりとり, 水 90 mL を加えて A 法と同様に超音波処理を行う方法(以下「B 法」とする.) , または③肥料等試験法⁴⁾に記載されている各硝酸化成抑制材の分析法と同様に, 試料 1 g を 200 mL 共栓三角フラスコにはかりとり, 水 100 mL を加えスターラーで 10 分間かき混ぜる方法(以下「C 法」とする.) について, それぞれ A 法と比較することにした。A 法と B 法, 及び A 法と C 法を比較するため, DMPP を配合された 3 種類の肥料について 4 点併行分析を行い, *F* 検定及び *t* 検定により DMPP 定量値の同等性を判断した。A~C 法間での抽出操作の相違点を Table 2 に, 比較の結果を Table 3-1~2 にそれぞれ示した。

A 法-B 法の比較, A 法-C 法の比較共に, 2 つの検定で有意差が認められなかったことから, この後の検討では他の硝酸化成抑制材の分析法における抽出方法と同様に, 試料 1 g を 200 mL 共栓三角フラスコにはかりとり 10 分間かき混ぜる抽出方法(C 法)を採用することとした。

Table 2 Differences in extraction operations between methods A, B and C

	Method A	Method B	Method C
Sampling volume	30 g	1 g	1 g
Constant capacity (water)	1000 mL	100 mL	-
Adding volume (water)	-	-	100 mL
Extraction	Ultrasonic shaking 15 minutes	Ultrasonic shaking 15 minutes	Stir to mix 10 minutes
Filtration	Hydrophilic PTFE membrane filter (0.45 µm)	Hydrophilic PTFE membrane filter (0.45 µm)	Centrifugal separation 8000 ×g, 5 minutes

Table 3-1 The comparison of methods A and B

Sample	Method	Quantitative value of DMPP ^{a)} (%) ^{b)}	<i>F</i> -test		<i>t</i> -test	
			Variance ratio	Critical value ^{c)}	<i>t</i> -value	Critical value ^{d)}
Urea	Method B	0.269	4.02	9.28	0.95	2.45
	Method A (Conventional method)	0.274				
Compound fertilizer A	Method B	0.0559	3.68	9.28	0.46	2.45
	Method A (Conventional method)	0.0560				
Mixed fertilizer	Method B	0.0248	1.33	9.28	0.83	2.45
	Method A (Conventional method)	0.0251				

a) Average ($n=4$)

b) Mass fraction

c) F (3,3;0.05)d) t (6;0.05)

Table 3-2 The comparison of methods A and C

Sample	Method	Quantitative value of DMPP ^{a)} (%) ^{b)}	<i>F</i> -test		<i>t</i> -test	
			Variance ratio	Critical value ^{c)}	<i>t</i> -value	Critical value ^{d)}
Urea	Method C	0.266	2.65	9.28	0.20	2.45
	Method A (Conventional method)	0.266				
Compound fertilizer A	Method C	0.0507	2.23	9.28	1.16	2.45
	Method A (Conventional method)	0.0498				
Mixed fertilizer	Method C	0.0231	1.14	9.28	0.55	2.45
	Method A (Conventional method)	0.0234				

a) Average ($n=4$)

b) Mass fraction

c) F (3,3;0.05)d) t (6;0.05)

3) 抽出条件の検討:ろ過方法

C法のろ過方法において、遠心分離をメンブレンフィルターろ過に変更した場合の同等性を確認した。Table

4 のとおり, F 検定及び t 検定で有意差が認められなかったことから, いずれのろ過方法も適用できることを確認した.

Table 4 The comparison of centrifugation and filtration

Sample	Method	Quantitative value of DMPP ^{a)} (%) ^{b)}	F -test		t -test	
			Variance ratio	Critical value ^{c)}	t -value	Critical value ^{d)}
Compound fertilizer A	Method C (Membrane filter)	0.0541	1.05	9.28	1.23	2.45
	Method C (Centrifugation: Conventional method)	0.0544				

a) Average ($n=4$)

b) Mass fraction

c) F (3,3;0.05)

d) t (6;0.05)

4) マトリックスの影響の確認

現在, 国内で肥料登録されている DMPP 配合肥料は全て有機質を含まない肥料であるが, 今後有機質を含む肥料についても登録される可能性があると考え, DMPP 非配合の有機質入り化成肥料 4 点及び混合堆肥複合肥料 1 点について C 法による抽出を行い, DMPP のピークと重なるピークの有無を確認した. また, DMPP 非配合であり有機質も含まない化成肥料 1 点及び配合肥料 2 点, 並びに DMPP を配合したものの登録実績がない肥料として, アセトアルデヒド縮合尿素 1 点, イソブチルアルデヒド縮合尿素 1 点, ホルムアルデヒド加工尿素肥料 1 点及び被覆窒素肥料 1 点についても同様に, ピークの有無を確認した.

その結果, 有機質入り化成肥料 4 点, 混合堆肥複合肥料 1 点及びホルムアルデヒド加工尿素肥料について, 8~10 分頃に DMPP のピークと重なるピークがあり, かつ検出下限相当を上回るピークが見られたことから, 有機質を含む肥料及びホルムアルデヒド加工尿素肥料については本法の適用外とすることとした.

なお, これらのピーク確認を実施した有機質を含む肥料に含まれる有機質原料を Table 5 に, 各肥料のクロマトグラムを Fig. 3 に, それぞれ示す.

Table 5 Organic raw materials in fertilizers containing organic matter for blank test

Type of fertilizer	Organic materials
Organic compound fertilizer-1	Rapeseed oil residue, Castor oil residue, Rice bran, Processed poultry manure fertilizer, Fish meal powder, Mixed organic fertilizer
Organic compound fertilizer-2	Rapeseed oil residue, Rice bran oil residue, Soybean oil residue, Mixed organic fertilizer, Steamed feather meal,
Organic compound fertilizer-3	Rapeseed oil residue, Castor oil residue, Rice bran, Processed poultry manure fertilizer, Fish meal powder, Mixed organic fertilizer, Dry cell fertilizer
Organic compound fertilizer-4	Steamed leather powder, Dry blood, Steamed feather meal, Processed organic fertilizer, Meat-and-bone meal
Compost mixed fertilizer	Chicken manure compost, Livestock manure compost

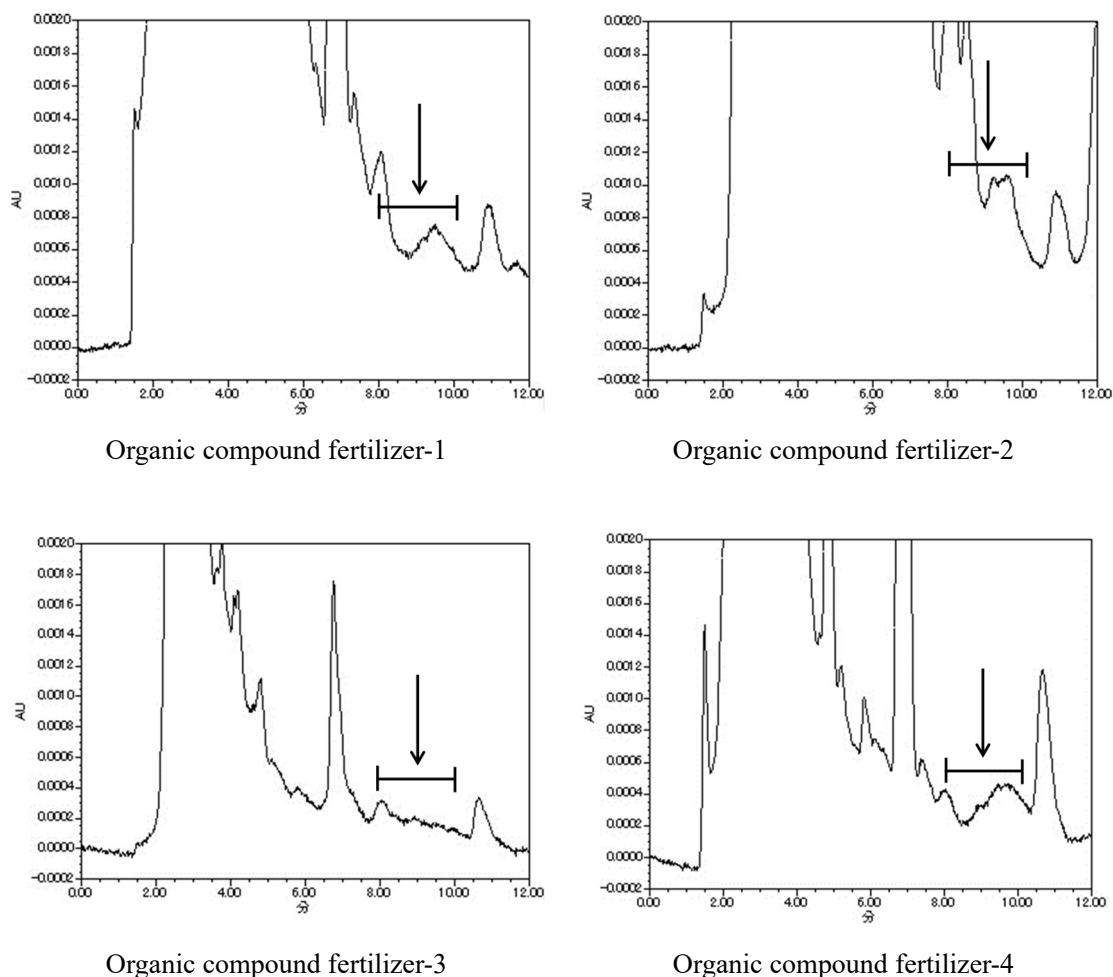


Fig. 3 Chromatogram of DMPP-free fertilizers at developed method

Arrow: Approximate retention time of DMPP

Horizontal line: Rough fluctuation range of retention time of DMPP

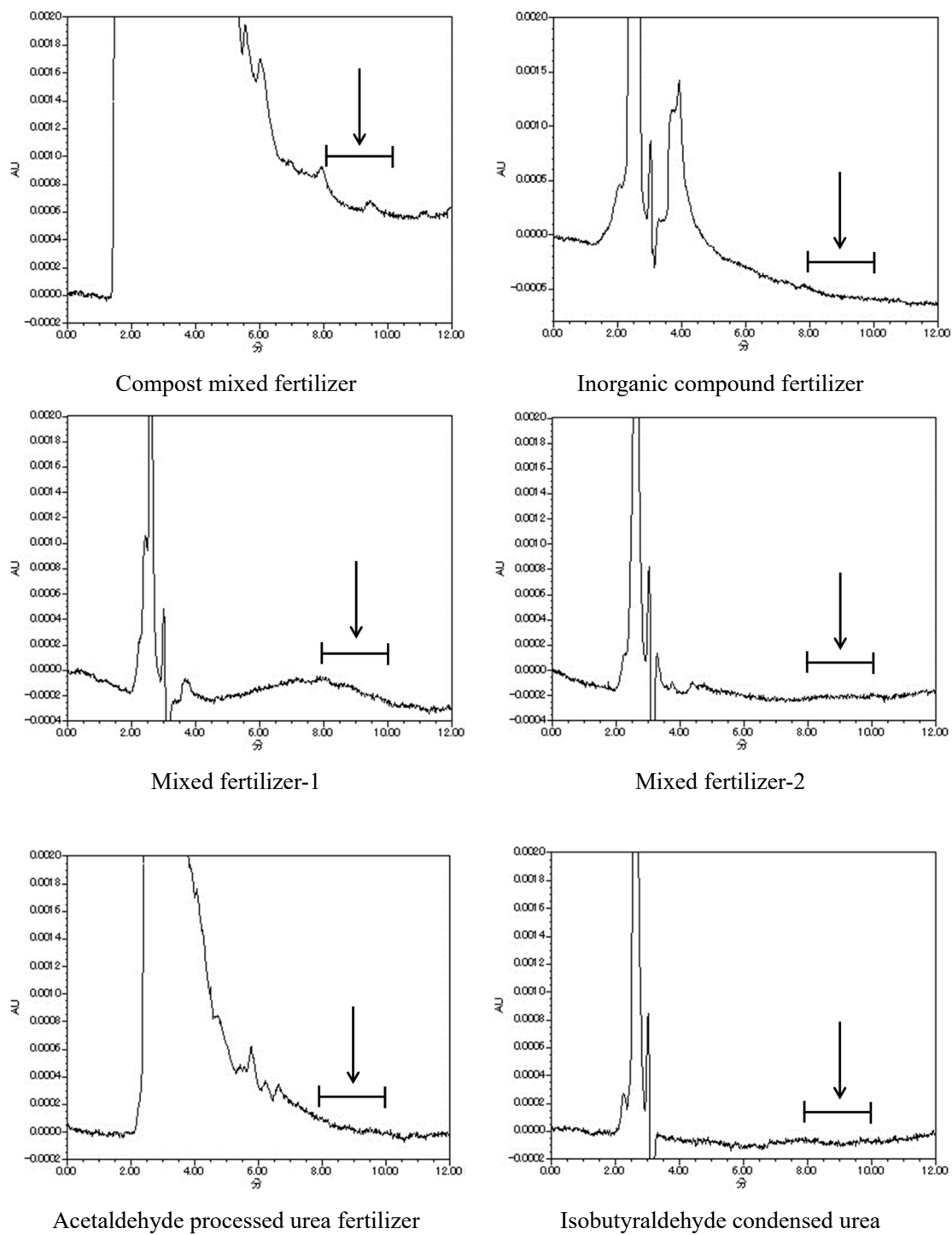


Fig. 3 (Continue)

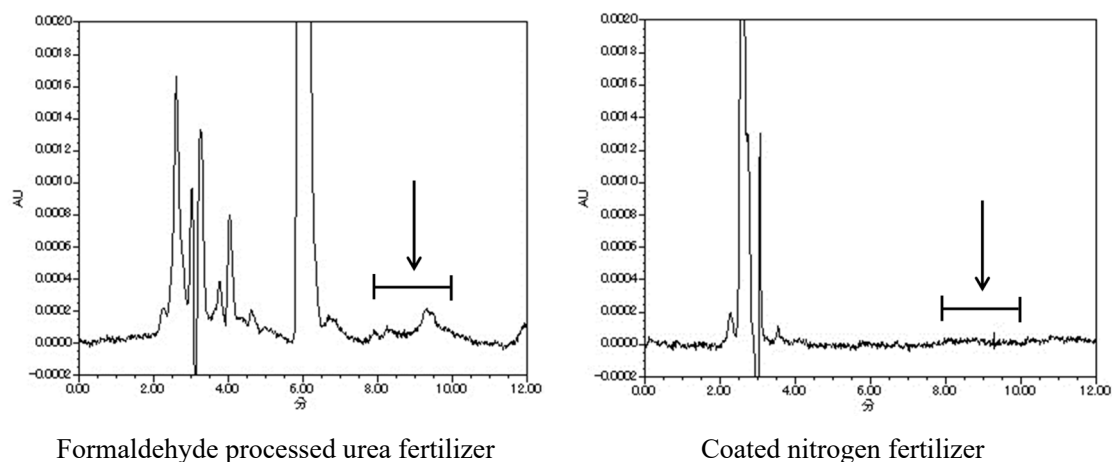


Fig. 3 (Continue)

5) 添加回収試験による真度の評価

真度を評価するため、DMPP 非配合の尿素、化成肥料(有機質肥料を含まない)及び配合肥料(同)各 1 点を使用し、3 点併行で添加回収試験を実施した結果を Table 6 に示す。これまでに国内で登録されている DMPP 配合肥料における、DMPP の使用範囲が約 0.03 %~0.3 %程度であり特に 0.1 %前後のものが多いこと、また、実際は設計値より過少または過剰に配合されるケースも想定して、添加濃度は 0.01 %、0.1 %及び 0.5 %とした。

いずれの回収率も肥料等試験法⁴⁾に示されている真度の目標範囲以内であったことから、本法は十分な真度を有していることが確認された。

Table 6 Results of recovery test

Sample	Spiked level (%) ^{a)}	Quantitative value of DMPP ^{b)} (%) ^{a)}	Recovery rate (%)	Criteria of the trueness ^{c)} (%)
Urea ^{d)}	0.5	0.501	100.2	85~110
	0.1	0.0976	97.6	85~110
	0.01	0.00989	98.9	80~115
Compound fertilizer ^{d)}	0.5	0.507	101.3	85~110
	0.1	0.0971	97.1	85~110
	0.01	0.00973	97.3	80~115
Mixed fertilizer ^{d)}	0.5	0.504	100.8	85~110
	0.1	0.0969	96.9	85~110
	0.01	0.00988	98.8	80~115

a) Mass fraction

b) Mean value ($n=3$)

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

d) DMPP-free fertilizer

6) 併行精度及び中間精度の確認

DMPP 配合肥料である尿素 1 点, 混合窒素肥料 1 点, 化成肥料 4 点及び配合肥料 1 点について, それぞれ 2 点併行で 5 日間測定を行った結果を Table 7 に示す. また, その結果を基に, 一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 8 に示す.

いずれの相対標準偏差も肥料等試験法⁴⁾に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の許容範囲内であったことから, 本法は十分な精度を有していることが確認された.

Table 7 Individual result of repetition test of changing the date for accuracy estimation (mass fraction (%))

Sample	Test day				
	1	2	3	4	5
Urea	0.262	0.258	0.253	0.259	0.260
	0.260	0.257	0.252	0.261	0.261
Mixed nitrogen fertilizer	0.149	0.147	0.147	0.138	0.143
	0.149	0.144	0.145	0.139	0.144
Compound fertilizer B	0.110	0.105	0.107	0.098	0.105
	0.111	0.105	0.108	0.099	0.105
Compound fertilizer C	0.0554	0.0541	0.0541	0.0504	0.0526
	0.0554	0.0545	0.0531	0.0507	0.0528
Compound fertilizer D	0.0380	0.0378	0.0377	0.0352	0.0372
	0.0388	0.0379	0.0376	0.0353	0.0366
Compound fertilizer A	0.0334	0.0320	0.0319	0.0324	0.0328
	0.0334	0.0331	0.0319	0.0325	0.0319
Mixed fertilizer	0.0183	0.0185	0.0181	0.0183	0.0179
	0.0190	0.0187	0.0173	0.0190	0.0185

Table 8 Statistical analysis of repetition test result for estimating precision

Sample	Quantitative value of DMPP ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
		s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%) ^{b)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)
Urea	0.258	0.0011	0.4	4	0.0036	1.4	6.5
Mixed nitrogen fertilizer	0.145	0.0011	0.8	4	0.0039	2.7	6.5
Compound fertilizer B	0.105	0.0004	0.4	4	0.0044	4.1	6.5
Compound fertilizer C	0.0533	0.0004	0.7	4	0.0019	3.5	6.5
Compound fertilizer D	0.0372	0.0003	0.8	4	0.0012	3.3	6.5
Compound fertilizer A	0.0325	0.0004	1.4	4	0.0006	1.9	6.5
Mixed fertilizer	0.0184	0.0004	2.4	4	0.0005	2.8	6.5

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

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

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

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

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

7) 定量下限等の推定

DMPP の検量線用の標準液の最小濃度は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (分析試料中で 0.005 %相当量) であり, SN 比は 10 を超えていた. また, DMPP 配合肥料のうち, DMPP 配合量の設計値が最も低かったものは約 0.03 %程度であったことから, その約 1/5 である 0.006 %相当量になるよう, DMPP 非配合の配合肥料 1 g に 60 μg を添加して 7 点併行で分析し, その平均値及び標準偏差等の結果を Table 9-1 に示した. この分析によって得られた DMPP の併行分析の結果, 用いた検量線 (0.5 ng/mL ~ 10 ng/mL) 及び試料溶液の SN 比についてそれぞれ, 肥料等試験法⁴⁾別添 試験法の妥当性確認の手順 に従って定量下限及び検出下限を Table 9-2 のとおり算出した.

その結果, DMPP の定量下限は 0.003 %, 検出下限は 0.001 %程度とそれぞれ推定された. また, 回収率は 95.7 %であり, 肥料等試験法に示されている真度評価の推奨範囲内であった.

Table 9-1 Result of parallel test for estimation of the lower limit of quantification of DMPP

Sample	Spiked level (%) ^{a)}	Quantitative value of DMPP (%) ^{a)}	s_r ^{b)} (%) ^{a)}	Recovery rate of DMPP ^{c)} (%) ^{a)}
Mixed fertilizer ^{d)}	0.006	0.00574	0.00007	95.7

a) Mass fraction

b) Repeatability standard deviation

c) Mean value ($n=7$)

d) DMPP-free fertilizer

Table 9-2 Result of estimation of the lower limit of quantification and detection of DMPP

By parallel test ^{a)}		By calibration curves ^{b)}		By SN ratio ^{c)}	
LOQ ^{d)}	LOD ^{e)}	LOQ ^{d)}	LOD ^{e)}	LOQ ^{d)}	LOD ^{e)}
(%) ^{f)}	(%) ^{f)}	(%) ^{f)}	(%) ^{f)}	(%) ^{f)}	(%) ^{f)}
0.0007	0.0003	0.003	0.001	0.003	0.001

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

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

c) Procedure(3.6.3) and (3.7.3) for validating the testing method in attachment of Testing Methods of Fertilizers

d) Estimation of the lower limit of quantitation of DMPP

e) Estimation of the lower limit of detection of DMPP

f) Mass fraction

4. まとめ

HPLC を用いて肥料中の DMPP の分析法について検討したところ、次の結果を得た。

(1) 試料溶液調製における抽出方法は、試料 1.0 g を 200 mL 容共栓三角フラスコにはかりとり、水 100 mL を加えてマグネチックスターラーで 10 分間かき混ぜ後、遠心分離またはメンブレンフィルターろ過する方法とした。

(2) HPLC の測定条件は、C18 カラムを用いて検出波長を 224 nm、溶離液を 10 mmol/L リン酸二水素ナトリウム+アセトニトリル(40+7)、流速を 0.7 mL/min、及びカラム温度を 40 °Cとした。また、検量線の直線性は 0.5 µg/mL~100 µg/mL の範囲で直線性(決定係数 $r^2=0.999$ 以上)を示した。

(3) 有機質を含む肥料及びホルムアルデヒド加工尿素肥料ではマトリックスの影響があることから、本法の適用外とした。

(4) 添加回収試験は、3 種類の肥料に、3 段階の濃度の DMPP を添加した計 9 通りについて 3 点併行分析をし、平均回収率は 96.9 %~101.3 %であり、肥料等試験法⁴⁾における各濃度レベルの回収率の許容範囲内にすべて含まれていた。

(5) 4種類7点の試料について5日間の反復分析を行い, 併行精度及び中間精度を確認した結果, 肥料等試験法で示されている目安の範囲内であった.

(6) 本法におけるDMPPの定量下限は0.003%程度, 検出下限は0.001%程度であると推定された.

以上から, 単一試験室における分析法の妥当性を確認した結果, 本法は肥料中のDMPPを測定するために, 十分な性能を有していることを確認した.

文 献

- 1) 田淵浩平, 小林 新: 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) の硝酸化成抑制効果と水稻基肥への活用, 日本土壤肥科学雑誌, 90(2), 147-152(2019)
- 2) Gero Benckiser et al: The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole-phosphate (DMPP) - quantification and effects on soil metabolism, Plant and Soil, 371, 257-266(2013)
- 3) 農林水産省告示: 肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和61年2月22日, 農林水産省告示第284号, 最終改正令和3年6月14日, 農林水産省告示第1010号(2021)
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC): 肥料等試験法(2020)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf>
- 5) Fertilizers. Determination of 3,4-dimethyl-1H-pyrazole phosphate (DMPP). Method using high-performance liquid chromatography (HPLC), EN 16328(2012)

Determination of 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in Fertilizers by High Performance Liquid Chromatography

FUNAKI Norio¹

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

DMPP is new nitrate inhibitor used in recent years. A High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for analytical method of DMPP in fertilizers was developed refer to EN 16328 (2012) and validated as a single-laboratory validation. I extracted the sample by adding water and stirred for ten minutes. After centrifugation, I analyzed sample solution by HPLC, on ODS column with UV detection at 224 nm. As a result of 3 replicate analysis of 3 fertilizer samples (urea, compound fertilizer and mixed fertilizer) spiked with DMPP (0.01 %, 0.1 % and 0.5 % (mass fraction)), the mean recoveries were 96.9 % - 101.3 %. Repeatability standard deviation of DMPP were estimated 0.4 % - 2.4 % by analyzing 7 fertilizer samples (urea, mixed nitrogen fertilizer, 4 compound fertilizers and mixed fertilizer). Similarly, intermediate relative standard deviations of there were estimated 1.4 % - 4.1 %. The limits of quantification of there were estimated 0.003 %, and the limits of detection of there were estimated 0.001 %. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of DMPP in fertilizers.

Key words DMPP, nitrate inhibitor, HPLC, fertilizer

(Research Report of Fertilizer, 14, 39-52, 2021)

5 ICP-MSを用いた肥料中のひ素等の分析法の開発

山西正将¹, 沼寄佳奈子¹, 白井裕治¹

キーワード 肥料, マイクロ波分解装置, ICP-MS

1. はじめに

汚泥肥料及び一部の汚泥肥料以外の肥料(以下、「従来肥料」という。)には公定規格¹⁾において含有を許される有害成分(ひ素(As), カドミウム(Cd), 水銀(Hg), ニッケル(Ni), クロム(Cr), 鉛(Pb))の最大量(許容値)が設定されている。肥料等試験法²⁾に記載されている As の分析法は液状の汚泥肥料以外の肥料については試料を酸分解し原子吸光分析装置を用いて測定する方法が示されているが, 高温の酸を長時間扱う必要があり, 試験結果を得るまでに時間を要するとともに酸分解の手順に非常に注意を要する。

また, マイクロ波分解により試料を分解し, 誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いて測定する方法については, 2015年にコリジョン・リアクションセルを備えていない ICP-MS を用いての液状汚泥肥料中の As, Cd, Ni, Cr, Pb の測定法³⁾, 2016年に同様の ICP-MS を用いての汚泥肥料中の Cd の測定法⁴⁾, 2018年にコリジョン・リアクションセルを備えた ICP-MS を用いての汚泥肥料中の Cd, Ni, Cr, Pb の測定法⁵⁾の検討を行っており, 肥料等試験法における各有害成分の ICP-MS 法の対応状況は Table 1 となっている。

そこで今回, これまで検討していなかった汚泥肥料中の As の分析法についてコリジョン・リアクションセルを備えた ICP-MS を用いた測定法の検討を行い, 単一試験室による妥当性確認を行うとともに, Table 1 で未対応となっている従来肥料中の As, Cd, Ni, Cr, Pb の測定法及びコリジョン・リアクションセルを備えた ICP-MS を用いた液状汚泥肥料中の As, Cd, Ni, Cr, Pb の測定法についても同様の確認を行ったので報告する。

Table 1 Item number of measurement method using ICP-MS in the test method of fertilizer 2020 for each fertilizer

Element	Liquid sludge fertilizer	Solid sludge fertilizer	Fertilizers other than sludge fertilizer
As	5.2.c ^{a)c)}	— ^{b) c)}	— ^{b) c)}
Cd	5.3.c ^{a)c)}	5.3.d	— ^{b) c)}
Hg	— ^{b)}	— ^{b)}	— ^{b)}
Ni	5.4.c ^{a)c)}	5.4.d	— ^{b) c)}
Cr	5.5.e ^{a)c)}	5.5.f	— ^{b) c)}
Pb	5.6.c ^{a)c)}	5.6.d	— ^{b) c)}

a) No gas mode

b) Not listed

c) The part investigated this time is colored

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

Table 2 に示した肥料生産工場等で生産され流通する肥料を収集した。液状の汚泥肥料を除く汚泥肥料については肥料等試験法²⁾2.3.1 に基づき、粉碎前に 40 °C で 60～70 時間乾燥した。粉碎は肥料等試験法 2.3.3 に基づき、鉍さいけい酸質肥料及び副産苦土肥料は 212 μm のふるいを通過するまで粉碎機 1 で粉碎し、その他の肥料は 500 μm のふるいを通過するまで粉碎機 2 で粉碎したものを分析用試料とした。なお、対象となる成分を高濃度含有する肥料を入手することが困難であったため、任意の濃度となるよう粉碎後の分析用試料に試薬を添加したのも併せて分析用試料とした。

Type and number of samples			
Sewage sludge fertilizer	3	Molded compound fertilizer	2
Sludge from fecal treatment plant	8	Coated mixed fertilizer	2
Industrial sludge fertilizer	1	Mixed fertilizer	4
Mixed sludge fertilizer	1	Complex fertilizer mixed with compost	1
Calcined sludge fertilizer	3	Byproduct mixed fertilizer	2
Composted sludge fertilizer	26	Fluid mixed fertilizer	4
Composted marine byproduct	1	Silicate slag fertilizer	1
Superphosphate	1	Byproduct magnesium fertilizer	1
Concentrated superphosphate	1	Micronutrient mixture	1
Processed phosphate fertilizer	2		
Mixed phosphate fertilizer	1		
Total			66

2) 試薬等の調製

- (1) ひ素標準液 (As 1000 mg/L)：富士フィルム和光純薬 JCSS
- (2) カドミウム標準液 (Cd 1000 mg/L)：富士フィルム和光純薬 JCSS
- (3) ニッケル標準液 (Ni 1000 mg/L)：富士フィルム和光純薬 JCSS
- (4) クロム標準液 (Cr 1000 mg/L)：富士フィルム和光純薬 JCSS
- (5) 鉛標準液 (Pb 1000 mg/L)：富士フィルム和光純薬 JCSS
- (6) 混合標準液：(1)～(5)の各標準原液を混合・希釈し、混合標準原液 (As: 200 ng/mL, Cd: 50 ng/mL, Ni: 500 ng/mL, Cr: 1000 ng/mL, Pb: 100 ng/mL) を調製した。なお、希釈時には硝酸(1+19)を用いた。
- (7) 検量線用標準液：(6)の混合標準液を希釈し、検量線用標準液 (As: 0.2 ng/mL～20 ng/mL, Cd: 0.05 ng/mL～5 ng/mL, Ni: 0.5 ng/mL～50 ng/mL, Cr: 1 ng/mL～100 ng/mL, Pb: 0.1 ng/mL～10 ng/mL) を調製した。なお、希釈時には硝酸(1+19)を用いた。
- (8) 検量線用空試験液：硝酸(1+19)を使用した。
- (9) テルル標準液 (Te 1000 mg/L)：GLサイエンス ICP 用
- (10) ロジウム標準液 (Rh 1000 mg/L)：GLサイエンス ICP 用

- (11) スカンジウム標準液(Sc 1000 mg/L): GL サイエンス ICP 用
- (12) タリウム標準液(Tl 1000 mg/L): GL サイエンス ICP 用
- (13) 混合内標準液: (9)~(12)の標準液を内標準原液として用いた. 各内標準原液を混合・希釈し, 混合内標準液(Te: 100 ng/mL, Rh: 50 ng/mL, Sc: 500 ng/mL, Tl: 50 ng/mL)を調製した. なお, 希釈時には硝酸(1+19)を用いた.
- (14) 塩化カルシウム 2 水和物: 富士フィルム和光純薬 特級
- (15) サマリウム標準液(Sm 1000 mg/L): 富士フィルム和光純薬 JCSS
- (16) ネオジウム標準液(Nd 1000 mg/L): 富士フィルム和光純薬 JCSS
- (17) モリブデン標準液(Mo 1000 mg/L): 富士フィルム和光純薬 JCSS
- (18) 酢酸: 関東化学 Ultrapur
- (19) 硝酸(68 %): 多摩化学工業 TAMAPURE-AA100
- (20) 硝酸(1+19): 硝酸の体積 1 と水の体積 19 とを混合したもの.
- (21) 過酸化水素(35 %): 多摩化学工業 TAMAPURE-AA100
- (22) 水: 超純水製造装置(Direct-Q UV5, Millipore)で精製した JIS K 0557 に規定する A4 の水を用いた.

3) 器具及び装置

- (1) 誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)
: Thermo Fisher Scientific iCAP RQ (四重極型質量分析計, デュアルモード二次電子増倍管検出器)
- (2) マイクロ波分解装置: Anton-Paar Multiwave 3000, マイルストーンゼネラル ETHOS-1
- (3) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (4) ポリプロピレン製ねじり容器: ジーエルサイエンス DigiTUBEs 100 mL 50 mL
- (5) 粉碎機 1: 川崎重工業 T-100
- (6) 粉碎機 2: Retsch ZM-200
- (7) 原子吸光分析装置: 日立ハイテクノロジー Z-2310
- (8) 誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES): 島津製作所 ICPE-9820

4) 分析操作

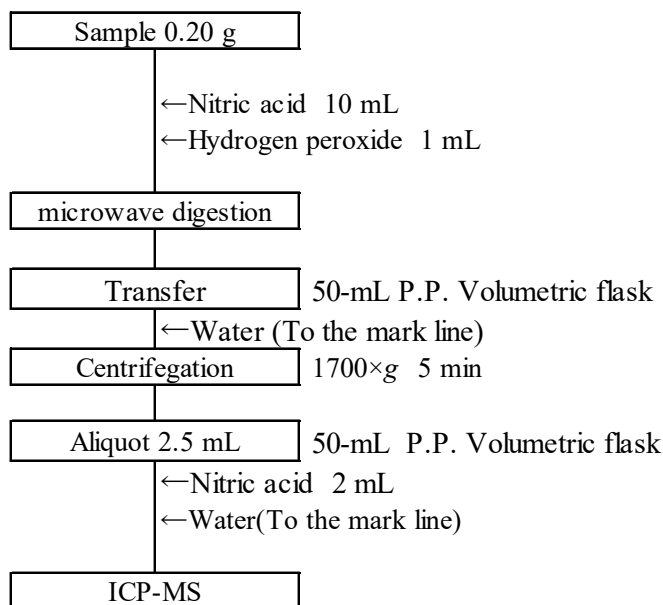
- (1) 測定溶液の調製

テフロン TFM 製の高压分解容器に分析試料 0.20 g をはかりとり, 硝酸 10 mL 及び過酸化水素 1 mL を加えた. 発泡がおさまったのち, マイクロ波分解装置を用いて Table 3 の分解プログラムによって分解した. 分解最高温度は約 200 °C~240 °C, 分解最高圧力は 6 MPa であった. 着色した沈殿物など有機物の残存が認められる場合は硝酸 2 mL, 過酸化水素 1 mL を加え再度分解操作を行った. 放冷後, 分解液をポリプロピレン製ねじり容器(容量 50 mL)に水で洗い込み, 50 mL の標線まで水を加えて 3000 rpm/min(約 1700×g)で 5 分間遠心分離した. 上澄み液 2.5 mL をポリプロピレン製ねじり容器(容量 50 mL)にとり, 溶液の酸濃度が検量線用標準液と同等となるように硝酸を加え, 水で 50 mL に定容した液を測定溶液とし, ICP-MS を用いて測定した. 測定する成分濃度が検量線濃度範囲を超える場合には, 硝酸(1+19)を用いて適宜希釈した(Scheme 1). なお, 液状の汚泥肥料については, テフロン TFM 製の高压分解容器に分析試料 20.0 g をはかりとり, 硝酸 2.5 mL 及び過酸化水素 1 mL を加え, マイクロ波分解装置を用いて分解した. 放冷後, 分解液をポリプロピレン製ねじり容器(容量 50 mL)に水で洗い込み, 50 mL の標線まで水を加えて 3000 rpm/min(約 1700×g)で 5 分間遠心分離した. 上澄み液 2.5 mL をポリプロピレン製ねじり容器(容量 50 mL)にとり, 硝酸(1+19)で 50 mL に定容し

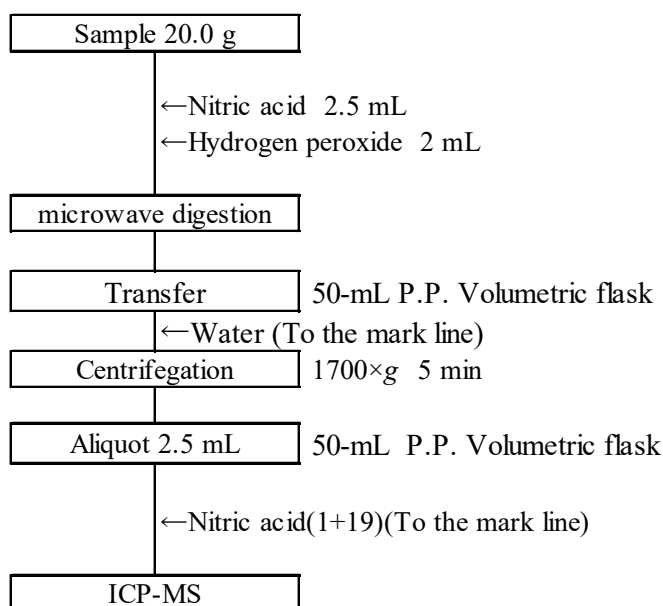
た液を測定溶液とし、ICP-MS を用いて測定した (Scheme 2) .

Table 3 Operating condition of microwave digestion equipment

	Electric power (W)	Time (min)	State
step 1	0→1400	10	Heating
step 2	1400	10	Fixed temperature
step 3	0	20	Residual heat



Scheme 1 Flow sheet for analysis of arsenic, etc.in fertilizer other than liquid sludge fertilizer using ICP-MS



Scheme 2 Flow sheet for analysis of arsenic, etc.in liquid sludge fertilizer using ICP-MS

(2) 測定及び濃度の算出

測定溶液及び混合内標準液をそれぞれ 9:1 の割合で混合した後 ICP-MS に導入し, ^{75}As , ^{111}Cd , ^{60}Ni , ^{52}Cr , ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb , ^{45}Sc , ^{103}Rh , ^{125}Te , ^{205}Tl を測定し, Table 4 の組み合わせで内標準補正をした. なお, 原材料としてモリブデンを含む試料については, ICP-MS により ^{111}Cd を測定する際に Mo を由来とした多原子イオンである $^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$ 及び $^{94}\text{Mo}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$ によるスペクトル干渉が生じることが知られている⁶⁾ことから, 底質調査方法⁷⁾に記載されている補正式 (a) を使用して測定溶液の ^{111}Cd の指示値を補正した.

同時に, 検量線用混合標準液を測定し, 同様に内標準補正をし, 検量線を作成して分析用試料中の As, Cd, Ni, Cr, Pb 濃度を算出した. なお, Pb については ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb のそれぞれの指示値を合算した指示値を内標準補正し, 分析試料中の Pb 濃度を算出した.

ICP-MS の測定条件は Table 5 のとおり.

$$^{111}\text{Cd} = 1.000 \times ^{111}\text{M} - 1.073(^{108}\text{M} - 0.712 \times ^{106}\text{M}) \cdots (a)$$

^{111}Cd : Indicated value of ^{111}Cd corrected

^{111}M : Indicated value of ^{111}Cd uncorrected

^{108}M : Indicated value of ^{108}Cd

^{106}M : Indicated value of ^{106}Cd

Table 4 Monitor ion

Target	Internal standard
^{75}As	^{125}Te
^{111}Cd	^{103}Rh
^{60}Ni	^{103}Rh
^{52}Cr	^{45}Sc
^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb	^{205}Tl

Table 5 Operation conditions of ICP-MS

High-frequency output	1.55 kW
Sampling depth	5.0 mm
Plasma gas (Ar)	14 L/min
Auxiliary gas (Ar)	0.8 L/min
Nebulizer gas (Ar)	1.05 L/min
Collision gas (He)	4.5 L/min
Oxide ion production rate (CeO/Ce)	Less than 1%
Collision mode	He-KED

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

(1) スペクトル干渉の確認

① ^{75}As 測定時の $^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$ 及び $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ によるスペクトル干渉

ICP-MS により Ca や Cl を含有する試料中の ^{75}As を測定する際には, 多原子イオンである $^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$ 及び

$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ によるスペクトル干渉が生じるが、多原子イオンによるスペクトル干渉はコリジョンガスを使用することにより低減できることが知られている⁶⁾。そこで、Table 6 の条件により試料当たり 5 % (質量分率) ~ 20 % (質量分率) 相当濃度の CaCl_2 溶液及び As 0.2 ng/mL の標準液を測定し、得られた ^{75}As の指示値を比較し、 $^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$ 及び $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ によるスペクトル干渉の影響を調査した。

その結果は Table 6 のとおりであり、 CaCl_2 溶液の結果は As 0.2 ng/mL 標準液と比較していずれも 1/10 以下であった。試料中に換算した場合には 0.05 mg/kg 以下であり、3. 7) で確認した定量下限の 1/20 以下であったため、コリジョンガスとして He を使用し KED モードにて測定することにより、多原子イオンである $^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$ 及び $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ によるスペクトル干渉は測定に影響を及ぼさない程度まで低減できることを確認した。

Table 6 Spectral interference to As by CaCl_2

Concentration of CaCl_2 (%) ^{a)}	Indicated value of ^{75}As	
	CaCl_2 solution	As 0.2 ng/mL
5	26 ^{b)}	403 ^{b)}
10	20 ^{b)}	
20	28 ^{b)}	

a) Mass fraction

b) Mean value($n=3$)

② ^{75}As 測定時の ^{150}Sm 及び ^{150}Nd によるスペクトル干渉

ICP-MS により ^{75}As を測定する際には、2 価イオンである ^{150}Sm 及び ^{150}Nd によるスペクトル干渉が生じるが、2 価イオンによるスペクトル干渉は多原子イオンと違いコリジョンガスを使用することにより影響を除去できない⁶⁾。そこで、収集した試料 66 点についてマイクロ波分解装置を用いて分解し、ICP-OES を用いて Sm 及び Nd を測定し、ICP-MS 測定溶液中の Sm 及び Nd 濃度を算出した (Table 7) ところ、最大濃度は Sm 1.2 ng/mL 程度、 Nd 0.07 ng/mL 程度であった。そこで、 Sm 2 ng/mL、 Nd 0.1 ng/mL の溶液及び As 0.2 ng/mL を調製し、ICP-MS を用いて測定し ^{75}As の指示値を確認した。結果は Table 7 のとおりであり、 Sm 溶液の結果は As 0.2 ng/mL 標準液と比較して ^{75}As の指示値が 1/3 程度であり、 Nd は 1/30 程度であった。試料中に換算した場合には Sm 2 ng/mL 溶液は As として 0.3 mg/kg 程度であり、定量下限以下であることから、 Sm 及び Nd によるスペクトル干渉は基準値相当濃度を測定する際には影響のない程度であると考えられた。

Table 7 Spectral interference to As by Sm and Nd

Element	Spiked level (ng/mL)	Indicated value of ^{75}As	Indicated value of ^{75}As in As 0.2 ng/mL
Sm	2	222 ^{a)}	634 ^{a)}
Nd	0.1	23 ^{a)}	

a) Mean value($n=3$)

③ ^{111}Cd 測定時の $^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$ 及び $^{94}\text{Mo}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ によるスペクトル干渉

現在流通する肥料の一部には効果発現促進材として Mo 化合物が使用されているが、ICP-MS により ^{111}Cd

を測定するには試料中の Mo を由来とした多原子イオンである $^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$ 及び $^{94}\text{Mo}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$ によるスペクトル干渉が生じることが知られている⁶⁾. それらのスペクトル干渉を He-コリジョンによりどの程度低減できるかを調べるため, Mo を原材料として使用していない分析用試料に Mo を一定量添加した試料と無添加の試料を用いて He-コリジョンガスを使用した ICP-MS による分析値を比較した. なお, Mo 添加濃度は流通する肥料における一般的な Mo 化合物の使用量を考慮し決定した.

分析結果について *t* 検定を行った結果, Mo 無添加と Mo 添加の測定結果において両側有意水準 5 % で有意差が認められた (Table 8).

一方, 底質調査方法⁷⁾には ^{111}Cd 測定時の Mo によるスペクトル干渉について, 2. 4) (2) 補正式(a)により指示値を補正する方法が記載されていることから, Mo を一定量添加した試料について, 測定した ^{111}Cd の指示値を補正し算出した分析値と指示値の補正をしていない無添加試料の分析値について *t* 検定を行った結果, 分析値の間に両側有意水準 5 % で有意差は認められず, 補正式(a)を使用することにより Mo によるスペクトル干渉の影響は測定に影響を与えない程度に補正できることが確認された.

よって, 以降の検討では分析用試料中に原材料として Mo を含む場合には, 補正式(a)により ^{111}Cd の指示値を補正することとした.

Table8 Comparison of Cd analysis values of Mo-added sample and non-added sample before and after correction

Sample	Spiked level of Mo (%) ^{a)}	correction	Analytical value of Cd (mg/kg)	<i>F</i> test		<i>t</i> test	
				Variance ratio	Critical value	t-value	Critical value
Compound fertilizer	Not added	Uncorrected	4.82	1.45	9.28	12.51	2.45
	0.1	Uncorrected	5.21				
	Not added	Uncorrected	4.82	1.10	9.28	0.42	2.45
	0.1	Corrected	4.84				

a) Mass fraction

b) Mean value($n=4$)

(2) 炭素によるマトリックス干渉の確認

ICP-MS により ^{75}As を測定する際, 測定溶液中に炭素が存在した場合に As の指示値が増感するため, 飼料研究報告⁸⁾では測定溶液中に酢酸を一定量添加することにより増感を補正する方法が報告されている. そこで酢酸の添加量を検討するため, As 4 ng/mL 標準液に段階的に酢酸を添加し As の指示値の増感の程度を確認するとともに, 内標準元素によりどの程度補正できるかを確認した. 内標準元素は肥料等試験法²⁾及び藤森による報告⁹⁾を参考として ^{103}Rh 及び ^{125}Te を使用した.

結果は Figure 1 のとおり, Rh を内標準元素とした場合, 酢酸を一定量添加し増感を補正するためには As の指示値の変化量の比較的小さい範囲である 10 % (体積分率) ~ 20 % (体積分率) 程度添加する必要があると考えられた. 一方, ^{125}Te により内標準補正を行った場合, 酢酸を測定溶液中に 1 % (C として約 0.4 %) 添加しても無添加と比較して As の指示値の割合は 104 % であり, 増感を大幅に低減できることを確認した.

固形肥料においては試料採取量が 0.20 g であり, その後の希釈率を考慮した場合, 試料が 100 % 炭素の場合でも測定溶液中では炭素として最大 0.04 % 程度にまで希釈される. また, 前処理操作によりほとんどの炭素

が分解され、増感はさらに小さくなると考えられることから、酢酸添加は実施せず、 ^{125}Te を内標準として使用することとした。

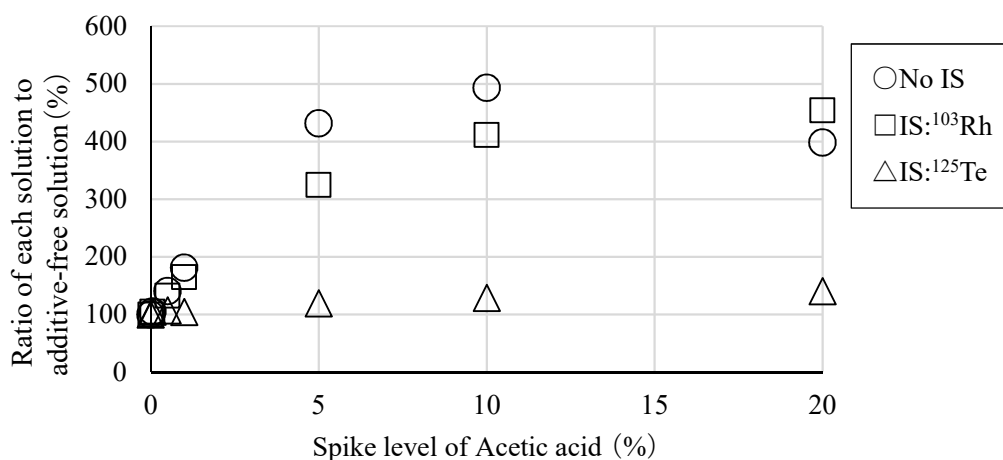


Figure 1 Effect of correction of each internal standard element when acetic acid is added

2) 検量線の直線性

2. 2)に従って調製した標準液を ICP-MS で測定し $^{75}\text{As}/^{125}\text{Te}$ の検量線を作成したところ、Figure 2 のとおり、0.2 ng/mL~20 ng/mL の範囲で決定係数 (r^2) が 0.999 以上であり、切片の 95%信頼区間に原点が含まれていた。

なお、Cd, Ni, Cr, Pb については坂井田らの報告⁵⁾にて直線性が報告されている。

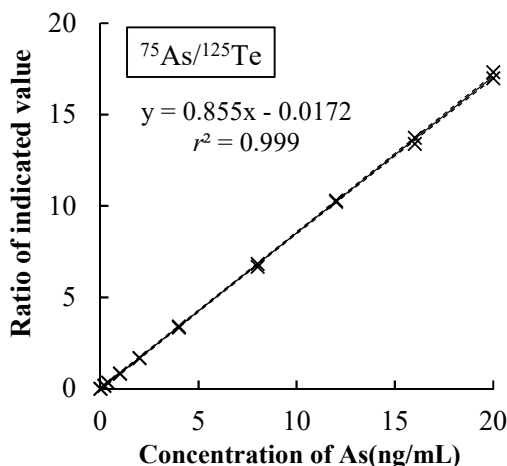


Figure 2 Calibration curve of As

Thick line: Regression line, Dotted line: 95 % prediction interval

3) 真度の評価

真度を評価するため、(1)認証標準物質を用いた評価、(2)今回検討したマイクロ波分解により試料液調製し ICP-MS により測定を行う分析法(以下「本法」と肥料等試験法²⁾の原子吸光法(以下「AAS 法」)の分析値の比較による評価及び(3)添加回収による評価を行った。なお、使用可能であった試料に合わせて複数の手法を用

いて評価した.

(1) 認証標準物質を用いた真度の評価

真度を評価するため、肥料認証標準物質 FAMIC-C-18-2 及び FAMIC-B-14 を用いて、本法により 3 点併行分析を実施した. 結果は Table 9 に示すとおりであり、いずれも平均値は認証値に対する警戒限界の範囲内であり、肥料等試験法²⁾に示されている真度評価の推奨範囲内であった.

Table 9 The estimation of trueness using certified reference materials

Element	Certified reference material	Mean ^{a)} (mg/kg)	Certified value (mg/kg)	Warning limit for the certified value (mg/kg)		
As	FAMIC-B-14	3.0	2.87	2.45	~	3.28
	FAMIC-C-18-2	13.7	12.9	10.3	~	15.5
Cd	FAMIC-B-14	4.5	4.23	3.70	~	4.76
Ni		40	37.9	32.0	~	43.7

a) Mean value ($n=3$)

(2) 既存法との比較による真度の評価

本法と AAS 法について、As は試料 58 点、Cd は試料 30 点、Ni は試料 33 点、Cr は試料 29 点、Pb は試料 14 点を用いて分析値の比較をした. 回帰直線の相関係数、回帰直線の傾き並びに切片の 95 %信頼区間を算出し、相関図及び 95 %予測区間とともに Figure 3 に示した. 比較した結果、回帰直線の相関係数は 0.99 以上であり回帰直線の傾きの 95 %信頼区間に 1 が含まれ、切片の 95 %信頼区間に 0 が含まれており肥料等試験法²⁾に示されている真度評価の推奨範囲を満たしていた.

一方、一部の無機肥料において本法による Cr の分析値が Table 10 に示すとおり AAS 法による分析値に対して低値となった. 肥料等試験法では AAS による Cr 分析法については前処理方法が無機肥料については硝酸-硫酸-過塩素酸による湿式分解であるが、有機入り肥料については灰化後に塩酸-硝酸による湿式分解であり、2 つの前処理法は用いる酸の種類が異なる. そのことから試料の組成によっては本法の分解方法では分解不足となり分析値に差が出たと考えられた.

今回の検討では As 分析法を主眼に置いているため、本法の適用範囲から無機肥料中の Cr を除外することとし、試料 29 点から無機肥料 16 点を除外した試料 13 点を用いて AAS による分析値と本法による分析値の比較を行い、回帰直線の相関係数、回帰直線の傾き並びに切片の 95 %信頼区間を算出し、相関図及び 95 %予測区間とともに Figure 4 に示した. その結果、回帰直線の相関係数は 0.99 以上であり回帰直線の傾きの 95 %信頼区間に 1 が含まれ、切片の 95 %信頼区間に 0 が含まれており肥料等試験法に示されている真度評価の推奨範囲を満たしていた.

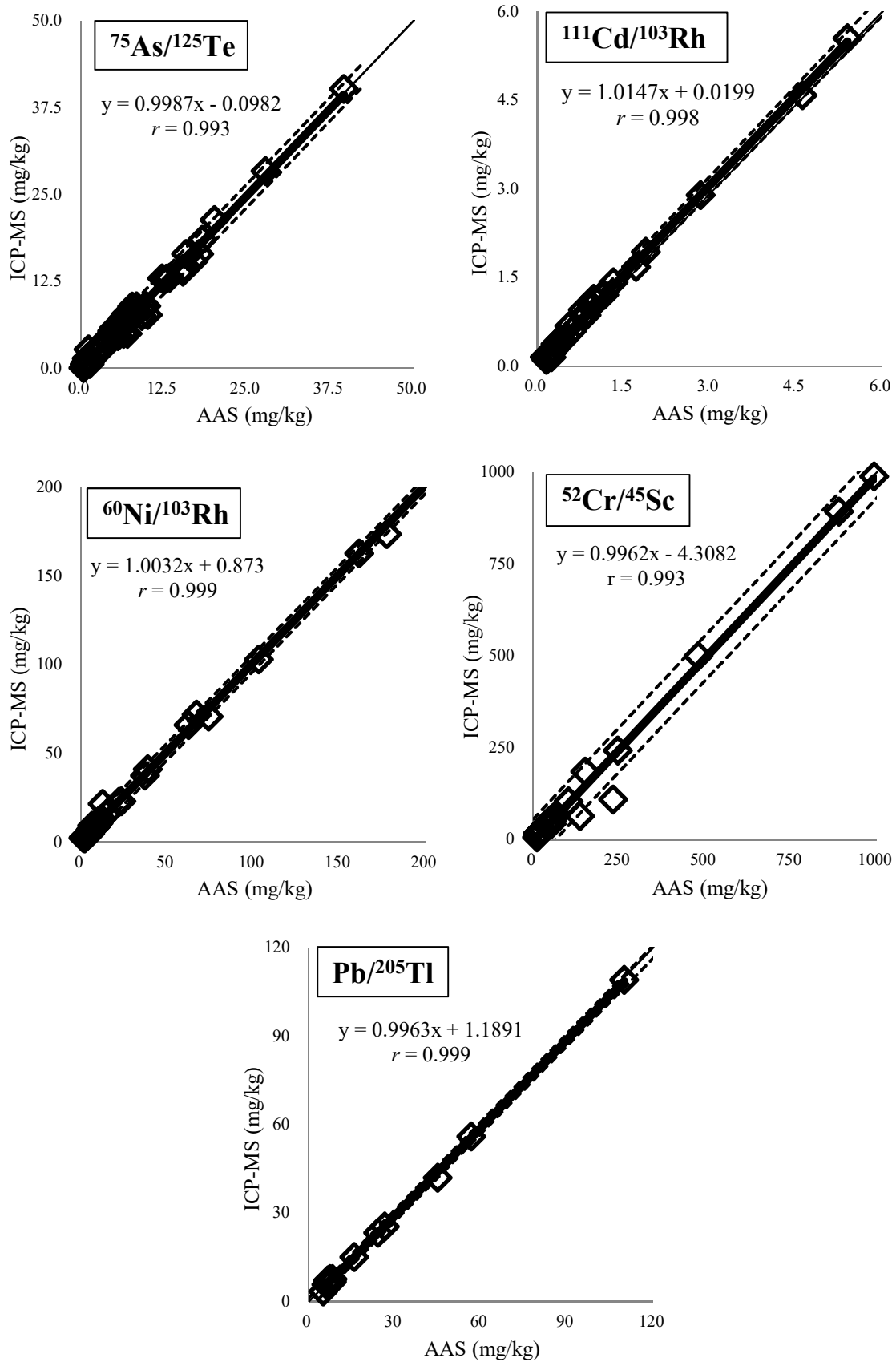
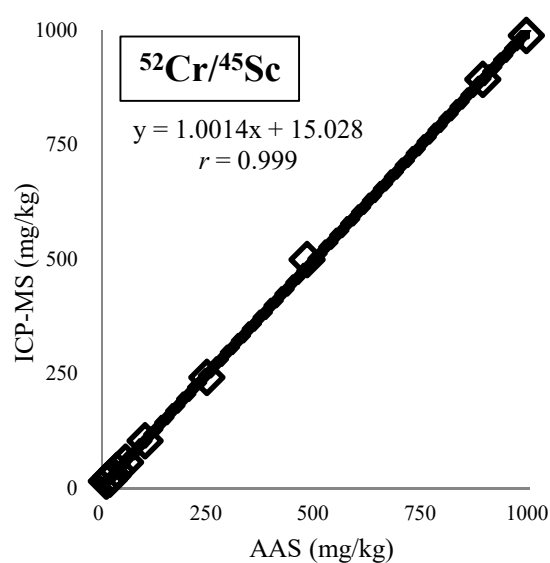


Figure 3 Comparison of the measurements in between two methods
 Thick line: Regression line, Dotted line: 95 % prediction interval, Thin line : $y=x$

Table 10 Comparison of measured values by ICP-MS method and AAS method

Sample	Cr (mg/kg) ^{a)}		ICP-MS/AAS (%)
	ICP-MS	AAS	
Processed phosphate fertilizer 1	63	136	47
Processed phosphate fertilizer 2	109	232	47

a) Mean value ($n=3$)Figure 4 Comparison of the chromium measurements in between two methods
Thick line: Regression line, Dotted line: 95 % prediction interval, Thin line: $y=x$

(3) 添加回収による真度の評価

真度を評価するため、混合堆肥複合肥料又は液状汚泥肥料を用いて、異なる3濃度で添加回収を実施した。結果は Table 11 及び Table 12 に示したとおりであり、いずれの回収率も肥料等試験法²⁾に示されている真度評価の推奨範囲内であった。なお、液状汚泥肥料は乾物相当量濃度で添加した。

Table 11 Recovery test (Complex fertilizer mixed with compost)

Element	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r (%) ^{b)}	Criteria of the trueness (%) ^{b)}		
As	50	106.4	0.7	90	~	110
	10	102.2	1.4	90	~	110
	1	107.3	0.5	85	~	115
Cd	5	105.5	1.7	85	~	115
	1	106.7	0.5	85	~	115
	0.1	99.5	1.0	85	~	115
Ni	300	103.6	0.2	92	~	108
	60	104.4	2.0	90	~	110
	6	101.6	2.0	85	~	115
Cr	500	98.4	0.4	92	~	108
	100	95.2	1.6	92	~	108
	10	93.9	1.6	90	~	110
Pb	100	99.1	0.6	92	~	108
	20	101.3	2.1	90	~	110
	2	101.5	3.3	85	~	115

a) Mean value ($n=3$)

b) Criteria of the trueness shown in Testing Method of Fertilizers

Table 12 Recovery test (Liquid sludge fertilizer)

Element	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r (%) ^{b)}	Criteria of the trueness (%) ^{b)}		
As	50	105.7	0.5	90	~	110
	25	104.0	0.4	90	~	110
	5	112.4	2.7	85	~	115
Cd	5	100.4	0.6	85	~	115
	2.5	98.9	2.2	85	~	115
	0.5	110.6	0.4	85	~	115
Ni	300	106.2	0.5	92	~	108
	150	102.5	1.5	92	~	108
	30	109.1	1.2	90	~	110
Cr	500	98.9	0.5	92	~	108
	250	98.8	1.3	92	~	108
	50	103.1	1.1	90	~	110
Pb	100	97.9	0.4	92	~	108
	50	96.5	0.6	90	~	110
	10	96.5	0.7	90	~	110

a) Mean value ($n=3$)

b) Criteria of the trueness shown in Testing Method of Fertilizers

4) 併行精度及び中間精度の評価

本法の併行精度及び中間精度を推定するため、汚泥発酵肥料または化成肥料を用い、該当有害成分無添加試料及び公定規格の許容値付近の濃度となるよう添加した試料をそれぞれ2点併行で日を変えて5回分析を行い、その結果をTable 13に示した。分析結果を基に推定された併行精度及び中間精度をTable 14に示した。その結果、いずれも肥料等試験法²⁾に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の許容範囲内であったことから、本法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 13 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation (mg/kg)

Test day	As				Cd			
	Composted sludge fertilizer		Compound fertilizer		Compound fertilizer			
	Non spiked sample		Spiked samples		Non spiked sample		Spiked samples	
1	3.52	3.59	52.7	52.1	0.50	0.53	5.53	5.61
2	2.94	3.18	53.1	52.0	0.57	0.69	5.40	5.64
3	3.19	3.32	53.4	53.2	0.61	0.54	5.84	5.53
4	3.21	3.31	53.2	51.7	0.55	0.54	5.45	5.44
5	3.23	3.30	51.6	52.3	0.54	0.62	5.72	5.70

Test day	Ni				Cr			
	Compound fertilizer				Compound fertilizer			
	Non spiked sample		Spiked samples		Non spiked sample		Spiked samples	
1	13.3	12.8	331	325	55.8	50.6	551	543
2	14.0	12.9	338	333	59.3	58.6	560	552
3	13.0	13.3	337	346	60.6	58.2	550	549
4	13.0	13.7	334	335	58.4	60.1	564	564
5	14.3	13.7	338	339	58.6	59.4	561	566

Test day	Pb			
	Compound fertilizer			
	Non spiked sample		Spiked samples	
1	3.47	3.34	104	106
2	3.71	4.26	104	103
3	3.69	3.50	105	104
4	3.76	3.94	102	100
5	3.68	3.75	105	104

Table 14 Statistical analysis result of repeatability test

Element	Sample	Mean ^{a)} (mg/kg)	Repeatability precision			Intermediate precision		
			s_r ^{b)} (mg/kg)	RSD_r ^{c)} (%)	$CRSD_r$ ^{d)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)} (mg/kg)	$RSD_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)
As	Composted sludge fertilizer	3.28	0.10	3.0	8.0	0.2	5.8	13.0
	Compound fertilizer	52.5	0.7	1.3	6.0	0.7	1.3	9.0
Cd	Compound fertilizer	0.57	0.05	9.1	11.0	0.06	9.9	18.0
		5.58	0.13	2.2	8.0	0.1	2.6	13.0
Ni	Compound fertilizer	13.4	0.5	3.6	6.0	0.5	3.8	9.0
		336	4	1.1	4.0	6	1.7	6.5
Cr	Compound fertilizer	58.0	1.9	3.3	6.0	3	5.2	9.0
		556	4	0.7	4.0	8	1.5	6.5
Pb	Compound fertilizer	3.71	0.12	3.0	8.0	0.2	5.0	13.0
		104	1	1.1	4.0	1	1.4	6.5

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

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

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

e) Intermediate standard deviation

f) Intermediate relative standard deviation

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

5) 定量下限及び検出下限の推定

本法に従って As 等を低濃度含有する化成肥料及び液状汚泥肥料(含水率 99%)を用いて 7 点併行試験を実施し、定量下限は「(標準偏差)×10」式、検出下限は「(標準偏差)×2× $t(n-1,0.05)$ 」式を用いて算出した。結果は Table 15 のとおりであり、本法の定量下限は液状汚泥肥料については、現物当たりの濃度で As は 0.009 mg/kg 程度、Cd は 0.001 mg/kg 程度、Ni は 0.03 mg/kg 程度、Cr は 0.04 mg/kg 程度、Pb は 0.01 mg/kg 程度、それ以外の肥料については、As は 1 mg/kg 程度、Cd は 0.2 mg/kg 程度、Ni は 3 mg/kg 程度、Cr は 4 mg/kg 程度、Pb は 1 mg/kg 程度と推定され、検出下限は液状汚泥肥料については、現物当たりの濃度で As は 0.003mg/kg 程度、Cd は 0.0006 mg/kg 程度、Ni は 0.01 mg/kg 程度、Cr は 0.01 mg/kg 程度、Pb は 0.004 mg/kg 程度、それ以外の肥料については、As は 0.4 mg/kg 程度、Cd は 0.07 mg/kg 程度、Ni は 1 mg/kg 程度、Cr は 2 mg/kg 程度、Pb は 0.4 mg/kg 程度と推定された。推定された定量下限は化成肥料、固形汚泥肥料及び液状汚泥肥料(含水率 99.8%未満)の公定規格における許容値の 1/5 以下であった¹⁾。

Table 15 Calculated *LOQ* and *LOD* values

Element	Sample	Mean ^{a)} (mg/kg)	Standard deviation (mg/kg)	<i>LOQ</i> ^{b)} (mg/kg)	<i>LOD</i> ^{c)} (mg/kg)
As	Compound fertilizer	2	0.1	1	0.4
	Liquid sludge fertilizer	0.02	0.001	0.009	0.003
Cd	Compound fertilizer	0.3	0.02	0.2	0.07
	Liquid sludge fertilizer	0.005	0.0001	0.001	0.0006
Ni	Compound fertilizer	6	0.3	3	1
	Liquid sludge fertilizer	0.09	0.003	0.03	0.01
Cr	Compound fertilizer	13	0.4	4	2
	Liquid sludge fertilizer	0.12	0.004	0.04	0.01
Pb	Compound fertilizer	5	0.1	1	0.4
	Liquid sludge fertilizer	0.03	0.001	0.01	0.004

a) Mean value ($n=7$)

b) Standard deviation $\times 10$

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

4. まとめ

ICP-MSを用いた汚泥肥料中のAs及び従来肥料中のAs, Cd, Ni, Cr, Pbの分析法について単一試験室による妥当性を確認したところ、次の結果を得た。

1) スペクトル干渉及びマトリックス干渉の影響を確認したところ、Asについては¹²⁵Teを内標準とし、He コリジョンガスにより測定すること、CdについてはMoを原料として使用した試料について補正式を用いることで、それらを測定に影響のない程度まで低減できることを確認した。

2) Asの検量線を作成したところ、As 0.2 ng/mL～20 ng/mLの範囲で決定係数(r^2)が0.999以上であり、切片の95%信頼区間に原点が含まれていることを確認した。

3) 真度評価のため、肥料認証標準物質の分析、AAS法の分析値との比較及び添加回収を行った結果、一部の無機肥料中のCr分析値において抽出時に用いる酸の違いが原因と考えられる分析値の差が従来法と本法の間で確認されたため、無機肥料中のCrを検討の対象外とした。

その他の試料については、いずれも肥料等試験法に示されている真度の目標を満たしていた。

4) 併行精度及び中間精度の評価を行った結果、併行相対標準偏差は0.7%～9.1%、中間相対標準偏差は1.3%～9.9%であり、肥料等試験法に示されている精度の目安の範囲内であった。

5) 各元素について、定量下限の推定を行った結果、液状汚泥肥料については、現物当たりの濃度でAsは0.01 mg/kg程度、Cdは0.002 mg/kg程度、Niは0.03 mg/kg程度、Crは0.04 mg/kg程度、Pbは0.01 mg/kg程度、それ以外の肥料については、Asは1 mg/kg程度、Cdは0.2 mg/kg程度、Niは3 mg/kg程度、Crは4 mg/kg程度、Pbは1 mg/kg程度と考えられた。これらは公定規格における許容値の1/5以下であることを確認した。

以上のことから、本法は肥料中のAs, Cd, Ni, Cr, Pbを測定するために、十分な性能を有していることが確認された。

文 献

- 1) 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, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1010 号 (2021)
- 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 (2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2020.pdf >
- 3) 八木寿治: ICP 質量分析計 (ICP-MS) 及び還元気化原子吸光光度計 (CV-AAS) による液状汚泥肥料中の重金属等の測定, 肥料研究報告, **8**, 26-37 (2015)
- 4) 八木寿治, 佐久間健太, 橋本良美: ICP-MS による汚泥肥料中の重金属の測定, 肥料研究報告, **9**, 21~31 (2016)
- 5) 坂井田里子, 大島舞弓, 青山恵介, 白井裕治: ICP-MS 法による肥料中の有害成分の測定, 肥料研究報告, **12**, 21-31 (2019)
- 6) (公社) 日本分析化学会: 分析化学実技シリーズ 機器分析編 誘導結合プラズマ質量分析, 共立出版, 75-83, 68-71 (2015)
- 7) 環境省: 底質調査方法 < <https://www.env.go.jp/water/teishitsu-chousa/index.html> >
- 8) 野村 昌代, 伊藤 紗織, 田端 麻里: 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発, 飼料研究報告, **45**, 67-83 (2020)
- 9) 藤森英治: ICP-MS を用いる土壤中ヒ素及びセレンの定量分析 - 陽イオン交換分離による希土類元素の二価イオン干渉の除去, 分析化学, **67**(7), 423-429 (2018)

Development of Determination Method of Arsenic, etc. in Fertilizers by ICP-MS

YAMANISHI Masayuki¹, NUMAZAKI Kanako¹, SHIRAI Yuji¹

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

We examined the measurement conditions of the ICP-MS, validated the ICP-MS measurement method in a single laboratory for Determination Method of Arsenic, etc. in Fertilizer, and obtained the following results. In order to determine the measurement condition, we investigated spectral interference and matrix interference using CaCl₂, Mo, Sm, Nd and acetic acid. The standard element of ⁷⁵As was determined ¹²⁵Te. The validity of the method for measuring As, etc. by ICP-MS was determined based on the results obtained. In the range of As 0.2 ng/mL to 20 ng/mL, the coefficient of determination (r^2) of the As calibration curve was 0.999 or higher. We evaluated trueness using analysis values of certified reference materials, estimated intermediate precision and repeatability by duplicate test per 5 tests on different days using two analytical samples of different concentration. As a result, they were within the criteria of trueness, repeatability and intermediate precision of the Testing Methods for Fertilizers. As the result of calculating *LOQ* based on 7 replicate measurements of naturally contained samples, these were 1 mg/kg for As, 0.2 mg/kg for Cd, 3 mg/kg for Ni, 4 mg/kg for Cr, 1 mg/kg for Pb. Each was no more than 1/5 of the permissible concentration. Each was no more than 1/5 of the permissible concentration.

Key words Fertilizer, Microwave decomposition, ICP-MS

(Research Report of Fertilizer, 14, 53-69, 2021)

6 く溶性石灰の分析法の性能評価

— 室間共同試験による妥当性確認 —

松尾信吾¹, 八木啓二¹, 小堀拓也², 吉村英美¹,

キーワード く溶性石灰, 原子吸光法, 共同試験

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中, わが国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)¹⁾の要求事項を参考にした分析結果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. また, 「肥料の品質の確保等に関する法律」施行規則で定められた肥料の主要な成分^{2~4)}に係る定量及び量の算出方法については, 農林水産省告示^{4~6)}により肥料等試験法⁷⁾が指定されている.

肥料等試験法に記載されたく溶性石灰のフレーム原子吸光分析装置による分析法について, 加藤ら⁸⁾が単一試験室における妥当性 (SLV: Single Laboratory Validation) を確認⁸⁾し, 室間再現精度は, 既報の外部精度管理試験等⁹⁾の結果により暫定的に評価している. 今回, 国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認 (HCV: Harmonized Collaborative Validation) 方法による評価を行うため, 肥料中のく溶性石灰のフレーム原子吸光分析装置による分析法について共同試験を実施したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 均質性試験用試料及び共同試験用試料の調製

肥料として流通している指定配合肥料, 汚泥発酵肥料, 化成肥料, 魚かす粉末, 石こう, 混合りん酸肥料及び銹さいけい酸質肥料を, 肥料等試験法⁷⁾に従い遠心型粉碎機 (ZM100; Retsch 製) により目開き 500 µm (銹さいけい酸質肥料は振動ミル型粉碎機 (TI-100; HEIKO 製) により目開き 212 µm) の網ふるいを通過するまで粉碎・混合した. 次に, 7 種類の肥料について, ねじ式ポリ容器に約 1.9 g 充填したものを各 44 個調製し, 各容器に乱数表を用いてランダムに番号 (1~308) を貼付したものを試料とした. これらの識別した 7 種類の試料から乱数表を用いてランダムに 10 個ずつ抜き取り均質性試験用試料とした.

また, 7 種類の試料からランダムにそれぞれ 2 個ずつ抽出したものを共同試験用試料とし, 以下の試験室に送付した.

(共同試験参加試験室)

- ・ 小野田化学工業株式会社 小野田工場
- ・ 片倉コープアグリ株式会社 日出工場
- ・ ジェイカムアグリ株式会社 戸畑工場
- ・ 公益財団法人日本肥糧検定協会 本部
- ・ 公益財団法人日本肥糧検定協会 関西支部

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)名古屋センター

- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部
- ・ 南九州化学工業株式会社 高鍋工場

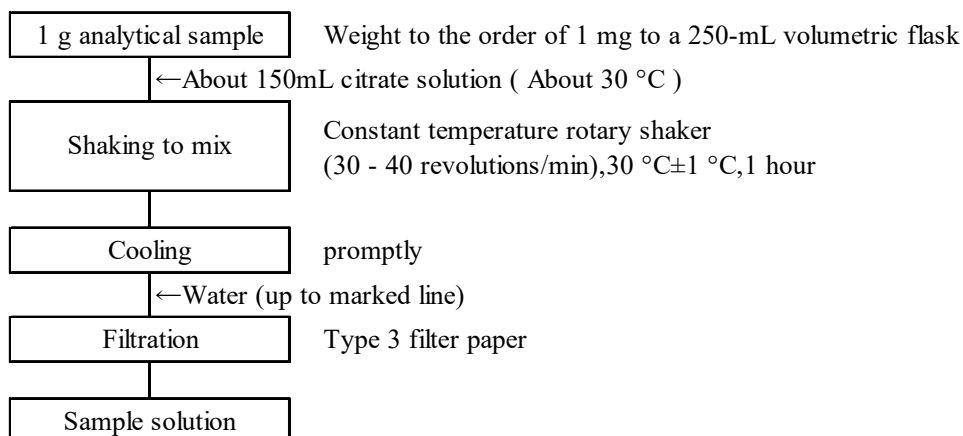
(50 音順)

2) 装置

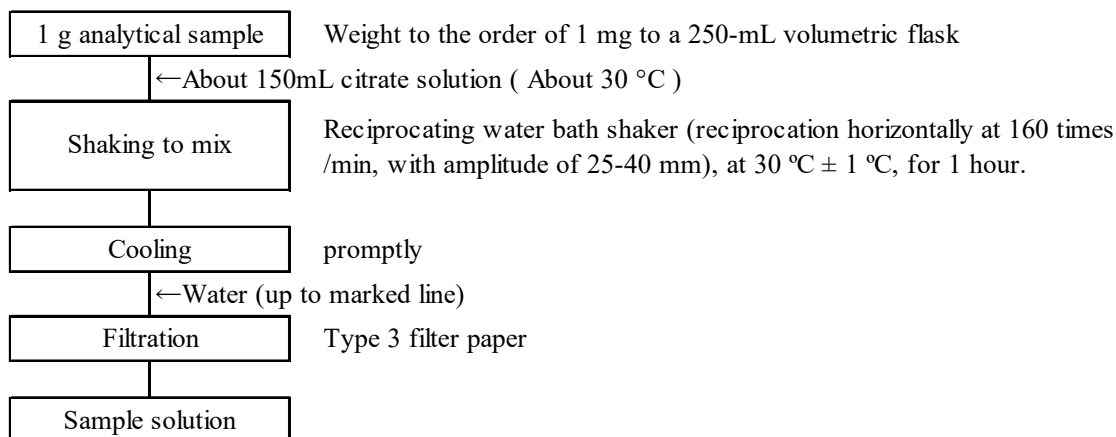
各試験室に設置している化学天秤, 恒温上下転倒式回転振り混ぜ機(または水平往復振とう恒温水槽)及びフレイム原子吸光分析装置を使用した。

3) 試験方法

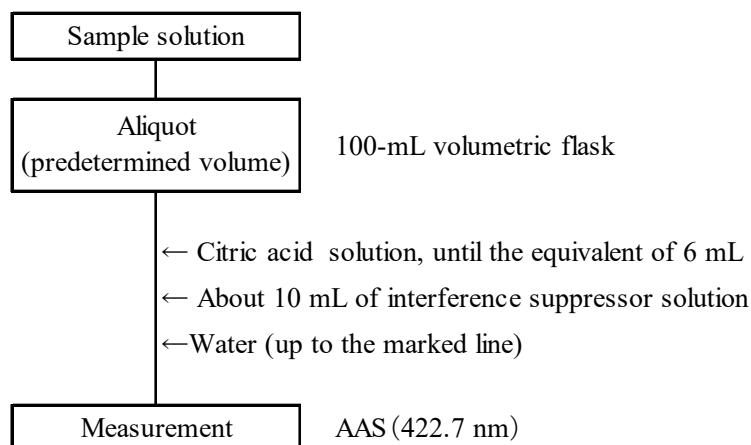
肥料等試験法⁷⁾4.5.3 く溶性石灰 4.5.3.a フレイム原子吸光法により測定した。なお, 参考のため, フローシートを Schem1 及び 2 に示した。



Scheme 1-1 Flow sheet of test for C-CaO in fertilizer(Extraction)



Scheme 1-2 Flow sheet of test for C-CaO in fertilizer(Extraction)



Scheme 2 Flow sheet of test for C-CaO in fertilizer(Measurement(AAS))

4) 共同試験用試料の均質性試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル^{10, 11)}の均質性試験に従い, 1)により調製, 抽出した合計 70 試料について各試料につき 2 点併行で分析した.

5) 共同試験

共同試験に参加した 12 試験室の各試験室で使用した原子吸光分析装置の型式は Table 1 のとおり. それぞれの試験室に 1)により調製された計 20 試料(分析項目ごとの 10 試料), 分析手順確認用試料分析項目ごと各 1 点及び試験実施要領を配付し, 各試験室において 2020 年 10 月 15 日~2020 年 12 月 18 日の期間, 各試料に対応する 3)の試験方法に従って分析した.

Table 1 Atomic absorption spectrometer

Lab ID ^{a)}	Mode of Atomic absorption spectrometer
A	iCE 3300 AA SPECTRO (WIDE PMT), Thermo Fisher Scientific
B	HITACHI, Z-2310
C	SHIMADZU, AA-6800
D	Agilent, 240AA
E	SHIMADZU, AA-7000
F	HITACHI, ZA3300
G	HITACHI, Z-2310
H	HITACHI, Z-2310
I	HITACHI, ZA3300
J	HITACHI, Z-2310
K	HITACHI, ZA3300
L	HITACHI, Z-2310

a) Laboratory identification (random order)

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

各 7 種類の試料を 2 点併行で分析した均質性試験の分析結果の総平均値 (\bar{x}) 及びその成績について一元配置分散分析から得られた統計量を用いて算出した併行標準偏差 (s_r), 試料間標準偏差 (s_{bb}), 併行精度を含む試料間標準偏差 (s_{b+r}) を Table 2 に示した. さらに, 肥料等試験法⁷⁾に示されている室間再現精度の目安 ($CRSD_R$) 及びそれらから算出 (式 1) した推定室間再現標準偏差 ($\hat{\sigma}_R$) を同じく Table 2 に示した.

均質性の判定は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル¹¹⁾の手順を参考に実施した. まず, 分析結果の等分散性を確認するため, Cochran の検定を実施した. その結果, すべての試料において等分散性が確認できたので, これらの分析結果について一元配置分散分析を実施し, 併行標準偏差 (s_r) 及び試料間標準偏差 (s_{bb}) を求めた. 次に, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの十分に均質の判定式 (式 2) を用いて均質性の判定を行った. その結果, 全ての試料で判定式 (式 2) を満たしていたことから, 共同試験用試料として妥当な均質性を有していることが確認された. なお, 参考のため, 併行精度を評価する式 (式 3) を下記に示す. また (式 4) によって併行精度を含む試料間標準偏差 (s_{b+r}) を算出したところ, いずれの試料も推定室間再現標準偏差 ($\hat{\sigma}_R$) と比較して小さい値であった.

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

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

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

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

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

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

\bar{x} : 総平均値

s_r : 併行標準偏差

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_{bb} : 試料間標準偏差

s_{b+r} : 併行精度を含む試料間標準偏差

Table 2 Homogeneity test results of citric acid-soluble lime

Sample	No. of Sample	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{e)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (%) ^{b)}	s_r ^{g)} (%) ^{b)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}	s_{b+r} ⁱ⁾ (%) ^{b)}
Designated blended fertilizer	10	3.07	4	0.12	0.00	0.04	0.04	0.06	0.04
Composted sludge fertilizer	10	5.62	4	0.22	0.04	0.07	0.04	0.11	0.05
Compound fertilizer	10	11.96	3	0.36	0.08	0.11	0.06	0.18	0.10
Fish meal	10	15.37	3	0.46	0.11	0.14	0.16	0.23	0.20
Calcium sulfate dehydrate	10	19.61	3	0.59	0.00	0.18	0.29	0.29	0.29
Mixed phosphate fertilizer	10	29.36	2.5	0.73	0.06	0.22	0.43	0.37	0.44
Slag silicate fertilizer	10	42.22	2.5	1.06	0.30	0.32	0.55	0.53	0.63

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

b) Mass fraction

c) Criteria of precision for Reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

d) Estimated standard deviation of reproducibility calculated based on $CRSD_R$

e) Standard deviation sample-to-sample

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

g) Repeatability standard deviation

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

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

2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験成績を Table 3 に示した。分析試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{10, 11)}に従って統計解析した。試験成績の外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施した。その結果、12 試験室の試験成績で、7 種類の試料のうち 3 種類、3 試験室の報告値が外れ値として判定された。

Table 3 Individual result of citric acid-soluble lime (C-CaO)

(%)^{a)}

Lab ID ^{b)}	Designated blended fertilizer		Composted sludge fertilizer		Compound fertilizer		Fish meal	
	A	3.05	2.95	5.71	5.68	11.41	11.27	15.01
B	3.13	3.15	5.72	5.75	12.29	12.37	15.89	15.44
C	3.12	3.03	5.74	5.77	11.82	12.17	14.87	15.06
D	3.14	3.05	5.68	5.65	12.19	12.19	15.10	15.00
E	3.16	3.15	5.94	6.19	13.96	13.21	15.79	16.02
F	3.14	3.10	5.82	5.82	12.39	12.26	16.11	15.42
G	3.15	3.22	5.97	5.89	12.32	12.07	16.03	15.99
H	3.10	3.24	6.05	5.85	12.54	12.36	15.89	16.39
I	3.17	3.23	5.68	5.76	12.48	12.60	15.65	16.04
J	3.21	3.30	6.03	5.95	12.90	12.75	16.21	16.36
K	3.07 ^{c)}	2.45 ^{c)}	5.70	5.73	11.47	12.23	15.27	15.63
L	3.30	3.08	5.74	5.83	11.94	11.96	14.88	15.31

Lab ID ^{b)}	Calcium sulfate dehydrate		Mixed phosphate fertilizer		Slag silicate fertilizer	
	A	19.03	18.57	29.33 ^{d)}	28.68 ^{d)}	38.94
B	19.37	19.11	31.80	31.80	40.99	41.18
C	17.60	17.30	30.72	31.59	40.45	40.86
D	20.01	19.62	31.09	31.54	40.26	40.25
E	17.85	17.96	31.58	31.63	41.35	41.24
F	19.35	19.14	32.11	31.90	41.69	41.55
G	18.15	18.02	32.16	32.06	41.31	41.11
H	19.11	19.11	32.44	31.72	41.36	41.52
I	19.64	19.72	31.73	32.06	41.05	41.17
J	19.33	19.01	33.22	33.10	43.02 ^{d)}	43.26 ^{d)}
K	19.47	19.12	31.43	32.80	40.37	40.09
L	18.25	18.31	31.62	31.46	40.99	40.46

a) Mass fraction

b) Laboratory identification (random order)

c) Outlier of Cochran test

d) Outlier of Grubbs test

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した試験成績により算出^{10, 11)}した平均値, 併行標準偏差 (s_r) 及び併行相対標準偏差 (RSD_r), 並びに室間再現標準偏差 (s_R) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を Table 4 に示した.

7 種類の試料について統計解析の結果, 平均値は 3.14 % ~40.78 % (質量分率) であり, その併行標準偏差 (s_r) は 0.07 % ~0.4 % (質量分率), 併行相対標準偏差 (RSD_r) は 0.4 % ~2.4 %, 室間再現標準偏差 (s_R) は 0.09 % ~0.78 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 1.9 % ~4.7 % であった.

いずれの併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) も肥料等試験法⁷⁾で妥当性確認の手順に示されている各濃度レベルにおける精度の許容範囲内であることから、本法の精度は肥料等試験法の性能規準に適合していることを確認した。

Table 4 Statistical analysis of Collaborative study results for citric acid-soluble lime

Sample	Labs $p(q)^a$	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	$2 \times CRSD_r$ ^{f)} (%)	s_R ^{g)} (%) ^{c)}	RSD_R ^{h)} (%)	$2 \times CRSD_R$ ⁱ⁾ (%)
Designated blended fertilizer	11 (1)	3.14	0.07	2.3	4	0.09	2.7	8
Composted sludge fertilizer	12	5.82	0.07	2.4	4	0.14	2.4	8
Compound fertilizer	12	12.30	0.24	2.0	3	0.58	4.7	6
Fish meal	12	15.60	0.25	1.6	3	0.51	3.2	6
Calcium sulfate dehydrate	12	18.84	0.19	1.0	3	0.75	4.0	6
Mixed phosphate fertilizer	11 (1)	31.89	0.40	1.3	2	0.60	1.9	5
Slag silicate fertilizer	11 (1)	40.78	0.18	0.4	2	0.78	1.9	5

- a) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier removed and (q)=number of outliers or test failures
- b) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retained after outlier and test failure removed (n =The number of laboratories(p) × The number of repetition(2))
- c) Mass fraction
- d) Standard deviation of repeatability
- e) Relative standard deviation of repeatability
- f) Tolerance limits of relative standard deviation of repeatability in Testing Methods for Fertilizer 2020
- g) Standard deviation of reproducibility
- h) Relative standard deviation of reproducibility
- i) Tolerance limits of relative standard deviation of reproducibility in Testing Methods for Fertilizer 2020

4. まとめ

肥料等試験法⁷⁾に記載された可溶性石灰(フレイム原子吸光法)の分析法について、12 試験室で 7 種類(14 点)の試料を用いて共同試験を実施し、室間再現性の評価をした。

その結果、フレイム原子吸光法による可溶性石灰の平均値 3.14 % (質量分率) ~40.78 % (質量分率) の範囲において、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 1.9 % ~4.7 % であり、肥料等試験法の妥当性確認の手順に示されている各濃度レベルにおける精度の許容範囲内であることから、本法の精度は性能評価規準の要求事項に適合していることが確認された。

今回検討した分析法は、すでに単一試験室による妥当性確認 (SLV) がされており、さらに今回の検討で国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認 (HCV) が評価されたことから、この試験法の性能は肥料等試験法における性能規準の Type B (SLV 及び HCV) による評価) に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力いただきました小野田化学工業株式会社、片倉コープアグリ株式会社、ジェイカムアグリ株式会社、公益財団法人日本肥糧検定協会及び南九州化学工業株式会社の各位に謝意を表します。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2017): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2018, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) 肥料の品質の確保等に関する法律施行令, 昭和 25 年 6 月 20 日, 政令第 198 号, 最終改正令和 2 年 10 月 14 日, 政令第 308 号(2021)
- 3) 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, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1018 号(2021)
- 4) 農林水産省告示:肥料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, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1011 号(2021)
- 5) 農林水産省告示:特殊肥料の品質表示基準, 平成 12 年 8 月 31 日農林水産省告示第 1163 号, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1012 号(2021)
- 6) 農林水産省告示:肥料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, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1010 号(2021)
- 7) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikengo_2020.pdf >
- 8) 加藤まどか, 山西正将, 白井裕治:肥料中の石灰の測定法の開発, 肥料研究報告, **13**, 36~49(2020)
- 9) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145~196 (2006)
- 10) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)
- 11) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

Performance Evaluation of Determination Method for Citric acid-soluble Lime in Fertilizers: Harmonized Collaborative Validation

MATSUO Shingo¹, YAGI Keiji¹, KOBORI Takuya² and YOSHIMURA Hidemi¹

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

² FAMIC, Fukuoka Regional Center (Now) FAMIC, Nagoya Regional Center

It has been verified performance that determination of citric acid-soluble lime (C-CaO) by atomic absorption spectrometry described in Testing Methods for Fertilizers. We conducted a collaborative study by means of international harmonized protocol to evaluate for determination of citric acid-soluble lime in fertilizer by atomic absorption spectrometry. We sent seven samples passed the test for homogeneity, respectively, to 12 collaborators. These samples were analyzed as blind duplicated. After identification of outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of citric acid-soluble lime were reported 3.14 % - 40.78 % as a mass fraction and 1.9 % - 4.7 %, respectively. In conclusion, these results indicated that method has acceptable precision for determination of citric acid-soluble lime in this concentration ranges.

Key words Citric acid-soluble lime, Flame atomic absorption spectrometry, harmonized collaborative validation

(Research Report of Fertilizer, **14**, 70-78, 2021)

7 イオンクロマトグラフィーによる硫酸イオン分析における抽出方法の改良

平田絵理香¹

キーワード イオンクロマトグラフィー, 硫酸イオン, 塩酸濃度, 単一試験室による妥当性確認

1. はじめに

肥料中の硫酸塩を評価する分析法として、無機陰イオン測定法として広く使われているイオンクロマトグラフィーを用いて硫酸塩を硫酸イオンとして測定する方法が令和 2 年度に坂井田ら¹⁾によって検討され、その真度及び精度の性能について単一試験室による妥当性 (SLV: Single Laboratory Validation) を確認している。しかし、この分析法は抽出溶液に塩酸 (1+35) を用いており、肥料等試験法 (2020)²⁾ 記載の他分析法で使用されている抽出溶液の塩酸濃度と異なっている。抽出溶液の塩酸濃度を可溶性成分抽出に用いられている塩酸 (1+23) と統一することができれば、同じ抽出液を使用しての分析が可能となり、使用する塩酸溶液濃度を複数パターン調製する必要がなくなることから、肥料等試験法を使うユーザーにとって有益であると考えた。

以上のことから、本法の抽出方法及び希釈操作について検討を行い、改良した分析法について単一試験室における妥当性を確認したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

流通している固形肥料等について、12 種類の肥料を合計 13 点 (硫酸苦土肥料 2 銘柄, 硫酸アンモニア, 硫酸グアニル尿素, 過りん酸石灰, 重過りん酸石灰, 硫酸加里, 化成肥料, 腐植酸苦土肥料, 混合苦土肥料, 硫酸マンガン肥料, 指定配合肥料, 石こう) 用いた。各試料については、目開き 500 μm のふるいを通すまで粉砕した。

加えて、硫酸イオンを 10% (質量分率) 含有する調製試料 1 点を分析用試料に用いた。調製のために使用した原料の配合割合及び成分設計を Table 1 に示した。これらの原料は JIS 規格に規定されている特級の試薬を使用し、他の試料と同様に粉砕した。

Table 1 The preparation of analytical samples

Sample	The mixing ratio of the materials (%) ^{a)}			Design component (%) ^{a)}			
	Ammonium Dihydrogenphosphate (NH ₄ H ₂ PO ₄)	Potassium Chloride (KCl)	Ammonium Sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	SO ₄ ²⁻
10 % preparation sample	18.1	68.1	13.8	5.1	11.2	43.0	10.0

a) Mass fraction

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) 試薬の調製

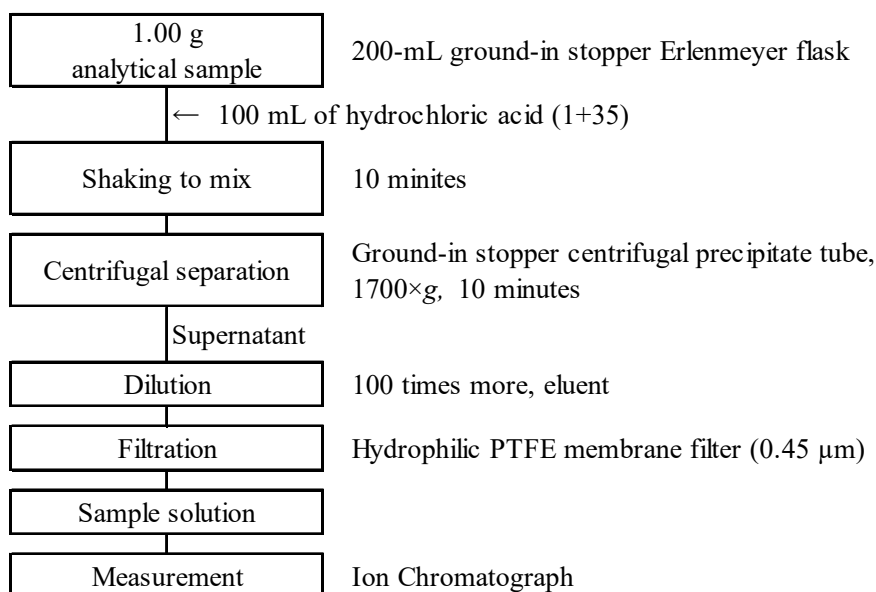
- (1) 硫酸イオン標準液(SO_4^{2-} 1 mg/mL): JCSS 硫酸イオン標準液(SO_4^{2-} 1000 mg/L) (関東化学)
- (2) 検量線用硫酸イオン標準液(0.2 mg/L ~ 5 mg/L): 硫酸イオン標準液の一定量を水で希釈して調製した。
- (3) 炭酸緩衝溶液 pH=10 (溶離液): JIS K 8625 に規定する特級の炭酸ナトリウム(関東化学)0.191 g 及び JIS K 8622 に規定する特級の炭酸水素ナトリウム(富士フィルム和光純薬)0.143 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (4) 塩酸: 富士フィルム和光純薬;有害金属測定用
- (5) 塩酸(1+23): 塩酸の体積 1 と水の体積 23 とを混合したもの。
- (6) 塩酸(1+35): 塩酸の体積 1 と水の体積 35 とを混合したもの。
- (7) 硫酸: 富士フィルム和光純薬;有害金属測定用
- (8) 硫酸アンモニウム: JIS K 8960 に規定する試薬(関東化学;特級)
- (9) リン酸二水素アンモニウム: JIS K 9006 に規定する試薬(関東化学;特級)
- (10) 塩化カリウム: JIS K 8121 に規定する試薬(富士フィルム和光純薬;特級)
- (11) 水: 超純水製造装置(Direct-Q UV5, Millipore)で精製した JIS K 0557 に規定する A4 の水を用いた。

3) 器具及び装置

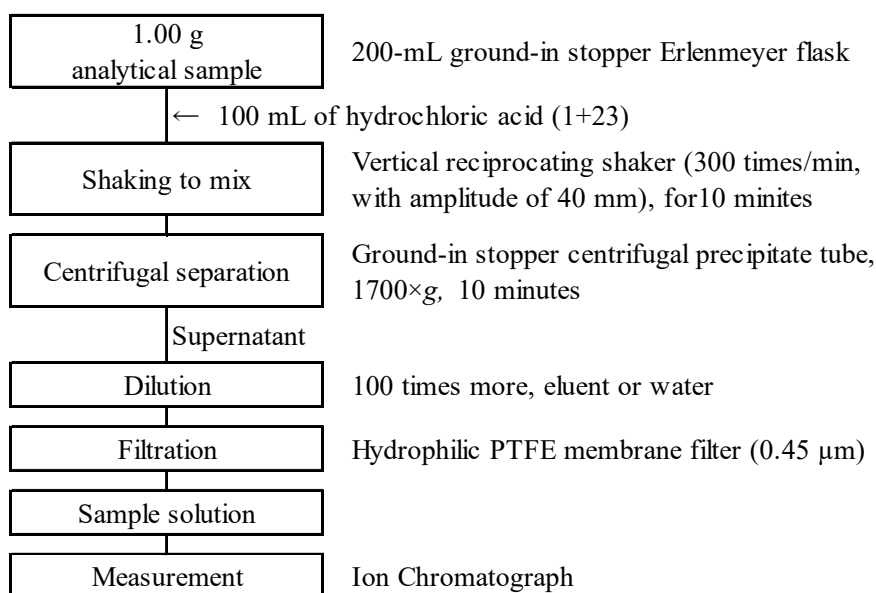
- (1) 振とう機: TAITEC SR-2DW
- (2) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (3) イオンクロマトグラフ(IC): メトローム 850 Professional IC ケミカルサプレッサー方式
- (4) カラム: Shodex IC SI-90 4E(内径 4.0 mm, 長さ 250 mm, 粒径 9 μm , 充填剤 ポリビニルアルコール基材に第 4 級アンモニウム基を化学結合した陰イオン交換体)
- (5) メンブレンフィルター: ADVANTEC 製 DISMIC-13HP(孔径 0.45 μm)
- (6) ポリプロピレン製ねじ口容器: ジーエルサイエンス DigiTUBEs 50 mL
- (7) pH メーター: HORIBA pH メーター F-54
- (8) 粉碎機: Retsch ZM-200

4) 分析方法

肥料等試験法²⁾に記載されている硫酸イオンのイオンクロマトグラフ法(6.10.1.a)を Scheme 1-1 で示した。また, Scheme1-1 を元に使用した試薬や試験操作を変更した分析方法を Scheme 1-2 に示した。Scheme1-2 での変更点として, 分析試料を量りとった後に加える試薬に塩酸(1+23)を用いるようにし, 抽出液を希釈する際に用いる溶液として, 溶離液に加えて水を使用できるようにした。また, Scheme 1-1 で振り混ぜ方法を明記していなかったことから, Scheme1-2 では振り混ぜ方法を示した。



Scheme 1-1 Flow sheet for sulfate ion in fertilizers
("6.10.1.a" in Testing Methods for Fertilizer 2020)



Scheme 1-2 Improved flow sheet for sulfate ion in fertilizers

3. 結果及び考察

1) 方法間比較による真度の評価

真度を評価するため、分析用試料 14 点を用いて、Scheme 1-1 及び Scheme 1-2 で分析した結果によって方法間比較を行った。イオンクロマトグラフの測定条件を Table 2 で示す。

Table 2 Analytical condition

Detection	Conductivity detector
Suppressor	Chemical suppressor (Column type)
Column	Shodex IC SI-90 4E(4.0 mm i.d., 250 mm L, 9 μm particle size)
Eluent	1.8 mmol/L Sodium carbonate +1.7 mmol/L Sodium bicarbonate
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μL
Column temp.	25°C

得られた分析値の相関並びに 95 %予測区間を回帰直線の周囲に描き, Figure 1 で示した. 回帰直線 ($y=1.001x+0.423$, $r=0.999$)の傾き (b)の 95 %信頼区間は 0.973~1.028, 切片 (a)の 95 %信頼区間は-0.770~1.616 であり, 肥料等試験法に示されている真度の推奨範囲を満たす結果となった.

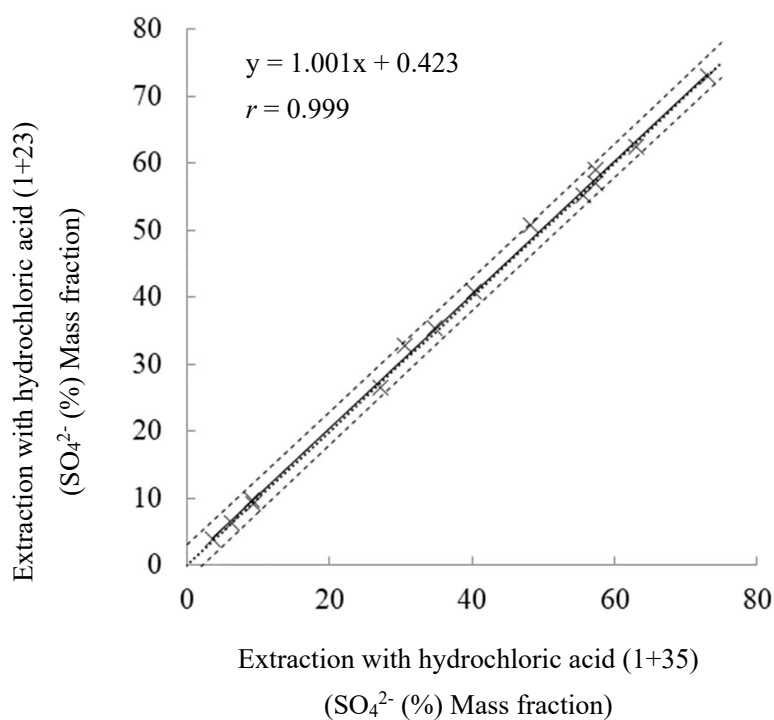


Figure 1 Comparison of analysis value (SO_4^{2-}) between extraction with hydrochloric (1+35) and with hydrochloric (1+23)

Heavy line : Regression line

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

Thin line : $y=x$

2) 併行精度及び中間精度の評価

併行精度及び中間精度を評価するため, 硫酸加里及び重過りん酸石灰を用いて 2 濃度の硫酸イオンを 2 点併行で日を変えて 5 回試験を実施して得られた結果を Table 3 に示した. また, これらの結果から, 一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 4 に示した.

硫酸加里の平均値は 56.69 % (質量分率) で, 併行相対標準偏差は 1.16 %, 中間相対標準偏差は 1.71 % で

あった。また、重過りん酸石灰の硫酸イオンの平均値は 3.74 % (質量分率) で、併行相対標準偏差は 0.76 %、中間相対標準偏差は 1.33 % であった。これらの結果は、肥料等試験法²⁾で示されている併行精度 (併行相対標準偏差) 及び中間精度 (中間相対標準偏差) の許容範囲内であった。

Table 3 Individual result of sulfate ion for accuracy estimateion (%)^{a)}

Sample	Test day				
	1	2	3	4	5
Potassium sulfate	57.06	56.48	55.93	57.71	56.86
	58.59	55.93	55.38	56.73	56.20
Triple superphosphate	3.78	3.69	3.67	3.71	3.77
	3.77	3.77	3.67	3.73	3.81

a) Mass fraction

Table 4 Statistical analysis of repetition test result for estimating percision

Sample	Mean of sulfate ion ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
		s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$2*CRSD_r$ ^{e)}	$s_{I(T)}$ ^{f)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)}	$2*CRSD_{I(T)}$ ^{h)}
		(%) ^{b)}	(%)	(%)	(%) ^{b)}	(%)	(%)
Potassium sulfate	56.69	0.66	1.16	8	0.97	1.71	13
Triple superphosphate	3.74	0.03	0.76	8	0.05	1.33	13

a) Mean value (n = Sample number of parallel test (2) × Number of Test days (5))

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

3) 希釈倍率の検討

抽出に使用する塩酸濃度を(1+23)に変更するに当たって、当試験室で使用しているカラム(Shodex SI 90-4E)の適用 pH が 3~12 であることから、試料溶液を適切な pH に調整するための希釈濃度を検討した。坂井田ら¹⁾の報告では、機器測定用の溶離液である 1.8 mM 炭酸ナトリウム+1.7 mM 炭酸水素ナトリウムの炭酸塩溶離液が pH 10 の緩衝溶液であることから、溶離液を用いて 100 倍以上に希釈することとしている。そこで、塩酸(1+23)の抽出液を水または炭酸塩溶離液で希釈した場合の pH を Table 5 に示した。その結果、塩酸(1+23)においても溶離液で 100 倍希釈したところ、pH が 3 以上であった。

また、他社製カラムの中には適用 pH が 1~14 とされているものがあり³⁾、pH 調整のために必ずしも溶離液で希釈する必要がないカラムも存在したことから、希釈には水または溶離液を用いて 100 倍以上で希釈することとした。

Diluent	Dilution ratio				Eluent
	50	100	250	625	
Water	1.969	2.237	2.638	3.046	10.034
Eluent	2.258	5.616	7.739	9.840	

4) 機器測定条件の検討 : 単一試験室における直線検量線の評価

サプレッサーを用いたイオンクロマトグラフィーでの測定で炭酸系溶離液を使用する場合、検量線の直線性が得られない場合があることが知られている⁴⁾。そのため、坂井田らの報告¹⁾では、本法の検討に二次式を用いた検量線を使用していた。しかし、所有するイオンクロマトグラフ(メトローム, 850 Professional IC)では、炭酸サプレッサーを使用しない場合に検量線の直線性が得られることがあると機器メーカー情報があり、Table 2 の測定条件で検量線に用いる回帰式を再度検討することとした。

検量線用標準液を調製するにあたって、濃度範囲は坂井田ら¹⁾が検討した 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ~5 $\mu\text{g/mL}$ とした。調製した標準液濃度と Table 2 の条件により測定した値を比較した結果を Figure 2 に示した。その結果、0.2 $\mu\text{g/mL}$ ~5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で一次式を用いて検量線を作成した場合、ピーク面積およびピーク高さのいずれにおいても決定係数(r^2)が 0.999 以上を示した。肥料等試験法²⁾で示す分析法の妥当性確認の手順において、検量線の決定係数(r^2)が 0.99 以上であれば使用可能であるとされていることから、当該機器において Table 2 の測定条件であれば一次式を用いた検量線が使用できることを確認した。

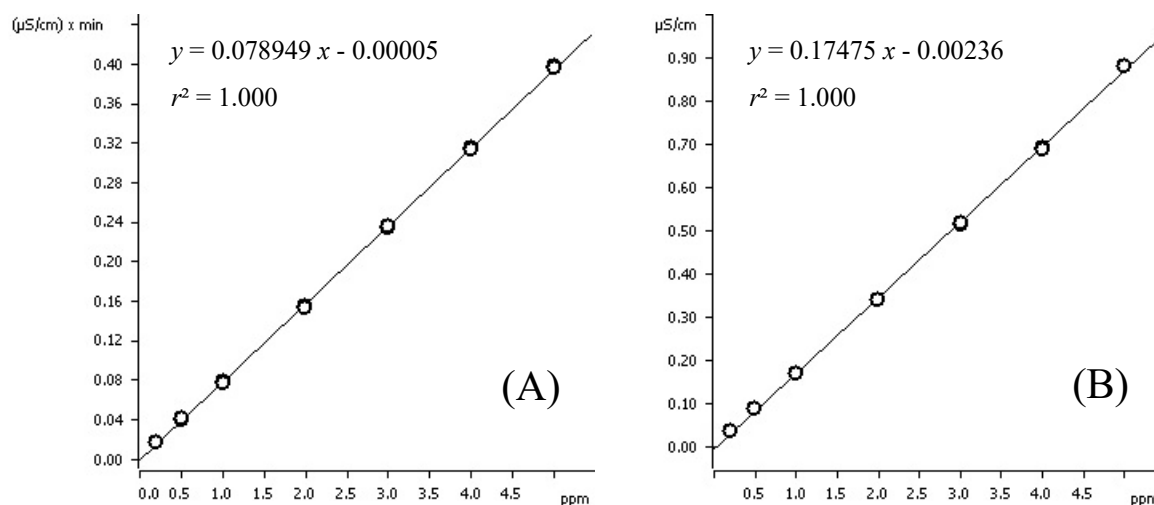


Figure 2 Calibration curve (concentration range SO_4^{2-} 0.2 mg/L~5 mg/L)

(A): Calculated from peak area (B): Calculated from peak height

4. まとめ

肥料等試験法²⁾に記載されている硫酸イオン測定法(イオンクロマトグラフ法)について、抽出方法の検討を行い、単一試験室における分析法の妥当性確認を実施したところ、次の結果を得た。

(1) 塩酸(1+23)を用いた抽出方法を検討するにあたり真度を確認するため、肥料 14 点で塩酸(1+23)及び塩酸(1+35)を用いた抽出液の分析値について方法間比較を行った結果、肥料等試験法で示す真度の基準を

満たしていた。

(2) 塩酸(1+23)を用いた抽出方法により肥料2点を用いて5日間2点併行で測定した値で併行精度及び中間精度を推定した結果、いずれも肥料等試験法に示されている精度の許容範囲内であった。

(3) 機器及びカラム等の調査により、カラムにはpHの適用範囲がpH3~12のタイプとpH1~14のようにpHの適用範囲が広いタイプがあることが判明したことから、試料液の希釈操作におけるpHの変化を確認し、希釈操作に溶離液だけでなく水も使用できることを確認した。

(4) 炭酸サプレッサーを使用せず0.2 µg/mL~5 µg/mLの範囲で検量線を作成した結果、ピーク面積、ピーク高さともに決定係数(r^2)は0.999以上を示し、検量線の直線性を確認できた。

以上のことから、本法において試料溶液の調製に用いる抽出溶液の塩酸濃度を塩酸(1+23)に変更し、希釈操作に溶離液又は水を使用できるように変更した。また、修正後の分析法について、単一試験室における妥当性を確認した結果、本法は肥料中の硫酸イオンを測定するために十分な性能を有していることが確認できた。

文 献

- 1) 坂井田里子, 小塚健志, 白井裕治:イオンクロマトグラフィーによる硫酸イオンの測定法の開発, 肥料研究報告, **13**, 50-64 (2020)
- 2) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2020)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf>
- 3) Thermo Scientific:Dionex IonPac AS22 and Dionex IonPac AS22-Fast Column Product Manual
<<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-065119-IC-IonPac-AS22-Fast-Man065119-EN.pdf>>
- 4) 四角目和広, 横山幸雄, 佐藤寿邦: サプレッサー付電気伝導率検出方式陰イオンクロマトグラフィーにおける直線検量線の妥当性, 分析化学, **52**(5), p297-304 (2003)

Improvement of the Extraction method of Sulfate ion in Ion Chromatography

HIRATA Erika ¹

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

Considering the efficiency of test, we improved the extraction method of sulfate ion (SO_4^{2-}) analysis by ion chromatography. Specifically, I changed the extraction solution at a ratio of 1:23, which is a mixture hydrochloric acid and water. As a single-laboratory, we validated the improved extraction method. First, I compared the values extracted using the 1:23 mixed hydrochloric acid solution with those extracted using the 1:35 mixed hydrochloric acid solution about 14 different fertilizer samples. The trueness estimated from the measured values was satisfied recommended reference by Testing Methods for Fertilizers. Next, I conducted the test using two fertilizer samples in the duplicate, per five different days. Based on the measurements, I estimated that the repeatability relative standard deviations (RSD_r) were 0.76 %-1.16 % and the intermediate relative standard deviations ($RSD_{I(T)}$) were 1.33 %-1.71 %. These results were within the criteria of repeatability and intermediate precision of the Testing Methods for Fertilizers. In conclusion, this improved extraction method are valid for the determination of the sulfate ion in the fertilizer.

Key words ion chromatography, sulfate ion, hydrochloric acid concentration, single laboratory validation

(Research Report of Fertilizer, **14**, 79-86, 2021)

8 硫酸イオンの分析法の性能評価

— 室間共同試験による妥当性確認 —

平田絵理香¹, 野崎友春¹, 白井裕治¹

キーワード イオンクロマトグラフィー, 硫酸イオン, サプレッサー法, 共同試験による妥当性確認

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中, わが国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)¹⁾の要求事項を参考にした分析結果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. 「肥料の品質の確保等に関する法律」の告示に定める分析法²⁾として肥料等試験法³⁾が指定され, FAMIC では収載する試験方法について開発及びその性能を調査し, 肥料等試験法の改正案を農林水産省担当官及び有識者と協議し, 承認を受けた後, ホームページにて公表することとしている.

現在, 肥料等試験法に収載されている硫酸イオンの分析法に関し, 坂井田ら⁴⁾がその真度及び精度の性能について単一試験室による妥当性 (SLV: Single Laboratory Validation) を確認している. しかし, 収載されている方法は抽出溶媒の塩酸濃度が他の可溶性成分で用いる濃度と異なっていたことから, 利便性向上を目的として分析法の改良を行ない, 改良された分析法について単一試験室による妥当性 (SLV) を確認した⁵⁾.

今回, この改良した硫酸イオンの分析法について, 国際的に標準とされる室間共同試験を実施して, 複数試験室による妥当性 (HCV: Harmonized Collaborative Validation) を確認し分析法の評価を行ったので, 概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 均質性試験用試料及び共同試験用試料の調製

市場に流通している肥料 (以下, 「流通肥料」とする.) のうち, 6 種類の肥料 (化成肥料 3 種類, 硫酸アンモニア, 石こう及び重過りん酸石灰を各 1 種類) を目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉碎 (ZM-200; Retsch 製) し混合した. その後, 共同試験用試料として 6 種類の肥料各 1.9 g をそれぞれねじ式ポリ容器に 60 個充填して密封した.

試料 360 個 (60 個 \times 6 種類) に乱数表を用いてランダムに番号を貼付し, 試料を識別した. これらの識別した試料から乱数表を用いて無作為に 6 種類の肥料グループから 10 個ずつ抜き取り, 60 個 (10 個 \times 6 種類) を均質性試験用試料とした. 次に, 6 種類の肥料グループから無作為にそれぞれ 2 個ずつ抽出したものを一試験室に送付する共同試験用試料とし, 以下の参加試験室数に必要な試料を準備・配付した.

(共同試験参加試験室)

- ・ 一般財団法人日本海事検定協会
- ・ 一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所

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

- ・ 株式会社島津製作所 分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター
- ・ 株式会社兵庫分析センター
- ・ 公益財団法人日本肥糧検定協会
- ・ サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
- ・ ジーエルサイエンス株式会社 カスタマーサポートセンター
- ・ 昭和電工株式会社 Shodex サービスセンター
- ・ 東亜ディーケーケー株式会社 開発研究センター
- ・ 東京都産業労働局 農林水産部家畜保健衛生所 肥飼料検査センター
- ・ 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部カスタマーサポートセンター
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター 肥飼料安全検査部 肥料鑑定課
- ・ メトロームジャパン株式会社

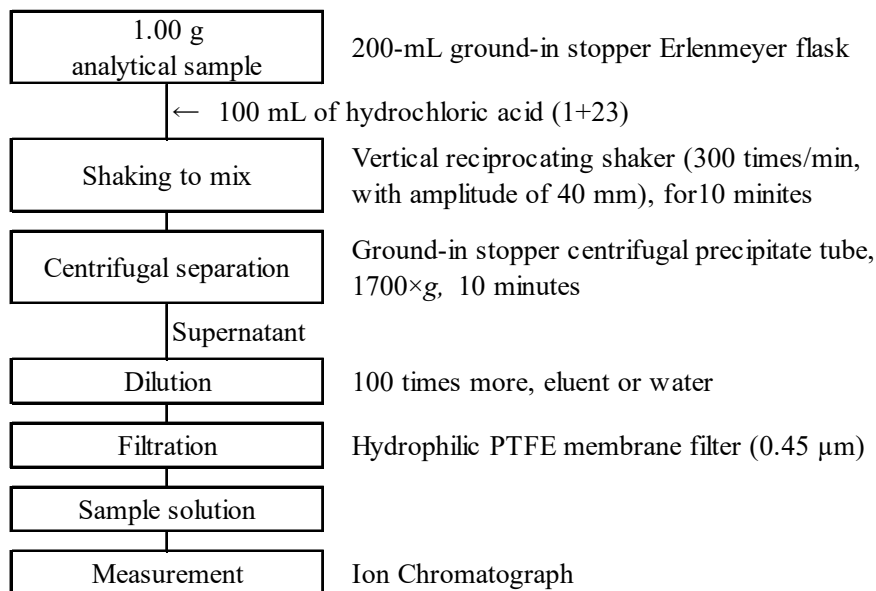
(50 音順)

2) 装置

各試験室に設置している振り混ぜ機, イオンクロマトグラフを使用した. 分離カラム(ガードカラムを含む)は各試験室が保有しているものを使用した.

3) 分析の方法

共同試験で用いる分析法として, 肥料等試験法(2020) 6.10.1 硫酸イオン 6.10.1.a イオンクロマトグラフ法を改良した方法⁵⁾により測定した. なお, 参考のため, フローシートを Scheme 1 で示す.



Scheme 1 Flow sheet for sulfate ion in fertilizers

検量線用標準溶液の調製は 0.2 μg/mL, 0.5 μg/mL, 1 μg/mL, 2 μg/mL, 3 μg/mL, 4 μg/mL, 5 μg/mL の濃度となるように指定し, クロマトグラムにおける硫酸イオンのピーク面積を用いて検量線を作成することとした. また, 参加試験室が使用する機器及び測定条件によっては検量線が二次曲線となる可能性が考えられたため, 一次式及び二次式で検量線を作成しそれぞれの検量線を用いて分析試料中の硫酸イオン濃度を算出した値

を報告結果とした。

4) 共同試験用試料の均質性試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁶⁾の均質性試験に従い, **1)**で調製した均質性試験用試料 60 個について, 各試料につき 2 点併行で **3)**に従って分析した。ただし, 三角フラスコにはかり入れる分析試料は 0.90 g とし, ピーク面積を用いて一次式の検量線を作成し各試料の硫酸イオン濃度を算出した。

5) 共同試験

共同試験に参加した 13 試験室において使用したイオンクロマトグラフの型式, 分離用カラム及びガードカラム, 測定条件は Table 1 のとおりである。試料到着日から令和 2 年 12 月 23 日まで(追加で依頼した一部の試験室は令和 3 年 1 月 29 日まで)に, それぞれの試験室において **1)**により配付した共同試験用試料 12 点を, **3)**の分析の方法に従って分析した。

Table 1 Instruments and conditions in the collaborative study

Labs ID ^{b)}	Ion Chromatograph	Column condition			Eluent	Flow rate	Diluent	Injection volume
		Column	Guard column	Column temperature				
A	840Professor IC, Metrohm	Shodex IC SI-90 4E, Showa Denko	Shodex IC SI-90G, Showa Denko	25°C	1.8 mmol/L Sodium carbonate +1.7 mmol/L Sodium bicarbonate	1.0 mL/min	eluent	20 µL
B	ICS-1100, Thermo Scientific Dionex	Shodex IC SI-90 4E, Showa Denko	— ^{b)}	25°C	1.8 mmol/L Sodium carbonate +1.7 mmol/L Sodium bicarbonate	1.0 mL/min	water	20 µL
C	IC-2010, Tosoh	TSKgel Super(C-Anion HS, Tosoh	TSKgel guardcolumn Super(C-A HS, Tosoh	40°C	1.1 mmol/L Sodium carbonate +7.5 mmol/L Sodium bicarbonate	1.5 mL/min	eluent	30 µL
D	881 Compact IC pro, Metrohm	IonPac AS12A, Thermo Scientific Dionex	IonPac AG12A, Thermo Scientific Dionex	32°C	2.7 mmol/L Sodium carbonate +0.3 mmol/L Sodium bicarbonate	1.2 mL/min	eluent	20 µL
E	Integrion RFI C, Thermo Scientific Dionex	IonPac AS20, Thermo Scientific Dionex	IonPac AG20, Thermo Scientific Dionex	35°C	5.0 mmol/L ~47.0 mmol/L potassium hydroxide gradient	1.5 mL/min	water	25 µL
F	ICS-2000, Thermo Scientific Dionex	IonPac AS19 (4×250 mm), Thermo Scientific Dionex	IonPac AG19 (4×50 mm), Thermo Scientific Dionex	30°C	10 mmol/L Potassium hydroxide	1.0 mL/min	water	20 µL
G	IC-8100EX, Tosoh	TSKgel Super(C-Anion HS, Tosoh	TSKgel guardcolumn Super(C-A HS, Tosoh	40°C	0.8 mmol/L Sodium carbonate +7.5 mmol/L Sodium bicarbonate	1.5 mL/min	water	30 µL
H	ICA-7000, DKK-Toa	PCI-205, DKK-Toa	PCI-205G, DKK-Toa	37°C	1.8 mmol/L Sodium carbonate +1.7 mmol/L Sodium bicarbonate	1.0 mL/min	water	20 µL
I	Integrion RFI C, Thermo Scientific Dionex	IonPac AS11-HC (4×250 mm), Thermo Scientific Dionex	IonPac AG11-HC (4×50 mm), Thermo Scientific Dionex	40°C	1.0 mmol/L ~70.0 mmol/L potassium hydroxide gradient	1.2 mL/min	water	25 µL
J	HIC-ESP, Shimadzu	Shim-pack IC-SA2, Shimadzu	Shim-pack IC-SA2(G), Shimadzu	25°C	1.8 mmol/L Sodium carbonate +1.7 mmol/L Sodium bicarbonate	1.0 mL/min	water	20 µL
K	ICS-2000, Thermo Scientific Dionex	IonPac AS11-HC (4×250 mm), Thermo Scientific Dionex	IonPac AG11-HC (4×50 mm), Thermo Scientific Dionex	35°C	15.0 mmol/L ~50.0 mmol/L potassium hydroxide gradient	1.2 mL/min	water	25 µL
L	Integrion RFI C, Thermo Scientific Dionex	IonPac AS22, Thermo Scientific Dionex	IonPac AG22, Thermo Scientific Dionex	35°C	4.5 mmol/L Sodium carbonate +1.4 mmol/L Sodium bicarbonate	1.0 mL/min	water	50 µL
M	Eco IC, Metrohm	Metrosep A Supp 4 - 250/4.0, Metrohm	Metrosep A Supp 4 Guard/4.0, Metrohm	room temperature (24°C)	1.8 mmol/L Sodium carbonate +1.7 mmol/L Sodium bicarbonate	1.0 mL/min	eluent	20 µL

a) Laboratory identification (In no particular order)

b) Not used Guard column

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

各 6 種類の試料 (10 個) を 2 点併行で分析した均質性試験の分析結果から求めた総平均値 (\bar{x}) 及び一元配置分散分析から得られた統計量を用いて算出した併行標準偏差 (s_r), 試料間標準偏差 (s_{bb}), 併行精度を含む試料間標準偏差 (s_{b+r}) を Table 2 に示した. さらに, 肥料等試験法³⁾に示されている室間再現精度の目安 ($CRSD_R$) 及びそれらから (式 1) により算出した推定室間再現標準偏差 ($\hat{\sigma}_R$) を同じく Table 2 に示した.

均質性の判定は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの手順を参考に実施した. まず, 分析結果の等分散性を確認するため, Cochran の検定を実施した. その結果, すべての試料において等分散性が確認できたので, これらの分析結果について一元配置分散分析を実施した. 次に IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの十分に均質の判定式 (式 2) を用いて均質性の判定を行った. その結果, 全ての試料で判定式 (式 2) を満たしていたことから, 共同試験用試料として妥当な均質性を有していることを確認した. なお, 参考のため, 併行精度を評価する式 (式 3) を下記に示す. また, (式 4) によって併行精度を含む試料間標準偏差 (s_{b+r}) を算出したところ, 化成肥料 3 を除く 5 種類の試料が $\hat{\sigma}_R$ と比較して十分に小さい値であった.

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

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

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

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

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

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

\bar{x} : 総平均値

s_r : 併行標準偏差

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_{bb} : 試料間標準偏差

s_{b+r} : 併行精度を含む試料間標準偏差

Table 2 Homogeneity test results of sulfate ion

Sample	Number of sample	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{e)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (%) ^{b)}	s_r ^{g)} (%) ^{b)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}	s_{b+r} ⁱ⁾ (%) ^{b)}
Ammonium sulfate	10	71.9	8	5.75	0.28	1.73	0.90	2.88	0.94
Gypsum	10	50.4	8	4.03	0.93	1.21	1.26	2.02	1.57
Complex fertilizer 1	10	33.5	8	2.68	0.16	0.80	0.44	1.34	0.47
Complex fertilizer 2	10	16.1	8	1.29	0.09	0.39	0.25	0.65	0.26
Triple superphosphate	10	3.46	8	0.28	0 ^{j)}	0.08	0.20	0.14	0.20
Complex fertilizer 3	10	2.48	8	0.20	0 ^{j)}	0.06	0.25	0.10	0.25

a) Grand mean value (n = 10×number of repetition(2))

b) Mass fraction

c) The aim of Rerative standard deviation of reproducibility in Testing Methods for Fertilizers 2020

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

e) Standard deviation of sample-to-sample

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

g) Repeatability standard deviation

h) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (S_r)i) Standard deviation of sample-to-sample including repeatability : $s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2}$ j) When the variance between groups < the variance within a group, s_{bb}^2 was considered as 0

2) 共同試験結果及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験結果のうち、試験室 C は使用機器の都合上、検量線の低濃度で十分なピーク強度が得られなかったことから 2.5 µg/mL～100 µg/mL の硫酸イオン濃度で検量線を作成し、希釈濃度も検量線濃度に合わせて変更されていた。また、試験室 B 及び G は垂直往復振り混ぜ機を保有していなかったことから、水平往復振り混ぜ機を使用したとの報告があった。これら 2 試験室で使用された水平往復振り混ぜ機及び振り混ぜ条件を Table 3 で示した。

Table 3 The conditions of shakers reciprocating horizontally

Labs ID ^{a)}	Horizontally reciprocating shaker	Shaking amplitude (mm)	Shaking frequency (times/min) ^{b)}	Shaking time (min)
B	SRR-2, AS ONE	30 ^{c)}	260～270	10
G	DOUBLE SHAKER NR-3, TAITEC	40	110	10

a) Laboratory identification (In no particular order)

b) 1 times/min = 1 rpm

c) Quoted from the user's manual

今回、検量線用標準液の濃度を変更した試験室 C 及び水平往復振り混ぜ機を用いて試料溶液を調製した試験室 B 及び G については、Scheme 1 の試験方法や実施要領で示した条件と異なる手順により分析された結果であることから、分析法の室間再現精度を推定するための統計解析には用いないこととした。統計解析に用いなかった試験室も含め、各試験室から報告された共同試験結果を Table 4-1(一次式による算出)及び Table 4-2(二次式による算出)に示した。

Table 4-1 Harmogeneity test results of sulfate ion by calibration curve designed linear function

(%)^{a)}

Labs ID ^{b)}	Ammonium sulfate		Gypsum		Complex fertilizer 1		Complex fertilizer 2		Triple superphosphate		Complex fertilizer 3	
A	75.74	75.46	50.83	49.57	36.08	36.06	16.71	16.24	4.37	4.20	2.56	2.46
D	71.93	71.81	50.07	49.89	32.79	32.55	15.73	15.69	3.75	3.67	1.78	1.71
E	70.88	70.62	47.90	47.59	32.55	31.91	14.93	14.42	3.22	3.20	1.51	1.50
F	76.09	69.72	49.09	48.38	31.61	31.27	18.01	16.71	3.90 ^{c)}	3.59 ^{c)}	2.00	1.80
H	72.22	70.48	48.78	47.28	32.46	32.12	15.31	15.03	3.54	3.52	2.00	1.97
I	84.97 ^{d)}	84.00 ^{d)}	56.29 ^{d)}	53.43 ^{d)}	36.92	35.16	18.68	18.31	3.95	3.90	1.94	1.85
J	76.06	71.49	50.69	49.39	34.38	33.62	15.17 ^{c)}	7.12 ^{c)}	3.96	3.88	2.03	2.02
K	67.10	66.93	46.39	46.23	30.56	30.31	14.43	14.15	3.27	3.23	1.69	1.64
L	73.96	69.75	49.59	48.90	32.66	32.04	16.13	15.79	3.43	3.40	1.91	1.72
M	70.91	70.73	49.03	48.75	32.19	31.97	15.76	15.75	3.56	3.54	1.93	1.90
B	66.74	66.45	46.53	44.94	30.99	30.67	14.69	14.68	3.44	2.87	1.96	1.94
C	75.29	74.94	49.46	32.45	33.17	32.94	15.20	14.86	3.51	3.19	4.71	1.90
G	72.20	71.95	39.86	35.68	33.01	31.75	15.89	15.84	3.29	3.06	1.83	1.78

a) Mass fraction

b) Laboratory identification

Upper row : Reported values used for statistical analysis (Original date for Table 5)

Lower row : Excluded reported values because of different procedures from the Scheme 1

c) Outlier of Cochran test

d) Outlier of Grubbs test

Table 4-2 Harmogeneity test results of sulfate ion by calibration curve designed quadratic function

(%)^{a)}

Labs ID ^{b)}	Ammonium sulfate		Gypsum		Complex fertilizer 1		Complex fertilizer 2		Triple superphosphate		Complex fertilizer 3	
A	75.90	75.62	51.19	49.93	36.36	36.34	16.71	16.25	4.39	4.23	2.54	2.44
D	72.21	72.11	50.56	50.39	33.15	32.91	15.76	15.72	3.77	3.68	1.73	1.66
E	70.72	70.47	47.66	47.36	32.38	31.75	14.91	14.39	3.22	3.20	1.54	1.53
F	76.28	70.10	49.84	49.14	32.36	32.02	17.94	16.69	4.02 ^{c)}	3.70 ^{c)}	2.07	1.86
H	72.66	70.98	49.50	48.00	32.98	32.62	15.38	15.10	3.55	3.53	1.94	1.91
I	84.99 ^{d)}	84.01 ^{d)}	56.10 ^{d)}	53.22 ^{d)}	36.73	34.98	18.71	18.33	3.94	3.88	1.94	1.86
J	76.18	71.67	50.97	49.67	34.60	33.83	15.20 ^{c)}	7.17 ^{c)}	3.97	3.89	2.01	2.00
K	70.72	70.56	48.77	48.60	32.24	31.97	15.22	14.93	3.44	3.41	1.78	1.73
L	74.23	70.10	50.11	49.42	33.05	32.42	16.15	15.82	3.44	3.41	1.87	1.67
M	71.12	70.94	49.37	49.09	32.44	32.22	15.78	15.78	3.56	3.55	1.90	1.87
B	66.99	66.69	46.98	45.38	31.30	30.96	14.73	14.70	3.43	2.84	1.90	1.87
C	- ^{e)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	72.35	72.10	40.22	36.04	33.36	32.10	15.90	15.85	3.34	3.11	1.86	1.80

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

e) No report

Table 4-1 及び Table 4-2 の上段で示した 10 試験室について、各試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{7, 8)}に従って統計解析した。まず、外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施した。その結果、Table 4-1 で示した一次式の検量線による算出方法では 10 試験室の試験結果のうち、硫酸アンモニアで 1 試験室、石こうで 1 試験室、化成肥料 2 で 1 試験室及び重過りん酸石灰で 1 試験室が外れ値として判定された。また、Table 4-2 で示した二次式の検量線による試験結果においても、一次式を用いた検量線の結果と同様に、10 試験室のうち硫酸アンモニアで 1 試験室、石こうで 1 試験室、化成肥料 2 で 1 試験室、重過りん酸石灰で 1 試験室が外れ値として判定された。

3) 併行精度及び室間再現精度

10 試験室の報告値から外れ値を除外した分析結果を用いて算出した平均値, 併行標準偏差 (s_r), 併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び肥料等試験法における併行精度の許容範囲並びに室間再現標準偏差 (s_R), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) 及び肥料等試験法³⁾における室間再現精度の許容範囲を Table 5 に示した。

Table 5 Statistical analysis of Collaborative study results

Calibration curve	Sample	Labs $p(q)^b$	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	Repeatability			Repeatability		
				s_r^d (%) ^{c)}	RSD_r^e (%)	$2*CRSD_r^f$ (%)	s_R^g (%) ^{c)}	RSD_R^h (%)	$2*CRSD_R^i$ (%)
linear function	Ammonium sulfate	9(1)	71.77	2.14	3.0	8	2.81	3.9	16
	Gypsum	9(1)	48.80	0.61	1.3	8	1.35	2.8	16
	Complex fertilizer 1	10	32.96	0.49	1.5	8	1.89	5.7	16
	Complex fertilizer 2	9(1)	15.99	0.38	2.4	8	1.34	8.4	16
	Triple superphosphate	9(1)	3.64	0.05	1.4	8	0.35	9.7	16
	Complex fertilizer 3	10	1.90	0.07	3.8	8	0.27	14.3	16
quadratic function	Ammonium sulfate	9(1)	72.37	2.09	2.9	8	2.25	3.1	16
	Gypsum	9(1)	49.42	0.61	1.2	8	1.09	2.2	16
	Complex fertilizer 1	10	33.37	0.49	1.5	8	1.62	4.8	16
	Complex fertilizer 2	9(1)	16.09	0.37	2.3	8	1.23	7.7	16
	Triple superphosphate	9(1)	3.67	0.05	1.4	8	0.34	9.2	16
	Complex fertilizer 3	10	1.89	0.07	3.9	8	0.26	13.7	16

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

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

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Repeatability relative standard deviation

f) Criteria of repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2020

g) Standard deviation of reproducibility

h) Reproducibility relative standard deviation

i) Criteria of reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2020

6 種類の試料について統計解析の結果, すべての測定条件において, 硫酸イオンの平均値は 1.89 % (質量分率) ~ 72.37 % (質量分率) であり, その併行標準偏差 (s_r) は 0.05 % (質量分率) ~ 2.14 % (質量分率), 併行相対標準偏差 (RSD_r) は 1.2 % ~ 3.9 %, 室間再現標準偏差 (s_R) は 0.26 % (質量分率) ~ 2.81 % (質量分率), 室

間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 2.2 % ~ 14.3 % であった。

いずれの試料及び測定条件においても、併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) が肥料等試験法³⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の許容範囲内であったことから、本法の精度は肥料等試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることを確認した。

なお、参考として、**2) 共同試験結果及び外れ値検定**にて、Scheme 1 の試験方法や実施要領と異なる手順で測定したことを理由に Table 5 で結果を示した解析に用いなかった試験室 B, C 及び G を含めた 13 試験室の試験結果について、Cochran の検定及び Grubbs の検定により外れ値を除外し、統計解析した結果を Table 6 に示す。これらの結果についても、併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) が肥料等試験法の妥当性確認の手順で示している各濃度のレベルにおける精度の許容範囲内であった。

Table 6 Statistical analysis of Collaborative study results containing excluded value because of different procedures

Calibration curve	Sample	Labs $p(q)^b$	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	Repeatability			Repeatability		
				s_r^d	RSD_r^e	$2*CRSD_r^f$	s_R^g	RSD_R^h	$2*CRSD_R^i$
				(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
linear function	Ammonium sulfate	12(1)	71.64	1.86	2.6	8	3.04	4.2	16
	Gypsum	11(2)	49.07	0.89	1.8	8	2.50	5.1	16
	Complex fertilizer 1	13	32.76	0.50	1.5	8	1.76	5.4	16
	Complex fertilizer 2	11(2)	15.65	0.21	1.4	8	1.16	7.4	16
	Triple superphosphate	13	3.56	0.15	4.4	8	0.36	10.2	16
	Complex fertilizer 3	11(2)	1.84	0.07	3.6	8	0.16	8.7	16
quadratic function	Ammonium sulfate	11(1)	71.85	1.89	2.6	8	2.62	3.6	16
	Gypsum	11(1)	49.60	0.89	1.8	8	2.23	4.5	16
	Complex fertilizer 1	10(2)	32.53	0.42	1.3	8	0.85	2.6	16
	Complex fertilizer 2	10(2)	15.81	0.21	1.3	8	1.13	7.1	16
	Triple superphosphate	11(1)	3.65	0.10	2.6	8	0.34	9.4	16
	Complex fertilizer 3	11(1)	1.83	0.07	3.8	8	0.14	7.9	16

a)~i) Refer to the footnote of Table 5

4) 機器測定条件の検討 : 室間共同試験の報告における直線検量線の評価

サプレッサーを用いたイオンクロマトグラフィーでの測定で炭酸系溶離液を使用する場合、検量線の直線性が得られない場合があることが知られている⁹⁾。しかし、メトローム社のイオンクロマトグラフで炭酸系溶離液を用いたサプレッサー法の測定において、炭酸サプレッサーを使用しない場合に検量線の直線性が得られたという報告もある⁵⁾。

そこで、検量線の直線性におけるイオンクロマトグラフの機器間差を確認するために、室間共同試験に参加した 13 試験室の報告について一次式を用いた検量線の決定係数(r^2)を確認したところ、全ての試験室において、一次式を用いた検量線の決定係数(r^2)が 0.99 以上となり、検量線の直線性を確認することができた (Table 7)。以上のことから、今回の共同試験で使用した機器及び測定条件においては、検量線に一次式を用いることが望ましいと考えられた。

よって、今回の共同試験においては、Table 5 の上段で示したとおり、一次式による報告値から推定された併行精度及び室間再現精度により分析法の性能を評価することとした。

Table 7 The coefficient of determination of the linear calibration curve

Labs ID ^{a)}	Coefficient of determination (r^2)
A	0.9997
B	0.9994
C	0.9992
D	0.9998
E	1.0000
F	0.9984
G	1.0000
H	0.9996
I	1.0000
J	1.0000
K	0.9982
L	0.9998
M	0.9999

a) Laboratory identification (In no particular order)

4. まとめ

肥料等試験法³⁾に記載されている硫酸イオン試験法(イオンクロマトグラフ法)の抽出方法等を改良した分析法について、国際的に標準とされる室間共同試験を実施した結果は次のとおり。

(1) 6 種類(12 点)の肥料を用いて 13 試験室が参加して室間共同試験を実施し、室間再現精度の評価を行った。抽出操作や検量線濃度が異なる試験室を除いた 10 試験室の一次式検量線による分析結果を用いて統計解析した結果、硫酸イオン平均値 1.90 % (質量分率) ~ 71.77 % (質量分率) において室間再現相対標準偏差は 2.8 % ~ 14.3 % であり、肥料等試験法で示す精度の許容範囲内であった。このことから、本法の精度は性能評価規準の要求事項に適合していることを確認した。

(2) 共同試験に参加した 13 試験室全てにおいて、一次式を用いた検量線の決定係数(r^2)が 0.99 以上であったことから、本法で検量線を作成する際は一次式を用いることが望ましいと考えられた。

今回検討した分析法は、すでに単一試験室による妥当性(SLV)の確認がされていることから、分析法の性能は肥料等試験法における性能規準の Type B (SLV 及び HCV による評価) に適合している。

謝 辞

共同試験にご協力いただきました一般財団法人日本海事検定協会，一般財団法人日本食品分析センター，株式会社島津製作所，株式会社兵庫分析センター，公益財団法人日本肥糧検定協会，サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社，ジーエルサイエンス株式会社，昭和電工株式会社，東亜ディーケーケー株式会社，東京都産業労働局農林水産部家畜保健衛生所，東ソー株式会社，メロームジャパン株式会社の各位に謝意を表します。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2017): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2018, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) 農林水産省告示:肥料の品質の確保等に関する法律第十七条第一項第三号の規定に基づき，肥料の品質の確保等に関する法律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，最終改正令和 3 年 6 月 14 日，農林水産省告示第 1011 号(2021)
- 3) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikengo_2020.pdf>
- 4) 坂井田里子，小塚健志，白井裕治:イオンクロマトグラフィーによる硫酸イオンの測定法の開発，肥料研究報告，**13**, 50-64 (2020)
- 5) 平田絵理香:イオンクロマトグラフィーによる硫酸イオン分析における抽出方法の改良，肥料研究報告，**14**, 79-86 (2021)
- 6) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145~196 (2006)
- 7) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2) , 331-343 (1995)
- 8) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)
- 9) 四角目和広，横山幸雄，佐藤寿邦: サプレッサー付電気伝導率検出方式陰イオンクロマトグラフィーにおける直線検量線の妥当性，分析化学，**52**(5), p297-304 (2003)

Performance Evaluation of Determination Method for Sulfate ion in Fertilizers : Harmonized Collaborative Validation

HIRATA Erika ¹, NOZAKI Tomoharu ¹ and SHIRAI Yuji ¹

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

For the determination of sulfate ion (SO_4^{2-}) by ion chromatography in Testing Methods for Fertilizers 2020, an improved method was reported in order to improve the efficiency of the test. We conducted a collaborative study by means of international harmonized protocol to evaluate the improved method for determination of sulfate ion in fertilizer by ion chromatography. Each of six samples passed the test for homogeneity, and we sent them to 13 collaborators. They analyzed them as blind duplicated. Because of not deviating from the extraction procedure, valid data were those reported by 10 collaborators. After identification of outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean values calculated by linear calibration curve and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of sulfate ion were estimated 1.90 %-71.77 % as a mass fraction and 2.8 %-14.3 %. This result indicated that the method has acceptable precision for determination of sulfate ion in this concentration range. In conclusion, we confirmed the validity of the method for the determination of sulfate ion.

Key words ion chromatography, sulfate ion, suppressor method, harmonized collaborative validation

(Research Report of Fertilizer, **14**, 87-98, 2021)

9 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた

堆肥等中のクロピラリドの測定

—精製操作の改良—

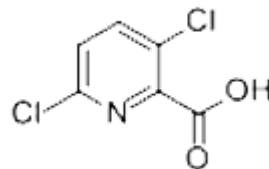
加藤まどか¹, 白井裕治¹

キーワード クロピラリド, 堆肥, 汚泥発酵肥料, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計, コポリマーカートリッジカラム

1. はじめに

クロピラリドは、日本では農薬としての登録はされていないが、米国、オーストラリア、カナダなどの海外で牧草や穀類の生産に使われているカルボキシル基を有するピリジン系の除草剤(Figure 1)である。クロピラリドが含まれた堆肥等を施用すると、トマト、スイートピーなどクロピラリドに感受性が高い野菜や花の生育に影響(生育障害)が生じる^{1, 2)}。このことから、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いた堆肥等中の分析方法の開発及び改良が続けられていた^{3~6)}。しかしながら、改良された方法⁶⁾においても、抽出液中の夾雑物質がコポリマーカートリッジカラムのフィルターを目詰まりさせて精製操作を困難にする事例があった。

このことから、同様の機能を有するリザーバー容量の大きい(フィルターの表面積の大きい)コポリマーカートリッジカラムを用いて精製する方法を検討したのでその概要を報告する。



CAS No: 1702-17-6

Figure 1 Structural formula of clopyralid

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

流通する肥料の堆肥 11 銘柄(鶏ふん堆肥 3 銘柄, 豚ふん堆肥 3 銘柄, 牛ふん堆肥 3 銘柄及び馬ふん堆肥 2 銘柄)及び汚泥発酵肥料 3 銘柄を 40 °C で約 60~70 時間乾燥した後, それぞれ超遠心粉砕機(Retsch ZM 200)で 500 μm のスクリーンを通過するまで粉砕し, 混合して分析用試料を調製した. 分析用試料は, ポリエチレン製袋に入れて輪ゴムで密閉し, 直射日光を避け, 常温で保存した.

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) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) : Waters Quattro Premier XE
カラム: Waters ACQUITY UPLC HSS C18 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μm)
- (2) 振り混ぜ機: TAITEC SR-2DW
- (3) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (4) ロータリーエバポレーター: BÜCHI R-200
- (5) コポリマーカートリッジカラム: GL-Sciences InertSep HLB FF 500 mg/20 mL
Waters Oasis HLB 12cc (500 mg)
- (6) ジルコニアコートシリカゲルカラム: Supelco HybridSPE[®]-Phospholipid (500 mg)
- (7) 超遠心分離機: AS ONE MCD-2000
- (8) マニホールド: GL-Sciences
- (9) 試験管ミキサー: AS ONE 試験管ミキサーTRIO TM-2N

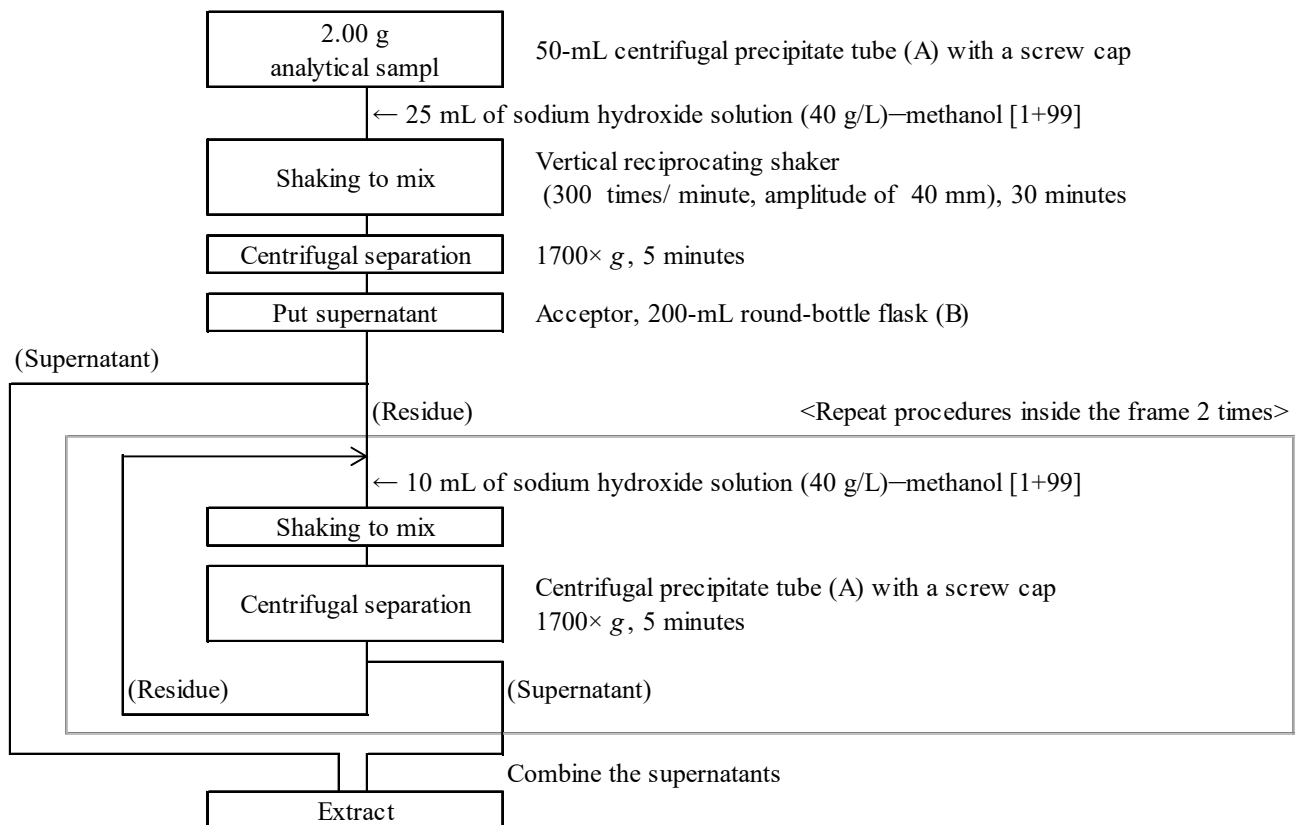
3) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水. ただし、LC-MS/MS に導入する溶離液については A4 の水を使用した.
- (2) アセトニトリル: JIS K 8039 残留農薬・PCB 試験用試薬 (濃縮 5000) (富士フィルム和光純薬)
- (3) メタノール (抽出・クリーンアップ用): 残留農薬・PCB 試験用試薬 (濃縮 5000) または LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬)
- (4) メタノール (溶離液用): LC-MS 用試薬 (富士フィルム和光純薬)
- (5) 水酸化ナトリウム: JIS K 8576 特級試薬 (関東化学)
- (6) 塩酸: JIS K 8180 微量金属分析用試薬 (富士フィルム和光純薬)
- (7) アンモニア水: JIS K8085 特級試薬 (質量分率 28 %) (富士フィルム和光純薬)
- (8) ぎ酸: LC-MS 用試薬 (富士フィルム和光純薬)
- (9) クロピラリド: 残留農薬試験用試薬 (富士フィルム和光純薬)
- (10) アンモニア溶液 (0.0028 % (質量分率)): アンモニア水 0.1 mL を水 1000 mL に加える.
- (11) クロピラリド標準液 (0.1 mg/mL): クロピラリド [$\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{NO}_2$] 約 0.01 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg の桁まで測定した後, 少量のアセトニトリルで溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた.
- (12) クロピラリド標準液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$): クロピラリド標準液 (0.1 mg/mL) の 2 mL を全量フラスコ 200 mL にとり, 標線までアセトニトリルを加えた.
- (13) 検量線用クロピラリド標準液 (100 ng/mL): 使用時にクロピラリド標準液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり, 標線までぎ酸 (1+1000) を加えた.
- (14) 検量線用クロピラリド標準液 (5 ng/mL ~ 50 ng/mL): 検量線用クロピラリド標準液 (100 ng/mL) の 2.5 mL ~ 25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 標線までぎ酸 (1+1000) を加えた.
- (15) 検量線用クロピラリド標準液 (0.5 ng/mL ~ 2 ng/mL): 検量線用クロピラリド標準液 (10 ng/mL) の 2.5 mL ~ 10 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 標線までぎ酸 (1+1000) を加えた.

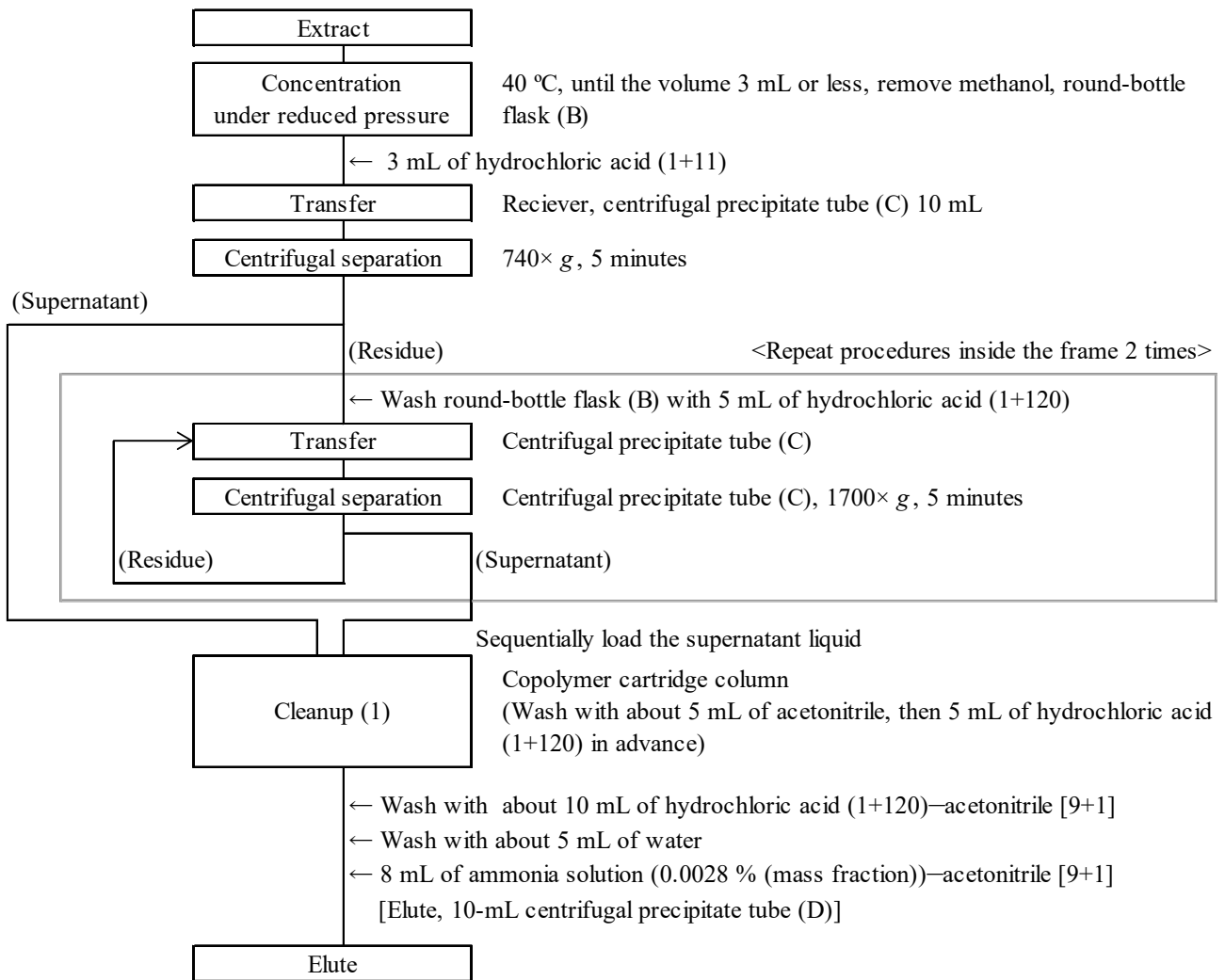
4) 試験操作

試料溶液の調製操作(抽出操作, クリーンアップ(1)操作及びクリーンアップ(2)操作)は, Scheme 1-1~ Scheme 1-3 に示した. 肥料等試験法(2020)⁷⁾の 8.2.c の変更は, クリーンアップ(1)操作においてコポリマーカラムに負荷する試料溶液を遠心分離する操作を追加した(Scheme 1-2). また, コポリマーカラムとして Oasis HLB が示されていたが, InertSep HLB FFを追加した.

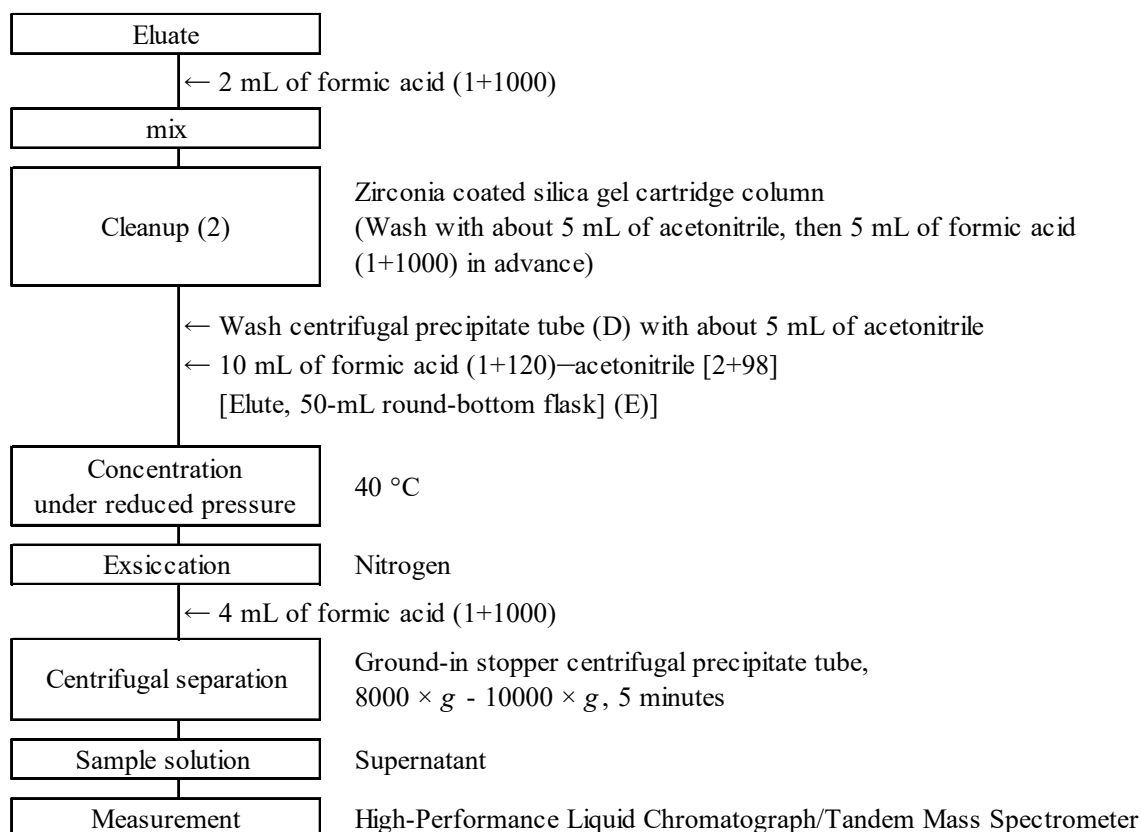
試料溶液及び検量線作成用混合標準液を LC-MS/MS に注入し, Table 1 の測定条件に従って選択反応検出(MRM)クロマトグラムを得た. 得られた MRM クロマトグラムから各成分のピーク面積を求めて検量線を作成し, 試料溶液中の各成分量を求め, 分析試料中のクロピラリドの量を算出した.



Scheme 1-1 Flow sheet for clopyralid in composts (Extraction procedure)



Scheme 1-2 Flow sheet for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers
(Cleanup (1) procedure)



Scheme 1-3 Flow sheet for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers
(Cleanup (2) and measurement procedure)

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

[LC conditions] ACQUITY UPLC

Guard column: Inertsil ODS-SP HP (3.0 mm I.D., 10 mm L, 3 μm)

Column: Waters ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm I.D., 100 mm L, 1.8 μm)

Mobile phase: A: Formic Acid (1+1000) B: Methanol

Gradient program: 0 min (5 % B)→5 min (60 % B)→6 min (95 % B)→7 min (5 % B)
→12 min (5 % B)

Flow rate: 0.4 mL/min

Column temperature: 40 °C

Injection volume: 5 μL

[MS conditions] Quatro Premier XE

Capillary voltage: 1.0 kV

Desolvation temperature: 400 °C

Desolvation gas flow: 1000 L/h

Cone gas: 50 L/h

Cone voltage: 24 V

Source temperature: 120 °C

Precursor ion: m/z 192

Product ion for determination: m/z 146 (Collision energy 20 eV)

Product ion for validation: m/z 110 (Collision energy 30 eV)

3. 結果及び考察

堆肥等中のクロピラリドの試料溶液の調製の初期手順として、水酸化ナトリウム水溶液 (40g/L) –メタノール[1+99]で抽出した後、抽出液中のメタノールをエバポレータで除いた後、塩酸 (1+11)を加えている。この際、溶液の pH がアルカリ性から酸性に変化することから、酸不溶物で白濁又は沈殿が生じる。肥料等試験法⁷⁾ではこの溶液の全体をコポリマーカートリッジカラムに負荷するため、同カラムの上部のフィルターに酸不溶物が詰まり、加圧及び減圧操作を加えても試料溶液又は洗浄溶媒が流下しなくなる事例が散見された。このため、コポリマーカートリッジカラム(Oasis HLB 12cc (500 mg))に負荷する試料溶液をあらかじめ遠心分離することとした。この精製操作により目詰まりする現象は軽減されたが、減圧又は加圧する操作は必要であった。

このことから、同様の機能を有するリザーバー容量の大きい(フィルターの表面積の大きい)コポリマーカートリッジカラム(InertSep HLB FF 500 mg/20 mL)を用いて自然流下で精製する方法の真度の評価をするため、次の検討を実施した。汚泥発酵肥料にクロピラリドとして 40 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、InertSep HLB FF 又は Oasis HLB を用いた精製操作によりそれぞれ 4 点併行で分析した結果を Table 2-1 に示し、*F* 検定により分散を評価し、*t* 検定により平均値の差を評価した (Table 2-2)。前者及び後者のコポリマーカートリッジカラムを用いた分析値の平均値は 36.6 µg/kg 及び 75.7 µg/kg であり、それらの標準偏差は 1.7 µg/kg 及び 0.6 µg/kg であった。更に、等分散性を確認した後、平均値を比較したところ有意な差は認められなかった。また、InertSep HLB FF を用いた精製操作による分析値の平均回収率は 73.2 %であり、肥料等試験法に示されている真度の目標 (70 %~120 %)を満たしていた。

2 種類のコポリマーカートリッジカラムを用いた分析結果の整合性を確認するため、方法間の比較を実施した。Oasis HLB を用いて精製し分析してクロピラリドとして 2 µg/kg 以上検出した堆肥等を用い、InertSep HLB FF を用いて精製しクロピラリドを分析し、前者の分析値に対する後者の分析値の関係を Figure 2 にプロットし、回帰直線及びその予測区間を描いた。また、各回帰直線の回帰式及びそれらの回帰係数の 95 %信頼区間並びに相関係数を Table 3 に示した。その結果、いずれのパラメータも肥料等試験法に示されている推奨基準(傾き(*b*)の 95 %信頼区間に 1, 切片(*a*)の 95 %信頼区間に 0 が含まれ、相関係数(*r*)が 0.99 以上)を満たしていた。

Table 2-1 Comparison of purification procedure with different copolymer cartridge column (μg)

	Analytical value of clopyralid ^{a)}	
	InertSep HLB FF ^{b)}	Oasis HLB ^{c)}
1	37.8	38.1
2	38.2	37.0
3	35.6	38.3
4	34.8	37.9
Mean value (<i>m</i>)	36.6	37.8
Standard deviation (<i>s</i>)	1.7	0.6
Recovery rate (Unit: %)	73.2	75.7

a) Composted sludge fertilizer spiked 50 μg/kg as clopyralid

b) Considered copolymer cartridge column

c) Conventional copolymer cartridge column

Table 2-2 Statistical analysis for evaluating trueness

		Calculated value	Critical value
<i>F</i> -test	Varyance ratio	8.17	9.28 ^{a)}
<i>t</i> -test	<i>t</i> -value	1.38	2.45 ^{b)}

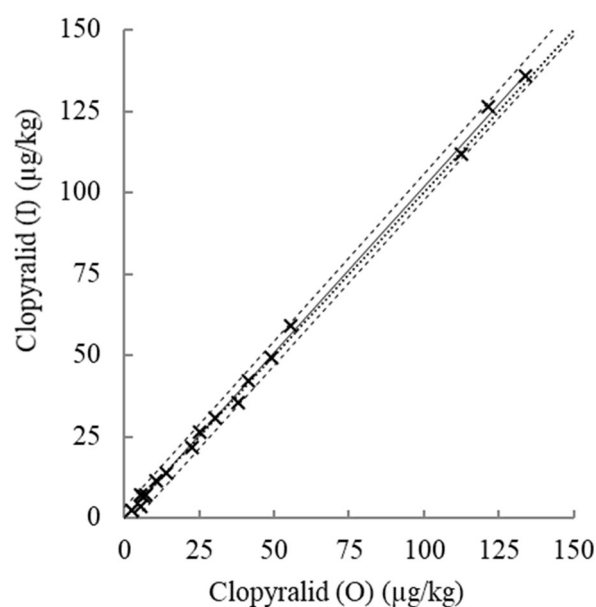
a) $F(3,3;0.05)$ b) $t(6;0.05)$ 

Figure 2 Comparison between analytical values purified with InertSep HLB FF and Oasis HLB

Clopyralid (I): Analytical values purified with InertSep HLB FF

Clopyralid (O): Analytical values purified with Oasis HLB

Solid line: Regression line, Thin line: $y=x$

Dotted lines: Upper and lower limit 95 % prediction intervals

Table 3 Evaluation of regression line for comparison of clopyralid analysis values
with two types of cartridges

Coefficient ^{a)}	Slope (<i>b</i>)	0.137
	Intercept (<i>a</i>)	0.968
	Correlation (<i>r</i>) ^{b)}	0.994
Range of slope (<i>b</i>) ^{c)d)}	Lower limit	0.911
	Upper limit	1.025
Range of intercept (<i>a</i>) ^{c)e)}	Lower limit	-0.361
	Upper limit	0.634

a) Regression equation: $y=bx+a$

b) The recommended criteria* of correlation coefficient: $r \geq 0.99$

c) The 95 % confidence interval

d) The recommended criteria* of coefficient of range of slope:

One is included in the intercept range.

e) The recommended criteria* of coefficient of range of intercept:

The origin (0) is included in the intercept range.

* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

4. まとめ

堆肥等中のクロピラリドの分析方法において、精製操作の手順の一部を改良し、従来のコポリマーカートリッジ(Oasis HLB)と同様の機能を持つ InertSep HLB FF を使用する分析方法についての妥当性を単一試験室により確認したところ、次の結果が得られた。

(1) コポリマーカートリッジカラムによる精製操作で同カラムの上部のフィルターに酸不溶物が詰まる現象は、負荷する試料溶液をあらかじめ遠心分離することにより軽減された。

(2) 汚泥発酵肥料にクロピラリドとして 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて、InertSep HLB FF 又は Oasis HLB を用いた精製操作によりそれぞれ 4 点併行で分析した結果、有意な差は認められなかった。

(3) Oasis HLB を用いて精製し分析してクロピラリドとして 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~121 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上検出した堆肥等を用い、InertSep HLB FF を用いて精製しクロピラリドを分析した結果を回帰分析したところ、相関係数(*r*)が 0.994 であり、両者の分析値は一致していた。

これらの結果を踏まえ、コポリマーカートリッジカラムによる精製操作において試料溶液の遠心分離操作を追加し、既存のコポリマーカートリッジカラムの他に InertSep HLB FF を含めることとし、室間共同試験⁸⁾のための試料溶液の調製操作手順を作成した。

文献

- 1) 農林水産省:クロピラリドが原因と疑われる生育障害の発生状況
< <https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-54.pdf> >

- 2) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構:飼料及び堆肥に残留する除草剤(クロピラリド)の簡易判定法と被害軽減対策マニュアル(第2版)
< https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_ver2.pdf >
- 3) 顯谷久典, 八木寿治, 橋本良美, 白井裕治:液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)法による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド, アミノピラリド及びピクロラムの測定, 肥料研究報告, **7**, 1-9 (2014)
- 4) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター:牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法(参考法)(2017)
< https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_analysis_1.pdf >
- 5) 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井祐治:液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による堆肥等中のクロピラリドの測定 ー微量試験法の適用範囲拡大ー, 肥料研究報告, **11**, 63-74 (2018)
- 6) 中村信仁, 小塚健志, 白井裕治:液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による堆肥等中のクロピラリドの測定法の改良, 肥料研究報告, **12**, 69-83 (2019)
- 7) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf >
- 8) 加藤まどか, 白井裕治:液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた堆肥等中のクロピラリドの分析 ー室間共同試験による妥当性確認ー, 肥料研究報告, **14**, 109-122 (2021)

Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer using Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS): Improvement of Purification Operation

KATO Madoka¹ and SHIRAI Yuji¹

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

The analytical methods for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers described in Testing Methods for Fertilizers (2020) are as follows. Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. We purified the extract with a copolymer cartridge column and a zirconia coated silica gel cartridge column. Clopyralid was determined using Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS). However, there were cases where contaminants in the extract clog the filter of the copolymer cartridge column. We improved a part of the purification operation procedure and examined the performance of InertSep HLB FF (Column size 500 mg/20 mL), which has the same function as the conventional copolymer cartridge (Oasis HLB 12cc (Column size 500 mg/12 mL)). We compared InertSep HLB FF and Oasis HLB using the analytical values purified by loading the centrifuge sample solution. As a result, the analytical values were in agreement in the range of 2 µg/kg to 121 µg/kg.

Key words clopyralid, compost, composted sludge fertilizer, LC-MS/MS, copolymer cartridge column

(Research Report of Fertilizer, 14, 99-108, 2021)

10 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた

堆肥等中のクロピラリドの分析

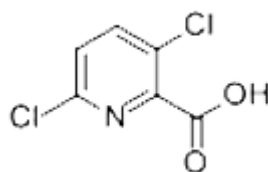
— 室間共同試験による妥当性確認 —

加藤まどか¹, 白井裕治¹

キーワード クロピラリド, 堆肥, 汚泥発酵肥料, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計, 高感度試験法, 共同試験

1. はじめに

クロピラリドは、日本では農薬としての登録はされていないが、米国、オーストラリア、カナダなどの海外で牧草や穀類の生産に使われているカルボキシル基を有するピリジン系の除草剤 (Figure 1) である。



CAS No: 1702-17-6

Figure 1 Structural formula of clopyralid

クロピラリドが含まれた飼料を家畜に与えると、クロピラリドは家畜のふん尿中に排せつされる。その家畜のふん尿を原料として作った堆肥等を施用すると、トマト、スイートピーなどクロピラリドに感受性が高い野菜や花の生育に影響 (生育障害) が生じる^{1, 2)}。平成 28 年度から平成 29 年度に農林水産省において実施された調査によると、国内で流通している飼料中及び家畜ふんを利用した堆肥中にクロピラリドが含まれることが確認された^{3, 4)}。

顯谷らは液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド及び関連物質の同時分析法を開発 (定量下限 10 µg/kg 程度) した⁵⁾。その後、土壌中のクロピラリド濃度が 1 µg/kg 程度の低濃度においても作物によっては生育障害を引き起こすことが報告されたことから⁶⁾、高感度な分析法が必要とされた。このことから、平成 29 年度に農業・食品産業技術総合研究機構により定量下限 2 µg/kg 以下の「牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法 (参考法)」が開発された⁷⁾。また、同年度に伊藤らによって当分析法の牛ふん以外の畜ふんを利用した堆肥への適用範囲拡大が行われた⁸⁾。しかしながら、その試料溶液の調製操作は工程が多く、試料によっては精製に用いるカートリッジカラムが目詰まりを起こして試料溶液の調製が困難となること、「特定化学物質障害予防規則の措置対象物質」であるジクロロメタンを使用することから、平成 30 年度にこれらの課題を解決するため、中村らにより分析法の改良が行われ、単一試験室における分析法の妥当性 (SLV: Single Laboratory Validation) が確認された⁹⁾。

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

今回、この LC-MS/MS を用いた堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの測定について国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認 (HCV: Harmonized Collaborative Validation) 方法による評価を行うため、共通試料を用いて試験室間の再現精度を調査したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料

市場に流通している肥料の堆肥 5 種類 (牛ふん堆肥 2 種類並びに鶏ふん堆肥、豚ふん堆肥及び馬ふん堆肥各 1 種類) 及び汚泥発酵肥料 1 種類を 40 °C で約 60~70 時間乾燥した後、それぞれ粉砕機 (Retsch ZM 200) で 500 µm のスクリーンを通過するまで粉砕して分析用試料を調製した。

共同試験用試料は、分析用試料約 3.8 g をポリエチレン袋に入れて密封し、それぞれ 54 袋を調製した。一対のブラインド試料を提供するため、それぞれの共同試験用試料の袋にはランダムな番号を付し、参加試験室に配付した。

(共同試験参加試験室)

- ・ 一般財団法人材料科学技術振興財団分析評価部 KB
- ・ 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター
- ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所微量試験部農薬試験課
- ・ 株式会社環境測定サービス筑波研究所
- ・ 株式会社島津製作所秦野工場
- ・ 公益財団法人日本食品衛生協会
- ・ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター有害化学物質研究領域
- ・ ジーエルサイエンス株式会社総合技術本部カスタマーサポートセンター
- ・ 昭和電工株式会社機能性化学品事業部特殊化学品部分離精製グループ
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部肥料鑑定課
- ・ 日本環境科学株式会社事業部分分析グループ
- ・ 三浦工業株式会社環境事業本部科学分析センター

(50 音順)

2) 装置及び器具

LC-MS/MS, LC 用分離カラム (ガードカラムを含む), 振り混ぜ機, 遠心分離機, 高速遠心分離機, ロータリーエバポレーター, マニホールドは各試験室が保有しているものを使用した。

3) 試験方法

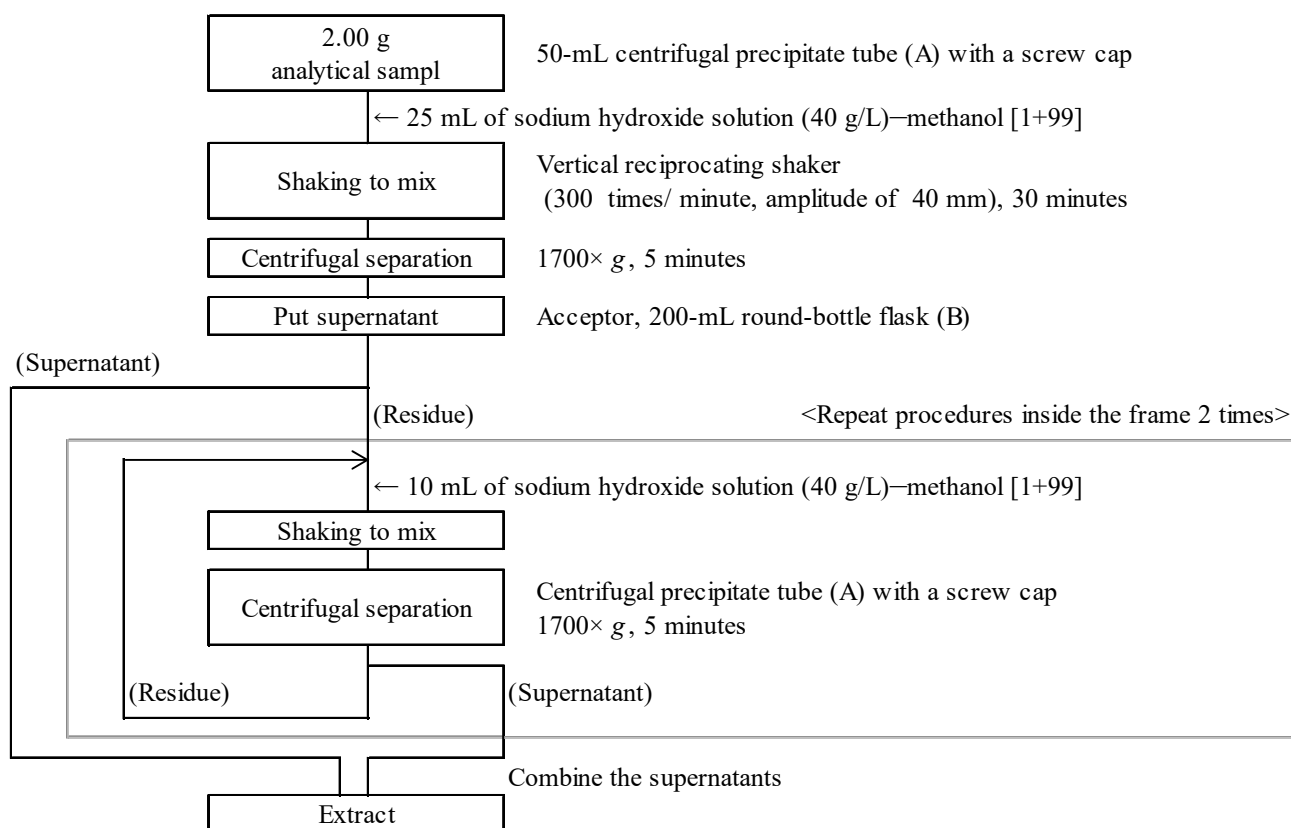
LC-MS/MS 法による堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの測定の性能評価のための共同試験には、肥料等試験法¹⁰⁾の 8.2.c のクリーンアップ (1) を改良した方法¹¹⁾を用いた。

試料溶液の調製操作 (抽出操作, クリーンアップ (1) 操作及びクリーンアップ (2) 操作) を試験法のフローシート (Scheme 1-1~Scheme 1-3) に示した。なお、参加試験室においてクリーンアップ (1) 操作で用いるコポリマーカラムは Oasis HLB 12 cc (500 mg) 又は InertSep HLB FF 500 mg /20 mL のいずれかによった。

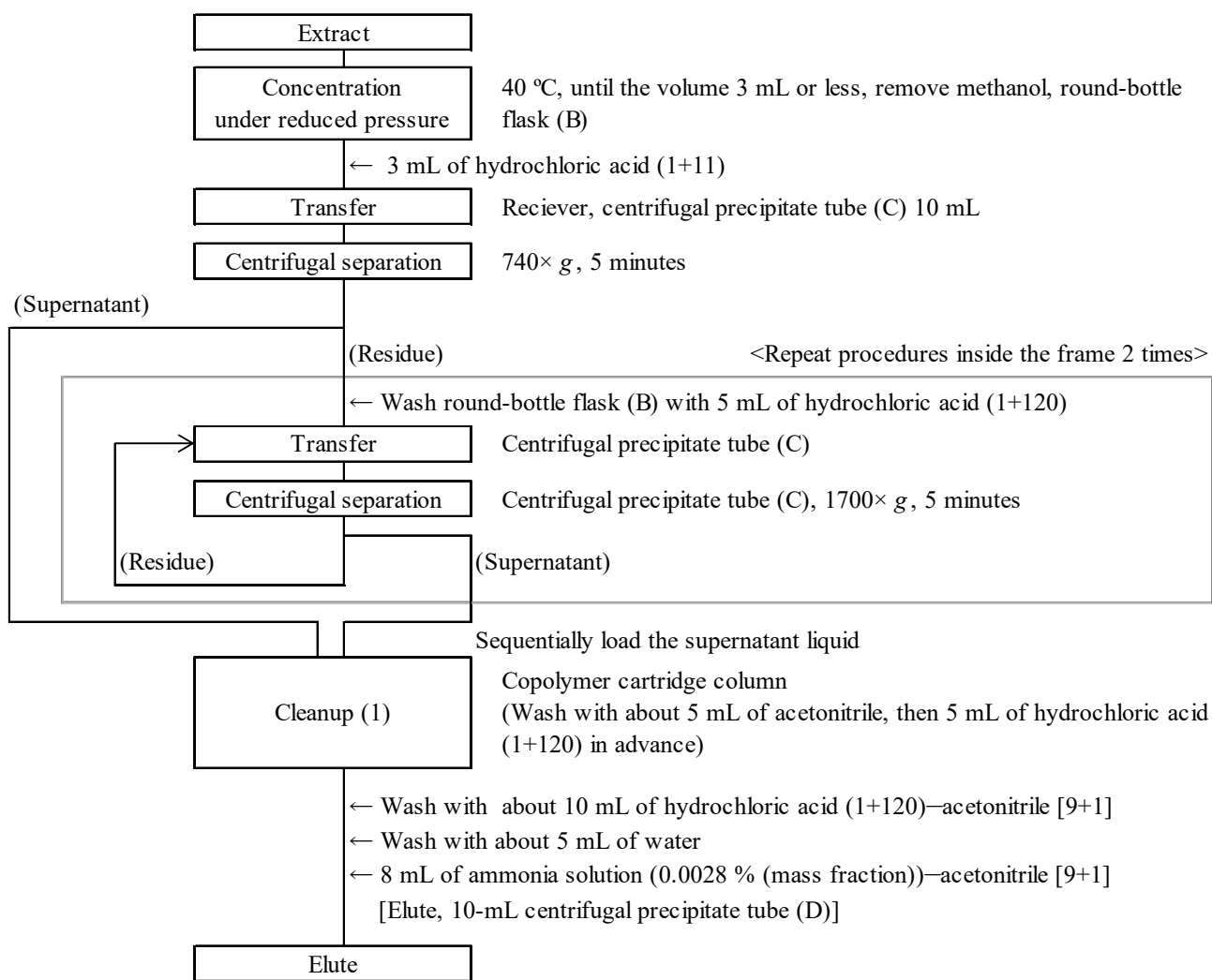
検量線用標準溶液の調製は 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL 及び

100 ng/mL の濃度となるように各試験室で肥料等試験法に従って実施した。

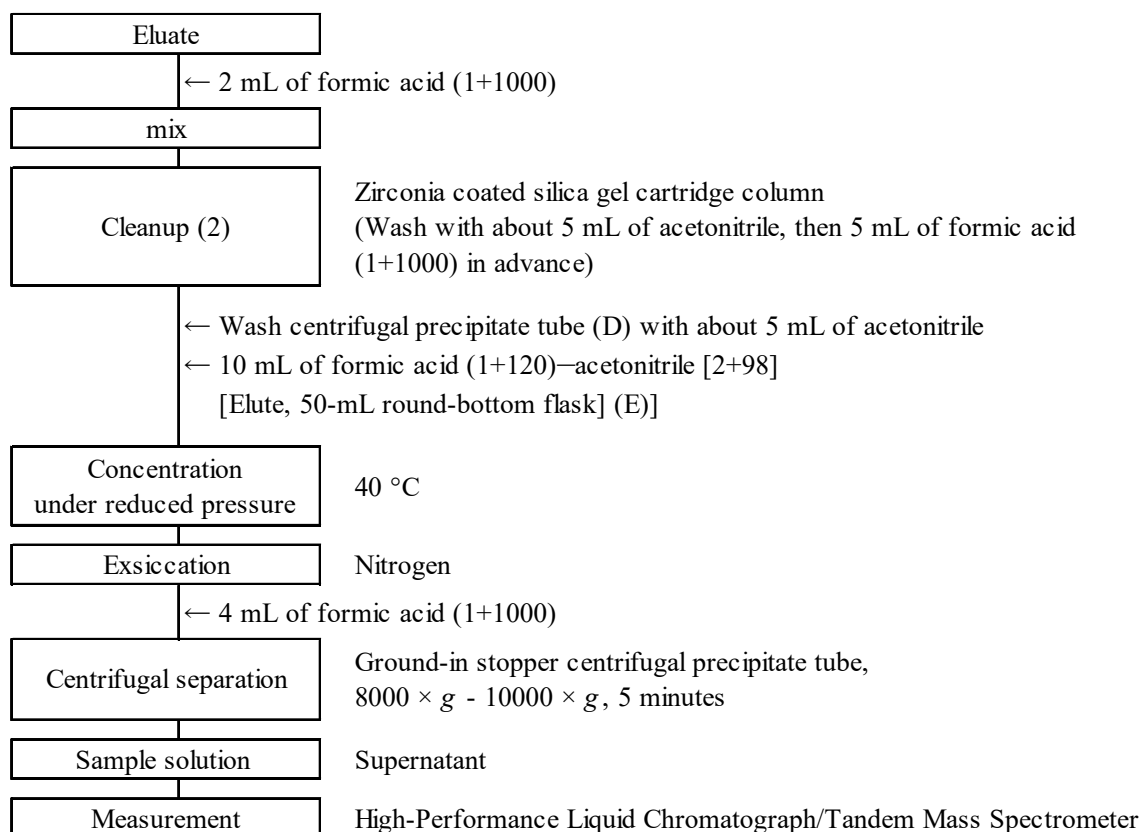
測定操作における基本的な測定条件を Table 1-1 に示したが、各試験室が保有している LC-MS/MS に適した測定条件 (Table 1-2 (一例)) に設定した。試料溶液及び検量線用標準液のプロダクトイオン (m/z 146 及び m/z 110) を選択反応検出 (SRM) によりそれぞれ測定した。検量線用標準液のクロピラリドのピーク面積及び高さについてそれぞれ検量線を作成した。試料溶液中の濃度が 10 ng/mL 未満の場合は 0.5 ng/mL ~ 10 ng/mL の濃度範囲の検量線を用い、10 ng/mL 以上の場合は全濃度範囲の検量線を用いて、試料溶液のクロピラリドのピーク面積及び高さから濃度を求め、それぞれの分析試料中のクロピラリドの量を算出した (Table 1-3)。



Scheme 1-1 Flow sheet for clopyralid in composts (Extraction procedure)



Scheme 1-2 Flow sheet for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers
(Cleanup (1) procedure)



Scheme 1-3 Flow sheet for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers
(Cleanup (2) and measurement procedure)

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

Column	A silica gel column to which octadecyl chemically bonds (2 mm~3 mm i.d, 50 mm~50 mm L, 1.6 μm~3.0 μm particle diameter)
Mobile phase	A: Formic Acid (1+1000) B: Methanol 0 min (5 % B)→5 min (60 % B)→6 min (95 % B)→7 min (5 % B)
Flow rate	0.2 mL/min~0.5 mL/min
Column temperature	40 °C
Injection Volume	5 μL
Ionaization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Precursor ion	<i>m/z</i> 192
Product ion (1)	<i>m/z</i> 146
Product ion (2)	<i>m/z</i> 110

Table 1-2 Example of parameter of MS/MS

Instrument	Parameter
Waters Quatro Premier XE	Capillary voltage: 1.0 kV
	Desolvation temperature: 400 °C
	Desolvation gas flow: 1000 L/h
	Cone gas: 50 L/h
	Cone voltage: 24 V
	Source temperature: 120 °C
Colision energy: (<i>m/z</i> 146) 20 eV, (<i>m/z</i> 110) 30 eV	
SHIMADZU LCMS-8045	Probe voltage: 0.5 kV
	DL temperature: 150 °C
	Heat block temperature: 150 °C
	Interface temperature: 400 °C
	Nebulizing gas flow: 3 L/min
	Drying gas flow: 10 L/min
	Heating gas flow: 10 L/min
	Colision energy: (<i>m/z</i> 146) 21 eV, (<i>m/z</i> 110) 34 eV
Agilent Technologies 6460	Drying gas temperature: 350 °C
	Drying gas flow: 10 L/min
	Sheath gas temperature: 370 °C
	Sheath gas flow: 12 L/min
	Nebulizing gas pressure: 50 psi
	Fragmentor voltage: 80 V
Colision voltage: (<i>m/z</i> 146) 20 V, (<i>m/z</i> 110) 36 V	

Table 1-3 Measurement operation of clopyralid

Product ion (<i>m/z</i>) ^{a)}		Indicated value of the peak ^{b)}
(1)	(2)	
<i>m/z</i> 146	<i>m/z</i> 110	Area
<i>m/z</i> 146	<i>m/z</i> 110	Height
<i>m/z</i> 110	<i>m/z</i> 146	Area
<i>m/z</i> 110	<i>m/z</i> 146	Height

a) Product ion that created the chromatograph

b) Indicated value of the peak used to calculate the amount
of clopyralid

4) 共同試験用試料の均質性試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル¹²⁾の均質性試験に従い、それぞれの共同試験用試料から 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 3) に従って分析した。なお、ねじ口遠心沈殿管に計り入れる分析試料は 1.8 g とした。ただし、クロピラリド量の算出方法は、プロダクトイオン(1) *m/z* 146 の面積による。

5) 共同試験

試験に参加した 12 試験室並びに使用した LC-MS/MS の型式及び LC 用分離用カラムは Table 2 のとおりであり、それぞれの試験室において送付した 12 試料について 3) に従って令和 2 年 10 月 23 日から 11 月末日まで分析することとした。なお、Table 1-3 の分析法によるそれぞれの分析結果が報告された。

Table 2 Instruments used in the collaborative study

Labs ID ^{a)}	LC-MS/MS	LC column		Copolymer cartridge for cleanup ^{b)} (Filler amount, column size)
		(Inner diameter×length, particle diameter)	(Inner diameter×length, particle diameter)	
A	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	InertSep HLB FF (500 mg, 20 mL)
B	LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4000, AB SCIEX	InertSustain AQ-C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)	InertSustain AQ-C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)	InertSep HLB FF (500 mg, 20 mL)
C	LC: Nexera X3, Shimadzu MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	Shim-pack Scepter C18-120, Shimadzu (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)	Shim-pack Scepter C18-120, Shimadzu (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)	InertSep HLB FF (500 mg, 20 mL)
D	LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: LCMS-8030 PLUS, Shimadzu	C18U 2B, Shodex (2.0 mm×50 mm, 1.9 μm)	C18U 2B, Shodex (2.0 mm×50 mm, 1.9 μm)	InertSep HLB FF (500 mg, 20 mL)
E	LC: LC: Exion LC, AB SCIEX MS/MS: API 5500+, AB SCIEX	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
F	LC: LC: Nexera XR, Shimadzu MS/MS: API 4500 QTRAP, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Science (3.0 mm×50 mm, 2.0 μm)	InertSustain C18, GL Science (3.0 mm×50 mm, 2.0 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
G	LC: 1260 Infinity, Agilent MS/MS: 6460 Triple Quad LC/MS, Agilent	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
H	LC: 1290 Infinity, Agilent MS/MS: 6460 Triple Quad LC/MS, Agilent	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 3.0 μm)	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 3.0 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
I	LC: 1260 Infinity, Agilent MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
J	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: TRIPLE QUAD 6500+, AB SCIEX	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
K	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: TQD, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
L	LC: ACQUITY UPLC H Class, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	ACQUITY UPLC HSS T3, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)	ACQUITY UPLC HSS T3, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)

a) Laboratory identification (In no particular order)

b) Copolymer cartridge column used in cleanup (1) operation

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

10 試料を 2 点併行で分析した均質性試験の成績の総平均値 (\bar{x}) 及びその成績について一元配置分散分析から得られた統計量を用いて算出した併行標準偏差 (s_r), 試料間標準偏差 (s_{bb}), 併行精度を含む試料間標

標準偏差(s_{b+r})を Table 3 に示した。さらに、肥料等試験法¹⁰⁾に示されている室間再現精度の目安($CRSD_R$)及びそれらから算出(式 1)した推定室間再現標準偏差($\hat{\sigma}_R$)を Table 3 に示した。

均質性の判定は、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル¹²⁾の手順を参考に実施した。まず、分析結果の等分散性を確認するため、Cochran の検定を実施した。その結果、すべての試料において外れ値は認められなかったため、これらの分析結果について一元配置分散分析を実施した。次に、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの十分に均質の判定式(式 2)を用いて均質性の判定を行った。その結果、全ての試料で判定式(式 2)を満たしていたことから、共同試験用試料として妥当な均質性を有していることを確認した。なお、参考のため、式 3 によって併行精度を含む試料間標準偏差(s_{b+r})を算出したところ、いずれの試料も $\hat{\sigma}_R$ と比較して十分に小さい値であった。

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

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

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

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

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

\bar{x} : 総平均値

s_r : 併行標準偏差

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_{bb} : 試料間標準偏差

s_{b+r} : 併行精度を含む試料間標準偏差

Table 3 Homogeneity test result of clopyralid

Sample	No. of sample	\bar{x} ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$CRSD_R$ ^{b)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_r ^{d)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{e)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_{bb} ^{f)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{g)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_{b+r} ^{h)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Poultry manure compost	10	5.38	22	1.18	0.34	0.59	0.25	0.36	0.42
Pig manure compost	10	53.1	22	11.7	3.5	5.8	0.0	3.5	3.5
Cattle manure compost 1	10	129	22	28	3	14	1	8	3
Cattle manure compost 2	10	7.03	22	1.55	0.32	0.77	0.15	0.46	0.35
Horse manure compost	10	25.0	22	5.5	0.4	2.8	0.4	1.7	0.5
Composted sludge fertilizer	10	17.1	22	3.8	0.6	1.9	0.2	1.1	0.6

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

b) Criteria of precision for reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

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

d) Repeatability standard deviation

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

f) Standard deviation of sample-to-sample

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

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

2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告されたそれぞれの共同試験成績を Table 4 に示した。各系列の分析試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{13, 14)}に従って統計処理した。外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施した。その結果、いずれのクロピラリド量の分析法(Table 1-3)においても 12 試験室の分析結果のう

ち、プロダクトイオン m/z 146 の面積での算出方法では鶏ふん堆肥で1 試験室及び牛ふん堆肥 2 で1 試験室が外れ値として判定され、また、その他の算出方法では鶏ふん堆肥、牛ふん堆肥 2 及び汚泥発酵肥料で各 1 試験室並びに馬ふん堆肥で各 2 試験室が外れ値として判定された。

Table 4 Individual result of clopyralid

Measurement operation ^{a)}	Lab ID ^{b)}	Poultry manure		Pig manure		Cattle manure		Horse manure		Composted sludge fertilizer			
		compost	compost	compost	compost	compost 1	compost 2	compost	compost	compost	fertilizer		
m/z 146	A	8.24	6.96	59.0	58.2	141	140	8.57	8.32	26.5	27.2	19.0	17.7
Area	B	5.14	5.45	46.3	52.2	106	79.0	6.02	5.98	19.1	23.4	13.4	13.2
	C	14.7 ^{c)}	8.15 ^{c)}	63.0	64.8	125	143	6.35 ^{c)}	9.36 ^{c)}	18.5	27.4	18.8	19.9
	D	5.23	6.00	53.8	51.9	116	129	7.60	6.97	20.3	24.4	12.3	12.7
	E	5.08	5.52	48.2	46.1	119	121	6.44	6.14	23.0	23.7	14.1	15.0
	F	8.15	6.43	68.6	66.3	175	133	9.93	8.83	24.3	31.3	23.6	26.8
	G	4.64	5.29	43.5	44.3	104	102	7.39	6.53	22.1	21.3	12.8	13.3
	H	3.90	5.73	36.6	42.8	98.5	98.7	6.71	6.63	20.8	22.0	13.4	11.7
	I	5.47	4.54	52.3	44.0	111	86.4	6.40	6.44	22.0	17.5	14.7	14.7
	J	3.65	4.46	44.5	43.4	103	102	6.05	5.87	19.7	21.5	13.7	12.1
	K	6.42	5.44	48.9	47.6	128	90.9	6.16	6.38	26.7	19.5	16.3	17.5
	L	2.50	2.36	43.4	38.0	105	101	4.37	3.10	19.6	19.6	9.07	10.3
m/z 146	A	8.53	7.44	59.2	58.8	140	137	8.24	8.52	26.8 ^{d)}	27.3 ^{d)}	19.0	17.9
Height	B	4.83	4.56	45.0	51.7	107	78.5	5.71	5.61	18.7	23.6	12.9	12.8
	C	15.1 ^{c)}	8.08 ^{c)}	65.1	67.3	127	146	6.51 ^{c)}	9.39 ^{c)}	18.6	28.6	19.3	20.2
	D	5.59	6.43	53.8	51.5	116	126	7.54	7.11	19.8	25.0	13.7	13.1
	E	5.03	5.39	47.6	45.2	119	121	6.39	5.81	22.8	23.6	14.0	15.0
	F	8.40	6.84	69.6	71.0	185	138	9.66	8.20	25.7 ^{d)}	34.2 ^{d)}	25.0 ^{d)}	29.2 ^{d)}
	G	4.43	5.11	43.0	43.7	104	102	7.27	6.28	21.7	20.9	13.0	13.7
	H	4.37	5.38	37.2	43.6	99.2	100	6.63	6.51	21.1	22.1	13.2	11.2
	I	5.91	4.37	50.4	44.1	111	88.8	6.05	6.64	22.0	18.4	15.5	14.7
	J	3.70	4.72	44.0	44.9	102	98.4	6.24	5.92	19.1	22.0	14.2	11.8
	K	5.99	4.91	49.0	47.5	126	91.4	6.00	5.95	26.6	19.9	16.0	17.2
	L	2.45	2.23	42.2	38.6	104	99.8	4.16	3.11	19.6	19.4	9.10	10.3

a) Upper column: Product ion, Lower column: Indicated value of the peak used to calculate the amount of clopyralid

b) Laboratory identification (In no particular order)

c) Outlier of Cochran test

d) Outlier of Grubbs test

Table 4 Continued

Measurement operation ^{a)}	Lab ID ^{b)}	Poultry manure		Pig manure		Cattle manure		Horse manure		Composted sludge fertilizer				
		compost	compost	compost	compost	compost 1	compost 2	compost	compost	compost	compost			
m/z 110 Area	A	7.99	7.03	59.2	57.8	140	140	8.00	8.17	26.9 ^{d)}	27.8 ^{d)}	18.1	18.0	
	B	4.49	4.69	47.1	52.3	106	77.6	5.73	5.61	20.2	22.8	13.2	12.8	
	C	14.4 ^{c)}	7.93 ^{c)}	63.3	65.2	123	143	6.23 ^{c)}	9.17 ^{c)}	18.0	27.1	18.8	19.9	
	D	5.92	6.89	53.3	52.3	115	125	6.98	8.02	20.5	24.9	13.0	13.3	
	E	5.10	5.71	47.5	46.1	118	121	6.21	6.13	23.0	23.0	13.9	15.2	
	F	8.25	6.63	69.8	67.6	177	137	9.91	9.20	26.3 ^{d)}	32.7 ^{d)}	25.2 ^{d)}	28.4 ^{d)}	
	G	4.44	5.06	43.6	43.4	103	101	6.89	6.12	22.0	21.2	12.6	13.2	
	H	4.38	5.17	36.5	42.9	98.0	98.9	6.41	6.38	20.7	21.9	13.1	11.2	
	I	4.88	5.54	51.1	43.7	109	85.4	6.41	6.41	21.9	18.2	14.7	15.3	
	J	3.37	4.65	44.6	42.8	102	101	6.12	5.93	19.5	21.6	13.8	12.0	
	K	5.02	4.78	48.4	50.5	130	95.7	5.09	6.18	26.3	18.5	17.0	16.3	
	L	2.69	2.85	41.8	39.5	105	101	3.70	3.25	19.2	19.2	9.42	11.2	
	m/z 110 Height	A	7.51	6.44	60.1	57.6	143	144	7.26	7.57	25.9 ^{d)}	28.1 ^{d)}	18.2	19.0
		B	4.62	4.48	47.2	51.9	107	77.9	5.69	5.50	19.2	23.3	13.3	12.6
C		14.9 ^{c)}	8.08 ^{c)}	65.5	68.6	126	145	6.32 ^{c)}	9.36 ^{c)}	18.3	28.0	18.9	20.1	
D		5.86	6.51	56.2	53.0	120	128	6.60	7.92	21.2	25.6	12.6	13.1	
E		5.03	6.04	47.4	47.3	118	122	6.37	6.44	22.5	23.4	14.5	15.4	
F		7.45	6.05	69.6	70.4	177	131	8.57	7.27	28.8 ^{d)}	32.7 ^{d)}	26.2 ^{d)}	30.1 ^{d)}	
G		4.41	5.04	43.2	43.3	103	102	7.05	6.15	22.0	20.9	12.7	13.6	
H		4.35	5.36	37.1	43.3	99.5	100	6.43	6.45	21.1	22.2	13.3	11.3	
I		5.41	4.92	50.5	43.5	106	85.8	6.32	6.49	22.2	18.2	15.0	15.1	
J		3.50	5.11	45.5	43.7	106	102	6.74	6.17	19.4	22.4	14.0	12.1	
K		5.24	5.20	49.4	51.1	131	96.0	5.22	6.45	26.3	19.3	17.1	17.2	
L		2.83	2.79	42.6	39.8	106	101	3.61	3.60	19.1	18.7	9.02	10.9	

3) 併行精度及び室間再現精度

それぞれのクロピラリド量の分析法 (Table 1-3) における外れ値を除外した試験成績より算出^{13, 14)}した平均値, 併行標準偏差 (s_r), 併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び肥料等試験法¹⁰⁾における併行相対標準偏差 ($CRSD_r$)

の目安並びに室間再現標準偏差 (s_R), 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) 及び肥料等試験法における室間再現相対標準偏差 ($CRSD_R$) の目安を Table 5 に示した。

すべての算出方法において, クロピラリドの平均値は 5.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~116 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり, その併行標準偏差は 0.41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 併行相対標準偏差は 4.9 %~15.3 %, 室間再現標準偏差は 1.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~23 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 室間再現相対標準偏差は 14.3 %~30.6 %であった。

いずれの算出方法においても, 併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) も肥料等試験法の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の許容範囲(精度の目安の相対標準偏差の 2 倍以内)であったことから, 本法の精度は同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることを確認した。

Table 5 Statistical analysis of Collaborative study results

Measurement operation ^{a)}	Sample	Labs $p(q)$ ^{b)}	Mean ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_r ^{c)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_r ^{d)} (%)	$2 \times CRSD_r$ ^{f)} (%)	s_R ^{g)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_R ^{h)} (%)	$2 \times CRSD_R$ ⁱ⁾ (%)
m/z 146 Area	Poultry manure compost	11(1)	5.30	0.73	13.8	22	1.50	28.4	44
	Pig manure compost	12	50.3	2.8	5.6	22	9.1	18.0	44
	Cattle manure compost 1	12	115	14	12.6	22	22	19.1	44
	Cattle manure compost 2	11(1)	6.67	0.44	6.5	22	1.48	22.1	44
	Horse manure compost	12	22.6	3.2	14.1	22	3.4	15.0	44
	Composted sludge fertilizer	12	15.3	1.0	6.4	22	4.2	27.5	44
m/z 146 Height	Poultry manure compost	11(1)	5.30	0.70	13.1	22	1.62	30.6	44
	Pig manure compost	12	50.6	2.6	5.1	22	9.9	19.6	44
	Cattle manure compost 1	12	115	15	12.8	22	23	20.2	44
	Cattle manure compost 2	11(1)	6.53	0.49	7.5	22	1.45	22.2	44
	Horse manure compost	10(2)	21.7	3.3	15.3	22	3.3	15.3	44
	Composted sludge fertilizer	11(1)	14.4	0.9	6.1	22	3.0	20.5	44
m/z 110 Area	Poultry manure compost	11(1)	5.25	0.61	11.5	22	1.48	28.1	44
	Pig manure compost	12	50.4	2.5	4.9	22	9.3	18.5	44
	Cattle manure compost 1	12	115	14	12.2	22	22	19.4	44
	Cattle manure compost 2	11(1)	6.49	0.41	6.3	22	1.57	24.2	44
	Horse manure compost	10(2)	21.5	3.1	14.3	22	3.1	14.3	44
	Composted sludge fertilizer	11(1)	14.4	0.8	5.6	22	2.8	19.2	44
m/z 110 Height	Poultry manure compost	11(1)	5.19	0.63	12.2	22	1.26	24.3	44
	Pig manure compost	12	51.2	2.5	4.9	22	9.9	19.3	44
	Cattle manure compost 1	12	116	15	12.6	22	22	19.4	44
	Cattle manure compost 2	11(1)	6.36	0.53	8.4	22	1.20	18.8	44
	Horse manure compost	10(2)	21.7	3.2	14.9	22	3.2	14.9	44
	Composted sludge fertilizer	11(1)	14.5	0.8	5.8	22	3.0	20.4	44

a) Upper column: Product ion, Lower column: Indicated value of the peak used to calculate the amount of clopyralid

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

c) Average value after excluding outliers(n =The number of laboratories(p) \times The number of samples(2))

d) Repeatability standard deviation

e) Repeatability relative standard deviation

f) Criteria of precision for repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

g) Reproducibility standard deviation

h) Reproducibility relative standard deviation

i) Criteria of precision for Reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

4. まとめ

12 試験室において 6 種類(12 点)の堆肥及び汚泥発酵肥料を用いて共同試験を実施し、LC-MS/MS 法による堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの測定について室間再現性の評価を行った。なお、クロピラリド量の算出方法は、プロダクトイオン(m/z 146 及び m/z 110)並びにピーク面積及び高さについてそれぞれ実施した。その結果、クロピラリドの平均値 5.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~116 $\mu\text{g}/\text{kg}$ において、室間再現相対標準偏差は 14.3 %~30.6 %であった。いずれの室間再現相対標準偏差(RSD_R)も肥料等試験法¹⁰⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の目安の範囲内であることから、本法の精度はいずれの算出方法においても同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることが確認された。

今回検討した試験法は、すでに単一試験室による試験法の妥当性確認(SLV)がされており、さらに今回の検討で国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認(HCV)が評価されたことから、この試験法の性能は肥料等試験法における性能規準の Type B(SLV 及び HCV による評価)に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力いただきました一般財団法人材料科学技術振興財団分析評価部 KB, 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所微量試験部農薬試験課, 株式会社環境測定サービス筑波研究所, 株式会社島津製作所秦野工場, 公益財団法人日本食品衛生協会, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター有害化学物質研究領域, ジーエルサイエンス株式会社総合技術本部カスタマーサポートセンター, 昭和電工株式会社機能性化学製品事業部特殊化学品部分離精製グループ, 日本環境科学株式会社事業部分分析グループ, 三浦工業株式会社環境事業本部科学分析センターの各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省:クロピラリドが原因と疑われる生育障害の発生状況
<<https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-54.pdf>>
- 2) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構:飼料及び堆肥に残留する除草剤(クロピラリド)の簡易判定法と被害軽減対策マニュアル(第2版)
<https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_ver2.pdf>
- 3) 農林水産省:平成28年度輸入飼料中及び堆肥中に含まれるクロピラリドの調査結果について
<<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-25.pdf>>
- 4) 農林水産省:平成29年度輸入飼料中及び堆肥中に含まれるクロピラリドの調査結果について
<<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-33.pdf>>
- 5) 顯谷久典, 八木寿治, 橋本良美, 白井裕治:液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)法による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド, アミノピラリド及びピクロラムの測定, 肥料研究報告, 7, 1-9 (2014)
- 6) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター:土壌中クロピラリドのトマト, サヤエンドウ, スイートピーの初期成育に及ぼす影響・データ集(2009)
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078226.html>

- 7) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター:牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法(参考法)(2017)
< https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_analysis_1.pdf >
- 8) 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井祐治:液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による堆肥等中のクロピラリドの測定 ー微量試験法の適用範囲拡大ー, 肥料研究報告, **11**, 63-74 (2018)
- 9) 中村信仁, 小塚健志, 白井裕治:液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による堆肥等中のクロピラリドの測定法の改良, 肥料研究報告, **12**, 69-83 (2019)
- 10) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf >
- 11) 加藤まどか, 白井裕治:液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた堆肥等中のクロピラリドの分析 ー精製操作の改良ー, 肥料研究報告, **14**, 99-108 (2021)
- 12) Thompson, M., L. R. Ellison S., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145-196 (2006)
- 13) Horwitz, W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2) , 331-343 (1995)
- 14) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

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

KATO Madoka¹ and SHIRAI Yuji¹

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

We conducted a collaborative study to evaluate LC-MS/MS for determination of clopyralid, in compost and composted sludge fertilizer. Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. The extract was purified with a copolymer cartridge column and a zirconia coated silica gel cartridge column. We analyzed the clopyralid by LC-MS/MS. We sent five samples, respectively, to 12 collaborators. They analyzed these samples as blind duplicates. The mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) for clopyralid were 5.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - 116 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 14.3 % - 30.6 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of clopyralid. Copolymer cartridge column

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

(Research Report of Fertilizer, **14**, 109-122, 2021)

11 LC-MS/MSを用いた汚泥肥料中のPFOS及びPFOAの分析

白井裕治¹, 沼寄佳奈子¹

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

1. はじめに

ペルフルオロオクタンスルホン酸(以下、「PFOS」という。Figure 1-1)はコーティング剤, 泡消火剤, 界面活性剤など¹⁾に, また, ペルフルオロオクタン酸(以下、「PFOA」という。Figure 1-2)はふっ素樹脂の加工助剤, 塗料, 乳化剤など²⁾に使用されていた有機ふっ素化合物であり, 生分解をほとんど受けず環境中に長い間残存する^{3~5)}。下水処理場における流入水中のPFOS及びPFOAはその工程において懸濁物や汚泥に移行することが報告^{6, 7)}されている。

このことから, 汚泥を利用した肥料中の調査が必要と考えられるが, 多様な汚泥肥料に対応したPFOS及びPFOAの分析法が報告されていない。農林水産省消費・安全局農産安全管理課長より汚泥肥料中のPFOS及びPFOAの含有量を把握するための実態調査に用いる分析法の開発を要請(2消安第2033号令和2年7月31日付け)されたことを受け, この分析法の開発及び単一試験室における分析法の妥当性(SLV: Single Laboratory Validation)を確認したのでその概要を報告する。

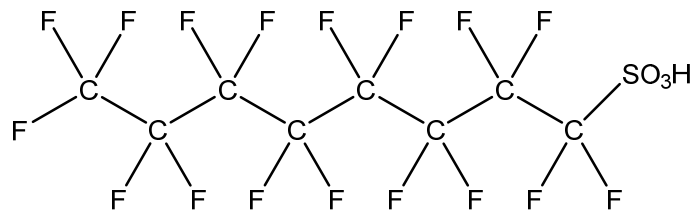


Figure 1-1 Structural formula of PFOS

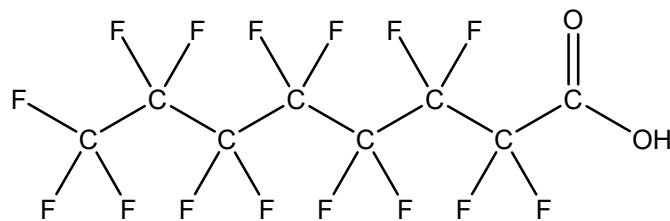


Figure 1-2 Structural formula of PFOA

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2. 材料及び方法

1) 試料の収集及び調製

汚泥肥料 37 点(下水汚泥肥料 3 点, し尿汚泥肥料 6 点, 工業汚泥肥料 4 点, 焼成汚泥肥料 1 点及び汚泥発酵肥料 23 点)を試験品とし, それぞれ 40 °C で約 70 時間乾燥した後, それぞれ超遠心粉碎機(Retsch ZM 200)で 500 µm のスクリーンを通過するまで粉碎し, 混合して分析用試料を調製した. 分析用試料は, ポリエチレン製袋に入れて輪ゴムで密閉し, 直射日光を避け, 常温で保存した.

2) 装置及び器具

- (1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS): SHIMADZU LCMS-8045
- (2) 分離用カラム: GL-Sciences InertSustain C18(内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 µm)
- (3) ガードカラム: GL-Sciences Cartridge Guard Column E Inertsil ODS-SP(内径 3.0 mm, 長さ 10 mm, 粒径 3 µm)
- (4) ディレイカラム: GL-Sciences Delay Column for PFAS(内径 3.0 mm, 長さ 10 mm)
- (5) 超音波発生器: Yamato 8510
- (6) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (7) 超遠心分離機: AS ONE MCD-2000
- (8) 弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム: GL-Sciences InertSep MA-2 500 mg/6 mL, Waters Oasis WAX 6 cc(500 mg)
- (9) グラファイトカーボンカートリッジカラム: GL-Sciences InertSep Slim GC 400 mg
- (10) マニホールド: GL-Sciences, WATERS
- (11) 濃縮器具: GL-Sciences 窒素吹き付け分岐ユニット
- (12) 試験管ミキサー: AS ONE 試験管ミキサーTRIO TM-2N
- (13) 目盛り付き試験管: GL-Sciences GL-SPE 濃縮管 0.5 mL&1.0 mL メス/7 mL
- (14) 標準液保存用ねじ口容器: Labcon ポリプロピレン製遠沈管 15 mL メタルフリータイプ
- (15) LC 用バイアル: WATERS ポリプロピレン製バイアル(300 µL), セプタムレスポリエチレン製ねじ口キャップ
- (16) ポリプロピレン製ねじ口試験管: GL-Sciences DigiTUBEs 50 mL, GL-Sciences DigiTUBEs 15 mL
- (17) ポリプロピレン製共栓遠心沈殿管: トレフ 1.5 mL クリックキャップチューブ ナチュラル
- (18) パスツールピペット: CORNING ほうけい酸ガラス製パスツールピペット(146 mm), CORNING ほうけい酸ガラス製パスツールピペット(229 mm)

3) 試薬

- (1) 水: 超純水製造装置(MILLIPORE 製 Milli-Q Integral 5)を用いて精製した超純水(比抵抗値 18 MΩcm 以上)を使用した. JIS K 0557 に規定する A4 の水
- (2) メタノール: 残留農薬・PCB 試験用(5000 倍濃縮)(富士フイルム和光純薬)
- (3) メタノール(器具洗浄用): JIS K 8891 特級試薬(富士フイルム和光純薬)
- (4) アセトニトリル(溶離液用): LC-MS 用試薬(富士フイルム和光純薬)
- (5) アンモニア水: JIS K 8085 特級試薬(濃度(NH₃)質量分率 28 %)(富士フイルム和光純薬)

- (6) ぎ酸: JIS K 8264 特級試薬(濃度(HCOOH)質量分率 98 %以上)(関東化学)
- (7) 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L): 高速液体クロマトグラフ用試薬(富士フイルム和光純薬)
- (8) 酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L): 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L)を水で 100 倍に希釈した.
- (9) PFOS 標準液(50 µg/mL): L-PFOS (Sodium perfluoro-1-octanesulfonate 1.2 mL)
(WELLINGTON)
- (10) PFOA 標準液(50 µg/mL): PFOA (Perfluoro-n-octanoic acid 1.2 mL) (WELLINGTON)
- (11) PFOS 標準液(1 µg/mL)及び PFOA 標準液(1 µg/mL): PFOS 標準液(50 µg/mL) 1 mL 及び PFOA 標準液(50 µg/mL) 1 mL をそれぞれ全量フラスコ 50 mL にとり, 標線までメタノールを加えて PFOS 標準液(1 µg/mL)及び PFOA 標準液(1 µg/mL)を調製した.
- (12) 混合標準液(100 ng/mL), (10 ng/mL)及び(1 ng/mL): PFOS 標準液(1 µg/mL) 5 mL 及び PFOA 標準液(1 µg/mL) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり混合し, 標線までメタノール-水(1+1)を加えて混合標準液(100 ng/mL)を調製した. 混合標準液(100 ng/mL) 1 mL を全量フラスコ 10 mL にとり, 標線までメタノール-水(1+1)を加えて混合標準液(10 ng/mL)を調製した. 混合標準液(10 ng/mL) 1 mL を全量フラスコ 10 mL にとり, 標線までメタノール-水(1+1)を加えて混合標準液(1 ng/mL)を調製した.
- (13) $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 内標準液(50 µg/mL): MPFOS (Sodium perfluoro-1-[1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$]-octanesulfonate 1.2 mL) (WELLINGTON)
- (14) $^{13}\text{C}_8$ -PFOS 内標準液(50 µg/mL): M8PFOS (Sodium perfluoro-1-[$^{13}\text{C}_8$]-octanesulfonate 1.2 mL)
(WELLINGTON)
- (15) $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 内標準液(50 µg/mL): MPFOA (Perfluoro-n-[1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$]-octanoic acid 1.2 mL)
(WELLINGTON)
- (16) $^{13}\text{C}_8$ -PFOA 内標準液(50 µg/mL): M8PFOA (Perfluoro-n-[$^{13}\text{C}_8$]-octanoic acid 1.2 mL)
(WELLINGTON)
- (17) $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 内標準液(1 µg/mL), $^{13}\text{C}_8$ -PFOS 内標準液(1 µg/mL), $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 内標準液(1 µg/mL)及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA 内標準液(1 µg/mL): $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 内標準液(50 µg/mL) 1 mL, $^{13}\text{C}_8$ -PFOS 内標準液(50 µg/mL) 1 mL, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 内標準液(50 µg/mL) 1 mL 及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA 内標準液(50 µg/mL) 1 mL をそれぞれ全量フラスコ 50 mL にとり, 標線までメタノールを加えて $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 内標準液(1 µg/mL), $^{13}\text{C}_8$ -PFOS 内標準液(1 µg/mL), $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 内標準液(1 µg/mL)及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA 内標準液(1 µg/mL)を調製した.
- (18) ^{13}C -混合内標準液(200 ng/mL): $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 内標準液(1 µg/mL) 10 mL, $^{13}\text{C}_8$ -PFOS 内標準液(1 µg/mL) 10 mL, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 標準液(1 µg/mL) 10 mL 及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA 内標準液(1 µg/mL) 10 mL を全量フラスコ 50 mL にとり混合し, 標線までメタノールを加えて ^{13}C -混合内標準液(200 ng/mL)を調製した.
- (19) ^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL): ^{13}C -混合内標準液(200 ng/mL) 2.5 mL を全量フラスコ 25 mL にとり, 標線までメタノール-水(1+1)を加えて混合内標準液(20 ng/mL)を調製した.
- (20) 検量線用混合標準液(0.1 ng/mL~50 ng/mL): 混合標準液(100 ng/mL)の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を全量フラスコ 10 mL に段階的にとり, ^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL) 1 mL をそれぞれ加え, 標線までメタノール-水(1+1)を加えた. 混合標準液(10 ng/mL)の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を全量フラスコ 10 mL に段階的にとり, ^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL) 1 mL を加え, 標線までメタノール-水(1+1)をそれぞれ加えた. 混合標準液(1 ng/mL)の 1 mL, 2 mL 及び 5 mL を全量フラスコ 10 mL に段階的にとり, ^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL) 1 mL をそれぞれ加え, 標線までメタノール-水(1+1)を加えた.
- (21) 分析試料添加用 ^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL): ^{13}C -混合内標準液(200 ng/mL) 10 mL を全量

フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノールを加えて混合内標準液(20 ng/mL)を調製した。

(22) 精製操作検討用 ^{13}C -混合内標準液(2 ng/mL)：分析試料添加用 ^{13}C -混合内標準液(20 ng/mL) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり、標線までメタノールを加えて混合内標準液(2 ng/mL)を調製した。

(23) 真度等確認用混合標準液(400 ng/mL), (40 ng/mL), (4 ng/mL)及び(1 ng/mL)：PFOS 標準液(1 $\mu\text{g/mL}$)4 mL 及び PFOA 標準液(1 $\mu\text{g/mL}$)4 mL を全量フラスコ 10 mL にとり混合し、標線までメタノールを加えて真度等確認用混合標準液(400 ng/mL)を調製した。混合標準液(100 ng/mL)10 mL を全量フラスコ 25 mL にとり、標線までメタノールを加えて真度等確認用混合標準液(40 ng/mL)を調製した。真度等確認用混合標準液(40 ng/mL)2 mL を全量フラスコ 20 mL にとり、標線までメタノールを加えて真度等確認用混合標準液(4 ng/mL)を調製した。真度等確認用混合標準液(4 ng/mL)5 mL を全量フラスコ 20 mL にとり、標線までメタノールを加えて真度等確認用混合標準液(1 ng/mL)を調製した。

4) 分析操作

(1) 抽出

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

(2) クリーンアップ

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

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

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

(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

各検量線用混合標準液及び試料溶液を LC-MS/MS に注入し、Table 1-1 及び Table 1-2 の測定条件に従って各イオンの選択反応検出(MRM)クロマトグラムを記録し、それぞれのピーク面積を求めた。各成分とそれらの内標準物質の定量用イオンのピーク面積比を算出した。各検量線用混合標準液の各成分の

濃度と求めたピーク面積比の検量線を作成し、試料溶液中の各成分の濃度を求め、分析試料中の各成分の濃度を算出した。

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

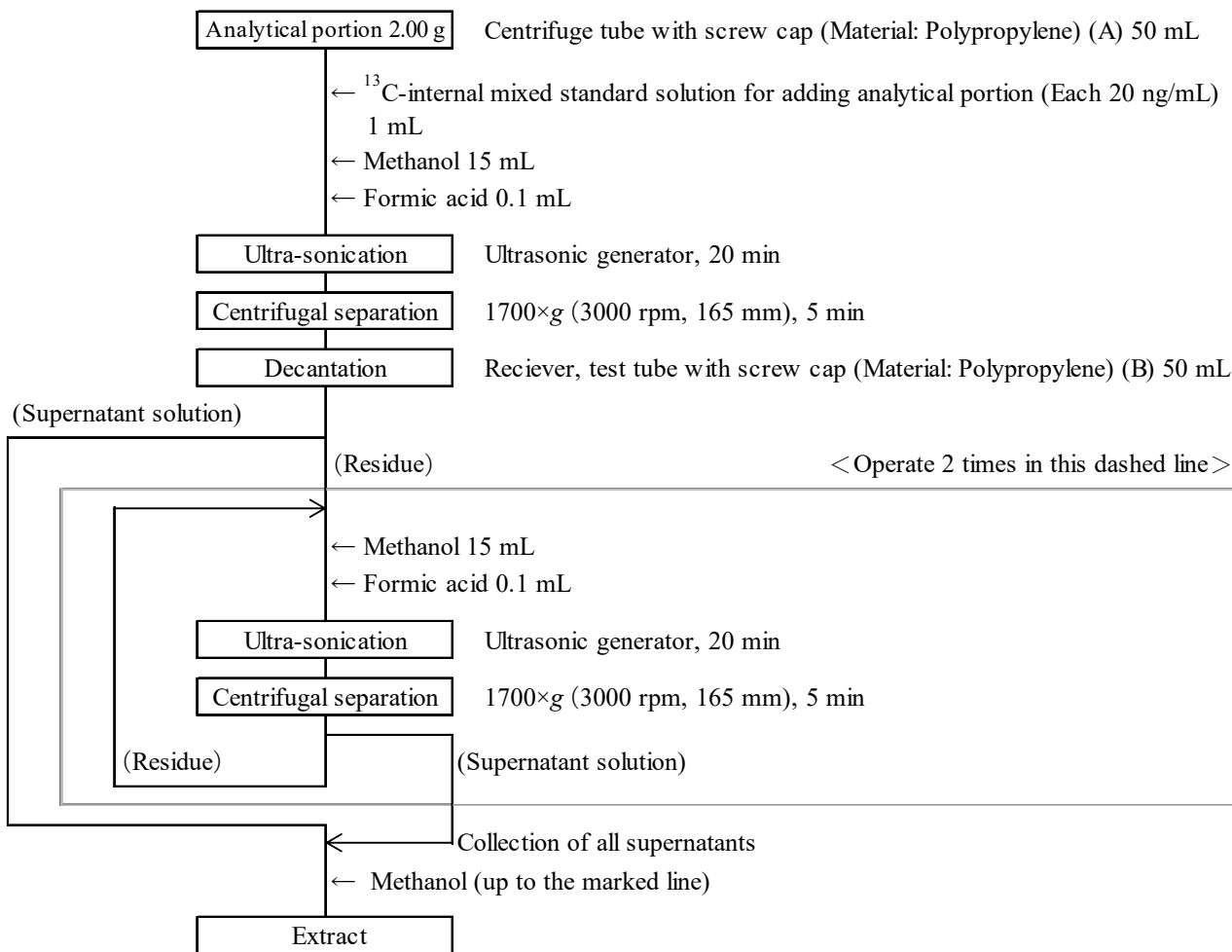
なお、参考のため分析法の概要を Scheme 1-1 及び Scheme 1-2 に示した。

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

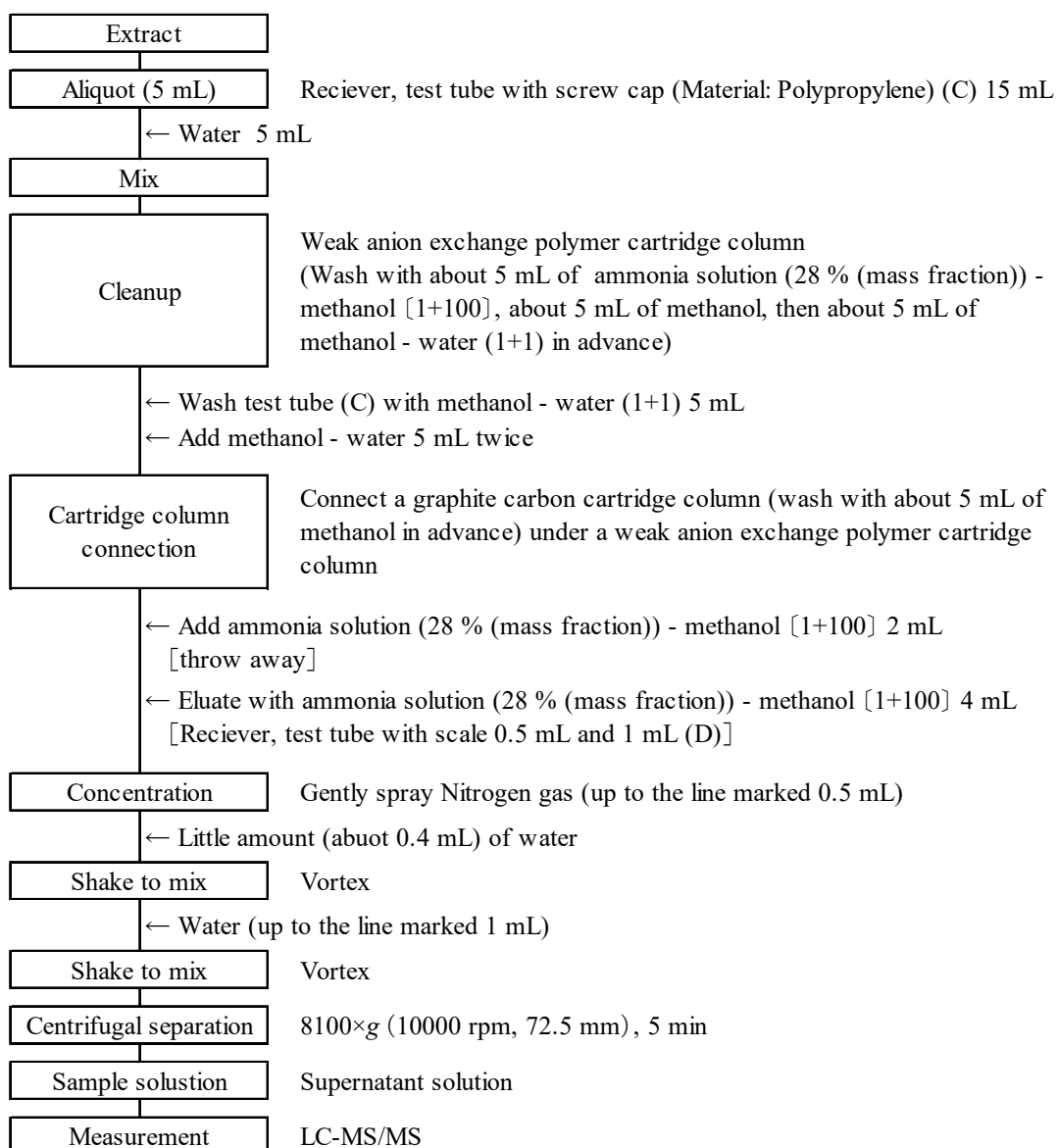
[LC conditions] SHIMADZU Nexera Series	
Delay column:	Delay Column for PFAS (3.0 mm I.D., 10 mm L)
Guard column:	Cartridge Guard Column E Inertsil (3.0 mm I.D., 10 mm L, 3 µm)
Column:	InertSustain C18 (2.1 mm I.D., 150 mm L, 3 µm)
Mobile phase (A):	A: 10 mmol/L ammonium acetate solution B: Acetonitrile
Gradient program:	0 min (40 %B)→1.5min (40 %B)→10 min (100 %B)→ 12 min (100 %B)→12.2 min (40 %B)→16 min (40 %B)
Flow rate:	0.2 mL/min
Column temperature:	40 °C
Injection volume:	5 µL
[MS conditions] SHIMADZU LCMS-8045	
Ionization:	Electrospray ionization (ESI)
Mode:	Positive
Probe voltage:	-1 kV
DL temperature:	200 °C
Heat block temperature:	300 °C
Interface temperature:	300 °C
Nebulizing gas flow:	3 L/min
Drying gas flow:	5 L/min
Heating gas flow:	15 L/min

Table 1-2 Parameters of MS/MS

Compound	Purpose	MRM transition		Collision energy (eV)
		Precursor ion	Product ion	
PFOS	for determination	<i>m/z</i> 498.8	<i>m/z</i> 80.0	54.0
	for validation	<i>m/z</i> 498.8	<i>m/z</i> 98.9	44.0
¹³ C ₄ -PFOS	for determination	<i>m/z</i> 502.8	<i>m/z</i> 80.0	52.0
	for validation	<i>m/z</i> 502.8	<i>m/z</i> 98.9	45.0
¹³ C ₈ -PFOS	for determination	<i>m/z</i> 506.8	<i>m/z</i> 80.0	54.0
	for validation	<i>m/z</i> 506.8	<i>m/z</i> 99.0	46.0
PFOA	for determination	<i>m/z</i> 412.8	<i>m/z</i> 169.0	18.0
	for validation	<i>m/z</i> 412.8	<i>m/z</i> 369.0	10.0
¹³ C ₄ -PFOA	for determination	<i>m/z</i> 416.8	<i>m/z</i> 162.0	18.0
	for validation	<i>m/z</i> 416.8	<i>m/z</i> 372.0	9.0
¹³ C ₈ -PFOA	for determination	<i>m/z</i> 421.1	<i>m/z</i> 172.0	19.0
	for validation	<i>m/z</i> 421.1	<i>m/z</i> 376.0	9.0



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



Scheme 1-2 Flow sheet for PFOS and PFOA in sludge fertilizers (Cleanup and measurement procedure)

3. 結果及び考察

1) LC-MS/MS の測定条件の検討

PFOA は、乳化剤として使用されたポリテトラフルオロエチレン(テフロン)製品から溶出することがあり、LC の溶離液の調製及び LC の溶離液の流路から混入する恐れがある。これらの影響を取り除くため活性炭を充てんしたディレイカラムを用いた LC の条件⁸⁾を設定した。

また、MS/MS 基本条件のイオン化法、イオン化モード及びモニターイオンについては JIS K 0450-70-10⁹⁾及び水質管理目標設定項目の検査方法¹⁰⁾を参考に設定し、その他の項目は使用した装置に適した条件¹¹⁾を設定した。更に、PFOS 標準液(1 µg/mL)、PFOA 標準液(1 µg/mL)、¹³C₄-PFOS 内標準液(1 µg/mL)、¹³C₈-PFOS 内標準液(1 µg/mL)、¹³C₄-PFOA 内標準液(1 µg/mL)及び¹³C₈-PFOA 内標準液(1 µg/mL)を用いて、それぞれの化合物の最適化を実施して測定条件を Table 1-1 及び Table 1-2 のとおり作成した。

検量線用混合標準液 (20 ng/mL) 及び試料溶液 (汚泥発酵肥料) について 2. 4) (3) に従って測定して得られたクロマトグラムを Figure 2-1 及び Figure 2-2 に示した. PFOS のピークの保持時間は約 9.4 分で, 試料溶液に含まれていた PFOS の側鎖 (分岐鎖) 体のピークを分離できた. PFOA のピークの保持時間は約 7.1 分で, 試料溶液に含まれていた PFOA の側鎖 (分岐鎖) 体のピークを分離できた.

各検量線用混合標準液 (PFOS 及び PFOA として 0 ng/mL ~ 50 ng/mL 含有, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, $^{13}\text{C}_8$ -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA として各 2 ng/mL 含有) について 2 回測定し, 各内標準に対するピーク面積比の検量線を作成し, その回帰式の係数及び決定係数を Table 2 に示した. その結果, いずれの検量線のパラメータも肥料等試験法 (2020)¹²⁾ に示されている切片の推奨基準及び決定係数の許容基準を満たしていた. なお, 参考のため, PFOS 及び PFOA 標準液濃度 - 内標準ピーク面積比を Figure 3-1 及び Figure 3-2 に示した.

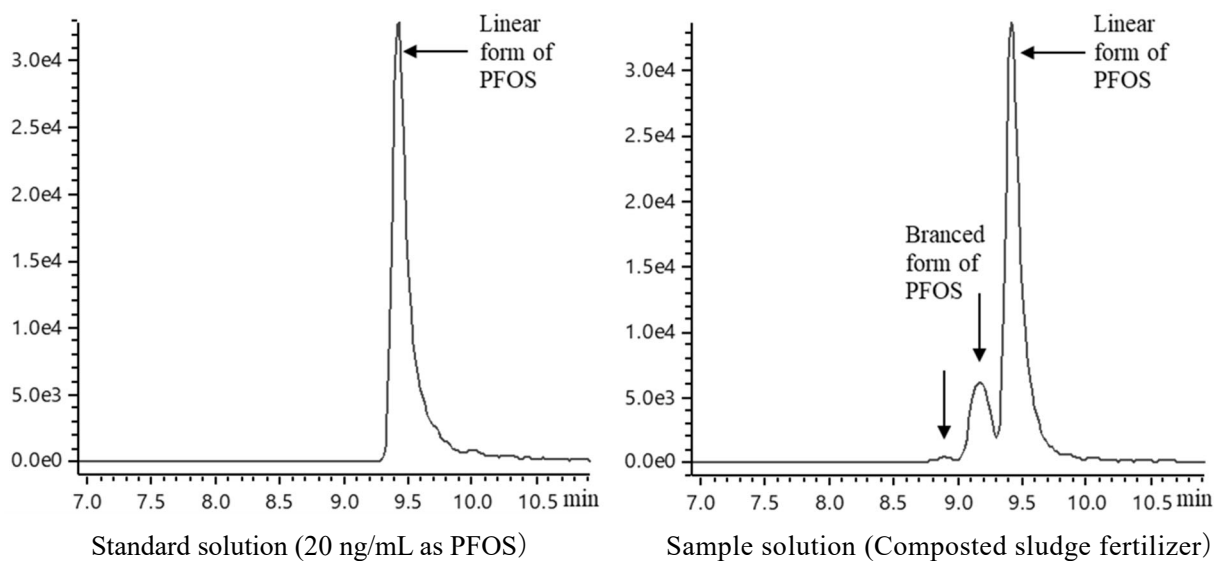


Figure 2-1 MRM chromatogram of PFOS

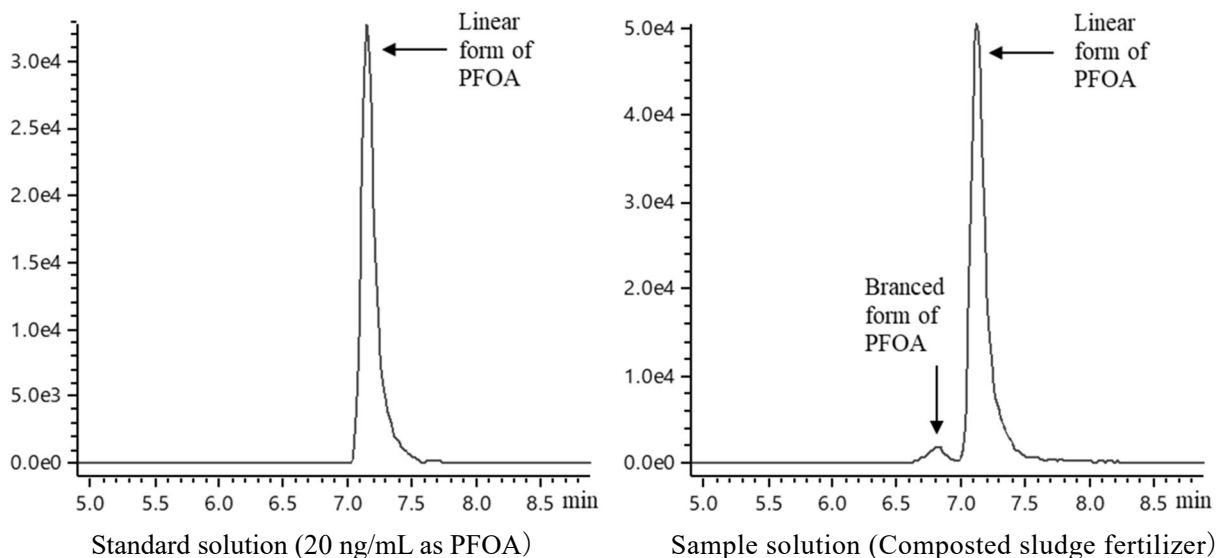


Figure 2-2 MRM chromatogram of PFOA

Conditions of LC-MS/MS shown in table 1-1 and table 1-2

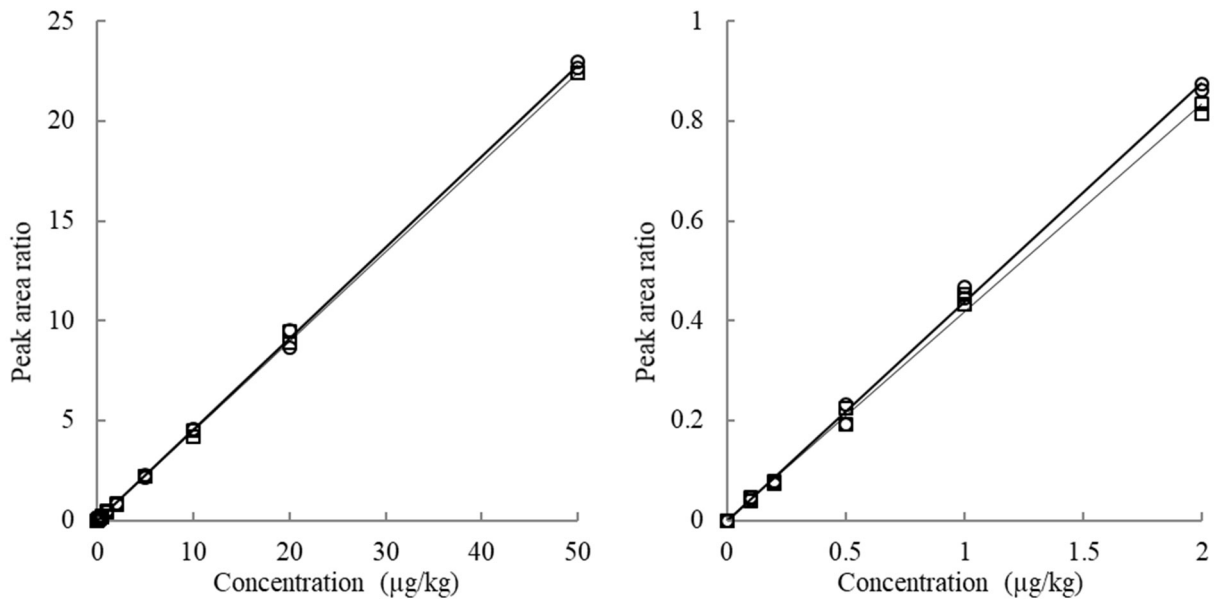


Figure 3-1 Calibration curve of PFOS

Left figure: PFOS concentration range from 0.1 ng/mL to 50 ng/mL

Right figure: PFOS concentration range from 0.1 ng/mL to 2 ng/mL

○: Plot of peak area ratio (Each PFOS / $^{13}\text{C}_4$ -PFOS (2 ng/mL)) to PFOS concentration

□: Plot of peak area ratio (Each PFOS / $^{13}\text{C}_8$ -PFOS (2 ng/mL)) to PFOS concentration

Solid and thin line: Regression line of the data shown in the plot (○) and the plot (□)

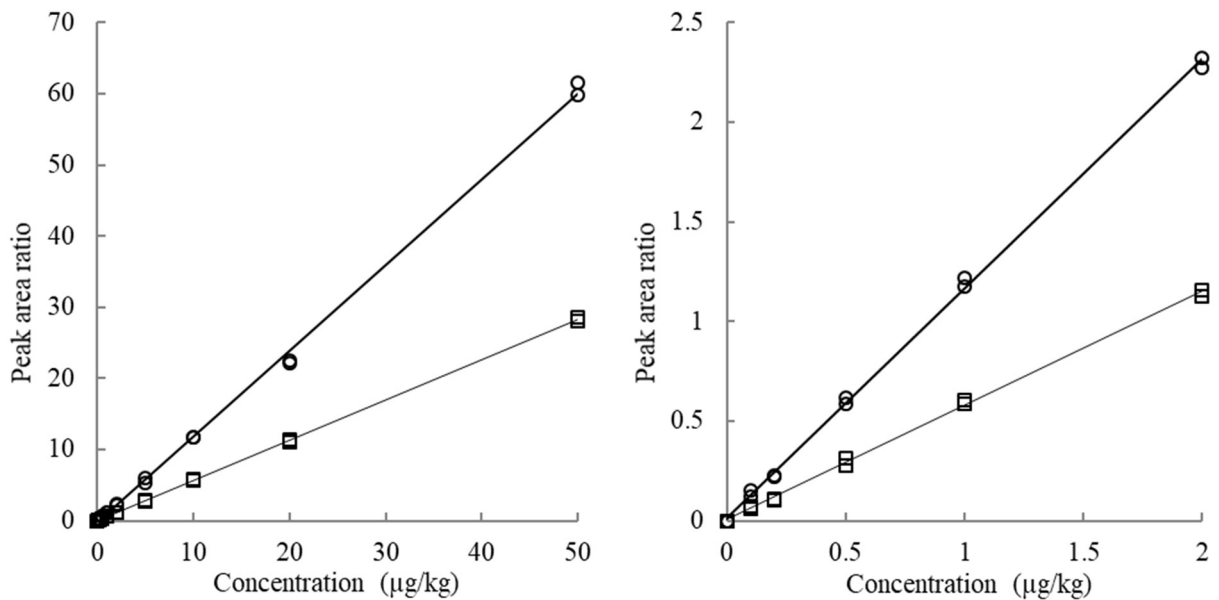


Figure 3-2 Calibration curve of PFOA

Left figure: PFOA concentration range from 0.1 ng/mL to 50 ng/mL

Right figure: PFOA concentration range from 0.1 ng/mL to 2 ng/mL

○: Plot of peak area ratio (Each PFOA / $^{13}\text{C}_4$ -PFOA (2 ng/mL)) to PFOA concentration

□: Plot of peak area ratio (Each PFOA / $^{13}\text{C}_8$ -PFOA (2 ng/mL)) to PFOA concentration

Solid and thin line: Regression line of the data shown in the plot (○) and the plot (□)

Table 2 Evaluation of calibration curve for PFOS and PFOA

Peak ratio Compound	Range of concentration (ng/mL)	Coefficient ^{a)}			Range of intercept (<i>a</i>) ^{c,d)}	
		Slope <i>b</i>	Intercept <i>a</i>	Determination ^{b)} <i>r</i> ²	Lower limit	Upper limit
PFOS/ ¹³ C ₄ -PFOS	≤ 50	0.456	-0.021	1.000	-0.108	0.067
	≤ 2	0.439	-0.002	0.998	-0.016	0.012
PFOS/ ¹³ C ₈ -PFOS	≤ 50	0.450	-0.015	1.000	-0.088	0.057
	≤ 2	0.417	0.002	0.998	-0.012	0.015
PFOA/ ¹³ C ₄ -PFOA	≤ 50	1.205	-0.207	0.999	-0.577	0.163
	≤ 2	1.150	0.015	0.999	-0.010	0.039
PFOA/ ¹³ C ₈ -PFOA	≤ 50	0.566	-0.002	1.000	-0.080	0.075
	≤ 2	0.574	0.004	0.999	-0.009	0.018

a) Regression equation: $y=bx+a$

b) The tolerance criteria* of coefficient of determination: $r^2 \geq 0.99$

c) The 95 % confidence interval

d) The recommended criteria* of coefficient of range of intercept:

The origin (0) is included in the intercept range.

* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

2) 精製操作の検討

環境関連試料の分析方法^{13, 14)}では弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム又はオクタデシル基を化学結合したシリカゲル(ODS)カートリッジカラムを用いて抽出液を精製している。しかしながら、汚泥発酵肥料に適用した場合、カートリッジカラムからの溶出液に着色があり、濃縮操作においては溶液中の析出物が溶けず、LC-MS/MSに注入できる状態ではなかった。三島ら^{15, 16)}は、マイクロプラスチック中の有機ふっ素化合物を測定する際に、抽出液を弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムで精製した後、更にグラフアイトカーボンカートリッジカラムで溶液中の着色成分を除去していた。

筆者らは、この操作を簡便にするため、ルアーデバイス型のグラフアイトカーボンカートリッジカラム(InertSep Slim GC)を用いて、弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム(InertSep MA-2 又は Oasis WAX)の下に連結することとし、溶出溶媒(アンモニア水-メタノール(1+100))を加えた際にPFOS及びPFOAの溶出する画分を確認するため次の試験を実施した。PFOS及びPFOA濃度が各2 ng/mLのメタノール-水(1+1)溶液10 mLを2.4) (2)クリーンアップの操作に用いるInertSep MA-2及びOasis WAXにそれぞれ負荷し、以下同様に操作し、溶出溶媒を加えた流出画分に精製操作検討用¹³C-混合内標準液(2 ng/mL)を加えPFOS及びPFOAを測定した。その結果、Table 3のとおり、PFOS及びPFOAは流出画分0 mL~2 mLでは溶出せず、流出画分2 mL~6 mLでほとんど溶出した。流出画分6 mL以降においても微少なピークを検出したが、内標準物質を添加していることから、以後の検討では流出画分2 mL~6 mLを分取することとした。

2種類の弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムを用いた分析結果の整合性を確認するため、PFOS又はPFOAとして0.5 µg/kg以上検出した汚泥肥料を用いて次の検討を実施した。各汚泥肥料の抽出液を5 mLずつ2本分取し、それぞれInertSep MA-2を用いた精製操作又はOasis WAXを用いた精製操作によって試料溶液を調製してPFOS及びPFOAを測定し、前者の分析値に対する後者の分析値の関

係を Figure 4 にプロットし、回帰直線及びその予測区間を描いた。また、各回帰直線の回帰式及びそれらの回帰係数の 95 %信頼区間並びに相関係数を Table 4 に示した。その結果、いずれのパラメータも肥料等試験法¹²⁾に示されている推奨基準(傾き(*b*)の 95 %信頼区間に 1, 切片(*a*)の 95 %信頼区間に 0 が含まれ、相関係数(*r*)が 0.99 以上)を満たしていた。

Table 3 Elution pattern from weak anion exchange polymer cartridge column
+ graphite carbon cartridge column

Fraction volume (mL)	PFOS ^{a)}		PFOA ^{a)}	
	InertSep MA-2 (ng)	Oasis WAX (ng)	InertSep MA-2 (ng)	Oasis WAX (ng)
0~1	N.D. ^{b)}	N.D. ^{b)}	N.D. ^{b)}	N.D. ^{b)}
1~2	N.D. ^{b)}	N.D. ^{b)}	N.D. ^{b)}	N.D. ^{b)}
2~3	12.5	15.8	14.4	16.9
3~4	5.3	2.4	4.1	1.9
4~5	0.2	0.1	0.2	Tr ^{c)}
5~6	0.1	Tr ^{c)}	0.1	Tr ^{c)}
6~7	Tr ^{c)}	Tr ^{c)}	Tr ^{c)}	Tr ^{c)}
7~8	Tr ^{c)}	Tr ^{c)}	Tr ^{c)}	Tr ^{c)}
Total ^{d)}	18.1	18.2	18.7	18.8
Recovery (%)	90.5	91.0	93.5	94.0

a) Each 20 ng for PFOS and PFOA

b) Not detected

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

d) Total amount of PFOS and PFOA eluted from 2 mL to 6 mL

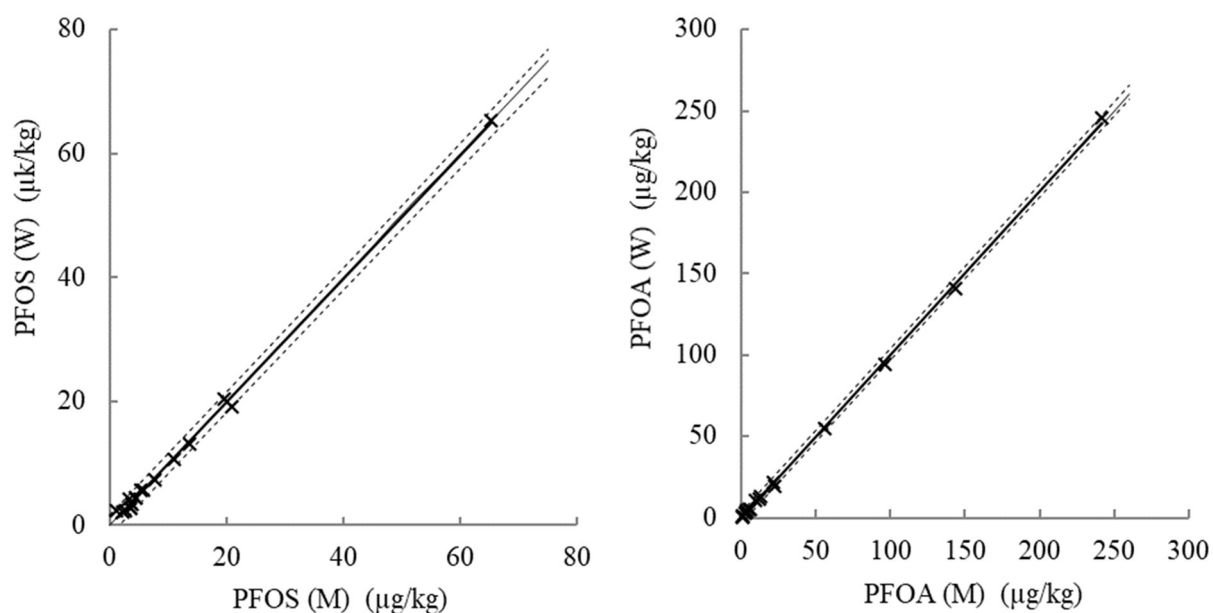


Figure 4 Comparison between analytical values purified with InertSep MA-2 and Oasis WAX

Left figure: Analytical values of PFOS, Right figure: Analytical values of PFOA

PFOS (M) and PFOA (M): Analytical values purified with InertSep MA-2

PFOS (W) and PFOA (W): Analytical values purified with Oasis WAX

Solid line: Regression line, Thin line: $y=x$

Dotted lines: Upper and lower limit 95 % prediction intervals,

Table 4 Evaluation of regression line for comparison of PFOS and PFOA analysis values with two types of cartridges

		PFOS	PFOA
Coefficient ^{a)}	Slope (b)	0.137	-0.434
	Intercept (a)	0.968	1.009
	Correlation (r) ^{b)}	0.994	1.000
Range of slope (b) ^{c)d)}	Upper limit	1.025	1.020
	Lower limit	0.911	0.998
Range of intercept (a) ^{c)e)}	Upper limit	0.634	0.315
	Lower limit	-0.361	-1.183

a) Regression equation: $y=bx+a$

b) The recommended criteria* of correlation coefficient: $r \geq 0.99$

c) The 95 % confidence interval

d) The recommended criteria* of coefficient of range of slope:

One is included in the intercept range.

e) The recommended criteria* of coefficient of range of intercept:

The origin (0) is included in the intercept range.

* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

3) 添加回収試験による真度の評価

真度を評価するため、下水汚泥肥料、工業汚泥肥料及び汚泥発酵肥料にそれぞれ 200 µg/kg, 20 µg/kg 及び 2 µg/kg 相当量を添加した試料について、3 点併行で添加回収試験を実施した結果を Table 5 に示した。

その結果、200 µg/kg, 20 µg/kg 及び 2 µg/kg の添加レベルでの PFOS の平均回収率はそれぞれ 96.5 % ~ 101.1 %, 93.8 % ~ 96.5 % 及び 83.3 % ~ 102.1 % であり、PFOA の平均回収率はそれぞれ 100.4 % ~ 107.3 %, 92.3 % ~ 95.0 % 及び 99.7 % ~ 102.7 % であった。いずれの平均回収率も肥料等試験法¹²⁾に示されている真度の目標範囲以内であった。

Table 5 Results of recovery test

Compound	Sample	Spiked level (µg/kg)	Mean ^{a)} (µg/kg)	Recovery rate (%)	Criteria ^{b)} (%)
PFOS	Sewage sludge fertilizer	200	202	101.1	70~120
		20	18.8	93.8	70~120
		2	1.81	90.4	60~125
	Industrial sludge fertilizer	200	199	99.4	70~120
		20	19.3	96.5	70~120
		2	1.67	83.3	60~125
	Composted sludge fertilizer	200	193	96.5	70~120
		20	19.3	96.3	70~120
		2	2.04	102.1	60~125
PFOA	Sewage sludge fertilizer	200	215	107.3	70~120
		20	19.0	95.0	70~120
		2	2.05	102.7	60~125
	Industrial sludge fertilizer	200	201	100.4	70~120
		20	18.5	92.5	70~120
		2	1.99	99.7	60~125
	Composted sludge fertilizer	200	201	100.6	70~120
		20	18.5	92.3	70~120
		2	2.04	101.8	60~125

a) Mean value ($n = 3$)

b) The tolerance criteria* of the trueness

* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

4) 中間精度及び併行精度の確認

併行精度及び中間精度を確認するため、PFOS 及び PFOA を含有しているし尿汚泥肥料及び汚泥発酵肥料について、2 点併行で日を変えて 5 回分析を実施して得られた結果を Table 6-1 に示し、一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 6-2 に示した。し尿汚泥肥料及び汚泥発酵肥料の PFOS の平均値は 4.46 µg/kg 及び 66.8 µg/kg で、併行精度 (RSD_r) は 3.6 % 及び 3.0 % で、中間精度 ($RSD_{I(T)}$) は 4.6 % 及び 3.3 % であった。PFOA の平均値は 2.08 µg/kg 及び 140 µg/kg で、併行精度 (RSD_r) は 6.2 % 及び 1.4 % で、中間精度 ($RSD_{I(T)}$) は 9.2 % 及び 2.6 % であった。

いずれの精度も肥料等試験法¹²⁾に示されている精度の許容範囲以内であった。

Table 6-1 Individual result of repeatability test on different days
for precision confirmation (µg/kg)

Compound	Test days	Human-waste sludge fertilizer		Composted sludge fertilizer	
		PFOS	1	4.25	4.20
	2	4.24	4.50	69.3	66.9
	3	4.38	4.71	66.2	69.7
	4	4.77	4.65	66.1	69.7
	5	4.43	4.44	63.5	65.6
PFOA	1	2.34	2.00	143	143
	2	1.99	1.94	140	145
	3	1.92	2.09	138	137
	4	1.91	1.92	135	136
	5	2.40	2.25	141	138

Table 6-2 Statistical analysis of replicate test results for precision confirmation

Compound	Sample	Mean ^{a)}	Repeatability precision			Intermediate precision		
		<i>m</i> (µg/kg)	<i>s_r</i> ^{b)} (µg/kg)	<i>RSD_r</i> ^{c)} (%)	<i>2×CRSD_r</i> ^{d)} (%)	<i>s_{I(T)}</i> ^{e)} (µg/kg)	<i>RSD_{I(T)}</i> ^{f)} (%)	<i>2×CRSD_{I(T)}</i> ^{g)} (%)
PFOS	Human-waste sludge fertilizer	4.46	0.16	3.6	22	0.21	4.6	36
	Composted sludge fertilizer	66.8	2.0	3.0	22	2.2	3.3	36
PFOA	Human-waste sludge fertilizer	2.08	0.13	6.2	22	0.19	9.2	36
	Composted sludge fertilizer	140	2	1.4	22	4	2.6	36

a) Total mean value (number of test days (5) × number of replication (2))

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

d) The tolerance criteria* of the repeatability precision

e) Intermedicate standare deviation

f) Intermedicate relative standard deviation

g) The tolerance criteria* of the intermediate precision

* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

5) 定量下限等の推定

PFOS 及び PFOA の検量線用の標準液の最小濃度は 0.1 ng/mL (分析試料中各 0.5 µg/kg 相当量) であり、いずれの SN 比も 10 を超えていた。このことから、定量下限を推定するため、PFOS 及び PFOA の含有量の低い下水汚泥肥料に各 0.5 µg/kg 相当量を添加して 7 点併行で分析し、その平均値、標準偏差等

の結果を Table 7-1 に示した. この試験によって得られた PFOS 及び PFOA の併行分析の結果, 用いた検量線 (0.1 ng/mL~2 ng/mL) 及び試料溶液の SN 比を用い, それぞれ肥料等試験法¹²⁾別添 試験法の妥当性確認の手順に従って定量下限及び検出下限を Table 7-2 のとおり算出した.

その結果, PFOS 及び PFOA の定量下限はいずれも 0.5 µg/kg, 検出下限はいずれも 0.2 µg/kg 程度と推定された.

Table 7-1 Replicate test results for estimating the lower limit of quantification of PFOS and PFOA

Compound	Sample	Spiked level (µg/kg)	Number of replication	Mean value (µg/kg)	s_r ^{c)} (µg/kg)	Recovery ^{d)} (%)
PFOS	Sewage sludge fertilizer ^{a)}	0.5	7	0.55	0.02	96.0
PFOA	Sewage sludge fertilizer ^{b)}	0.5	7	0.58	0.05	90.6

a) PFOS detection amount: 0.07 µg/kg

b) PFOA detection amount: 0.14 µg/kg

c) Repeatability standard deviation

d) Recovery rate including the amount of PFOS or PFOA detected in the sample

Table 7-2 Result of estimation of the lower limit of quantification of PFOS and PFOA

Compound	(µg/kg)					
	Procedure ^{a)} for estimating the LOQ ^{b)} and LOD ^{c)}					
	Replicate test		Calibration curve		SN ratio	
	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD
PFOS	0.2	0.1	0.4	0.2	0.2	0.06
PFOA	0.5	0.2	0.4	0.2	0.3	0.09

a) The Procedure shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

b) Lower limit of quantitation

c) Lower limit of detection

4. まとめ

LC-MS/MS を用いた PFOS 及び PFOA の分析法を開発し, 単一試験室における分析法の妥当性確認を実施したところ, 次のとおり分析法として十分な性能を有していることを確認した.

(1) JIS K 0450-70-10 を参考に LC-MS/MS の測定条件設定したところ, 直鎖体の PFOS 及び PFOA と側鎖体の PFOS 及び PFOA を分離することができた.

(2) 検量線用混合標準液 (PFOS 及び PFOA として 0.5 ng/mL~50 ng/mL 含有, ¹³C₄-PFOS, ¹³C₈-PFOS, ¹³C₄-PFOA 及び ¹³C₈-PFOA として各 2 ng/mL 含有) を 2 回測定し, 各 PFOS 及び PFOA の濃度と内標準に対するピーク面積比について一次回帰分析を用いて検量線を作成した. それらの回帰式の切片の 95 %信頼区間に原点 (0) が含まれ, それらの決定係数は 0.992~1.000 であり, 検量線の直線性が確認された.

(3) 汚泥発酵肥料の抽出液を弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムのみで精製した場合, 着色成分

を除けず、析出物が残ることから、LC-MS/MS に注入できる状態ではなかったが、弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムにカーボングラファイトカートリッジカラムを連結することで溶液中の着色成分等が除去できた。

(4) 3 種類の汚泥肥料を用いて添加回収試験により真度の確認を行った結果、PFOS 及び PFOA 各 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度範囲で平均回収率 83.3 %~107.3 %であり、いずれも肥料等試験法¹²⁾に示されている真度の目標範囲以内であった。

(5) 併行精度及び中間精度を確認するため、し尿汚泥肥料及び汚泥発酵肥料を用いて 2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った結果、PFOS 及び PFOA の併行精度 (RSD_r) は 1.4 %~6.2 %で、中間精度 ($RSD_{I(T)}$) は 2.6 %~9.2 %であった。肥料等試験法に示されている併行精度及び中間精度の許容範囲を満たしていた。

(6) 開発した分析法において PFOS 及び PFOA の定量下限は 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された。

文 献

- 1) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部：PFOS 含有廃棄物の処理に関する技術的留意事項，平成 23 年 3 月，p.1~2, p.23~39 (2011)
< <https://www.env.go.jp/recycle/misc/pfos/tptc.pdf> >
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構，経済産業省製造産業局化学物質課，厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課化学物質安全対策室：製品含有化学物質のリスク評価，ペルフルオロオクタン酸，平成元年 9 月，p.7-9 (1989)
< https://www.nite.go.jp/chem/risk/products_risk-PFOA_jp_full.pdf >
- 3) 環境省環境保険部リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 6 巻，[18]ペルフルオロオクタン酸及びその塩，平成 20 年 5 月 (2008)
< <https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/pdf/chpt1/1-2-2-18.pdf> >
- 4) 環境省環境保険部リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 6 巻，[19]ペルフルオロオクタンスルホン酸及びその塩，平成 20 年 5 月 (2008)
< <https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/pdf/chpt1/1-2-2-19.pdf> >
- 5) 一般財団法人化学物質評価研究機構：平成 27 年度化学物質安全対策(残留性有機汚染物質等に関する調査)報告書，【添付資料 1】PFOA とその塩及び PFOA 関連物質の残留性，生物蓄積性等に関する情報，平成 28 年 3 月 (2010)
< https://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2016fy/000052.pdf >
- 6) 野添宗裕，藤井滋穂，田中周平，田中宏明，山下尚之：残留性有機フッ素化合物 PFOS, PFOA の下水処理場における挙動調査，環境工学研究論文集，43, p.105-110 (2006)
< https://www.jstage.jst.go.jp/article/proes1992/43/0/43_0_105/_pdf/-char/ja >
- 7) 広瀬知直，尾崎博明，谷口省吾，菅野悦治，中平亨：下水処理過程における PFOS および PFOA の挙動について，土木学会第 63 回年次学術講演会要旨，p.3-4 (2008)
< <http://library.jsce.or.jp/jsce/open/00035/2008/63-07/63-07-0002.pdf> >
- 8) GL Sciences：固相抽出ー液体クロマトグラフ質量分析計を用いた有機フッ素化合物 (PFAS) の分析，LC Technical Note, LT181
< <https://www.gls.co.jp/viewfile/?p=LT181> >
- 9) JIS K 045-70-10:2011：工業用水・工場排水中のペルフルオロオクタンスルホン酸及びペルフルオロ

- オクタン酸試験法 (2011)
- 10) 厚生労働省: 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について 別添 4 水質管理目標設定項目の検査方法, 平成 15 年 10 月 10 日, 厚生労働省健康局水道課長通知健水発第 1010001 号第 284 号, 最終改正令和 2 年 3 月 30 日, 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課長通知薬生水発 0330 第 1 号 (2020)
< <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000615826.pdf> >
< <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000055189.pdf> >
 - 11) SHIMADZU Excellence in Science: トリプル四重極型 LC/MS/MS による有機フッ素化合物 (PFAS) の直接注入分析, Application News, No.C225A
 - 12) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC): 肥料等試験法 (2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2020.pdf >
 - 13) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部: PFOS 含有廃棄物の処理に関する技術的留意事項, 平成 23 年 3 月, p.23~39 (2011)
< <https://www.env.go.jp/recycle/misc/pfos/tptc.pdf> >
 - 14) 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, p.58~66 (2010)
< <https://www.env.go.jp/water/chosa/h20-03.pdf> >
 - 15) 三島聡子: マイクロプラスチックに吸着した有機フッ素化合物の分析, 神奈川県環境科学センター研究報告, **41**, 23-30 (2018)
< <https://www.pref.kanagawa.jp/documents/3464/03.pdf> >
 - 16) 三島聡子, 小沢憲司, 中山駿一, 菊池宏海: 相模湾漂着マイクロプラスチックの有機フッ素化合物の吸着実態と流入河川の影響, 環境化学, **30**, 66-81 (2020)

Determination of PFOS and PFOA in Sludge Fertilizer using Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)

SHIRAI Yuji¹ and NUMAZAKI Kanako¹

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

We developed and validated the determination method of PFOS and PFOA in sludge fertilizers using liquid chromatograph/tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). After the analytical portion was added the internal standard solution (each 20 ng as PFOS and PFOA), PFOS and PFOA were extracted with methanol containing a small amount of formic acid. The extract was purified with weak anion exchange polymer cartridge column and graphite carbon cartridge column. PFOS and PFOA were measured by LC-MS/MS. As a result of 3 replicate analysis in 3 kinds of sludge fertilizer samples prepared to contain with PFOS and PFOA at 2 µg/kg, 20 µg/kg and 200 µg/kg, the mean recoveries were 88.6 % - 100.8 %, respectively. As a result of duplicate analysis on 5 days in human-waste sludge fertilizer and composted sludge fertilizer contaminated with PFOS and PFOA, the mean value, repeatability relative standard deviation (RSD_r) and intermediate relative standard deviation ($RSD_{I(T)}$) were 2.08 µg/kg - 140 µg/kg, 1.4 % - 6.2 % and 2.6 % - 9.2 %, respectively. Minimum limit of quantification of there were estimated 0.5 µg/kg. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of PFOS and PFOA in sludge fertilizers.

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

(Research Report of Fertilizer, **14**, 123-140, 2021)

12 汚泥肥料の連用によるカドミウム等の土壌への

蓄積，作物への吸収試験（継続）

－2019年冬作・2020年夏作－

浅尾直紀¹，村山和晃²，松尾信吾³，小塚健志⁴，阿部文浩⁵

キーワード 汚泥肥料，連用試験，カドミウム

1. はじめに

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

1年目(2009年)夏作から11年目(2019年)夏作にかけては，汚泥肥料を施用した区及び施用していない区の2試験区を設け，ニンジン，ホウレンソウ，ホウレンソウ，チンゲンサイ，カブ，ホウレンソウ，以後ニンジン，ホウレンソウの繰返しの順で栽培し，土壌中のカドミウム濃度の変化及び作物体のカドミウム吸収量を確認した。その結果は既に肥料研究報告第4号³⁾～13号⁴⁾で報告しているが，引き続き，11年目(2019年)冬作及び12年目(2020年)夏作においても栽培試験を実施したのでその結果を報告する。

2. 材料及び方法

(1) 肥料等

施肥する肥料は市販されているし尿汚泥肥料を使用した。成分分析結果は Table 1 のとおり。標準区に施肥する肥料及び汚泥肥料施用区で補正肥料として特級試薬の尿素，リン酸一アンモニウム及び塩化カリウムを使用した。汚泥肥料及び補正肥料の各成分の分析は肥料等試験法⁵⁾によった(補正肥料の成分量は Table 2 に示した)。その他，塩基バランスの改善のため特級試薬の硫酸マグネシウムを使用した。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部 (現)農薬検査部

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

⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部 (現)神戸センター

⁵ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部 (現)名古屋センター

Table 1 Properties of sludge fertilizer

Item	Unit	Content	Item	Unit	Content
Total nitrogen	% ^{a)}	5.8	Moisture	% ^{a)}	11.2
Total phosphoric acid ^{b)}	% ^{a)}	4.7	Total copper	mg/kg	329
Citric acid-soluble phosphoric acid ^{b)}	% ^{a)}	2.2	Total Zinc	mg/kg	1038
Total potassium ^{c)}	% ^{a)}	0.4	Carbon to nitrogen ratio	-	6.3
Total calcium ^{d)}	% ^{a)}	1.4	Total cadmium ^{e)}	mg/kg	2.8 ^{f)}
Organic carbon	% ^{a)}	36.0	Acid-solubility-cadmium ^{g)}	mg/kg	1.8

a) Mass fraction

b) Content as P₂O₅c) Content as K₂O

d) Content as CaO

e) Content of cadmium dissolved with aqua regia

f) 4.9 mg/kg in the dry matter

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

Table 2 Properties of reagent

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

a) Mass fraction

b) Content as P₂O₅c) Content as K₂O

(2) 土壌の理化学性

本試験は当センター岩槻圃場(埼玉県さいたま市)で実施した。土壌の種類は黒ボク土であり、土性は軽しよく土である。1年目夏作から11年目夏作までの土壌の理化学性のうち、pH、電気伝導率(EC:Electrical Conductivity, 以下ECと記す)、陽イオン交換容量(CEC:Cation Exchange Capacity, 以下CECと記す)、窒素全量(TN:Total Nitrogen, 以下TNと記す)、炭素全量(TC:Total Carbon, 以下TCと記す)、有効態りん酸、交換性加里、交換性石灰及び交換性苦土)をFigure 1に示す。

pHは、土壌中のCd蓄積量に与える影響が大きいため、pH 6~pH 7となるように、試験開始から3年目、5年目、6年目及び7年目に炭酸苦土石灰及び消石灰を用いてpH調整を行った。7年目冬作から11年目夏作までpH 6.4程度で安定して推移していたが、11年目冬作、12年目夏作とpH 6.0付近に下がっている。

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

有効態りん酸は、地力増進基本指針において黒ボク土における有効態りん酸含有量の目標値が乾土 100 g 当たり 10 mg 以上 100 mg 以下と定められているのに対して、試験開始時から 10 mg 以下で推移していたことから、りん酸肥料の施肥量を調整したところ、8年目冬作以降は 10 mg 以上を推移している。

11年目夏作跡地土壌の理化学性を確認したところ、主要農作物施肥基準(埼玉県)⁶⁾に記された土壌管理目標値を参考として、土壌中の交換性塩基3成分(交換性加里、交換性石灰、交換性苦土)のうち、交換性苦土の成分が低い傾向が見られたため、硫酸マグネシウムを施肥することにより、交換性塩基のバランスの改善を

図った(硫酸マグネシウムの分量は Table 3-2 に示した).

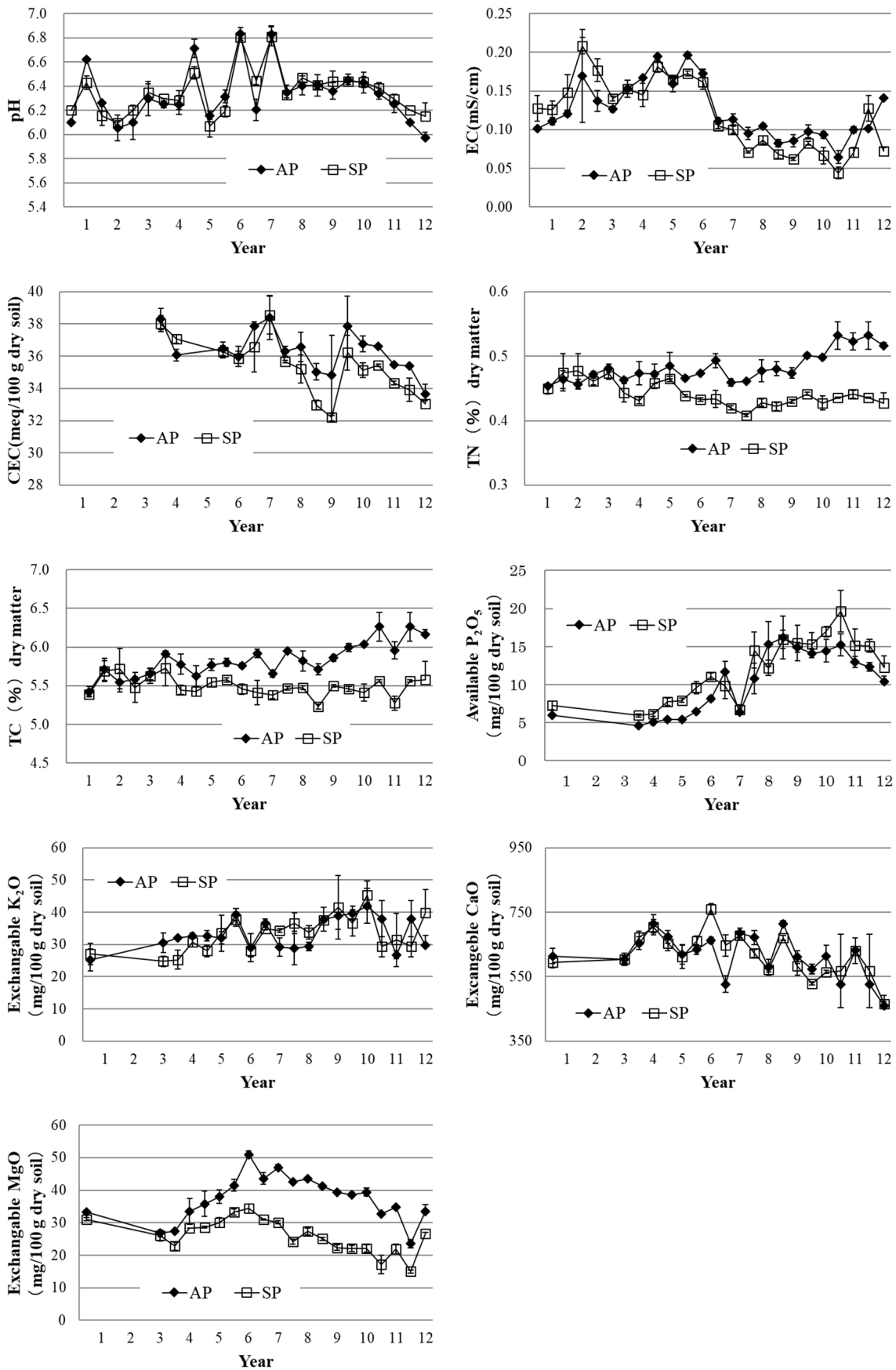


Figure 1 Transition of the characteristics of the soil

(3) 試験区の構成

試験区は1試験区の面積を4 m²(縦2 m×横2 m)とし、汚泥肥料施用区及び標準区それぞれ2反復の計4試験区を配置した。

(4) 施肥設計

11年目冬作ホウレンソウ及び12年目夏作ニンジン⁹の施肥設計をTable 3-1及びTable 3-2に示した。施肥設計は、主要農作物施肥基準(埼玉県)を参考に設計した。

汚泥肥料は、汚泥肥料中の重金属の農地への蓄積を抑制するために、施用量の上限の目安を年間500～1000 kg/10 aとしている⁷⁻⁹自治体があり、一般的に1作当たり500 kg/10 a程度施用されている¹⁰。また、高分子凝集剤を使用した汚泥肥料を連用した場合、土壌のpHが低下する¹¹。これらから、4年目夏作から11年目冬作までの試験において、1作あたりの汚泥肥料の施用量を500 kg/aとした。しかしながら、本試験の目的の一つである土壌への蓄積量を確認するには供試汚泥肥料中のカドミウム濃度が低い¹¹ため、本試験の12年目夏作における汚泥肥料の施用量は1作当たり750 kg/10 aとした。汚泥肥料の窒素の無機化率は、前作までの収量を考慮して冬作は20%、夏作は40%として窒素の成分量を算出し、不足分については尿素を用いて補正した。

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

Table 3-1 The fertilization amount (spinach in winter 11th)

Types of fertilizer	Amounts (g/4 m ²)	Components (g/4 m ²)				Amounts (kg/10 a)	Components (kg/10 a)			
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cd
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>										
Sludge fertilizer	2000	115	95	9	5.7	500	28.8	23.7	2.2	1.4
Urea	123	57	—	—	—	31	14.3	—	—	—
Potassium chloride	100	—	—	63	—	25	—	—	15.8	—
Total		172	95	72	5.7		43.0	23.7	18.0	1.4
<Standard plot (SP)>										
Urea	133	61	—	—	—	33	15.3	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	155	19	95	—	—	39	4.7	23.7	—	—
Potassium chloride	114	—	—	72	—	29	—	—	18.0	—
Total		80	95	72	—		20.0	23.7	18.0	—

Table 3-2 The fertilization amount (carrot in summer 12th)

Types of fertilizer	Amounts (g/4 m ²)	Components (g/4 m ²)					Amounts (kg/10 a)	Components (kg/10 a)				
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Cd		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Cd
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>												
Sludge fertilizer	3000	164	142	12	—	8.5	750	40.9	35.6	3.1	—	2.1
Urea	23	11	—	—	—	—	5.7	2.6	—	—	—	—
Potassium chloride	82	—	—	52	—	—	20	—	—	12.9	—	—
Magnesium sulfate	100	—	—	—	33	—	25	—	—	—	8.4	—
Total		174	135	64	33	8.5		43.6	35.6	16.0	8.4	2.1
<Standard plot (SP)>												
Urea	136	63	—	—	—	—	34	15.7	—	—	—	—
Ammonium dihydrogen phosphate	109	13	67	—	—	—	27	3.3	16.6	—	—	—
Potassium chloride	101	—	—	64	—	—	25	—	—	16.0	—	—
Magnesium sulfate	100	—	—	—	33	—	25	—	—	—	8.4	—
Total		76	67	64	33	—		19.0	16.6	16.0	8.4	—

Table 4 The fertilizer application log of the test plots

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

Table 4 continue

Year	Season	Types of fertilizer	<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>				<Standard plot (SP)>				
			Amounts (kg/10 a)	Components (kg/10 a)			Amounts (kg/10 a)	Components (kg/10 a)			
				N	P ₂ O ₅	K ₂ O		Cd	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
2015	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	42	5	26	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16
		Slaked lime (pH adjustment)	196	—	—	—	—	—	—	—	—
		Total		27	26	16	1.8		19	26	16
2015	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—
		Urea	21	10	—	—	—	15	7	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphate	72	9	44	—	—	109	13	67	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total		35	70	18	1.8		20	67	18
2016	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—
		Urea	—	—	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphate	89	11	54	—	—	42	5	26	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16
		Total		27	80	16	1.8		19	26	16
2016	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—
		Urea	36	17	—	—	—	32	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	43	5	26	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total		33	26	18	1.8		20	26	18
2017	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	43	5	26	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16
		Total		27	26	16	1.8		19	26	16
2017	Winter	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—
		Urea	36	17	—	—	—	32	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	43	5	26	—
		Potassium chloride	26	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total		34	26	18	1.8		20	26	18
2018	Summer	Sludge fertilizer	500	17	26	2	1.8	—	—	—	—
		Urea	23	11	—	—	—	30	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	43	5	26	—
		Potassium chloride	23	—	—	14	—	25	—	—	16
		Total		28	26	16	1.8		19	26	16
2018	Winter	Sludge fertilizer	500	29	24	2	1.4	—	—	—	—
		Urea	31	14	—	—	—	33	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	39	5	24	—
		Potassium chloride	25	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total		43	24	18	1.4		20	24	18
2019	Summer	Sludge fertilizer	500	29	24	2	1.4	—	—	—	—
		Urea	10	5	—	—	—	31	14	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	39	5	24	—
		Potassium chloride	22	—	—	14	—	25	—	—	16
		Total		34	24	16	1.4		19	24	16
2019	Winter	Sludge fertilizer	500	29	24	2	1.4	—	—	—	—
		Urea	31	14	—	—	—	33	15	—	—
	Spinach	Ammonium dihydrogenphosphate	—	—	—	—	—	39	5	24	—
		Potassium chloride	25	—	—	16	—	29	—	—	18
		Total		43	24	18	1.4		20	24	18
2020	Summer	Sludge fertilizer	750	41	36	3	2.1	—	—	—	—
		Urea	6	3	—	—	—	34	16	—	—
	Carrot	Ammonium dihydrogen phosphate	—	—	—	—	—	27	3	17	—
		Potassium chloride	20	—	—	13	—	25	—	—	16
		Magneium sulfate	25	—	—	—	—	25	—	—	—
		Total		44	36	16	2.1		19	17	16

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

(5) 栽培方法

栽培の概要は Table 5 のとおり。施肥は、各試験区の表層土約 12 kg を袋に取り、Table 3-1, 3-2 の施肥設計にしたがって肥料を加えて混合し、各試験区表層に均等に散布した。なお、各試験区の周辺 1 m の部分(ガードプランツ)には、標準区の施肥設計と同じ割合で施肥した。その後、耕耘機を用いて深さ約 15 cm まで耕耘した。

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

Table 5 Cultivation summary

	Spinach	Carrot
Species	Mirage	Koigokoro
Fertilization	2019.11.15	2020.5.12
Pesticide application	11.15	5.11
Seeding	11.21	5.22
Thinning (first)	2020.1.9	7.7
Thinning (second)	—	7.16
Harvest	2020.3.18	10.1
Cultivation period	118 days	132 days

(6) 作物体の前処理

ホウレンソウの葉部(可食部)を収穫した後、土壌を払い落とし、作物体の重量を試験区毎に測定した。さらに、分析用試料として試験区中央の 1 m² 分全てを、水道水、イオン交換水の順に洗浄し、ガラス室で自然乾燥した後に通風乾燥器にて 65 °C で一昼夜乾燥した。

ニンジンについては根についた土壌を水道水で洗い落とし、セラミック製包丁を用いて葉部と根部(可食部)に切断し、それぞれの重量を試験区毎に測定した。さらに分析用試料として試験区中央の 1 m² 分全てを、水道水、イオン交換水の順に洗浄し、葉部はガラス室で自然乾燥した後に通風乾燥器にて 65 °C で一昼夜乾燥した。根部はセラミック製包丁を用いて細かく切断した後、通風乾燥器にて 65 °C で一昼夜乾燥した。

乾燥した試料を目開き 500 μm のふるいを通過するまで粉砕機(ZM200:Retsch ローター回転数 6000 rpm)で粉砕し分析試料とした。

(7) 作物体のカドミウム分析

分析試料 0.5 g に硝酸 5 mL 及び過酸化水素水 2 mL を加えマイクロ波分解装置(Multiwave 3000:Perkin Elmar)で分解¹³⁾したものを 50 mL に定容し、ICP 質量分析装置(iCAP RQ :Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。

(8) 跡地土壌の分析

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

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

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

3. 結果及び考察

1) 冬作ホウレンソウ

(1) 作物体の収量, カドミウム濃度

11年目冬作ホウレンソウの結果を Table 6 に示した.

収量は, 汚泥肥料施用区で 12.1 kg, 標準区で 13.0 kg であり, 標準区に対する汚泥肥料施用区の収量指数は 93 であった.

ホウレンソウ現物中のカドミウム濃度は, 汚泥肥料施用区で 0.055 mg/kg, 標準区で 0.042 mg/kg であった.

また, ホウレンソウ乾物中のカドミウム濃度について各区を比較したところ, 汚泥肥料施用区で 0.485 mg/kg, 標準区で 0.334 mg/kg であり, 汚泥肥料施用区が有意に高い結果であった ($p=3.3 \times 10^{-4}$).

1年目から11年目の冬作の収量の推移を Figure 2 に示した.

作物体の現物中のカドミウム濃度は Figure 3-1 に示すとおり Codex 基準値¹⁶⁾ (0.2 mg/kg) に対して低い濃度で推移していた. 汚泥肥料の連用によるホウレンソウ乾物中のカドミウム濃度の変化は Figure 3-1 に示すとおり濃度上昇は今のところ認められなかった.

Table 6 Yield of spinach (edible portion) and Cadmium concentration (winter 11th)

	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Average	Yield index ^{a)}	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>								
Fresh weight	kg	11.75		12.35		12.05	93	-
Cadmium concentration (fresh matter)	mg/kg	0.054	0.057	0.052	0.058	0.055	-	-
Cadmium concentration (dry matter)	mg/kg	0.47	0.49	0.47	0.52	0.48	-	Significance ^{b)}
<Standard plot (SP)>								
Fresh weight	kg	13.80		12.15		12.98	100	-
Cadmium concentration (fresh matter)	mg/kg	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	-	-
Cadmium concentration (dry matter)	mg/kg	0.35	0.35	0.32	0.32	0.33	-	-

a) Yield of Standard plot was indexed as 100

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

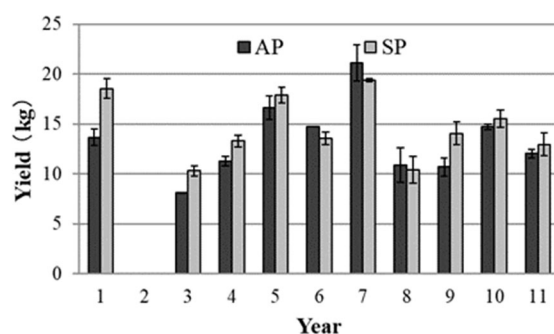


Figure 2 The yield of the spinach in winter (Note: 2nd year (qinggengcai))

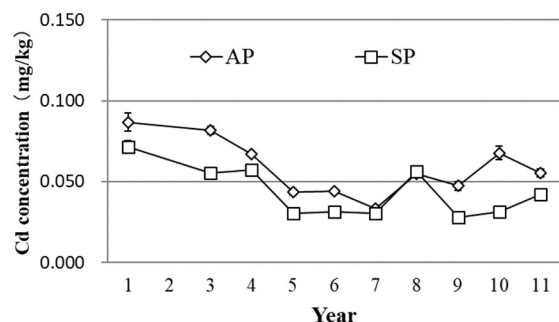


Figure 3-1 Cd concentration (content in the fresh matter) in spinach (Note: 2nd year (qinggengcai))

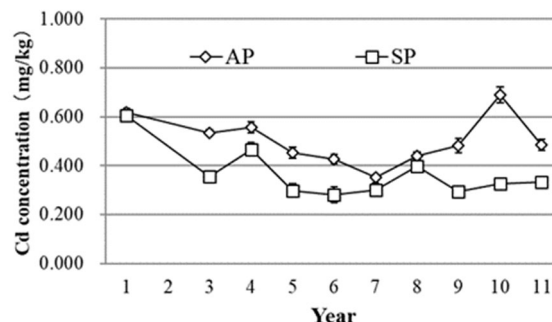


Figure 3-2 Cd concentration (content in the dry matter) in spinach (Note: 2nd year (qinggengcai))

(2) 跡地土壌のカドミウム

11年目冬作ホウレンソウ跡地土壌の0.1 mol/L HCl-Cd, pH(H₂O)及びECを分析した結果をTable 7に示した。0.1 mol/L HCl-Cdは、汚泥肥料施用区は0.32 mg/kg, 標準区は0.20 mg/kgであり、汚泥肥料施用区で有意に高かった($p=1.9 \times 10^{-5}$)。

Table 7 Characteristics of cultivated soil in winter 2019

	Unit	Test prot-1		Test prot-2		Average	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
0.1 mol/L HCl-Cd ^{a)}	mg/kg	0.32	0.31	0.33	0.33	0.32	Significance ^{d)}
pH (H ₂ O) ^{b)}		6.1		6.1			
EC ^{c)}	mS/cm	0.10		0.10			
<Standard plot(SP)>							
0.1 mol/L HCl-Cd	mg/kg	0.21	0.20	0.20	0.21	0.20	
pH (H ₂ O)		6.2		6.2			
EC	mS/cm	0.14		0.14			

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

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

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

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

2) 夏作ニンジン

(1) 作物体の収量, カドミウム濃度

12年目夏作ニンジンの結果をTable 8に示す。

収量は、汚泥肥料施用区で12.2 kg(葉部 6.8 kg, 根部 5.4 kg), 標準区で8.8 kg(葉部 4.8 kg, 根部 4.0 kg)であり、収量指数は142(葉部 142, 根部 134)であった。ニンジン現物中のカドミウム濃度は、汚泥肥料施用区で根部0.041 mg/kg, 葉部0.051 mg/kgであり、標準区で根部0.017 mg/kg, 葉部0.021 mg/kgであった。

また、ニンジン乾物中のカドミウム濃度について各区を比較したところ、汚泥肥料施用区で根部0.42 mg/kg, 葉部0.41 mg/kg, 標準区で根部0.16 mg/kg, 葉部0.17 mg/kgであり、根部($p=1.7 \times 10^{-8}$), 葉部($p=4.5 \times 10^{-6}$)の両部位で汚泥肥料区が有意に高い結果であった。

1年目から12年目における夏作の収量の推移をFigure 4-1(葉部), Figure 4-2(根部)に示した。12年目は播種後から雨天が続いた影響で試験区に水がたまり、標準区内に発芽しない箇所があった。その後の生育もあまり良くなかったため、標準区は例年に比べ収量が少ない結果となった。汚泥肥料施用区は11年目の収量と

同程度であった。

根菜類の Codex 基準値¹⁶⁾ (0.1 mg/kg) は可食部の根部について定められており、ニンジン現物中のカドミウム濃度は Figure 5-1 に示した。根部のカドミウム濃度は Codex 基準値に対し、低い濃度で推移していた。汚泥肥料の連用によるニンジン乾物中のカドミウム濃度の推移は Figure 5-2 に示した。汚泥肥料施用区において本試験の乾物中カドミウム濃度は葉部 0.410 mg/kg, 根部 0.416 mg/kg であり、前年 11 年目の葉部 0.268 mg/kg, 根部 0.206 mg/kg と比較すると急激に上昇していた。

Table 8 Yield of carrot and Cadmium concentration (summer 2020)

	Part	Unit	Test plot-1		Test plot-2		Average	Yield index ^{b)}	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>									
Fresh weight	Root	kg	10.25		10.30		10.28	103	-
	Leaf	kg	5.80		5.60		5.70	95	-
	Total	kg	16.05		15.90		15.98	100	-
Cadmium concentration (dry matter)	Root	mg/kg	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	Pending ^{b)} Significance ^{c)}	
	Leaf	mg/kg	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19		
Cadmium concentration (fresh matter)	Root	mg/kg	0.012	0.012	0.014	0.014	0.013	-	
	Leaf	mg/kg	0.023	0.024	0.024	0.025	0.024	-	
<Standard plot (SP)>									
Fresh weight	Root	kg	9.65		10.35		10.00		
	Leaf	kg	6.20		5.85		6.03		
	Total	kg	15.85		16.20		16.03		
Cadmium concentration (dry matter)	Root	mg/kg	0.10	0.11	0.08	0.08	0.10		
	Leaf	mg/kg	0.17	0.17	0.13	0.14	0.15		
Cadmium concentration (fresh matter)	Root	mg/kg	0.013	0.013	0.022	0.022	0.017		
	Leaf	mg/kg	0.010	0.010	0.017	0.017	0.014		

a) Yield of Standard plot was indexed as 100

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

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

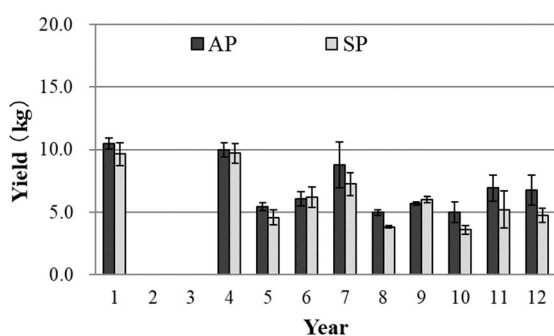


Figure 4-1 The yield of the carrot (leaf) in summer
(Note: 2nd year (spinach), 3rd year (trunip))

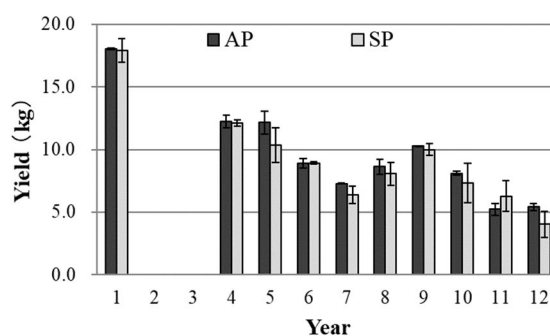


Figure 4-2 The yield of the carrot (root) in summer
(Note: 2nd year (spinach), 3rd year (trunip))

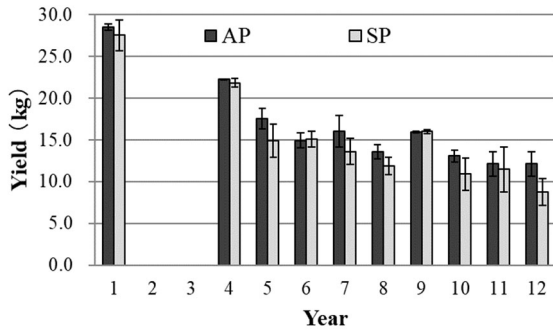


Figure 4-3 The yield of the carrot (total) in summer
(Note: 2nd year (spinach), 3rd year (trunipp))

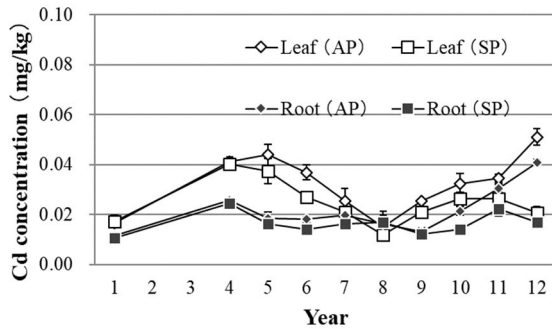


Figure 5-1 Cd concentration (content in the fresh matter) in carrot (Note: 2nd year (qinggengcai))

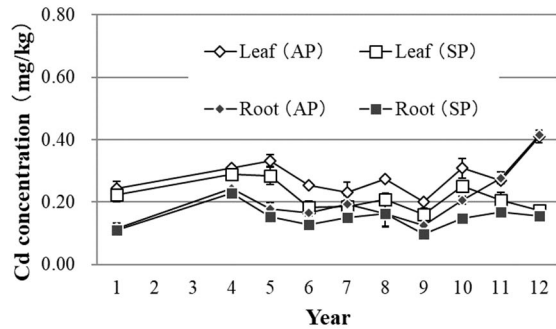


Figure 5-2 Cd concentration (content in the dry matter) in carrot (Note: 2nd year (qinggengcai))

(2) 跡地土壌のカドミウム

跡地土壌の全カドミウム，0.1 mol/L HCl-Cd，pH(H₂O)及びECの分析結果をTable 9に示した。

全カドミウム濃度は，汚泥肥料施用区は0.58 mg/kg，標準区は0.42 mg/kgで，汚泥肥料施用区が有意に高かった($p=2.1 \times 10^{-5}$)。

0.1 mol/L HCl-Cdは，汚泥肥料施用区は0.33 mg/kg，標準区は0.20 mg/kgであり，汚泥肥料施用区が有意に高かった($p=9.1 \times 10^{-6}$)。

Table 9 Characteristics of cultivated soil in summer 2020

	Unit	Test prot-1		Test prot-2		Average	Significance test
<Sludge-fertilizer-application plot (AP)>							
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.58	0.58	0.59	0.58	0.58	Significance ^{e)}
0.1 mol/L HCl-Cd ^{b)}	mg/kg	0.33	0.31	0.34	0.34	0.33	Significance
pH (H ₂ O) ^{c)}		6.0		5.9			
EC ^{d)}	mS/cm	0.14		0.14			
<Standard plot (SP)>							
Total-Cd ^{a)}	mg/kg	0.41	0.43	0.42	0.42	0.42	
0.1 mol/L HCl-Cd ^{b)}	mg/kg	0.20	0.20	0.21	0.20	0.20	
pH (H ₂ O) ^{c)}		6.1		6.2			
EC ^{d)}	mS/cm	0.08		0.07			

a) Content in the dry matter

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

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

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

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

3) 跡地土壌中のカドミウムの推移

(1) 跡地土壌の全カドミウム濃度

跡地土壌の全カドミウム濃度の推移を Table 10 に示した。また、0.1 mol/L HCl-Cd 濃度の推移とともに Figure 6-1 (汚泥肥料施用区), Figure 6-2 (標準区) に示した。

汚泥肥料施用区及び標準区の全カドミウム濃度の推移について傾向を把握するため、それぞれの処理区における、1 年目夏作からの経過月 (夏作から次の夏作までの間隔は 12 ヶ月とした) に対する全カドミウム濃度の線形単回帰分析を行い (単回帰式の分散分析表の p 値により評価した (両側有意水準 5 %) (Table 10)). 2020 年夏作跡地までの汚泥肥料施用区は上昇傾向 ($p=3.00 \times 10^{-4}$) が認められ、標準区は下降傾向 ($p=1.42 \times 10^{-4}$) が認められた。

汚泥肥料施用区及び標準区の全カドミウム濃度を比較したところ、調査した 1 年目夏作から汚泥肥料施用区が標準区より有意に高くなっており、その差は 2012 年夏作以降、顕著なものとなり以後同様の結果が続いている。これは、汚泥肥料施用区は汚泥肥料由来のカドミウムの供給量が、作物体の収穫による土壌中カドミウムの圃場外への持ち出し量よりも多いため、カドミウムが蓄積する傾向にあるが、標準区は肥料由来のカドミウムの供給がないことを示している。

Table 10 Changes in the total-Cd concentration^{a)} of soil after harvest

Year	Season	Test Crops	Ap ^{b)} (mg/kg)	SP ^{c)} (mg/kg)	Significance test (difference between the processing)	p-value of single regression analysis ^{d)}	
						Ap ^{b)}	SP ^{c)}
1st	Summer	Carrot	0.51 (0.02) ^{e)}	0.48 (0.03)	Significance ^{f)}	—	—
2nd	Summer	Spinach	0.52 (0.01)	0.49 (0.03)	Significance	—	—
3rd	Summer	Turnip	0.51 (0.02)	0.48 (0.02)	Significance	—	—
4th	Summer	Carrot	0.52 (0.02)	0.46 (0.03)	Significance	—	—
5th	Summer	Carrot	0.53 (0.01)	0.46 (0.03)	Significance	—	—
6th	Summer	Carrot	0.57 (0.03)	0.47 (0.03)	Significance	$p < 0.05^g)$	0.16
7th	Summer	Carrot	0.57 (0.01)	0.46 (0.01)	Significance	$p < 0.01$	0.06
8th	Summer	Carrot	0.54 (0.00)	0.45 (0.02)	Significance	$p < 0.05$	$p < 0.05$
9th	Summer	Carrot	0.61 (0.01)	0.46 (0.01)	Significance	$p < 0.01$	$p < 0.05$
10th	Summer	Carrot	0.58 (0.03)	0.41 (0.03)	Significance	$p < 0.01$	$p < 0.01$
11th	Summer	Carrot	0.58 (0.00)	0.42 (0.00)	Significance	$p < 0.01$	$p < 0.01$
12th	Summer	Carrot	0.58 (0.01)	0.42 (0.01)	Significance	$p < 0.01$	$p < 0.01$

a) Content in the drying soil

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

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

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

f) It was significantly different for processing examination section

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

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

(2) 跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd の推移

跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd の推移を Table 11 に示した。また，全カドミウム濃度の推移とともに Figure 6-1 (汚泥肥料施用区)，Figure 6-2 (標準区) に示した。

汚泥肥料施用区及び標準区の 0.1 mol/L HCl-Cd の推移について傾向を把握するため，それぞれの処理区における試験開始時からの経過月（各試験の間隔は 6 ヶ月とした）に対する 0.1 mol/L HCl-Cd の線形単回帰分析を行った（単回帰式の分散分析表の p 値により評価，両側有意水準 5 %）(Table 11)。12 年目夏作跡地までの汚泥肥料施用区の回帰は有意となり，上昇傾向が認められた ($p=5.4 \times 10^{-4}$)。10 年目夏作までの各採取時期時点における汚泥肥料施用区の回帰は有意でなく一定で推移している傾向であったが，直近 2 回（11 年目冬作及び 12 年目夏作）の分析値が高い値を示し，上昇に転じた。

一方，標準区では，3 年目冬作以降，11 年目冬作までの各採取時期時点における回帰は有意となり下降傾向が認められていたが，12 年目夏作を含めた回帰は有意でなく一定で推移している傾向となった。これは跡地土壌の 0.1 mol/L HCl-Cd 濃度が 11 年目冬作 0.20 mg/kg，12 年目夏作 0.20 mg/kg と直近 2 回の分析値が他の採取時期における分析値と比較して高い値を示したことによる。

また，高い値を示した 11 年目冬作 0.20 mg/kg，12 年目夏作の土壌の pH は上記 Table 7，Table 9 に示したとおり，汚泥肥料施用区 pH 5.9～6.1，標準区 pH 6.1～6.2 と過去と比較し，低い値であった。

Table 11 Changes in the 0.1 mol/L HCl-Cd concentration^{a)} of soil after harvest

Year	Season	Test Crops	Ap ^{b)}		SP ^{c)}		Significance test (difference between the processing)	P-value of single regression analysis ^{d)}	
			(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)		Ap ^{b)}	SP ^{c)}
—	Start	—	0.19 (0.01) ^{e)}	0.20 (0.02)			N.S. ^{f)}	—	—
1st	Summer	Carrot	0.21 (0.01)	0.21 (0.02)			N.S.	—	—
1st	Winter	Spinach	0.20 (0.003)	0.18 (0.01)			Pending ^{g)}	—	—
2nd	Summer	Spinach	0.19 (0.01)	0.17 (0.02)			Pending	—	—
2nd	Winter	Qing geng cai	0.18 (0.02)	0.18 (0.01)			N.S.	0.55	0.20
3rd	Summer	Turnip	0.19 (0.004)	0.18 (0.01)			Pending	0.41	0.11
3rd	Winter	Spinach	0.20 (0.01)	0.17 (0.01)			Significance ^{h)}	0.63	< 0.05
4th	Summer	Carrot	0.19 (0.005)	0.15 (0.01)			Significance	0.41	< 0.01
4th	Winter	Spinach	0.21 (0.01)	0.17 (0.01)			Significance	0.98	< 0.01
5th	Summer	Carrot	0.20 (0.004)	0.16 (0.01)			Significance	0.89	< 0.01
5th	Winter	Spinach	0.22 (0.01)	0.16 (0.004)			Significance	0.34	< 0.01
6th	Summer	Carrot	0.20 (0.01)	0.15 (0.005)			Significance	0.30	< 0.01
6th	Winter	Spinach	0.21 (0.01)	0.15 (0.003)			Pending	0.17	< 0.01
7th	Summer	Carrot	0.15 (0.01)	0.11 (0.005)			Significance	0.80	< 0.01
7th	Winter	Spinach	0.16 (0.01)	0.11 (0.001)			Pending	0.29	< 0.01
8th	Summer	Carrot	0.19 (0.02)	0.12 (0.005)			Pending	0.30	< 0.01
8th	Winter	Spinach	0.17 (0.01)	0.11 (0.002)			Significance	0.16	< 0.01
9th	Summer	Carrot	0.21 (0.002)	0.14 (0.004)			Significance	0.45	< 0.01
9th	Winter	Spinach	0.27 (0.004)	0.17 (0.005)			Significance	0.51	< 0.01
10th	Summer	Carrot	0.27 (0.01)	0.17 (0.003)			Significance	0.15	< 0.01
10th	Winter	Spinach	0.27 (0.01)	0.16 (0.01)			Significance	< 0.05	< 0.01
11th	Summer	Carrot	0.25 (0.003)	0.15 (0.002)			Significance	< 0.05	< 0.01
11th	Winter	Spinach	0.32 (0.01)	0.20 (0.01)			Significance	< 0.01	< 0.05
12th	Summer	Carrot	0.33 (0.01)	0.20 (0.003)			Significance	< 0.01	0.20

a) Content in drying soil

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

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

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

f) N.S. was not significantly different for processing examination section

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

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

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

h) Significance was significantly different for processing examination section

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

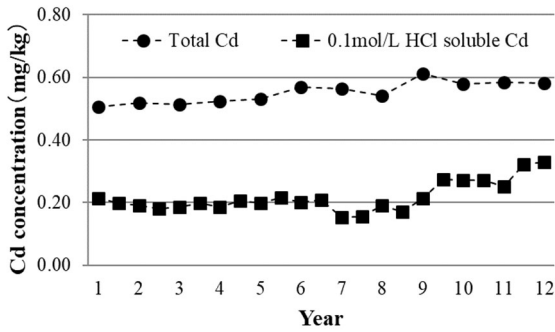


Figure 6-1 Cd concentration of cultivated soil (AP: Sludge-fertilizer-application plot)

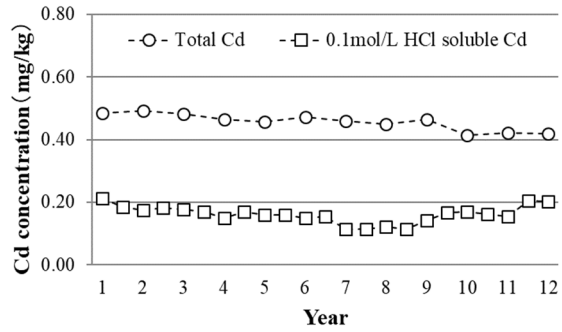


Figure 6-2 Cd concentration of cultivated soil (SP: Standard plot)

(3) カドミウムの負荷量，持ち出し量及び蓄積量

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

汚泥肥料施用区では，各試験において，カドミウム負荷量と比較して持ち出し量が少ないことから土壌のカドミウム収支がプラスとなるため，汚泥肥料の連用によるカドミウム負荷量の増加に伴って土壌蓄積するカドミウムが高まる傾向であることが考えられる. 実測値においても跡地土壌の全カドミウム濃度の増加傾向が認められている. 過去 23 作の試験における汚泥肥料施用区のカドミウム負荷量は 131.7 mg/試験区 (329 g/ha)，カドミウム蓄積濃度 (カドミウム蓄積量と試験区土壌量から算出した理論上の土壌中カドミウムの上昇濃度) は 0.314 mg/kg となった.

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

Year	Season	Test Crops	Sludge-fertilizer-application plot (AP)				Standard plot (SP)			
			Quantity of cadmium ^{a)}			Concentration of cadmium accumulation ^{e)}	Quantity of cadmium ^{a)}			Concentration of cadmium accumulation ^{e)}
			Load ^{b)}	Removal ^{c)}	Accumulation ^{d)}		Load ^{b)}	Removal ^{c)}	Accumulation ^{d)}	
(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/kg)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/plot)	(mg/kg)			
1st	Summer	Carrot	4.84	0.39	4.45	0.011	0	0.37	-0.37	-0.001
1st	Winter	Spinach	4.40	1.18	3.22	0.008	0	1.34	-1.34	-0.003
2nd	Summer	Spinach	3.30	0.72	2.58	0.006	0	0.96	-0.96	-0.002
2nd	Winter	Qing geng cai	2.64	0.21	2.43	0.006	0	0.21	-0.21	-0.0005
3rd	Summer	Turnip	3.30	0.17	3.13	0.007	0	0.20	-0.20	-0.0005
3rd	Winter	Spinach	7.04	0.66	6.37	0.015	0	0.56	-0.56	-0.001
4th	Summer	Carrot	7.28	0.73	6.55	0.016	0	0.68	-0.68	-0.002
4th	Winter	Spinach	7.28	0.75	6.53	0.016	0	0.75	-0.75	-0.002
5th	Summer	Carrot	7.28	0.46	6.82	0.016	0	0.34	-0.34	-0.001
5th	Winter	Spinach	7.28	0.73	6.55	0.016	0	0.53	-0.53	-0.001
6th	Summer	Carrot	7.28	0.38	6.90	0.016	0	0.29	-0.29	-0.001
6th	Winter	Spinach	7.28	0.65	6.63	0.016	0	0.42	-0.42	-0.001
7th	Summer	Carrot	7.28	0.36	6.92	0.016	0	0.26	-0.26	-0.001
7th	Winter	Spinach	7.28	0.71	6.57	0.016	0	0.59	-0.59	-0.001
8th	Summer	Carrot	7.28	0.21	7.07	0.017	0	0.18	-0.18	-0.0004
8th	Winter	Spinach	7.28	0.60	6.68	0.016	0	0.57	-0.57	-0.001
9th	Summer	Carrot	7.28	0.28	7.00	0.017	0	0.24	-0.24	-0.001
9th	Winter	Spinach	7.28	0.51	6.77	0.016	0	0.38	-0.38	-0.001
10th	Summer	Carrot	7.28	0.33	6.95	0.017	0	0.20	-0.20	-0.0005
10th	Winter	Spinach	5.38	1.00	4.38	0.010	0	0.51	-0.51	-0.001
11th	Summer	Carrot	5.38	0.40	4.98	0.012	0	0.28	-0.28	-0.001
11th	Winter	Spinach	5.38	0.67	4.71	0.011	0	0.53	-0.53	-0.001
12th	Summer	Carrot	8.08	0.57	7.52	0.018	0	0.17	-0.17	-0.0004
Total			144.38	12.67	131.71	0.314	0.000	10.568	-10.57	-0.025

a) It show every test plot 4 m²

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

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

d) Quantity of cadmium accumulation to the soil = b) - c)

e) Concentration of cadmium accumulation to the soil = d) / Amount of test plot soil (420 kg)

跡地土壤の全カドミウム濃度について、1年目夏作跡地からの実測値と理論値の推移を Table 13 及び Figure 7 に示した。汚泥肥料施用区及び標準区の全カドミウム濃度の理論値は、1年目夏作跡地土壤の実測値を起点として、Table 12 で算出したカドミウム蓄積濃度を累積し算出した。標準区は実測値と理論値がほぼ一致して推移していた。一方、汚泥肥料施用区は、理論値と比較して実測値の方が低い傾向で推移していた。

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

Year	Season	Test Crops	Actual measurement		Theoretical value	
			AP ^{b)} (mg/kg)	SP ^{c)} (mg/kg)	AP ^{b)d)} (mg/kg)	SP ^{c)e)} (mg/kg)
1st	Summer	Carrot	0.51 (0.02) ^{f)}	0.48 (0.03)	0.51	0.48
2nd	Summer	Spinach	0.52 (0.01)	0.49 (0.03)	0.52	0.47
3rd	Summer	Turnip	0.51 (0.00)	0.48 (0.00)	0.53	0.47
4th	Summer	Carrot	0.52 (0.02)	0.46 (0.02)	0.56	0.47
5th	Summer	Carrot	0.53 (0.00)	0.46 (0.00)	0.60	0.47
6th	Summer	Carrot	0.57 (0.02)	0.47 (0.03)	0.63	0.46
7th	Summer	Carrot	0.57 (0.00)	0.46 (0.00)	0.66	0.46
8th	Summer	Carrot	0.54 (0.01)	0.45 (0.03)	0.69	0.46
9th	Summer	Carrot	0.61 (0.00)	0.46 (0.00)	0.73	0.46
10th	Summer	Carrot	0.58 (0.03)	0.41 (0.03)	0.76	0.46
11th	Summer	Carrot	0.58 (0.00)	0.42 (0.00)	0.78	0.46
12th	Summer	Carrot	0.58 (0.01)	0.42 (0.01)	0.81	0.45

a) Total-Cd concentration in the drying soil

b) Sludge-fertilizer-application plot

c) Standard plot

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

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

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

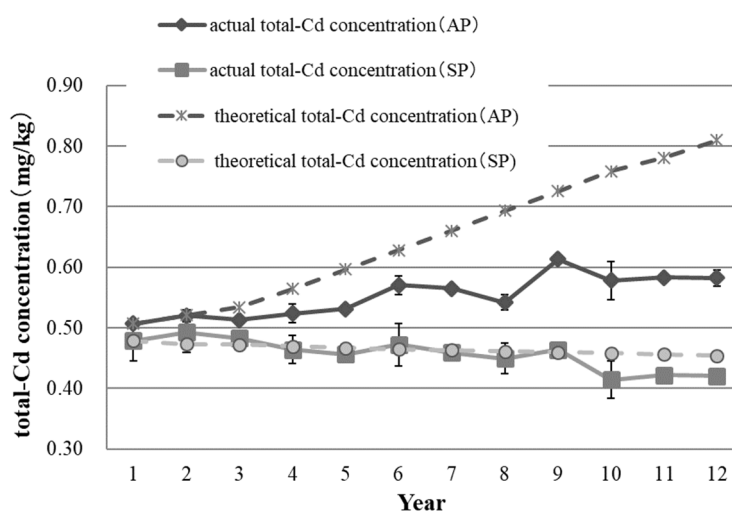


Figure 7 Changes in the actual total-Cd concentration and the theoretical total-Cd concentration of soil after harvest

5. まとめ

肥料の有効性及び安全の確保に必要な課題に関する調査研究として、汚泥肥料の連用施用試験を2009年より行っており、汚泥肥料施用区及び汚泥肥料無施用の標準区の2試験区に、11年目冬作としてホウレンソウを、12年目夏作としてニンジンを栽培し、土壌中のカドミウム濃度の変化及び作物体中のカドミウム濃度を確認した。11年目冬作ホウレンソウ現物中のカドミウム濃度は、汚泥肥料区で0.055 mg/kg、標準区で0.042 mg/kgであり、Codex 基準値(0.2 mg/kg)に対して低い結果であった。また、ホウレンソウ乾物中のカドミウム濃度は汚泥肥料施用区が標準区に対して有意に高い結果であった。

ニンジン現物中のカドミウム濃度は、汚泥肥料施用区で葉部0.051 mg/kg、根部0.041 mg/kg、標準区で葉部0.021 mg/kg、根部0.017 mg/kgであった。可食部である根部の濃度はCodex 基準値(0.1 mg/kg)に対して低い結果であった。

また、ニンジン乾物中のカドミウム濃度について各区を比較したところ、葉部及び根部の両部位で汚泥肥料施用区が有意に高い結果であった。12年目夏作ニンジンの跡地土壌の全カドミウム濃度は汚泥肥料施用区が標準区に比べて有意に高かった。汚泥肥料施用区においてニンジンの乾物中カドミウム濃度は葉部0.410 mg/kg、根部0.416 mg/kgであり、前年(11年目)の葉部0.268 mg/kg、根部0.206 mg/kgと比較すると急激に上昇していた。

1年目から12年目の跡地土壌中の全カドミウム濃度及び0.1 mol/L HCl-Cd濃度の推移を解析したところ、汚泥肥料施用区の全カドミウム濃度は増加傾向を示しており、汚泥肥料に含有するカドミウムが土壌に蓄積していることが示された。一方で、汚泥肥料施用区の0.1 mol/L HCl-Cdについては10年目夏作までは一定に推移する傾向が示されていたが、10年目冬作以降は増加傾向を示しており、特に直近2作(11年目冬作及び12年目夏作)の分析値が高い値を示していた。汚泥肥料に含有するカドミウムは土壌中では有機物等と結合¹⁷⁾することにより不溶化していると考えられている。しかしながら、汚泥肥料施用区において10年目夏作まで6.4付近で安定していた跡地土壌のpHが、11年冬作6.1、12年目夏作6.0と下がったことにより、カドミウムが0.1 mol/L HClに溶ける状態となったため高い値を示したと考えられる。

標準区の全カドミウム濃度は減少傾向であり、0.1 mol/L HCl-Cdについては11年目冬作までは減少傾向を示していたが、12年目夏作を含めた傾向は一定推移に変化した。標準区の跡地土壌においても、11年目夏作まで6.4付近で安定していたpHが、11年目冬作6.2、12年目夏作6.2と下がったことにより、汚泥肥料区と同じ事由からカドミウムが0.1 mol/L HClに溶ける状態となったと考えた。そのため、今回「横ばいで推移」との解析結果が得られたが、pHの低下がなければ前年までの報告どおり、標準区の全カドミウムは施肥によるカドミウムの供給がないため減少し、また、作物体は0.1 mol/L HCl-Cdを持ち出すため、土壌中の0.1 mol/L HCl-Cdも減少すると考えられた。

試験で施肥した汚泥肥料由来のカドミウム投入量である負荷量及び作物を栽培したことによるカドミウムの持ち出し量から、土壌に蓄積されているはずのカドミウムの量を算出したところ、標準区は実測値と理論値がほぼ一致して推移していた。一方、汚泥肥料施用区は、理論値と比較して実測値の方が低い傾向で推移していた。これは、後藤ら¹⁸⁾や過去の調査結果¹⁹⁾から、土壌中のカドミウムの水平方向への移行が認められたことから耕耘により一部のカドミウムが作土に留まらないことによるものと考えられた。

これまでの汚泥肥料の試験区への連用の結果、収穫された作物のCd濃度及び土壌へのCdの蓄積について当分は問題ないと言える。しかしながら、作物や土壌への影響について明確な傾向が把握されたとは言えず、今後もモニタリングしていく必要がある。

文 献

- 1) 農林水産省告示:肥料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, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1010 号(2021)
- 2) 農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課 肥料企画班:汚泥肥料の規制のあり方に関する懇談会報告書 平成 21 年 3 月, (2009)
< http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_hiryo/odei_hiryo/pdf/honnbun.pdf >
- 3) 舟津正人, 阿部文浩, 添田英雄:カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における汚泥肥料連用の影響, 肥料研究報告, **4**, 74-84, (2011)
- 4) 松尾信吾, 浅尾直紀, 村山和晃, 青山恵介, 小塚健志, 阿部文浩:汚泥肥料の連用によるカドミウム等の土壌への蓄積, 作物への吸収試験(継続)－2018年冬作・2019年夏作－, 肥料研究報告, **10**, 146-167, (2020)
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2020.pdf >
- 6) 埼玉県ホームページ:主要農作物施肥基準 平成 25 年 3 月
< <http://www.pref.saitama.lg.jp/a0903/sehikijun.html> >
- 7) 千葉県 農林水産技術推進会議農林部会:肥料価格高騰に伴う土壌管理・施肥適正化指導指針 平成 20 年 9 月, **20**, (2008)
< <http://www.pref.chiba.lg.jp/ninaite/network/h21-fukyuu/documents/kakakukoutou.pdf> >
- 8) 栃木県 農作物施肥基準－環境と調和のとれた土づくり・施肥設計の手引き 平成 18 年 1 月, **110**, (2006) < <http://www.pref.tochigi.lg.jp/g04/work/nougyou/keiei-gijyutsu/sehikijun.html> >
- 9) 群馬県 作物別施肥基準及び土壌診断基準 おでい肥料と土壌の重金属
< <http://www.aic.pref.gunma.jp/agricultural/management/technology/soil/01/index.html> >
- 10) 農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課 肥料企画班:汚泥肥料の施用に係る指導実態等に関するアンケート結果(抜粋), (2008)
< http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_hiryo/odei_hiryo/pdf/03_data1.pdf >
- 11) 有機性汚泥の緑農地利用委員会:有機性汚泥の緑農地利用, **183**, 博友社, 東京(1991)
- 12) 農林水産省:地力増進基本指針, 平成 20 年 10 月 16 日
< http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_dozyo/pdf/chi4.pdf >
- 13) Perkin Elmer 社:マイクロ波分解装置取扱説明書, 分解メソッド集, ホウレンソウ
- 14) 財団法人日本土壌協会:土壌, 水質及び植物体分析法, 東京(2001)
- 15) 農林省省令:農用地土壌汚染対策地域の指定要件に係るカドミウムの量の検定の方法を定める省令, 昭和 46 年 6 月 24 日農林省令第 47 号, 最終改正平成 24 年 8 月 6 日環境省令第 22 号(2012)
- 16) 農林水産省ホームページ:コーデックス委員会が策定した国際基準値
< http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_cd/kiziyunti/ >
- 17) 独立行政法人 農業環境技術研究所:農作物中のカドミウム低減対策技術集, 平成 23 年 3 月, 49, (2011)
- 18) 後藤茂子, 林浩昭, 山岸順子, 米山忠克, 茅野充男:下水汚泥コンポストの長期連用に伴う重金属の土壌への蓄積と水平方向への移行, 日本土壌肥料学雑誌, **73**(4), 391-396, (2002)

- 19) 阿部進, 鈴木時也, 田中雄大, 阿部文浩, 橋本良美, 廣井利明, 加島信一:カドミウムの土壌蓄積及び作物吸収における汚泥肥料連用の影響(継続)－2014年冬作・2015年夏作－, 肥料研究報告, **8**, 77-108, (2016)

Effect of Continuous Application of Sludge Fertilizer on Cadmium Absorption of the Crop and Accumulation of Cadmium in the Soil (Continued Report) - Winter 2019 and Summer 2020 -

ASAO Naoki¹, MURAYAMA Kazuaki², MATSUO Shingo³,
KOZUKA Kenji⁴, ABE Fumihiko⁵

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) Agricultural Chemicals Inspection Station

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

⁴ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Kobe Regional Center

⁵ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Nagoya Regional Center

We have been researching Cd absorption of the crop and accumulation in the soil used sludge fertilizer since 2009. The soil is composed of the Andosol. We cultivated spinach in winter 2019 and carrot in summer 2020. Those crops were cultivated in the standard plot (SP) and the sludge-fertilizer-application plot (AP). In the SP, we used only chemical reagents for the crops. In the AP, we used 500 kg/10 a in winter 2019 (750 kg/10 a in summer 2020) of the sludge fertilizer and chemical reagents for the crops. The amount of nitrogen, phosphorus and potassium applied to each plot was designed based on the fertilization standard shown on the Saitama prefecture's web site. The concentration of total cadmium in the crop, acid-solubility-Cd in the soil after each of the harvests were measured by the inductivity coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). As a result, the soil in the AP after the harvests has indicated a high concentration of the total-Cd compared with the soil in the SP since summer 2012. The concentration of total-Cd in the soil (from summer 2009 to summer 2020) showed significant increasing trend in the AP. The concentrations of cadmium in each crop harvested (from summer 2009 to summer 2020) in the SP and AP were less than that of the CODEX standard. We consider that it is necessary to be conducted further monitoring of the cadmium-transition in the soil from now on.

Key words sludge fertilizer, continuous application, cadmium

(Research Report of Fertilizer, **14**, 141-161, 2020)

13 2020 年度 全国共通試料を用いた肥料の

外部精度管理試験成績の解析

秋元里乃¹, 義本将之², 平原稔夫³, 天野忠雄⁴,
井上直⁵, 小堀拓也⁶, 沼寄佳奈子¹, 引地典雄⁷

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

1. はじめに

国際的な適合性評価の動きが進む中, わが国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)¹⁾ の要求事項を参考にした分析結果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, 外部精度管理として他機関との分析結果の整合性確認及び外部機関による分析結果の信頼性保証が必須となっており, 試験所は技能試験に参加することで, 分析結果の信頼性保証に努めている.

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, 分析結果の妥当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⁾ による内部品質管理が日常的になりつつあり, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) においても立入検査で収去した肥料の主成分及び有害成分の分析結果の信頼性保証は不可欠である.

しかし, 肥料を基材とした技能試験を開催している第三者機関は現在国内外にないため, 各地域肥料品質保全協議会会員に対して実施していた共通試料による手合わせ分析を全国統一し, 2006 年度より肥料品質保全協議会等の試験所を中心に, 共通の試料を用いた共同試験により試験所間比較を行い, その結果を用いて外部精度管理を行っている. 均質性試験及び共同試験成績については ISO/IEC 17043 (JIS Q 17043)³⁾ を参考に解析し, 2020 年度は液状複合肥料及び鉍さいけい酸質肥料について試料調製をし, 共同試験を実施したのでその結果を報告する.

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料調製

液状複合肥料は, 試料 60 L を容器に入れ, 品質の安定を図るため約 2 ヶ月間保管した. その後, 試料をよく混合してろ過 (6 種ろ紙) し, ポリ容器に一定量ずつ採取し, 1 本当たり約 200 mL 入りの試料 250 本を調製して

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

⁵ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター (現) 農林水産省消費・安全局

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 (現) 名古屋センター

⁷ 公益財団法人日本肥糧検定協会

配付まで常温保管した。

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

表1 混合操作表

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

2) 均質性確認試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁴⁾の均質性確認試験に従い、**2.1)**で調製した鉍さいけい酸質肥料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、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。液状複合肥料については **2.1)**調製工程により均質性が保たれていると考えられることから、均質性確認試験を実施しなかった。

3) 配付

試料番号を付した試料、実施要領及び分析成績報告書を参加試験室に送付した。2020 年度においては、液状複合肥料は 123 試験室、鉍さいけい酸質肥料は 78 試験室が参加した。

3. 共同試験の試験項目及び試験方法

1) 試験項目

液状複合肥料については、窒素全量(T-N)、アンモニア性窒素(A-N)、硝酸性窒素(N-N)、水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)、水溶性苦土(W-MgO)、水溶性マンガン(W-MnO)、水溶性ほう素(W-B₂O₃)、水溶性鉄(W-Fe)、水溶性銅(W-Cu)、水溶性亜鉛(W-Zn)及び水溶性モリブデン(W-Mo)の 12 項目を試験項目とした。また、鉍さいけい酸質肥料については、可溶性けい酸(S-SiO₂)、アルカリ分(AL)及びく溶性苦土(C-MgO)の 3 項目を試験項目とした。

2) 試験方法

肥料等試験法(2020)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) 窒素全量は、肥料等試験法 4.1.1.b(燃焼法)により定量。又は肥料等試験法 4.1.1.c(デバルダ合金ケルダール法)により定量。あるいは窒素全量を含有する原料を使用していないため、肥料等試験法 4.1.1.e(アンモニア性窒素及び硝酸性窒素による算出)により、以下の(2)及び(3)で測定した結果から算出。

- (2) アンモニア性窒素(A-N)は、肥料等試験法 4.1.2.a(蒸留法)により定量.
- (3) 硝酸性窒素(N-N)は、肥料等試験法 4.1.3.a (デバルダ合金-蒸留法)により定量. 又は肥料等試験法 4.1.3.c (フェノール硫酸法)により定量.
- (4) 水溶性りん酸(W-P₂O₅)は、肥料等試験法 4.2.4.a.(バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法)により定量.
- (5) 水溶性加里(W-K₂O)は、肥料等試験法 4.3.3.a(フレイム原子吸光法又はフレイム光度法)により定量.
- (6) 水溶性苦土(W-MgO)は、肥料等試験法 4.6.4.a(フレイム原子吸光法)により定量.
- (7) 水溶性マンガン(W-MnO)は、肥料等試験法 4.7.3.a(フレイム原子吸光法)により定量.
- (8) 水溶性ほう素(W- B₂O₃)は、肥料等試験法 4.8.2.a.(アゾメチン H 法)により定量.
- (9) 水溶性鉄(W-Fe)は、肥料等試験法 4.13.1.a(フレイム原子吸光法)により定量.
- (10) 水溶性銅(W-Cu)は、肥料等試験法 4.10.2.a(フレイム原子吸光法)により定量.
- (11) 水溶性亜鉛(W-Zn)は、肥料等試験法 4.9.2.a(フレイム原子吸光法)により定量.
- (12) 水溶性モリブデン(W-Mo)は、肥料等試験法 4.14.1.a(チオシアン酸ナトリウム吸光光度法)により定量.
- (13) 可溶性けい酸(S-SiO₂)は、肥料等試験法 4.4.1.a(ふっ化カリウム法)により定量.
- (14) アルカリ分(AL)は、肥料等試験法 4.5.4.a(エチレンジアミン四酢酸塩法(以下「EDTA 法」という)により定量. 又は可溶性石灰(S-CaO)(肥料等試験法 4.5.2.a)及び可溶性苦土(S-MgO)(肥料等試験法 4.6.1.a)を測定し、肥料等試験法 4.5.4.b(可溶性石灰及び可溶性苦土よりの算出)の(2)により算出.
- (15) 可溶性苦土(C-MgO)は、肥料等試験法 4.6.3.a(フレイム原子吸光法)により定量.

4. 統計解析方法及び試験成績の評価方法

1) 報告された試験成績の評価

(1) ロバスト法による z スコアの求め方

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

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

標準化されたロバスト標準偏差(NIQR)を(b)式により算出した. 正規分布の場合、NIQR と標準偏差は一致する.

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

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

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

(2) z スコアによる評価

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

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

2) 試験成績全体を評価する統計量

各成分の報告された試験成績全体を評価するため、次の統計量を求めた。

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

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

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

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

- (9) 肥料等試験法で共同試験の精度の目安として示されている室間再現相対標準偏差 ($CRSD_R$)。

肥料等試験法において、共同試験の精度は、 $CRSD_R$ の値の 2 倍まで許容している。この精度の目安は、水分等の経験的分析法には適用されない。

5. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

2.2) において 10 試料を 2 点併行で分析した分析結果の総平均値 (\bar{x}) 及びその結果についての一元配置分散分析から得られた統計量を用いて算出した併行標準偏差 (s_r)、試料間標準偏差 (s_{bb})、併行精度を含む試料間標準偏差 (s_{b+r}) を表 2 に示した。更に、肥料等試験法に示されている室間再現精度の目安 ($CRSD_R$) 及びそれらから算出 (式 1) した推定室間再現標準偏差 ($\hat{\sigma}_R$) を表 2 に示した。

均質性の判定は、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁴⁾の手順を参考に実施した。まず、分析結果の等分散性を確認するため、分析結果について Cochran の検定を実施した。その結果、すべての成分において外れ値は認められなかったため、これらの分析結果について一元配置分散分析を実施した。次に、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの判定式 (式 2) を用いて均質性の判定を行った。その結果、すべての成分において判定式 (式 2) を満たしていたことから、分析用試料は均質であることを確認した。なお、参考の

ため、式 3 によって併行精度を含む試料間標準偏差(s_{b+r})を算出したところ、いずれの成分も $\hat{\sigma}_R$ と比較して十分に小さい値であった。

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

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

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

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$: 肥料等試験法⁵⁾に示されている室間再現精度(室間再現相対標準偏差(%))の目安

\bar{x} : 総平均値

s_r : 併行標準偏差

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_{bb} : 試料間標準偏差

s_{b+r} : 併行精度を含む試料間標準偏差

表 2 均質性確認試験の結果

肥料の種類	分析成分	試料数	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	s_r ^{c)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{d)} (%) ^{b)}	s_{b+r} ^{e)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{f)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{g)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}
鉰さいけい酸質肥料	C-MgO	10	6.93	0.01	0.03	0.03	4	0.28	0.08

a) 総平均定量値(試料数×2点併行分析)

b) 質量分率

c) 併行標準偏差

d) 試料間標準偏差

e) 併行精度を含む試料間標準偏差

f) 肥料等試験法で示されている室間再現精度(室間再現相対標準偏差)の目安

g) 室間再現精度の目安から算出した推定室間再現標準偏差

h) 均質性の判定(s_{bb} の評価)のためのパラメータ

2) 試験成績の解析結果

4.2) (1)～(2)の試験室数及びzスコアで評価された各試験室数及びその割合を表3に示した。各成分の試験成績で「満足($|z| \leq 2$)」との評価を受けた試験室の割合は、液状複合肥料中の水溶性ほう素が93%と最も高く、液状複合肥料中の窒素全量が79%と最も低い割合を示した。また、「不満足($|z| \geq 3$)」と評価を受けた試験室の割合は、液状複合肥料の硝酸性窒素が13%と最も高い結果であった。昨年度は、「満足」と評価された試験室の割合は昨年度が77%～98%、「不満足」と評価された試験室の割合は昨年度が2%～15%であったので、「満足」と評価を受けた試験室の割合は昨年度と同程度であり、また、作業工程が多く、不確かさが最も多くなると考えられる硝酸性窒素において「不満足」と評価を受けた試験室の割合も、昨年度よりも多くはなかったことから、全体としての分析技術のレベルは維持されていた。

4.2) (3)～(9)で求めた統計量を表4に示した。多くの成分で全体のMeanはMedianとほぼ一致したが、外れ値の影響を受け、一部の試験項目でMeanとMedianの差が認められ、全体の標準偏差sは、NIQRと比較してほとんどが大きな値を示した。RSD_{rob}と各試験成分の濃度レベルにおけるCRSD_R及びCRSD_Rの2倍の値との関係を図1に示した。硝酸性窒素についてのみCRSD_Rを超えたが、肥料等試験法で精度として許容されている範囲内であった。その他の試験成分はいずれも、RSD_{rob}はCRSD_Rの範囲内であった。

また、本年度8試験室以上報告のあった試験方法別のMedian、NIQR、RSD_{rob}及びCRSD_R等を表5に示した。

表3 zスコアによる試験成績の評価

試験項目	参加 試験 室数	$ z \leq 2$ ^{a)}		$2 < z < 3$ ^{b)}		$3 \leq z $ ^{c)}	
		試験 室数	割合 (%)	試験 室数	割合 (%)	試験 室数	割合 (%)
(液状複合肥料)							
T-N	108	85	79	12	11	11	10
A-N	114	96	84	7	6	11	10
N-N	106	86	81	6	6	14	13
W-P ₂ O ₅	118	102	86	8	7	8	7
W-K ₂ O	118	96	81	9	8	13	11
W-MgO	114	97	85	5	4	12	11
W-MnO	106	90	85	5	5	11	10
W-B ₂ O ₃	94	87	93	5	5	2	2
W-Fe	72	61	85	3	4	8	11
W-Cu	78	67	86	8	10	3	4
W-Zn	79	67	85	6	8	6	8
W-Mo	47	40	85	2	4	5	11
(鉱さいけい酸質肥料)							
S-SiO ₂	56	46	82	7	13	3	5
AL	73	63	86	6	8	4	5
S-CaO	63	55	87	3	5	5	8
S-MgO	63	56	89	2	3	5	8
C-MgO	75	64	85	4	5	7	9

- a) zスコアによる評価が満足 ($|z| \leq 2$)となった試験室数及びその割合(%)
- b) zスコアによる評価が疑わしい ($2 < |z| < 3$)となった試験室数及びその割合(%)
- c) zスコアによる評価が不満足 ($3 \leq |z|$)となった試験室数及びその割合(%)

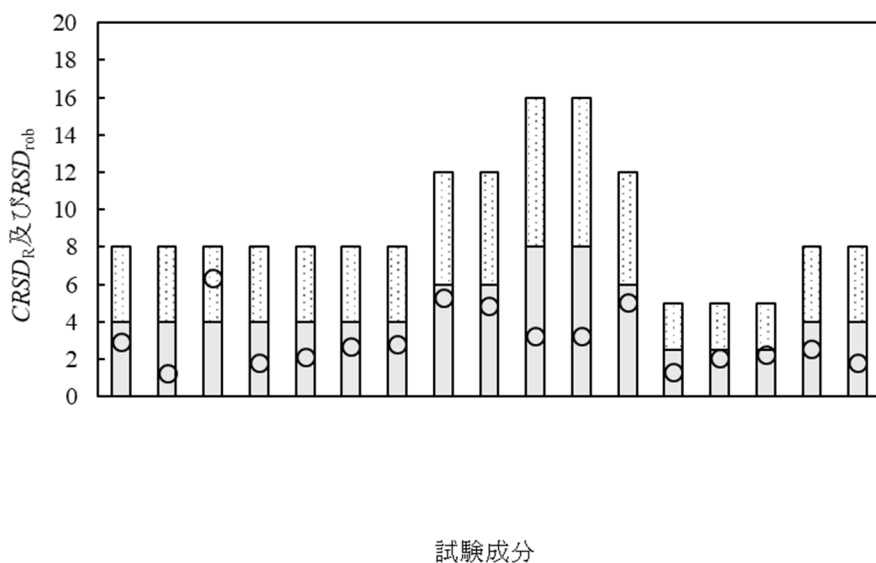


図1 各試験成績のCRSD_RとRSD_{rob}の関係
 □ 2×CRSD-R □ CRSD-R ○ RSD-rob

表4 共同試験成績の統計量

試験項目	試験室数	Mean ^{a)} (%) ⁱ⁾	Median ^{b)} (%) ⁱ⁾	$U_{95\%}$ ^{c)} (%) ⁱ⁾	s ^{d)} (%) ⁱ⁾	$NIQR$ ^{e)} (%) ⁱ⁾	RSD_{rob} ^{f)} (%)	$CRSD_R$ ^{g)} (%)	$2 \times CRSD_R$ ^{h)} (%)
(液状複合肥料)									
T-N	108	4.57	4.57	0.03	0.31	0.13	2.9	4	8
A-N	114	2.40	2.41	0.006	0.08	0.03	1.2	4	8
N-N	106	2.20	2.20	0.03	0.33	0.14	6.3	4	8
W-P ₂ O ₅	118	2.82	2.82	0.01	0.09	0.05	1.8	4	8
W-K ₂ O	118	2.44	2.43	0.01	0.16	0.05	2.1	4	8
W-MgO	114	1.68	1.67	0.008	0.17	0.044	2.7	4	8
W-MnO	106	1.32	1.32	0.007	0.12	0.037	2.8	4	8
W-B ₂ O ₃	94	0.238	0.238	0.003	0.015	0.013	5.3	6	12
W-Fe	72	0.218	0.217	0.002	0.023	0.011	4.9	6	12
W-Cu	78	0.056	0.056	0.0004	0.0029	0.0018	3.3	8	16
W-Zn	79	0.059	0.059	0.0004	0.0064	0.0019	3.3	8	16
W-Mo	47	0.229	0.227	0.003	0.018	0.011	5.1	6	12
(鉱さいけい酸質肥料)									
S-SiO ₂	56	34.96	35.05	0.1	1.0	0.5	1.3	2.5	5
AL	73	52.41	52.07	0.3	2.7	1.1	2.1	2.5	5
S-CaO	63	42.72	42.54	0.2	1.4	1.0	2.2	2.5	5
S-MgO	63	6.99	6.75	0.04	1.84	0.17	2.6	4	8
C-MgO	75	6.76	6.75	0.03	0.36	0.12	1.8	4	8

a) 全体の平均値(報告桁数)

b) 全体の中央値(報告桁数)

c) 全体の中央値の不確かさ

d) 全体の標準偏差

e) ロバスト標準偏差

f) ロバスト相対標準偏差($NIQR$ /メディアンを%表示したもの)

g) 肥料等試験法で精度の目安として推奨されている室間再現相対標準偏差

h) 肥料等試験法で精度として許容されている室間再現相対標準偏差

i) 質量分率

表5 試験方法別の共同試験成績の統計量

試験項目	試験方法	報告試験室数	Median ^{a)} (%) ^{f)}	NIQR ^{b)} (%) ^{f)}	RSD _{rob} ^{c)} (%)	CRSD _R ^{d)} (%)	2×CRSD _R ^{e)} (%)
(液状複合肥料)							
T-N	燃焼法	11	4.57	0.09	1.9	4	8
	デバルダ合金-ケルダール法	37	4.48	0.14	3.1	4	8
	デバルダ合金-蒸留法	32	4.58	0.07	1.5	4	8
	算出(AN+NNフェノール硫酸法)	16	4.66	0.04	0.8	4	8
A-N	蒸留法	112	2.41	0.03	1.2	4	8
N-N	フェノール硫酸法	29	2.24	0.06	2.8	4	8
	デバルダ合金-ケルダール法	19	2.11	0.06	3.0	4	8
	デバルダ合金-蒸留法	47	2.17	0.06	2.9	4	8
W-P ₂ O ₅	バナドモリブデン酸アンモニウム法	113	2.82	0.06	2.2	4	8
W-K ₂ O	フレイム原子吸光法	86	2.43	0.04	1.8	4	8
	フレイム光度法	24	2.41	0.04	1.8	4	8
W-MgO	フレイム原子吸光法	102	1.67	0.04	2.2	4	8
	ICP-OES法	10	1.70	0.02	1.4	4	8
W-MnO	フレイム原子吸光法	90	1.31	0.03	2.3	4	8
	ICP-OES法	13	1.33	0.02	1.7	4	8
W-B ₂ O ₃	アゾメチンH法	79	0.24	0.01	5.3	6	12
	ICP-OES法	15	0.24	0.01	3.5	6	12
W-Fe	フレイム原子吸光法	57	0.22	0.01	5.0	6	12
	ICP-OES法	14	0.22	0.00	2.2	6	12
W-Cu	フレイム原子吸光法	65	0.06	0.00	3.1	8	16
	ICP-OES法	13	0.06	0.00	3.1	8	16
W-Zn	フレイム原子吸光法	66	0.06	0.00	2.8	8	16
	ICP-OES法	13	0.06	0.00	2.6	8	16
W-Mo	チオシアン酸ナトリウム吸光光度	29	0.23	0.01	3.5	6	12
	ICP-OES法	16	0.22	0.01	3.4	6	12
(鉱さいけい酸質肥料)							
S-SiO ₂	ふっ化カリウム法	39	35.04	0.39	1.1	2.5	5
	過塩素酸法	15	35.22	0.48	1.4	2.5	5
AL	EDTA法	10	52.20	0.64	1.2	2.5	5
	フレイム原子吸光法	58	51.99	1.09	2.1	2.5	5
S-CaO	フレイム原子吸光法	58	42.49	0.87	2.0	2.5	5
S-MgO	フレイム原子吸光法	58	6.75	0.17	2.5	4	8
C-MgO	フレイム原子吸光法	67	6.73	0.12	1.7	4	8

a) 全体の中央値

b) ロバスト標準偏差

c) ロバスト相対標準偏差

d) 肥料等試験法で精度の目安として推奨されている
室間再現相対標準偏差

e) 肥料等試験法で精度として許容されている室間再現相対標準偏差

f) 質量分率

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うち、同一試料・同様の抽出方法で異なる成分(液状複

合肥料中の W-P₂O₅ と W-K₂O 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 (液状複合肥料中の W-K₂O と W-MgO 等) の z スコアの関係を図 2-1~図 2-7 に示した.

更に, z スコアが同じ値となる点線を書き加えた. この直線に平行方向のプロットは抽出方法又は測定方法において系統的な偏りの要因があると考えられる. 図示し比較したいずれにおいても系統的な偏りは認められず, 測定において単発的に偏りが生じている試験室があった. なお, 極端に外れたデータを表示すると, 大多数のプロットの傾向を視認できなくなるため, 表示範囲を z スコア 20 以内としたが, それを超えるデータにおいても系統的な偏りは認められなかった.

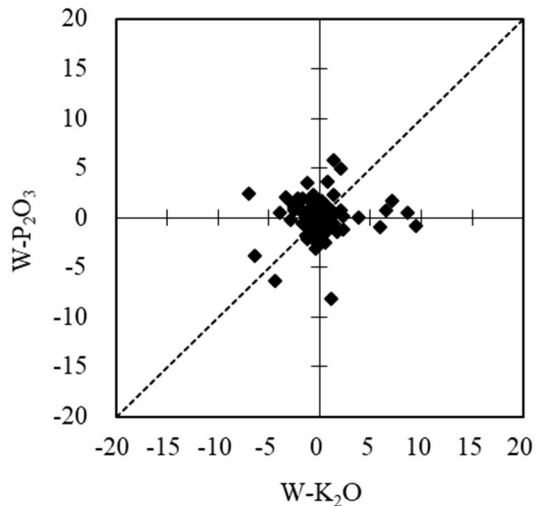


図2-1 液状複合肥料中の W-K₂O—
W-P₂O₃の z スコアの関係

◆ 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)

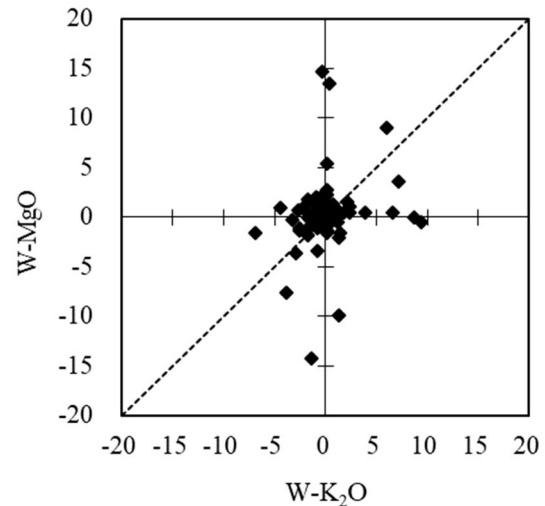


図2-2 液状複合肥料中の W-K₂O—
W-MgOの z スコアの関係

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

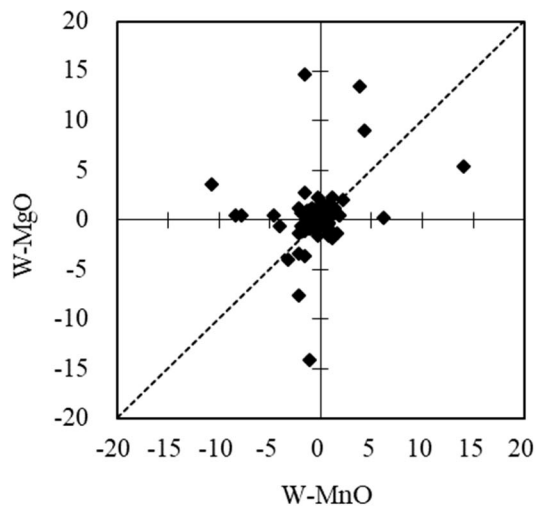


図2-3 液状複合肥料中の W-MnO—
W-MgOの z スコアの関係

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

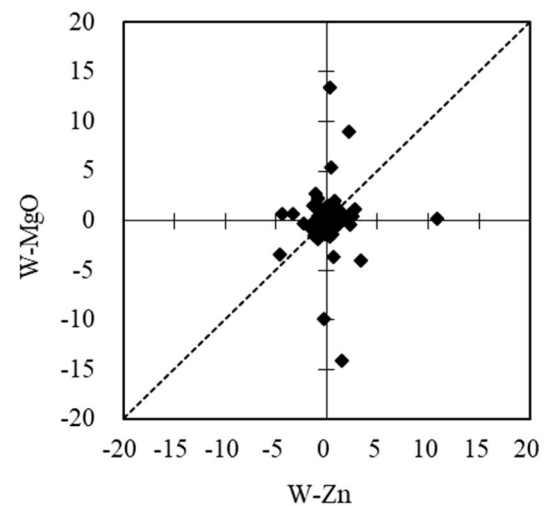


図2-4 液状複合肥料中の W-Zn—
W-MgOの z スコアの関係

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

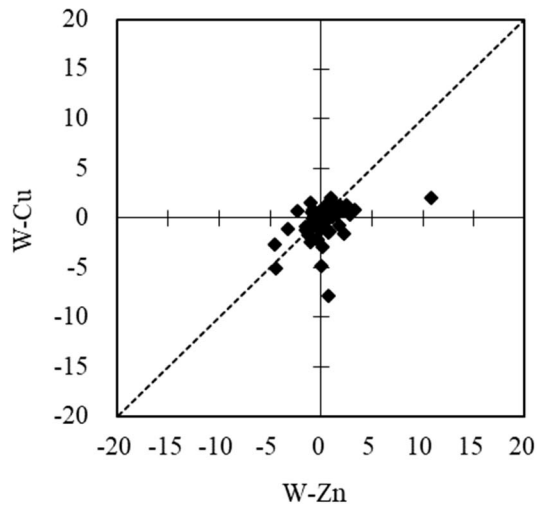


図2-5 液状複合肥料中のW-Zn－
W-Cuのzスコアの関係

◆ 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)

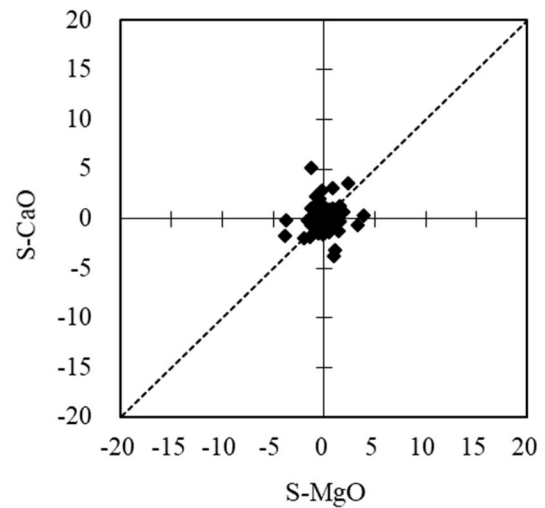


図2-6 鉱さいけい酸質肥料のS-MgO－
S-CaOのzスコアの関係

◆ 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)

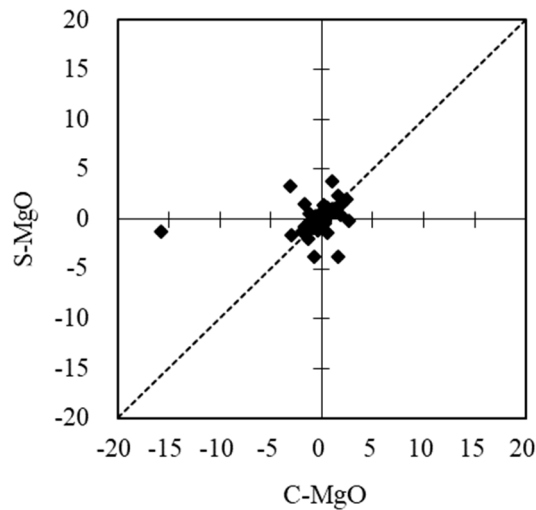


図2-7 鉱さいけい酸質肥料のC-MgO－
S-MgOのzスコアの関係

◆ 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) 液状複合肥料中の窒素全量(T-N)

今回使用した試料は有機質や尿素を含有しないため、アンモニア性窒素と硝酸性窒素を合わせて窒素全量となっている。108 試験室が参加し、11 試験室が燃焼法、37 試験室がデバルダ合金－ケルダール法、32 試験室がデバルダ合金－蒸留法、7 試験室が還元鉄－ケルダール法、2 試験室が還元鉄を使用し、1 試験室がサリチル酸－ケルダール法、1 試験室がケルテックを使用、そして17 試験室がアンモニア性窒素と硝酸性窒素をそれぞれ異なる試験法（1 試験室を除いてフェノール硫酸法）によつ

て測定した値を基にした算出であった。

燃焼法とデバルダ合金-ケルダール法及びデバルダ合金-蒸留法の分析成績の平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ、いずれも有意水準 5% で有意な差は認められなかったが、デバルダ合金-ケルダール法とデバルダ合金-蒸留法の 2 方法間においては有意な差が認められた。また、算出による報告値と燃焼法、デバルダ合金-ケルダール法及びデバルダ合金-蒸留法について検定を行うと、いずれにおいても方法間に有意な差が認められた。全報告値より解析を行った結果、分析成績のメディアンは 4.57% (質量分率)、 $NIQR$ は 0.13% (質量分率)、平均値は 4.57% (質量分率) であった。85 試験室が「満足」であり、11 試験室が「不満足」な結果であった。

デバルダ合金-ケルダール法が、デバルダ合金-蒸留法に対して有意に低値となったのは、デバルダ合金-ケルダール法では最初の塩酸及び塩化スズによる還元が十分でないと、硫酸添加時に硝酸性窒素が硫酸と反応して二酸化窒素ガスが発生してロスとなる。また、液状肥料の場合には硫酸分解する際の突沸を防ぐために沸石を使用する必要がある。さらに、蒸留する際、強酸試料に強アルカリ液を添加するため、反応が早いにもかかわらず、発泡を避けるために冷却しながら、ゆっくり水酸化ナトリウムを添加する等、注意点が多い。作業に不慣れであるとロスを生じやすいため、今回のような結果となったと考えられた。

なお、硝酸性窒素を直接定量し、アンモニア性窒素と合算した報告値においては、後述の硝酸性窒素のとおり、精度の良い成績となった。

(2) 液状複合肥料中のアンモニア性窒素(A-N)

114 試験室が参加し、112 試験室が蒸留法、1 試験室が自動分析装置、1 試験室がインドフェノール法を用いた。報告された分析成績のメディアンは 2.41% (質量分率)、 $NIQR$ は 0.03% (質量分率)、平均値は 2.40% (質量分率) であった。96 試験室が「満足」であり、11 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」な結果となった試験室は全て蒸留法での実施だった。

今回は尿素及び有機物を含まなかったため、蒸留法時に加えるアルカリに水酸化ナトリウムを使用してもよい。水酸化ナトリウムを使用する場合は、反応が早いた

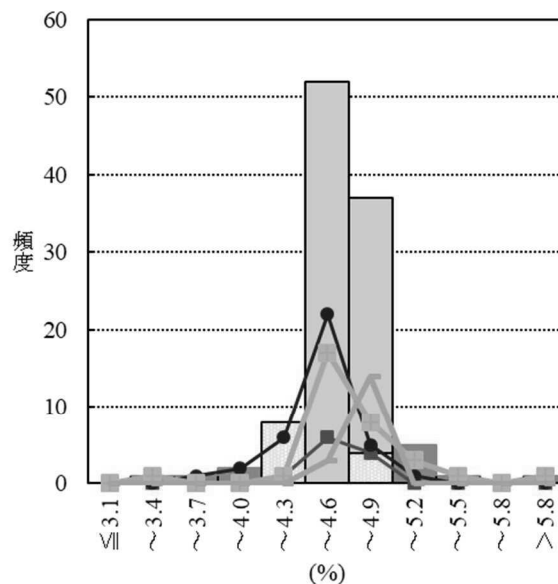


図3-1 液状複合肥料中の窒素全量の分析成績

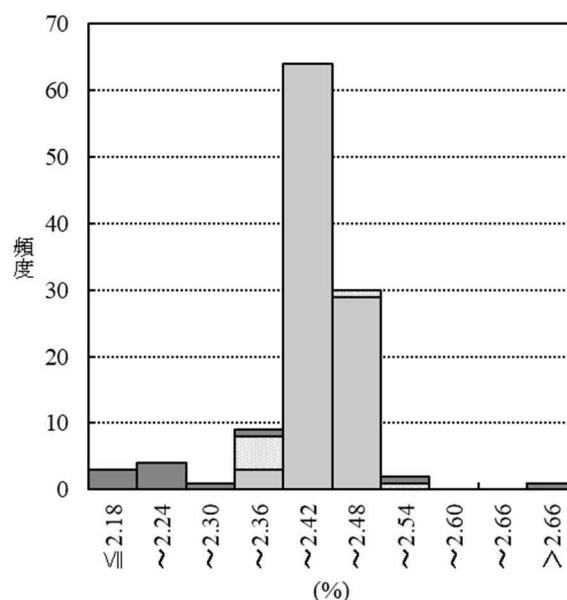
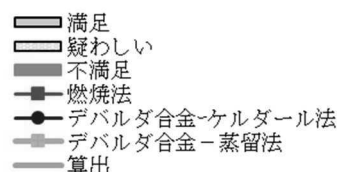
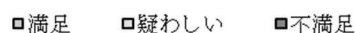


図3-2 液状複合肥料中のアンモニア性窒素の分析成績



め、酸化マグネシウムを使用する場合よりも蒸留器への連結作業を素早く行う必要がある。酸化マグネシウムは試験室中の二酸化炭素を吸着していき、終点が不鮮明になることがあるので、酸化マグネシウムをばい焼(800℃, 2時間程度)させてから使用すると良い。

(3) 液状複合肥料中の硝酸性窒素(N-N)

硝酸性窒素はフェノール硫酸法またはイオンクロマトグラフ法では直接測定となるが、その他の分析法では窒素全量とアンモニア性窒素を測定し、その差から算出することとなる。106 試験室が参加し、29 試験室がフェノール硫酸法、2 試験室がイオンクロマトグラフ法により直接測定し、19 試験室がデバルダ合金-ケルダール法、47 試験室がデバルダ合金-蒸留法、6 試験室が燃焼法、2 試験室が還元鉄-蒸留法、1 試験室がサリチル酸ケルダール法を用い、アンモニア性窒素を差し引いて報告した。各試験方法間の分析成績の平均値の差による検定(t検定)を行ったところ、デバルダ合金-ケルダール法とフェノール硫酸法の2方法間において有意水準5%で有意な差が認められた。報告された分析成績のメディアンは2.20% (質量分率)、*NIQR*は0.14% (質量分率)、平均値は2.20% (質量分率)であった。86 試験室が「満足」であり、14 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」な結果となった試験室はデバルダ合金-蒸留法が7 試験室、デバルダ合金-ケルダール法が4 試験室、燃焼法が2 試験室、フェノール硫酸法が1 試験室だった。

前述の窒素全量において、デバルダ合金-ケルダール法が有意に低値であったことから、これを基に算出した硝酸性窒素においても有意に低値となっている。また、直接測定であるフェノール硫酸法と比べ、算出による報告値は2方法のばらつきを含むため、ロバスト相対標準偏差 *RSD_{rob}* が肥料等試験法で示している試験法の評価のための精度の目安である *CRSD_R* より大きく、デバルダ合金-ケルダール法では許容される *CRSD_R* の2倍を超える結果となった。

(4) 液状複合肥料中の水溶性りん酸(W-P₂O₅)

118 試験室が参加し、113 試験室はバナドモリブデン酸アンモニウム法、5 試験室が ICP-OES 法を用いた。報告された分析成績のメディアンは2.82% (質量分率)、*NIQR*は0.05% (質量分率)、平均値は2.82% (質量分率)であった。102 試験室が「満足」であり、8 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」な結果となった試験室はバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光

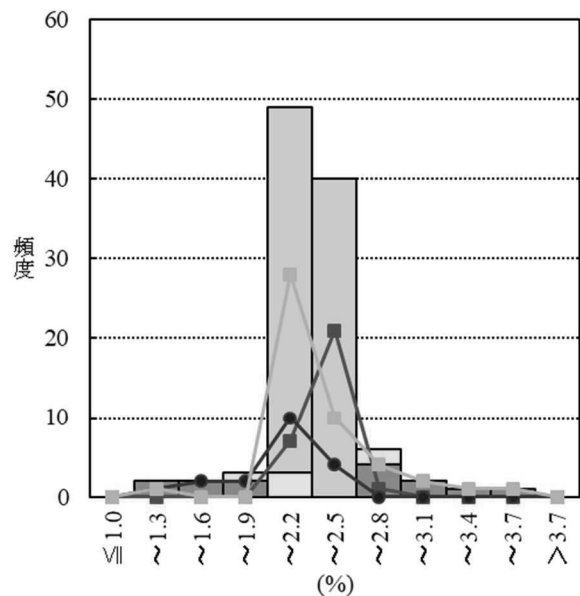


図3-3 液状複合肥料中の硝酸性窒素の分析成績

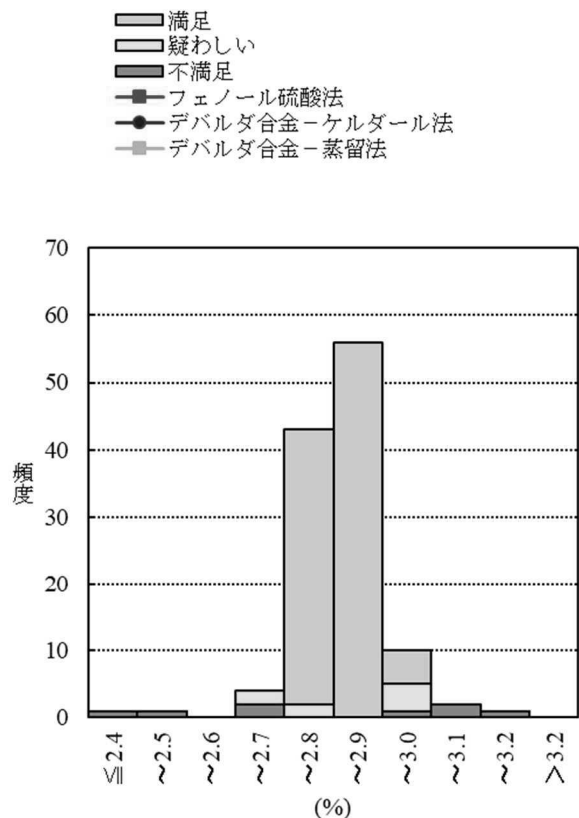


図3-4 液状複合肥料中の水溶性りん酸の分析成績

度法が7試験室, ICP-OES法が1試験室だった。

(5) 液状複合肥料中の水溶性加里(W-K₂O)

118試験室が参加し, 86試験室がフレイム原子吸光法, 24試験室がフレイム光度法, 1試験室がテトラフェニルホウ酸ナトリウム容量法, 7試験室がICP-OES法を用いた。フレイム原子吸光法及びフレイム光度法について, 分析成績の平均値の差による検定(*t*-検定)を行ったところ, 有意水準5%で有意な差は認められなかった。報告された分析成績のメディアンは2.43% (質量分率), *NIQR*は0.05% (質量分率), 平均値は2.44% (質量分率)であった。86試験室が「満足」であり, 13試験室が「不満足」な結果であった。*NIQR*が十分に小さいため, 「不満足」な試験結果が多くみられる結果となった。

原子吸光法等, 検量線法での測定では直線性に留意し, 調製した標準液についても, 時間の経過とともに濃度変化が生じることがあるので定期的に調製し直すことが望ましい。また, 定量には試料溶液の噴霧効率が影響するため, 測定時には試料液及び標準液の温度, 酸組成及び酸濃度を同一とするといふ。

(6) 液状複合肥料中の水溶性苦土(W-MgO)

114試験室が参加し, 102試験室はフレイム原子吸光法, 10試験室がICP-OES法, 2試験室がEDTA法を用いた。報告された分析成績のメディアンは1.67% (質量分率), *NIQR*は0.04% (質量分率), 平均値は1.68% (質量分率)であった。97試験室が「満足」であり, 12試験室が「不満足」な結果であった。この「不満足」な試験結果を棄却した後, 2方法について平均値の差による検定(*t*-検定)を行ったところ, 有意水準5%で有意な差は認められなかった。

「不満足」な結果となった試験室は9試験室がフレイム原子吸光法で, 2試験室はICP-OES法, 1試験室はEDTA法であった。フレイム原子吸光法の報告値が低値側に偏っていたため, 棄却を行わないと平均値に有意な差が認められた。

苦土についてのフレイム原子吸光法は, 機器によっては感度が高いために検量線濃度を変更する, または試料液を希釈する等の対応が求められる。検量線を2次曲線とすると, 測定濃度によっては大きな誤差を生じるので注意が必要である。

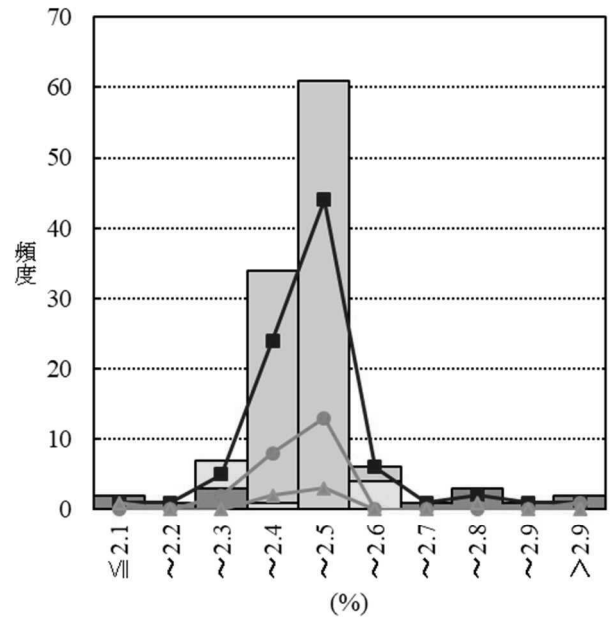


図3-5 液状複合肥料中の水溶性加里の分析成績

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

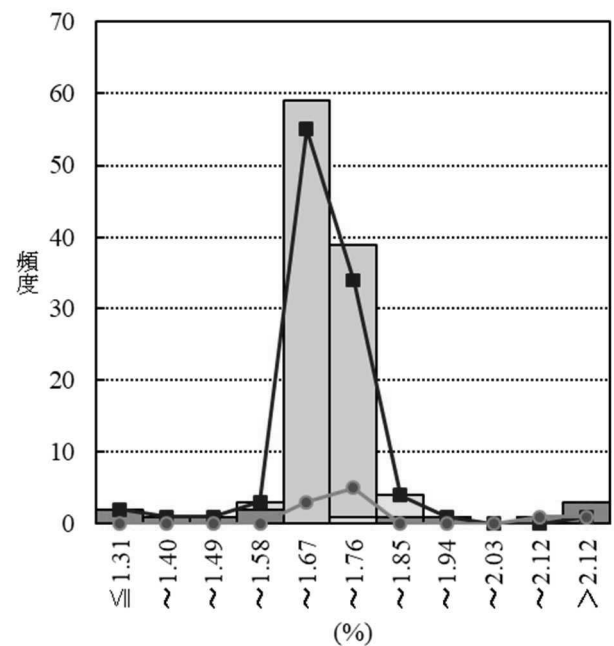


図3-6 液状複合肥料中の水溶性苦土の分析成績

満足 不満足 疑わしい 不満足
フレイム原子吸光法 ICP-OES

(7) 液状複合肥料中の水溶性マンガン(W-MnO)

106 試験室が参加し、90 試験室がフレイム原子吸光法、13 試験室が ICP-OES 法、2 試験室が過よ素酸カリウム法、1 試験室がフレイム光度法を用いた。フレイム原子吸光法及びICP-OES 法について、分析成績の平均値の差による検定 (*t*-検定) を行ったところ、「不満足」な結果を除外しても有意水準 5 % で有意な差が認められたが、平均の差はわずかに 0.03 % (質量分率) であった。報告された分析成績のメディアンは 1.32 % (質量分率)、*NIQR* は 0.04 % (質量分率)、平均値は 1.32 % (質量分率) であった。90 試験室が「満足」であり、11 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」な結果となった試験室は、9 試験室がフレイム原子吸光法で、2 試験室は ICP-OES 法であった。

ICP-OES 法は測定元素の性質、測定条件及び機器差が結果に大きく影響する。フレイム原子吸光法と ICP-OES 法に有意差が見られたが、全体に占める ICP-OES 法の試験室数は少ないため、差があると断定するのは尚早と思われる。

(8) 液状複合肥料中の水溶性ほう素(W-B₂O₃)

94 試験室が参加し、79 試験室がアゾメチン H 法、15 試験室が ICP-OES 法を用いた。アゾメチン H 法により試験した試験室中、42 試験室が補正を行い、37 試験室が補正を行わなかった。分析成績の平均値の差による検定 (*t*-検定) を行ったところ、分析方法間、補正の有無いずれにおいても有意水準 5 % で有意な差は認められなかった。報告された分析成績のメディアンは 0.238 % (質量分率)、*NIQR* は 0.013 % (質量分率)、平均値は 0.238 % (質量分率) であった。87 試験室が「満足」であり、2 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」の試験室はアゾメチン H 法によるものであった。今回の試料は透明だったため、補正の有無の影響は現れなかった。

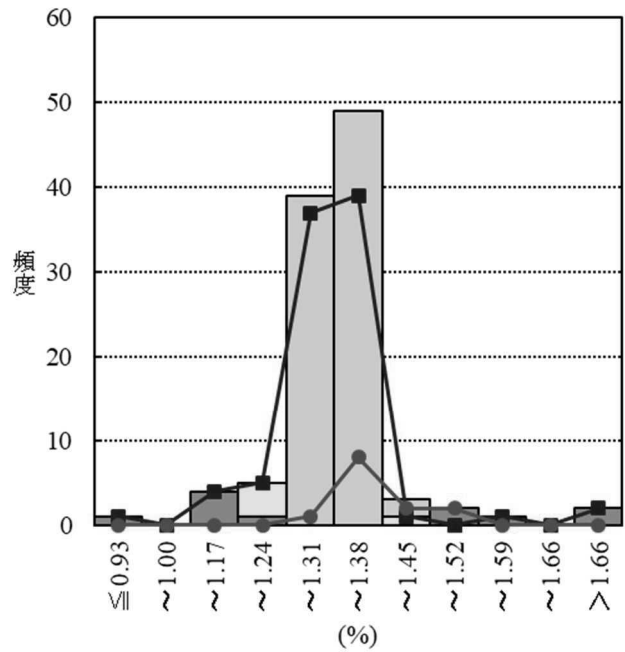


図3-7 液状複合肥料中の水溶性マンガン分析成績

満足 不満足 疑わしい フレイム原子吸光法 ICP-OES

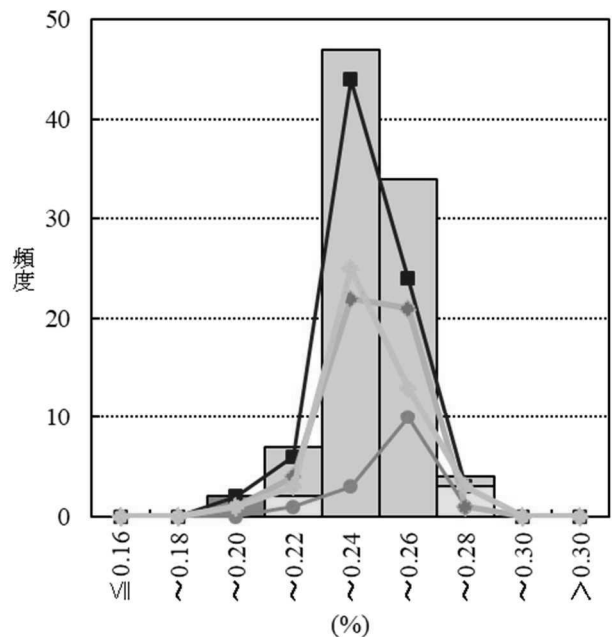


図3-8 液状複合肥料中の水溶性ほう素分析成績

満足 不満足 アゾメチンH法 ICP-OES 補正あり 補正なし

(9) 液状複合肥料中の水溶性鉄(W-Fe)

72 試験室が参加し, 57 試験室がフレイム原子吸光法, 14 試験室が ICP-OES 法, 1 試験室がフェナントロリン法を用いた. フレイム原子吸光法と ICP-OES 法について平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ, 有意水準 5 % で有意な差は認められなかった. 報告された分析成績のメディアンは 0.217 % (質量分率), $NIQR$ は 0.011% (質量分率), 平均値は 0.218 % (質量分率) であった. 61 試験室が「満足」であり, 8 試験室が「不満足」であった. 「不満足」な結果となった試験室は, 7 試験室がフレイム原子吸光法で, 1 試験室はフェナントロリン法であった.

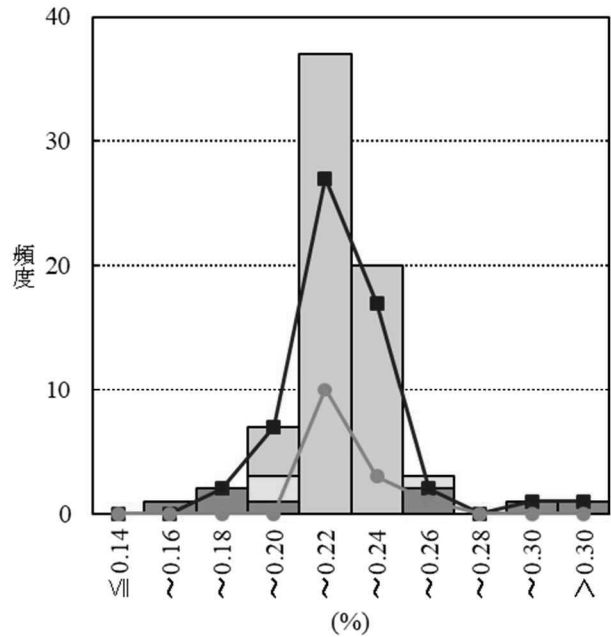


図3-9 液状複合肥料中の水溶性鉄の分析成績

満足
 不満足
 ICP-OES法
 疑わしい
 フレイム原子吸光法

(10) 液状複合肥料中の水溶性銅(W-Cu)

78 試験室が参加し, 65 試験室がフレイム原子吸光法, 13 試験室が ICP-OES 法を用いた. 2 方法について平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ, 有意水準 5 % で有意差は認められなかった. 報告された分析成績のメディアンは 0.056 % (質量分率), $NIQR$ は 0.002 % (質量分率), 平均値は 0.056 % (質量分率) であった. 67 試験室が「満足」であり, 3 試験室が「不満足」な結果であった. 「不満足」の試験室はフレイム原子吸光法が 2 試験室で, ICP-OES 法が 1 試験室であった.

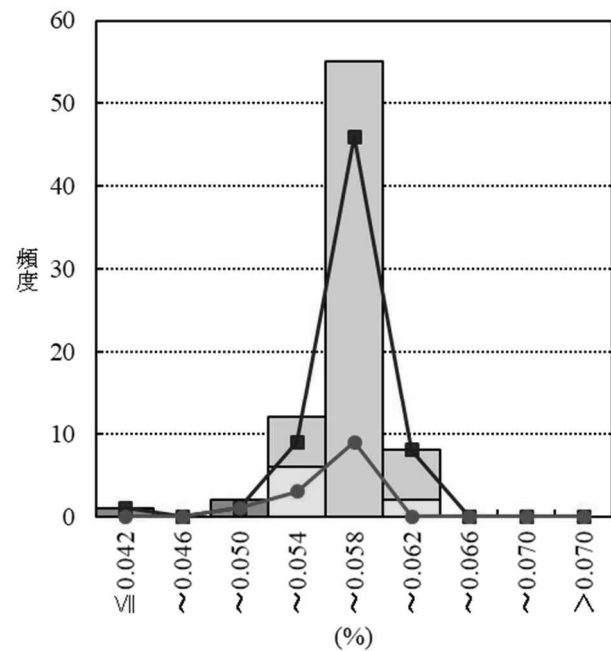


図3-10 液状複合肥料中の水溶性銅の分析成績

満足
 不満足
 ICP-OES法
 疑わしい
 フレイム原子吸光法

(11) 液状複合肥料中の水溶性亜鉛(W-Zn)

79 試験室が参加し, 66 試験室がフレイム原子吸光法, 13 試験室が ICP-OES 法を用いた. 2 方法について平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ, 有意水準 5 % で有意差は認められなかった. 報告された分析成績のメディアンは 0.059 % (質量分率), $NIQR$ は 0.002 % (質量分率), 平均値は 0.059 % (質量分率)

であった。67 試験室が「満足」であり、6 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」となった試験室は、5 試験室がフレイム原子吸光法、1 試験室が ICP-OES 法であった。

「不満足」となった試験室は、水溶性銅を同様に標準液、希釈倍率等に留意願いたい。

(12) 液状複合肥料中の水溶性モリブデン(W-Mo)

47 試験室が参加し、29 試験室がチオシアン酸ナトリウム吸光光度法、16 試験室が ICP-OES 法、1 試験室が ICP-MS 法、1 試験室がフレイム原子吸光法を用いた。チオシアン酸ナトリウム吸光光度法と ICP-OES 法について、平均値の差による検定 (t -検定) を行ったところ、有意水準 5 % で有意差は認められなかった。報告された分析成績のメディアンは 0.227 % (質量分率)、 $NIQR$ は 0.011 % (質量分率)、平均値は 0.229 % (質量分率) であった。40 試験室が「満足」であり、5 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」となった試験室は、2 試験室がチオシアン酸ナトリウム吸光光度法、2 試験室が ICP-OES 法、1 試験室が ICP-MS 法であった。

モリブデンの測定は、例年の重金属と同程度の参加試験室数であり、普段あまり実施していない試験室が多いようであった。チオシアン酸ナトリウム吸光光度法は試薬を順番に添加していただくだけであるが、各試薬濃度が高いため混濁が生じやすく、添加するたびに十分混和する必要がある。また、ブランクにおいても先に他の試料液と同程度の水をフラスコに添加してから発色作業に供試しないと、混濁が生じやすい。

「鉄の赤色が消失」は一瞬で起こり、測定まで時間を置く必要性はないが、混濁が生じた場合には 1 時間放置後に、遠心分離してから測定する。遠心の条件はりん酸の試験法と同様に回転数 1700 g (3000 rpm)、5 分程度かけると良い(試験法において遠心条件が未記載)。

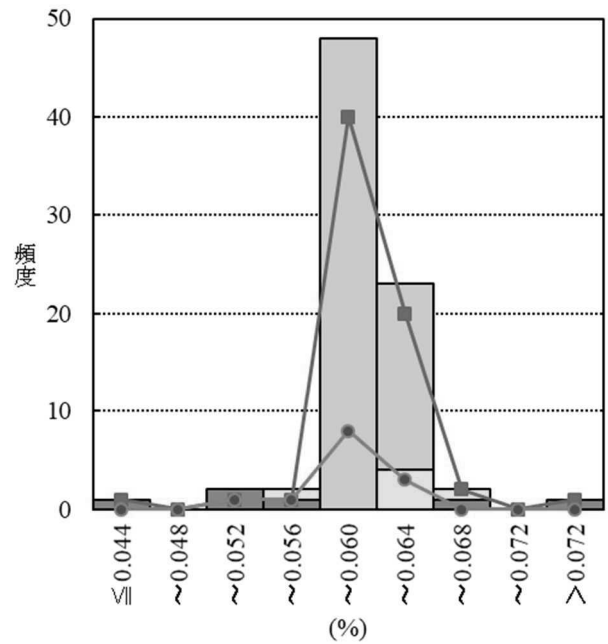


図3-11 液状複合肥料中の水溶性亜鉛の分析成績

満足
 不満足
 疑わしい
 フレイム原子吸光法
 ICP-OES法

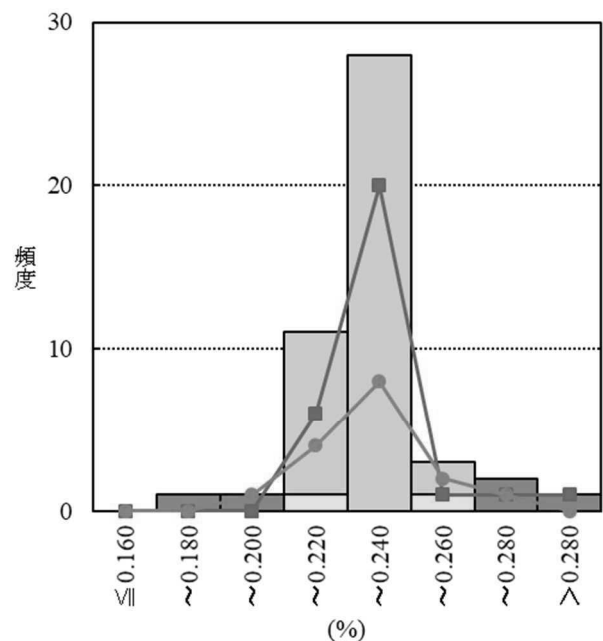


図3-12 液状複合肥料中の水溶性モリブデンの分析成績

満足
 不満足
 疑わしい
 チオシアン酸ナトリウム吸光光度法
 ICP-OES法

(13) 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性けい酸(S-SiO₂)

56 試験室が参加し、39 試験室がふっ化カリウム法、15 試験室が過塩素酸法、2 試験室が ICP-OES 法を用いた。ふっ化カリウム法及び過塩素酸法による分析成績について平均値の差による検定(*t*-検定)を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準 5% で有意な差は認められなかった。報告された分析成績のメディアンは 35.05% (質量分率)、*NIQR* は 0.45% (質量分率)、平均値は 34.96% (質量分率)であった。46 試験室は「満足」であり、3 試験室が「不満足」であった。「不満足」となった試験室のうち、極端に過大または過小であったものはふっ化カリウム法によるものであった。

ふっ化カリウム法で低値となった試験室は、結晶をろ過する際の結晶の流出に注意し、ろ紙くず液を使用する等の対策をし、十分に冷やした塩化カリウム液で結晶を洗浄すると良い。高値となった試験室は滴定操作の見直しをお願いしたい。

自動滴定装置を使用する際は、pH の変異点設定を 8.5 前後とすると良い。手動滴定でも同様だが、過去の手合わせ共通試料等の管理試料を一緒に測定し、設定・色味等にずれが生じていないか確認を行うことが、「不満足」な結果回避に有効である

(14) 鉍さいけい酸質肥料中のアルカリ分(AL)

73 試験室が参加し、10 試験室が EDTA 法、58 試験室がフレイム原子吸光法、5 試験室が ICP-OES 法を用いた。EDTA 法及びフレイム原子吸光法による分析成績について平均値の差による検定(*t*-検定)を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準 5% で有意な差は認められなかった。報告された分析成績のメディアンは 52.07% (質量分率)、*NIQR* は 1.07% (質量分率)、平均値は 52.41% (質量分率)であった。63 試験室が「満足」であり、4 試験室が「不満足」な結果であった。

アルカリ分の分析成績の報告に際して、可溶性石灰及び可溶性苦土を測定している試験室からは各成分の分析成績について報告を受けた。可溶性石灰及び可溶性苦土は 63 試験室から報告があり、58 試験室がフレイム原子吸光法、5 試験室が ICP-OES 法を用いた。可溶性石灰について報告された分析成績のメディアンは 42.54% (質量分率)、*NIQR* は 0.95% (質量分率)、平均値は 42.72% (質量分率)であった。55 試験室が「満足」であり、5 試験室が「不満足」な結果であった。可溶性苦土について報告された分析成績のメディアンは 6.75% (質量分率)、*NIQR* は 0.17% (質量分率)、平均値は 6.99% (質量分率)であった。56 試験室は「満足」であり、5 試験室が「不満足」な結果であった。アルカ

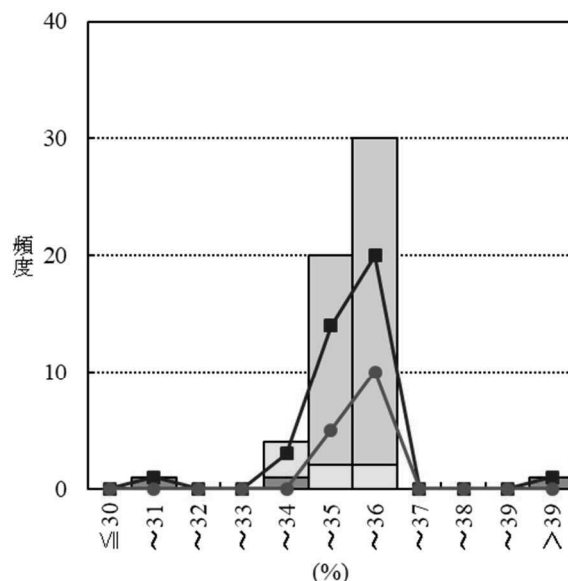


図3-13 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性けい酸の分析成績

満足 不満足 疑わしい 過塩素酸法 ふっ化カリウム法

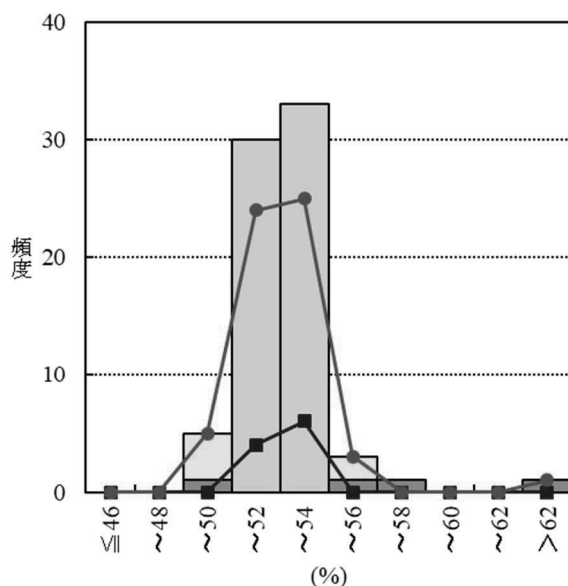


図3-14 鉍さいけい酸質肥料中のアルカリ分の分析成績

満足 不満足 疑わしい フレイム原子吸光法 EDTA法

リ分の試験結果として「不満足」だった試験室は3試験室がフレイム原子吸光法で、1試験室が ICP-OES 法であった。

今回、極端に外れる報告が見られたので、試料液の希釈、標準液の調製、干渉抑制剤の添加の有無、データの確認等について、作業の見直しが必要である。

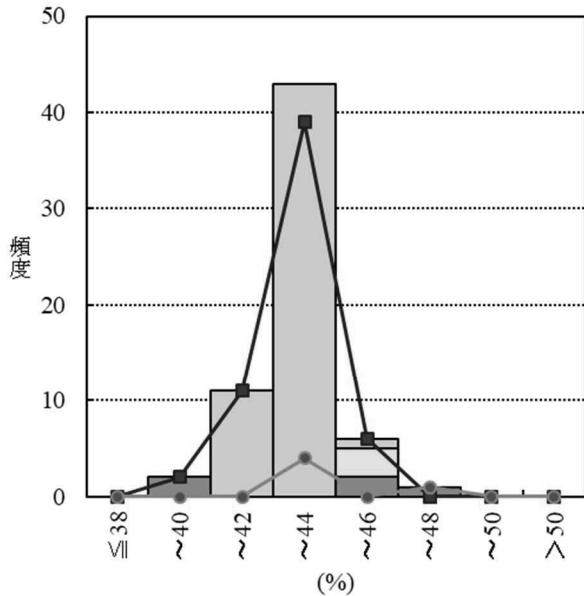


図3-15 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性石灰の分析成績

満足 不満足 疑わしい
 フレイム原子吸光法 ICP-OES法

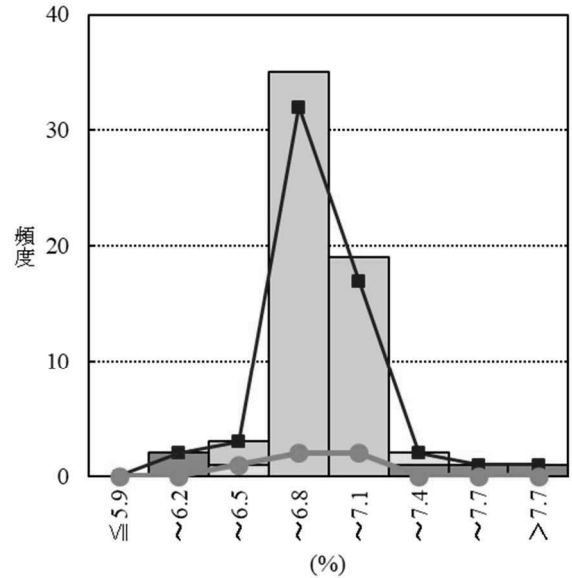


図3-16 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土の分析成績

満足 不満足 疑わしい
 フレイム原子吸光法 ICP-OES法

(15) 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土(C-MgO)
 75 試験室が参加し、67 試験室がフレイム原子吸光法、5 試験室が ICP-OES 法、3 試験室が EDTA 法を用いた。報告された分析成績のメディアンは 6.75 % (質量分率), *NIQR* は 0.12 % (質量分率), 平均値は 6.76 % (質量分率)であった。64 試験室は「満足」であり、7 試験室が「不満足」な結果であった。「不満足」の評価のうち、5 試験室がフレイム原子吸光法、2 試験室が EDTA 法であった。

こちらも可溶性苦土と同様に外れる報告値があり、フレイム原子吸光法における注意点は可溶性苦土と同じである。EDTA 法における注意点は可溶性けい酸と同様に、過去の手合わせ試料等の管理試料と一緒に測定し、設定・色味等にずれが生じていないか確認を行うと良い。

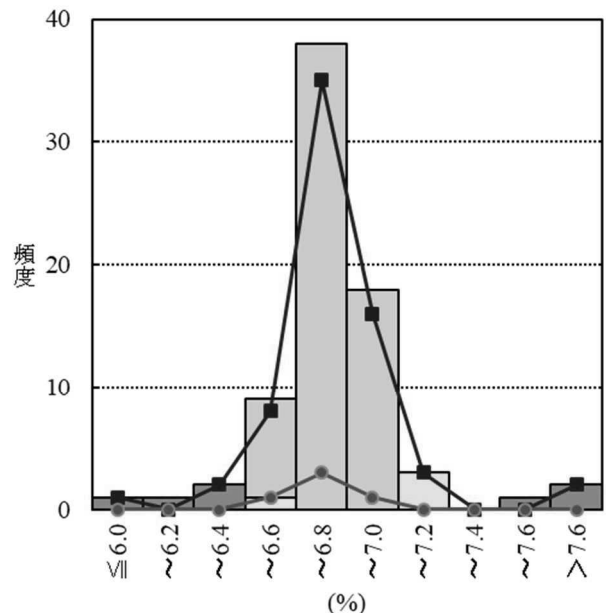


図3-17 鉍さいけい酸質肥料中の可溶性苦土の分析成績

満足 不満足 疑わしい
 フレイム原子吸光法 ICP-OES法

5) 分析法の比較

昨年度、分析法ごとの統計解析結果の要望があったことから、8 試験室以上が採用した分析法ごとのメディアン、メディアン⁵⁾の信頼区間等について、表 7 に取りまとめた。

ほとんどの成分において、分析法間で大きくメディアン及びその信頼区間は変わらなかったが、**4) (1)** で述べたように、窒素全量においては分析法間で偏りがあることから、分析法の選択により得られる分析値に 0.2 % の差が生じる可能性が示唆された。窒素において保証成分量 10 % 以下である場合の分析検査成績に適用される許容差⁶⁾である 0.4 % であることから、今後留意すべき問題と思われた。特に、作業に不慣れな分析法を実施する場合、管理試料または認証標準物質を使用し、分析結果の妥当性を確認することが必要となる。

肥料成分は多岐にわたるため、FAMIC で調製している肥料認証標準物質により全ての成分を網羅することは困難な状況であることから、今回使用した共同試験用試料の残量を分析実施時の内部品質管理用試料として活用することが望ましい。

表7 各試験方法の統計解析結果 (n_{≧3} を除く)

分析成分	分析方法	参加試験 室数	分析方 法採用 試験室 数内訳	n _{≧3} を除く試 験室数	平均値 (%) ^{a)}	メディアン (%) ^{a)}	メディアンの 95%信頼区間	NIQR (%) ^{a)}	RSD _{rob} ^{b)} (%)
(液状複合肥料)									
窒素全量	1: 燃焼法	108	11	11	4.56	4.57	4.52 ~ 4.62	0.09	1.9
	2: デバルダ合金- ケルダール法		37	33	4.46	4.48	4.43 ~ 4.53	0.14	3.1
	3: デバルダ合金- 蒸留法		32	26	4.59	4.58	4.55 ~ 4.61	0.07	1.5
	5: 算出 (AN+NNフェノール 硫酸法)		16	16	4.67	4.66	4.64 ~ 4.68	0.04	0.8
アンモニア性窒素	1: 蒸留法	114	112	101	2.41	2.41	2.40 ~ 2.42	0.03	1.2
硝酸性窒素	1: フェノール硫酸法	106	29	28	2.24	2.24	2.21 ~ 2.26	0.06	2.8
	2: デバルダ合金- ケルダール法		19	15	2.10	2.11	2.08 ~ 2.14	0.06	3.0
	3: デバルダ合金- 蒸留法		47	40	2.18	2.17	2.15 ~ 2.19	0.06	2.9
水溶性りん酸	1: バナドモリブデン酸ア ンモニウム法	118	113	106	2.82	2.82	2.81 ~ 2.83	0.06	2.2
水溶性加里	1: フレーム原子吸光法	118	86	78	2.42	2.43	2.42 ~ 2.44	0.04	1.8
	2: フレーム光度法		24	21	2.42	2.41	2.39 ~ 2.43	0.04	1.8
水溶性苦土	1: フレーム原子吸光法	114	102	93	1.67	1.67	1.66 ~ 1.68	0.04	2.2
	2: ICP-OES法		10	8	1.69	1.70	1.68 ~ 1.72	0.02	1.4
水溶性マンガン	1: フレーム原子吸光法	106	90	81	1.31	1.31	1.30 ~ 1.32	0.03	2.3
	2: ICP-OES法		13	11	1.34	1.33	1.32 ~ 1.34	0.02	1.7
水溶性ほう素	1: アズメチンH法	94	79	77	0.238	0.237	0.234 ~ 0.240	0.013	5.3
	2: ICP-OES法		15	15	0.245	0.244	0.240 ~ 0.248	0.009	3.5
水溶性鉄	1: フレーム原子吸光法	72	57	50	0.216	0.217	0.214 ~ 0.220	0.011	5.0
	2: ICP-OES法		14	14	0.219	0.217	0.214 ~ 0.219	0.005	2.2
水溶性銅	1: フレーム原子吸光法	78	65	63	0.056	0.056	0.056 ~ 0.057	0.002	3.1
	2: ICP-OES法		13	12	0.055	0.056	0.055 ~ 0.057	0.002	3.1
水溶性亜鉛	1: フレーム原子吸光法	79	66	61	0.059	0.059	0.059 ~ 0.060	0.002	2.8
	2: ICP-OES法		13	12	0.059	0.059	0.058 ~ 0.060	0.002	2.6
水溶性モリブデン	1: チオシアン酸ナトリウ ム吸光光度	47	29	27	0.229	0.230	0.227 ~ 0.233	0.008	3.5
	2: ICP-OES法		16	14	0.227	0.224	0.220 ~ 0.228	0.008	3.4
(鉱さいけい酸質肥料)									
可溶性けい酸	1: ふっ化カリウム法	56	39	37	34.9	35.0	34.9 ~ 35.2	0.39	1.1
	2: 過塩素酸法		15	15	35.2	35.2	35.0 ~ 35.5	0.48	1.4
アルカリ分	1: EDTA法	73	10	10	52.2	52.2	51.8 ~ 52.6	0.64	1.2
	2: フレーム原子吸光法		58	55	52.0	52.0	51.7 ~ 52.3	1.09	2.1
く溶性苦土	1: フレーム原子吸光法	75	67	62	6.75	6.73	6.70 ~ 6.76	0.12	1.7

a) 質量分率

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

6) 肥料等試験法の公定法化に係るアンケート調査

肥料法改正にともない告示改正⁷⁾が行われ、2020年4月1日から肥料等試験法が肥料の公定規格への適合を判断するための試験法として定められた。このことから、参加いただいた品質保全協議会会員及び都道府県分析室に対して、肥料等試験法にかかるアンケート（2020年8月23日回収）を行った。アンケート項目については、告示で定められる肥料の分析法が肥料分析法から肥料等試験法に変わったことにより現在各試験室において生じている問題、また肥料等試験法についての要望等を伺った。

各試験室より挙げられた内容については以下のとおりであり、マイノリティな分析法が肥料等試験法に収載されていないことが最も問題となっていることがうかがわれた。肥料等試験法を分析関係機関において共有していく必要があるため、今後の肥料等試験法の改正にあたっては、本省から示された手順により作業を行うこととしている。FAMIC以外の試験室が提案した試験の取扱い、妥当性確認の実施方法の検討などにより、肥料等試験法の整備が進んでいくことが望まれている。

<アンケート概要>

- (1) 肥料分析法から肥料等試験法に変わったことにより生じている問題
 - 地域的な理由により室温が維持できない
 - 分析法により結果に差違がある場合、どちらを採用すべきか分からない
 - 高濃度試料の測定時、希釈誤差が大きい
 - Ti分析法がICPのみでは、対応ができない
 - HPLC測定が増えているが、所有していないため対応できない
 - 原子吸光を所有していないが、滴定法がなくなり対応ができない
- (2) 肥料等試験法への要望
 - 迅速で安価な試験法や簡易分析法の開発
 - 例) アンモニア性窒素や硝酸性窒素にイオンクロマトグラフ法を追加
 - 肥料分析法に記載されていた試験法の追加
 - 例) EDTA法（高濃度試料分析のため）
 - チタンの過酸化水素法や原子吸光法
 - 既存の試験法についての改良
 - 例) 対象肥料の適用拡大
 - 水平往復振とうの追加
 - 灰化－王水分解の分解不足について検討
 - フェノール硫酸法での不足硫酸銀を添加できるような記載へ改良
 - 可溶性りん酸、モリブデン、尿素性窒素等、工程が複雑な分析方法の簡素化
 - 新たなカテゴリーの追加
 - 例) 過酷試験
- (3) その他の要望
 - 肥料等試験法の最新版への変更点の明確化
 - 改定時のメール連絡
 - 肥料等試験法の詳解（冊子）出版
 - 肥料等試験法の相談窓口の開設

6. まとめ

2020年度外部精度管理のための共同試験は、液状複合肥料12成分に123試験室、鉍さいけい酸質肥料3成分に78試験室が参加した。各成分において各試験成績をロバスト法による z スコアを用いて評価したところ、「満足($|z| \leq 2$)」と評価された試験室の割合は79%~93%、「不満足($|z| \geq 3$)」と評価された試験室の割合は2%~13%であった。複数の試験法による報告で、8試験室以上が採用した方法間について、不満足であった報告値を棄却した後に平均値の差による検定(t -検定)を行ったところ、それぞれの平均値に有意水準5%で差が認められたのは、窒素全量におけるデバルダ合金-ケルダール法とデバルダ合金-蒸留法の間、算出による結果とその他の各方法間において、また、硝酸性窒素におけるデバルダ合金-ケルダール法とフェノール硫酸法の間であった。デバルダ合金-ケルダール法は分析上の注意ポイントが多く、試験法の記載だけでは分かりにくい部分があり、熟練者と初心者で大きな差が生じていた。

分析法ごとの統計解析結果より、複数の分析結果から算出する成分においては、2つの分析法から得られた分析値から算出により分析結果を得る分析法の場合、メディアンに0.2%程度の差が生じ、そのような場合の管理試料(または認証標準物質)の使用が必須だと考えられた。適切な認証標準物質が無い場合、このような外部精度管理試験の残試料を管理試料として活用することが有益である。今後の当外部精度管理試験に用いる試料の選択時には、認証標準物質で認証されている成分と肥料分析試験室において要望がある成分を十分に考慮することが必要である。

また、2020年度はICP-OESを用いた報告数が2019年度と比して倍増したため、各成分の分析において、原子吸光分析装置とICP-OESを用いた結果において平均値の差による検定(t -検定)を行ったところ、不満足であった報告値を棄却しても水溶性マンガンを有意水準5%で差が認められたが、他の成分(水溶性苦土、水溶性鉄、水溶性銅、水溶性亜鉛)において、有意差は認められなかった。依然ICP-OESを用いての報告数が原子吸光分析装置を用いた報告数と比して少ないことから、今後のICP-OESを用いた試験室による報告が増えることによる傾向把握が期待された。

告示改正により肥料等試験法が肥料の公定規格への適合を判断するための試験法として定められたことをうけ、各試験室から肥料等試験法についての意見・要望等を伺ったところ、分析法の追加や改良等の他、行政的な要望も多く挙げられた。今後もこのような共同試験を活用し、分析試験室の要望を的確に取り入れていくことが必須と考えられた。

謝 辞

この共同試験を実施するにあたり、試料の準備・調製、均質性試験等多大なご協力を賜りました、ジェイカムアグリ株式会社水俣工場及び産業振興株式会社名古屋工場の関係者各位に深く感謝致します。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2017): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2017, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC): 肥料認証標準物質の配布申請手続き
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6.html> >
- 3) ISO/IEC 17043 (2010): “Conformity assessment—General requirements for proficiency testing” (JIS Q

17043 : 2011, 「適合性評価－技能試験に対する一般要求事項」)

- 4) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemical Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78** (1), 145~196 (2006)
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2020)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikengo_2020.pdf>
- 6) 農林水産省消費・安全局:分析検査成績に適用する許容差の見直しについて
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_hiryo/kyoyosa.html>
- 7) 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, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1010 号(2021)

Result of Proficiency Testing for Determination of Major Components and Harmful Elements in Ground Fertilizers Conducted in Fiscal Year 2020

AKIMOTO Satono¹, YOSHIMOTO Masayuki², HIRABARA Toshio³, AMANO Tadao⁴,
INOUE Tadashi⁵, KOBORI Takuya⁶, NUMAZAKI Kanako¹ and HIKICHI Norio⁷

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

² FAMIC, Sapporo Regional Center

³ FAMIC, Sendai Regional Center

⁴ FAMIC, Nagoya Regional Center

⁵ FAMIC, Kobe Regional Center

(Now) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Food Safety and Consumer Affairs Bureau

⁶ FAMIC, Fukuoka Regional Center (Now) FAMIC, Nagoya Regional Center

⁷ Japan Fertilizer and Feed Inspection Association

A proficiency testing of analytical laboratories was conducted in fiscal year 2020, using reference materials of liquid fertilizer and silicate slag fertilizer based on ISO/IEC 17043, “Conformity assessment – General requirements for proficiency testing”. Total nitrogen (T-N), ammonium nitrogen (A-N), nitrate nitrogen (N-N), water-soluble phosphorus (W-P₂O₅), water-soluble potassium (W-K₂O), water-soluble magnesia (W-MgO), water-soluble manganese (W-MnO), water-soluble boron (W-B₂O₃), water-soluble iron (W-Fe), water-soluble copper (W-Cu), water-soluble zinc (W-Zn), water-soluble molybdenum (W-Mo), were analyzed using a liquid fertilizer sample. Acid-soluble silicon (S-SiO₂), alkalinity (AL) and citric acid-soluble magnesium (C-MgO) were analyzed using a silicate slag fertilizer sample. Two homogenized samples were sent to the participants. From the 123 participants which received a liquid fertilizer sample, 47-118 results were returned for each element. From the 78 participants which received a silicate slag fertilizer sample, 56-75 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 %-93 % and the results from the satisfactory participants were almost normally distributed.

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

(Research Report of Fertilizer, **14**, 162-185, 2021)

14 2020年度 肥料認証標準物質の開発

—高度化成肥料 FAMIC-A-17, 普通化成肥料 FAMIC-B-14,
汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 の長期安定性評価—

井上直¹, 青山恵介², 川口伸司²,
船木紀夫³, 秋元里乃⁴

キーワード 認証標準物質, 肥料, 主成分, 有害成分, ISO Guide 35, 長期安定性

1. はじめに

安全な肥料の流通を確保するために、独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) が行っている立入検査において収去した肥料の主成分及び有害成分の分析は不可欠であり、その分析結果について、妥当性を確認した分析法による実施及び品質管理による信頼性の保証(品質保証)が求められている。従前から、肥料生産事業場の品質管理室、生産事業場から分析依頼を受けた民間分析機関、肥料検査機関等の試験所では、分析結果の品質保証及び分析技術の向上のために管理用試料又は肥料認証標準物質¹⁾による内部品質管理が日常的に行われている。近年国際的に、試験所の試験実施能力評価の見直しが進む中、わが国においても ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)²⁾の要求事項を参考にした分析結果の妥当性の確保及び品質保証が重要視されている。その要求事項として、試験所は結果の妥当性を監視する手順を有することが義務付けられており、その具体的手順の一つとして「認証標準物質又は品質管理用物質の使用」があげられている。

そのような情勢の中、FAMIC においては、肥料認証標準物質 A (高度化成肥料 FAMIC-A-17)、同 B (普通化成肥料 FAMIC-B-14) 及び同 C (汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2) (以下、それぞれ「FAMIC-A-17」「FAMIC-B-14」「FAMIC-C-12-2」「FAMIC-C-18-2」という。)を調製^{3~8)}、配付しており(表 1) (「FAMIC-C-12-2」は、2020年6月で配付終了)、これらの調製については国際的に必要とされる事項を満たすために ISO 17034 (JIS Q 17034)⁹⁾の「7 技術及び生産に関する要求事項」を参考に調製することとし、ISO Guide 35 (JIS Q 0035)¹⁰⁾を参考に解析を行った上で ISO Guide 31 (JIS Q 0031)¹¹⁾を参考に認証書及びラベルを作成しているところである。2020年度は、FAMIC-A-17, FAMIC-B-14, FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 の在庫試料を用い、認証成分について、認証値設定時からの長期の安定性のモニタリングを実施したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 安定性のモニタリング

(1) 実験計画

ISO Guide 35 (JIS Q 0035)¹⁰⁾では、認証標準物質の保管期間中、モニタリングを実施して安定性を確認する

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)農林水産省消費・安全局

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神戸センター(現)名古屋センター

⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

ことが望まれている。安定性の検討については、有効期限の終了時点でのデータを提供する同時測定型安定性試験及び保存期間中にデータが得られる従来型安定性試験の二つの基本的実験方法がある。同時に調製した認証標準物質の保存期間の経時的なデータが必要なことから、後者の方法を長期安定性のモニタリングの方法として選択した。この従来型安定性試験を実施するため、次の a)～f)を FAMIC 神戸センターで計画した。

- a) 分析用試料・・・FAMIC-A-17, FAMIC-B-14, FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 の認証書の【保存に関する注意事項】に記載された、常温(20±10℃)、直射日光及び高温多湿を避けて保存された在庫から、それぞれボトルに付された番号と乱数表を使ってランダムに1本を抜き取った試料。
- b) 試験成分・・・認証されたすべての成分(表1参照)。
- c) 試験方法・・・認証値設定の共同試験で使用された肥料等試験法¹²⁾(表3A, 表3B及び表3Cを参照)。
- d) 試験時期・・・認証値設定時の共同試験での神戸センターの分析結果を1回目としたモニタリング分析の実施回数として、FAMIC-A-17は6回目及び7回目、FAMIC-B-14は12回目及び13回目、FAMIC-C-12-2は15回目、FAMIC-C-18-2は4回目及び5回目。具体的な時期並びに認証値設定後の経過月数については表2参照のこと。
- e) 試験室・・・FAMIC 神戸センター。
- f) 安定性の評価・・・認証値設定直後(0ヶ月経過)から、定期的な経過月数ごとに2点併行でモニタリング分析を行い、その平均値の推移についてISO Guide 35 (JIS Q 0035)¹⁰⁾付属書B.5を参考に解析した。

表1 肥料認証標準物質の概要

名称	種類	原料組成	認証成分	有効期限
FAMIC-A-17	高度化成肥料	りん酸アンモニア, 硫酸アンモニア, 尿素, 塩化加里, 軽焼マグネシア, ほう酸塩肥料, 熔成微量元素複合肥料	窒素全量, アンモニア性窒素, く溶性りん酸, く溶性加里, く溶性苦土, く溶性マンガン, く溶性ほう素, 水溶性ほう素, 尿素性窒素(全9成分)	2023年6月末
FAMIC-B-14	普通化成肥料	硫酸アンモニア, 過りん酸石灰, 塩化加里	アンモニア性窒素, 可溶性りん酸, 水溶性りん酸, 水溶性加里, ひ素, カドミウム, ニッケル(全7成分)	2023年6月末
FAMIC-C-12-2	汚泥発酵肥料	下水汚泥, 食品工業汚泥, 動物質原料	窒素全量, 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)	2020年6月末
FAMIC-C-18-2	汚泥発酵肥料	し尿汚泥	窒素全量, りん酸全量, 加里全量, 銅全量, 亜鉛全量, 石灰全量, 有機炭素, ひ素, カドミウム, ニッケル, クロム, 鉛(全12成分)	2023年6月末

(2) モニタリングの実施

表2 モニタリング実施時期

標準物質名	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目
FAMIC-A-17	2017年 7～9月	2018年 4～5月	10～11月	2019年 4～5月	10～11月	2020年 6～7月	10～11月
経過月	0ヶ月	9ヶ月	15ヶ月	21ヶ月	27ヶ月	35ヶ月	39ヶ月
FAMIC-B-14	2014年 12～1月	2015年 4～5月	10～11月	2016年 4～5月	10～11月	2017年 4～5月	10～11月
経過月	0ヶ月	4ヶ月	10ヶ月	16ヶ月	22ヶ月	28ヶ月	34ヶ月
FAMIC-C-12-2	2012年 8～10月	2013年 4～5月	10～11月	2014年 4～5月	10～11月	2015年 4～5月	10～11月
経過月	0ヶ月	8ヶ月	14ヶ月	20ヶ月	26ヶ月	32ヶ月	38ヶ月
FAMIC-C-18-2	2018年 11～12月	2019年 4～5月	10～11月	2020年 6～7月	10～11月	-	-
経過月	0ヶ月	5ヶ月	11ヶ月	19ヶ月	23ヶ月	-	-

表2(続き)

標準物質名	8回目	9回目	10回目	11回目	12回目	13回目	14回目	15回目
FAMIC-A-17	-	-	-	-	-	-	-	-
経過月	-	-	-	-	-	-	-	-
FAMIC-B-14	2018年 4～5月	10～11月	2019年 4～5月	10～11月	2020年 6～7月	10～11月	-	-
経過月	40ヶ月	46ヶ月	52ヶ月	58ヶ月	66ヶ月	70ヶ月	-	-
FAMIC-C-12-2	2016年 4～5月	10～11月	2017年 4～5月	10～11月	2018年 4～5月	10～11月	2019年 7～8月	2020年 6～7月
経過月	44ヶ月	50ヶ月	56ヶ月	62ヶ月	68ヶ月	74ヶ月	83ヶ月	94ヶ月
FAMIC-C-18-2	-	-	-	-	-	-	-	-
経過月	-	-	-	-	-	-	-	-

表2の各分析時とも未開封のFAMIC-A-17, FAMIC-B-14, FAMIC-C-12-2及びFAMIC-C-18-2各1瓶を用いて、成分毎に2点併行分析を行った。

分析値の桁数は、FAMIC-A-17 及び FAMIC-B-14 については、有害成分(As, Cd, Hg, Ni, Pb), く溶性マンガ(C-MnO), く溶性ほう素(C-B₂O₃) 及び水溶性ほう素(W-B₂O₃) の分析値は有効数字 3 桁, それ以外の成分は, 小数点第 2 位までに丸めた. FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 については, 銅全量(T-Cu) 及び亜鉛全量(T-Zn) の分析値は整数, それ以外の成分について有効数字 3 桁とした. また, 認証値と同様に水分補正しない濃度(有姿濃度)とした.

表3A FAMIC-A-17の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ¹⁾	試験法の概要		備考
		試料液調製方法	測定方法	
窒素全量(T-N)	4.1.1.a	ケルダール分解-蒸留	中和滴定法	
アンモニア性窒素(A-N)	4.1.2.b	塩酸(1+20)抽出	ホルムアルデヒド添加/ 中和滴定法	
く溶性りん酸(C-P ₂ O ₅)	4.2.3.a	くえん酸(20 mg/mL)抽出	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色/吸光光度法	
く溶性加里(C-K ₂ O)	4.3.2.a	くえん酸(20 mg/mL)抽出	フレイム原子吸光法 又はフレイム光度法	
く溶性苦土(C-MgO)	4.6.3.a	くえん酸(20 mg/mL)抽出	フレイム原子吸光法	
く溶性マンガ(C-MnO)	4.7.2.a	くえん酸(20 mg/mL)抽出	フレイム原子吸光法	
く溶性ほう素(C-B ₂ O ₃)	4.8.1.a	くえん酸(20 mg/mL)抽出	アゾメチンH発色/ 吸光光度法	補正なし
水溶性ほう素(W-B ₂ O ₃)	4.8.2.a	水抽出	アゾメチンH発色/ 吸光光度法	補正なし
尿素性窒素(U-N)	6.3.b	水抽出	高速液体クロマトグラフ法	

1) 肥料等試験法の試験項目番号.

表3B FAMIC-B-14の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ¹⁾	試験法の概要		備考
		試料液調製方法	測定方法	
アンモニア性窒素(A-N)	4.1.2.a	蒸留	中和滴定法	
可溶性りん酸(S-P ₂ O ₅)	4.2.2.a	水抽出/ペーテルマンくえん 酸塩溶液抽出	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色/吸光光度法	
水溶性りん酸(W-P ₂ O ₅)	4.2.4.a	水抽出	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色/吸光光度法	
水溶性加里(W-K ₂ O)	4.3.3.a	水抽出	フレイム原子吸光法 又はフレイム光度法	
ひ素(As)	5.2.a	硫酸-硝酸-過塩素酸分解	水素化物発生原子吸光法	
カドミウム(Cd)	5.3.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
ニッケル(Ni)	5.4.a	王水分解	フレイム原子吸光法	

脚注は表3Aを参照.

表3C-1 FAMIC-C-12-2の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ¹⁾	試験法の概要		備考
		試料液調製方法	測定方法	
窒素全量(T-N)	4.1.1.a	ケルダール分解－蒸留	中和滴定法	
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	4.2.1.a	ケルダール硫酸分解	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色／吸光光度法	
加里全量(T-K ₂ O)	4.3.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法又はフレイム光度法	
石灰全量(T-CaO)	4.5.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
有機炭素(O-C)	4.11.1.a	二クロム酸酸化	酸化還元滴定法	
銅全量(T-Cu)	4.10.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
亜鉛全量(T-Zn)	4.9.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
ひ素(As)	5.2.a	硫酸－硝酸－過塩素酸分解	水素化物発生原子吸光法	
カドミウム(Cd)	5.3.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
水銀(Hg)	5.1.a	硝酸－過塩素酸分解	還元気化原子吸光法	
ニッケル(Ni)	5.4.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
クロム(Cr)	5.5.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
鉛(Pb)	5.6.a	王水分解	フレイム原子吸光法	

脚注は表3Aを参照。

表3C-2 FAMIC-C-18-2の試験成分及び試験方法

試験成分	試験項目 番号 ¹⁾	試験法の概要		備考
		試料液調製方法	測定方法	
窒素全量(T-N)	4.1.1.a	ケルダール分解－蒸留	中和滴定法	
りん酸全量(T-P ₂ O ₅)	4.2.1.a	ケルダール硫酸分解	バナドモリブデン酸アンモニウム 発色／吸光光度法	
加里全量(T-K ₂ O)	4.3.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法又はフレイム光度法	
石灰全量(T-CaO)	4.5.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
有機炭素(O-C)	4.11.1.a	二クロム酸酸化	酸化還元滴定法	
銅全量(T-Cu)	4.10.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
亜鉛全量(T-Zn)	4.9.1.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
ひ素(As)	5.2.a	硫酸－硝酸－過塩素酸分解	水素化物発生原子吸光法	
カドミウム(Cd)	5.3.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
水銀(Hg)	5.1.a	硝酸－過塩素酸分解	還元気化原子吸光法	
ニッケル(Ni)	5.4.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
クロム(Cr)	5.5.a	王水分解	フレイム原子吸光法	
鉛(Pb)	5.6.a	王水分解	フレイム原子吸光法	

脚注は表3Aを参照。

3. 結果

1) 安定性のモニタリング

(1) モニタリング結果

FAMIC-A-17, FAMIC-B-14, FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 の成分のモニタリングの結果を表 4A～表 4C②に示した。ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025) では、5.9 試験・校正結果の品質の保証に認証標準物質を用いての試験所の日常の内部品質管理が推奨されているため、FAMIC では、肥料認証標準物質を用いて併行分析を行い、認証値設定時の分析により算出された警戒限界及び処置限界を用いて品質管理を行っている。FAMIC-A-17 のモニタリング開始から 39 ヶ月後、FAMIC-B-14 のモニタリング開始から 70 ヶ月後、FAMIC-C-12-2 のモニタリング開始から 94 ヶ月後及び FAMIC-C-18-2 のモニタリング開始から 23 ヶ月後までに実施した各経過月数及び各成分の 2 点併行分析の結果の平均値を図 1A～図 1C②に示し、更に警戒限界及び処置限界

を描いた。なお、警戒限界及び処置限界の算出に用いた標準偏差、警戒限界及び処置限界については、各標準物質の認証書の【不確かさの算出】を参考に認証値設定の際の共同試験に参加した試験室数(n)並びに認証値(μ)、室内標準偏差(s_W)及び室間再現標準偏差(s_R)を用いて(a)式、(b)式及び(c)式により求めた。その結果、FAMIC-A-17、FAMIC-B-14、FAMIC-C-12-2及びFAMIC-C-18-2のモニタリングにおいて得られた各成分の分析値の平均値は、いずれも警戒限界の範囲内であった。

$$\text{警戒限界及び処置限界の算出に用いた標準偏差}(\sigma) = \sqrt{(s_R^2 - s_W^2) + \frac{s_W^2}{n}} \quad \dots (a)$$

$$\text{平均値に対する警戒限界} = \mu \pm 2\sigma \quad \dots (b)$$

$$\text{平均値に対する処置限界} = \mu \pm 3\sigma \quad \dots (c)$$

n : 共同試験における参加試験室数

s_R : 共同試験で得られた室間再現標準偏差

s_W : 共同試験で得られた室内標準偏差

μ : 認証値

表4A FAMIC-A-17の安定性モニタリング試験成績

(質量分率%)

経過月数	窒素全量 (T-N)		平均値	アンモニア性窒素 (A-N)		平均値	＜溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)		平均値	＜溶性加里 (C-K ₂ O)		平均値
0	13.92	14.03	13.98	11.62	11.64	11.63	13.20	13.32	13.26	13.76	13.91	13.84
9	13.99	14.03	14.01	11.70	11.74	11.72	13.39	13.44	13.42	13.38	14.32	13.85
15	14.01	14.02	14.01	11.94	12.11	12.03	13.24	13.36	13.30	13.95	13.99	13.97
21	13.98	14.00	13.99	11.59	11.61	11.60	13.19	13.22	13.20	13.63	13.70	13.67
27	13.99	14.00	14.00	11.72	11.82	11.77	13.32	13.47	13.40	13.55	13.57	13.56
35	14.00	13.94	13.97	11.99	12.03	12.01	13.17	13.30	13.23	13.70	13.75	13.73
39	13.98	13.99	13.98	12.03	11.75	11.89	13.36	13.28	13.32	14.17	14.34	14.26

表4A (続き)

(質量分率%)

経過月数	＜溶性苦土 (C-MgO)		平均値	＜溶性マンガン (C-MnO)		平均値	＜溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)		平均値	水溶性ほう素 (W-B ₂ O ₃)		平均値	尿素性窒素 (U-N)		平均値
0	3.44	3.47	3.46	0.298	0.318	0.308	0.568	0.583	0.575	0.444	0.462	0.453	2.14	2.24	2.19
9	3.42	3.44	3.43	0.289	0.303	0.296	0.561	0.567	0.564	0.452	0.464	0.458	2.28	2.31	2.30
15	3.52	3.54	3.53	0.309	0.318	0.313	0.561	0.578	0.569	0.445	0.453	0.449	2.29	2.33	2.31
21	3.41	3.49	3.45	0.294	0.311	0.302	0.527	0.572	0.549	0.460	0.470	0.465	2.12	2.35	2.23
27	3.52	3.54	3.53	0.311	0.319	0.315	0.555	0.563	0.559	0.446	0.452	0.449	2.35	2.36	2.35
35	3.47	3.50	3.48	0.304	0.309	0.306	0.569	0.549	0.559	0.427	0.444	0.436	2.48	2.48	2.48
39	3.50	3.61	3.56	0.319	0.319	0.319	0.575	0.575	0.575	0.447	0.443	0.445	2.33	2.36	2.35

表4B FAMIC-B-14の安定性モニタリング試験成績

(質量分率 %)

経過月数	アンモニア性窒素 (A-N)		可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)			水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)			水溶性加里 (W-K ₂ O)			
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値		
0	7.94	8.09	8.02	9.13	9.14	9.13	6.66	6.74	6.70	8.18	8.23	8.20
4	7.98	7.98	7.98	9.18	9.23	9.20	6.77	6.79	6.78	8.15	8.16	8.16
10	7.96	8.01	7.98	9.12	9.13	9.12	6.65	6.67	6.66	8.28	8.29	8.29
16	8.01	8.05	8.03	9.19	9.26	9.23	6.65	6.66	6.66	8.23	8.27	8.25
22	8.02	8.06	8.04	9.25	9.33	9.29	6.72	6.77	6.75	8.17	8.47	8.32
28	7.98	8.00	7.99	9.10	9.13	9.12	6.69	6.71	6.70	8.17	8.28	8.23
34	7.93	8.03	7.98	9.10	9.11	9.11	6.69	6.73	6.71	8.27	8.54	8.41
40	7.89	8.02	7.96	9.21	9.23	9.22	6.66	6.67	6.67	8.07	8.30	8.18
46	7.93	7.95	7.94	9.27	9.28	9.27	6.74	6.76	6.75	8.17	8.18	8.17
52	7.93	8.01	7.97	9.17	9.26	9.22	6.77	6.78	6.77	8.35	8.44	8.39
58	7.96	8.01	7.99	9.25	9.26	9.25	6.82	6.82	6.82	8.07	8.19	8.13
66	8.08	8.03	8.06	9.19	9.17	9.18	6.71	6.76	6.74	8.15	8.20	8.18
70	8.13	8.12	8.13	9.15	9.15	9.15	6.66	6.66	6.66	8.21	8.19	8.20

表4B (続き)

(mg/kg)

経過月数	砒素 (As)		カドミウム (Cd)			ニッケル (Ni)			
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値		
0	3.01	3.23	3.12	3.92	4.11	4.01	36.7	38.3	37.49
4	2.96	3.07	3.02	4.26	4.27	4.26	37.7	37.7	37.70
10	2.93	2.96	2.94	4.15	4.19	4.17	36.9	37.8	37.37
16	2.88	2.97	2.93	4.17	4.19	4.18	36.9	37.1	37.00
22	2.91	2.98	2.94	3.95	3.99	3.97	38.1	39.0	38.55
28	3.01	3.08	3.05	3.70	3.78	3.74	36.3	36.6	36.44
34	3.06	3.10	3.08	4.43	4.44	4.43	38.3	39.1	38.74
40	2.94	2.99	2.96	4.29	4.38	4.34	37.2	37.2	37.20
46	2.94	2.98	2.96	4.04	4.14	4.09	37.4	38.1	37.75
52	2.85	2.90	2.88	4.34	4.37	4.35	37.2	38.7	37.91
58	2.82	2.96	2.89	4.35	4.48	4.42	36.0	36.5	36.26
66	2.96	2.93	2.94	4.22	4.30	4.26	39.0	39.0	39.01
70	3.19	3.34	3.27	4.44	4.40	4.42	36.6	36.7	36.66

表4C① FAMIC-C-12-2の安定性モニタリング試験成績

(質量分率 %)

経過月数	窒素全量 (T-N)		りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)			加里全量 (T-K ₂ O)			石灰全量 (T-CaO)			有機炭素 (O-C)			
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値			
0	4.77	4.79	4.78	8.64	8.64	8.64	0.607	0.619	0.61	5.99	6.03	6.01	20.4	20.6	20.50
8	4.57	4.75	4.66	8.46	8.49	8.48	0.553	0.561	0.56	5.76	5.82	5.79	20.0	20.1	20.01
14	4.71	4.78	4.75	8.52	8.53	8.53	0.560	0.564	0.56	6.03	6.08	6.06	20.1	20.9	20.50
20	4.67	4.72	4.70	8.59	8.59	8.59	0.538	0.541	0.54	5.84	6.17	6.00	20.7	20.8	20.77
26	4.67	4.69	4.68	8.56	8.61	8.59	0.572	0.573	0.57	6.20	6.30	6.25	20.2	20.3	20.29
32	4.79	4.80	4.79	8.62	8.63	8.63	0.583	0.588	0.59	5.62	5.66	5.64	20.1	20.3	20.22
38	4.80	4.81	4.81	8.72	8.76	8.74	0.610	0.614	0.61	5.90	5.95	5.93	20.2	20.4	20.31
44	4.62	4.69	4.66	8.53	8.57	8.55	0.524	0.532	0.53	5.42	5.44	5.43	20.4	20.9	20.67
50	4.63	4.66	4.65	8.73	8.76	8.74	0.611	0.623	0.62	5.78	5.78	5.78	19.0	19.2	19.12
56	4.65	4.68	4.67	8.48	8.54	8.51	0.605	0.608	0.61	5.79	5.87	5.83	19.9	20.2	20.02
62	4.58	4.61	4.59	8.59	8.60	8.60	0.570	0.579	0.57	5.77	5.82	5.79	19.3	19.5	19.44
68	4.63	4.69	4.66	8.60	8.64	8.62	0.560	0.579	0.57	5.85	5.90	5.88	19.8	20.0	19.90
74	4.66	4.69	4.67	8.70	8.72	8.71	0.608	0.611	0.61	6.12	6.14	6.13	20.4	20.5	20.42
83	4.83	4.85	4.84	8.72	8.76	8.74	0.604	0.604	0.60	5.97	5.98	5.98	20.8	21.5	21.18
94	4.77	4.78	4.77	8.66	8.62	8.64	0.576	0.585	0.58	6.03	6.14	6.09	20.8	21.0	20.86

表4C① (続き)

(mg/kg)

経過月数	銅全量 (T-Cu)		平均値	亜鉛全量 (T-Zn)		平均値	砒素 (As)			平均値	カドミウム (Cd)		平均値
0	583	587	585	963	991	977	22.1	22.5	22.3	1.81	1.84	1.83	
8	575	591	583	991	992	991	19.2	20.3	19.7	1.83	1.85	1.84	
14	567	586	576	1,015	1,015	1015	20.7	21.1	20.9	1.79	1.82	1.80	
20	582	582	582	982	988	985	21.8	22.1	22.0	1.78	1.78	1.78	
26	545	547	546	991	996	993	22.9	23.1	23.0	1.84	1.90	1.87	
32	561	575	568	1,000	1,004	1002	22.4	22.9	22.6	1.82	1.82	1.82	
38	570	571	570	985	996	990	22.7	22.9	22.8	1.77	1.79	1.78	
44	567	569	568	981	992	986	21.7	21.9	21.8	1.83	1.83	1.83	
50	571	579	575	1,001	1,003	1002	19.8	20.0	19.9	1.82	1.88	1.85	
56	587	589	588	996	1,002	999	21.4	23.7	22.6	1.85	1.91	1.88	
62	554	561	558	997	1,006	1001	21.1	21.6	21.4	1.77	1.82	1.79	
68	575	577	576	998	1,007	1003	20.4	20.5	20.5	1.72	1.81	1.77	
74	572	574	573	983	999	991	22.1	22.9	22.5	1.83	1.85	1.84	
83	559	566	563	992	995	993	21.3	22.4	21.8	1.72	1.80	1.76	
94	547	552	550	991	995	993	23.6	22.6	23.1	1.74	1.80	1.77	

表4C① (続き)

(mg/kg)

経過月数	水銀 (Hg)		平均値	ニッケル (Ni)		平均値	クロム (Cr)			平均値	鉛 (Pb)		平均値
0	0.464	0.470	0.467	73.3	74.3	73.8	78.6	81.2	79.9	36.4	36.5	36.5	
8	0.448	0.478	0.463	74.2	74.6	74.4	80.5	80.5	80.5	35.1	35.1	35.1	
14	0.443	0.473	0.458	78.3	78.7	78.5	75.4	79.4	77.4	36.1	36.9	36.5	
20	0.511	0.514	0.512	72.7	74.3	73.5	81.8	82.9	82.3	35.3	35.3	35.3	
26	0.501	0.503	0.502	73.3	73.4	73.4	86.6	88.5	87.5	35.4	35.9	35.6	
32	0.462	0.479	0.471	77.3	77.4	77.4	80.4	81.2	80.8	36.0	36.0	36.0	
38	0.506	0.514	0.510	74.7	74.9	74.8	79.1	79.4	79.2	35.3	35.8	35.5	
44	0.488	0.509	0.498	71.6	72.6	72.1	79.5	80.2	79.9	35.3	35.7	35.5	
50	0.483	0.520	0.502	75.9	76.3	76.1	83.1	84.0	83.5	35.5	36.0	35.8	
56	0.476	0.484	0.480	76.1	76.3	76.2	80.5	82.1	81.3	36.8	37.3	37.1	
62	0.466	0.476	0.471	74.3	74.4	74.3	77.2	79.3	78.2	34.6	35.1	34.8	
68	0.489	0.501	0.495	73.2	75.5	74.4	80.8	83.5	82.2	34.8	35.8	35.3	
74	0.512	0.522	0.517	74.0	74.6	74.3	78.8	81.0	79.9	36.1	36.9	36.5	
83	0.470	0.523	0.497	72.7	72.8	72.7	78.5	78.7	78.6	35.7	36.2	35.9	
94	0.496	0.492	0.494	77.6	77.5	77.5	80.6	80.0	80.3	36.4	36.2	36.3	

表4C② FAMIC-C-18-2の安定性モニタリング試験成績

(質量分率%)

経過月数	窒素全量 (T-N)			りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)			加里全量 (T-K ₂ O)			石灰全量 (T-CaO)			有機炭素 (O-C)		
	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値
0	4.70	4.71	4.70	4.61	4.67	4.64	0.107	0.118	0.113	1.62	1.68	1.65	36.6	36.7	36.7
5	4.78	4.79	4.79	4.60	4.60	4.60	0.117	0.120	0.119	1.61	1.65	1.63	37.6	37.8	37.7
11	4.81	4.85	4.83	4.60	4.65	4.62	0.117	0.118	0.118	1.68	1.68	1.68	37.8	38.0	37.9
19	4.82	4.84	4.83	4.43	4.72	4.57	0.116	0.116	0.116	1.62	1.65	1.63	38.0	37.8	37.9
23	4.84	4.80	4.82	4.49	4.40	4.44	0.111	0.111	0.111	1.64	1.69	1.67	37.8	37.8	37.8

表4C② (続き)

(mg/kg)

経過月数	銅全量 (T-Cu)			亜鉛全量 (T-Zn)			砒素 (As)			カドミウム (Cd)		
	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値
0	919	922	920	1,547	1,553	1550	12.0	13.7	12.8	1.80	1.93	1.87
5	911	913	912	1,533	1,537	1535	14.0	14.3	14.2	1.86	1.93	1.89
11	951	954	952	1,547	1,547	1547	13.3	13.9	13.6	1.81	1.83	1.82
19	874	882	878	1,512	1,516	1514	13.6	13.9	13.7	1.85	1.85	1.85
23	926	920	923	1,561	1,557	1559	14.7	13.7	14.2	1.88	1.82	1.85

表4C② (続き)

(mg/kg)

経過月数	水銀 (Hg)			ニッケル (Ni)			クロム (Cr)			鉛 (Pb)		
	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値	全量	標準偏差	平均値
0	0.905	1.012	0.959	24.2	26.2	25.2	42.4	46.5	44.5	23.0	24.8	23.9
5	0.862	1.049	0.955	24.8	25.6	25.2	49.3	51.3	50.3	24.8	25.3	25.1
11	0.878	1.005	0.941	24.9	25.4	25.1	44.0	44.2	44.1	24.3	24.8	24.5
19	0.933	0.866	0.900	25.2	25.4	25.3	43.9	44.4	44.2	23.3	23.2	23.3
23	1.254	0.940	1.097	24.7	25.2	24.9	43.7	46.0	44.8	26.4	27.1	26.8

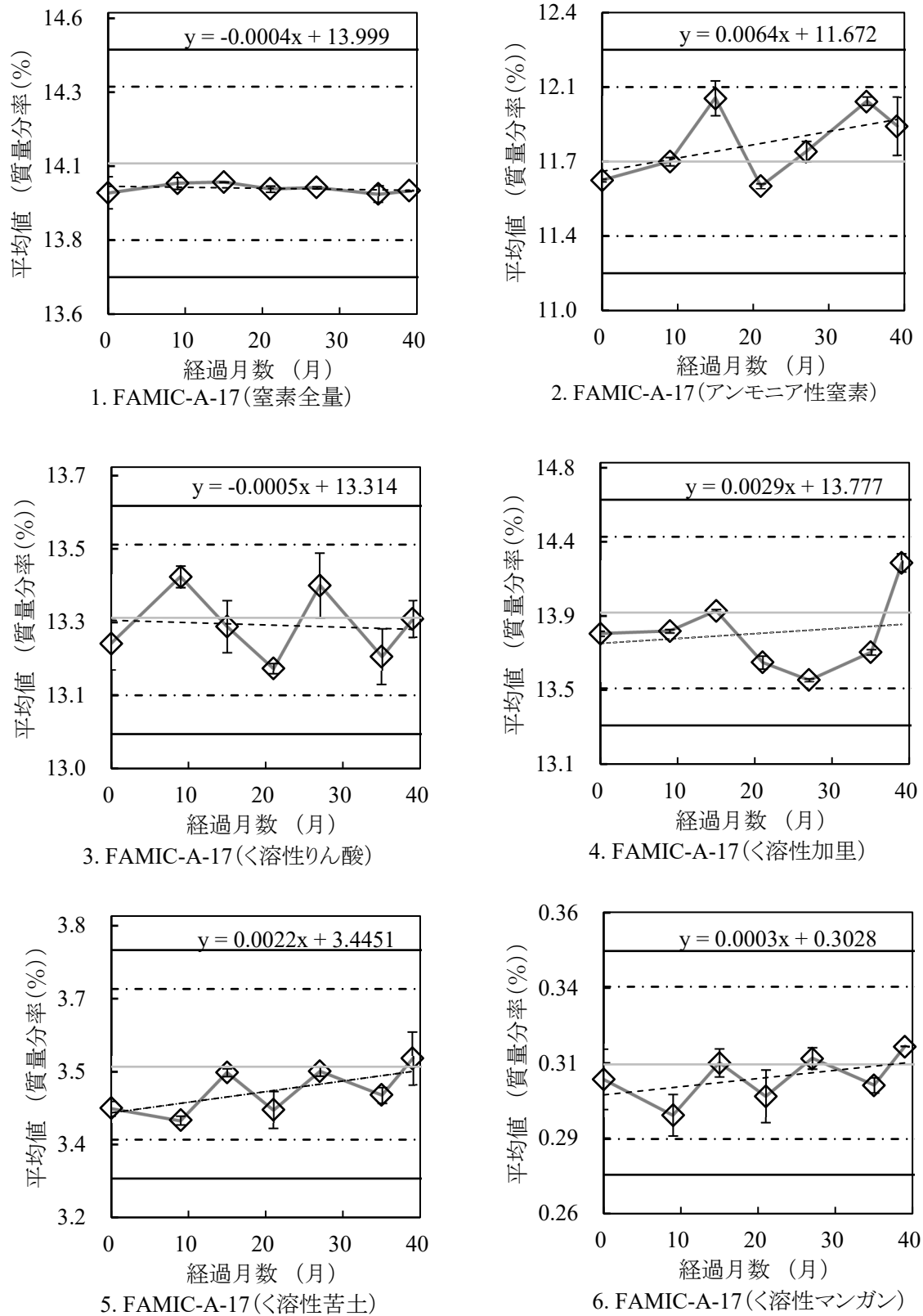
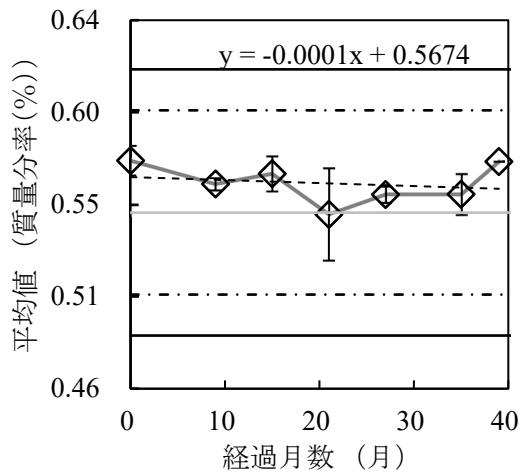
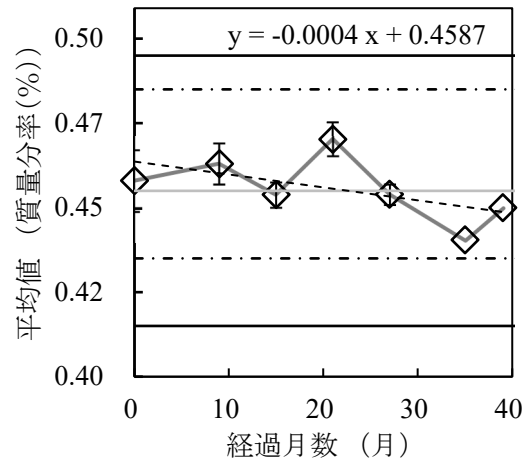


図 1A FOMIC-A-17 のモニタリング分析結果

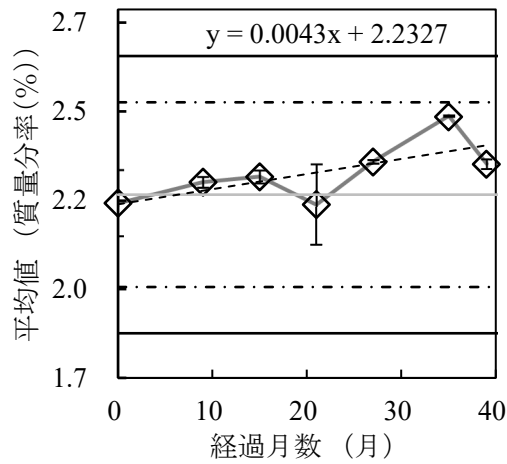
◇: 平均値 エラーバー: 測定値の幅 破線: 回帰直線
 実線: 上下処置限界 一点鎖線: 上下警戒限界 灰色実線: 認証値



7. FOMIC-A-17(く溶性ほう素)

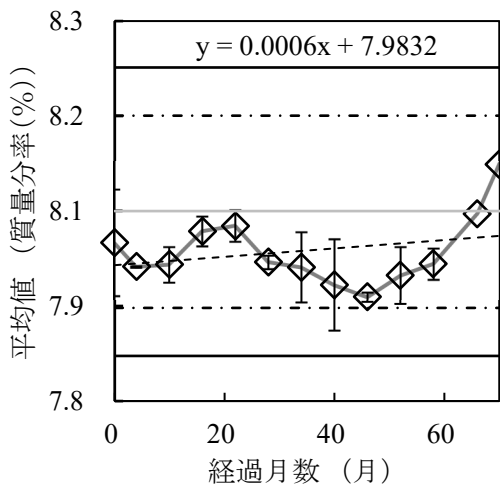


8. FOMIC-A-17(水溶性ほう素)

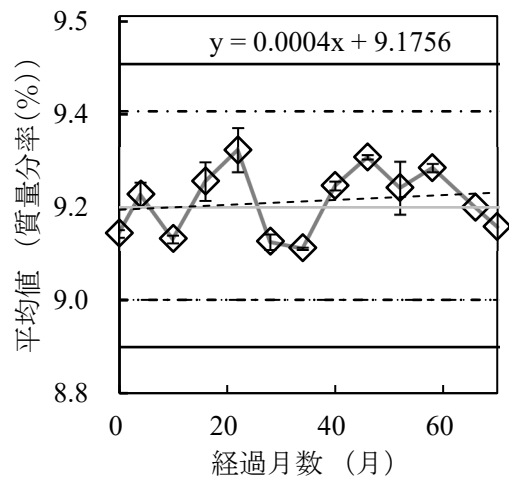


9. FOMIC-A-17(尿素性窒素)

図 1A (続き)



1. FOMIC-B-14(アンモニア性窒素)



2. FOMIC-B-14(可溶性りん酸)

図 1B FOMIC-B-14 のモニタリング分析結果

(脚注は図 1A 参照)

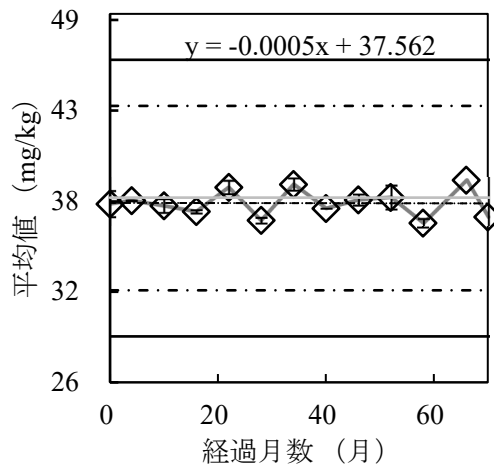
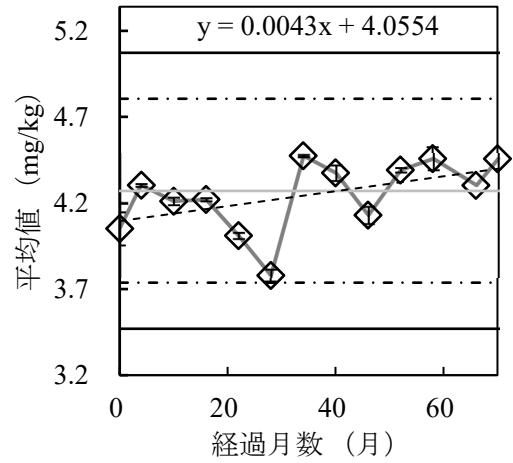
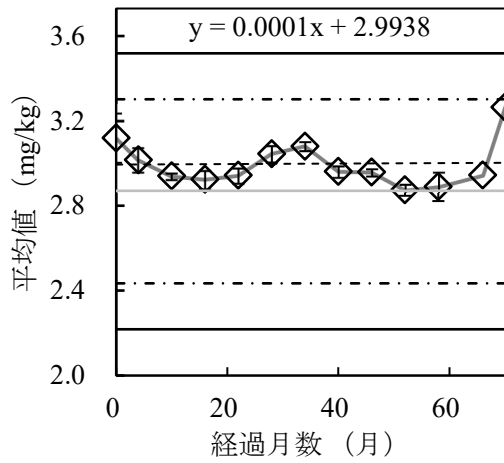
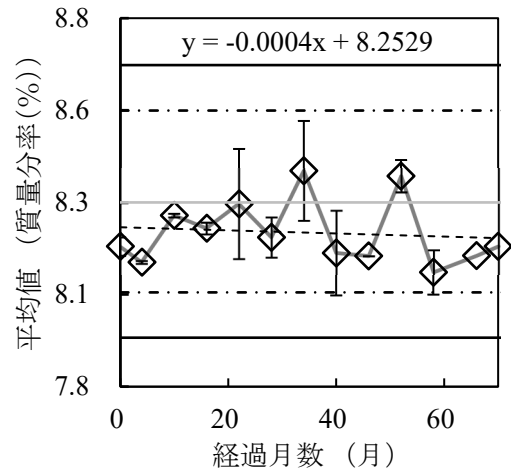
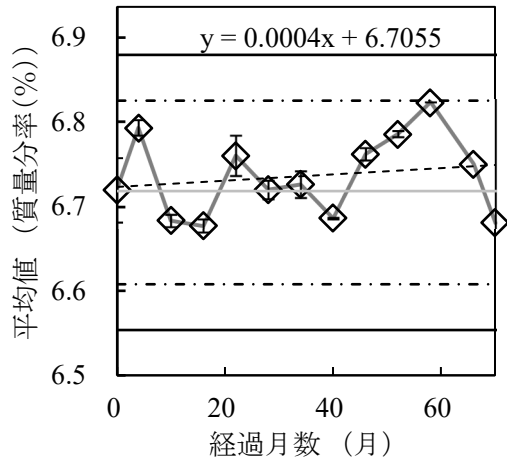
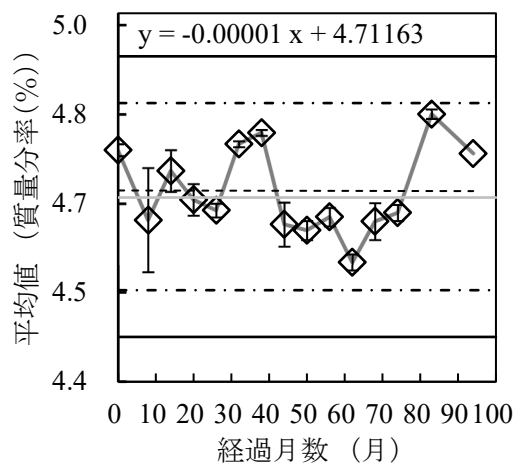
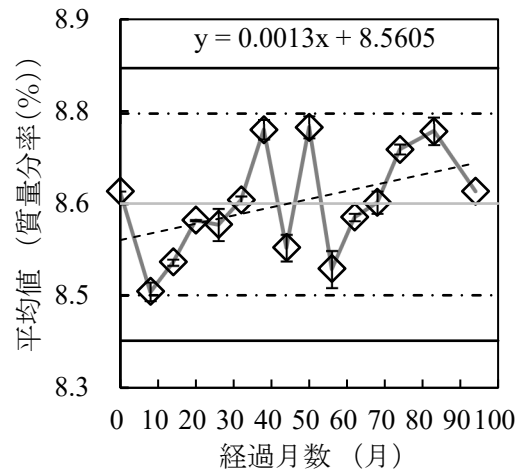


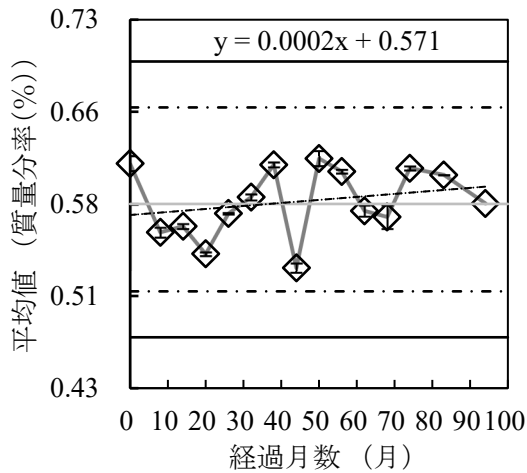
図 1B (続き)



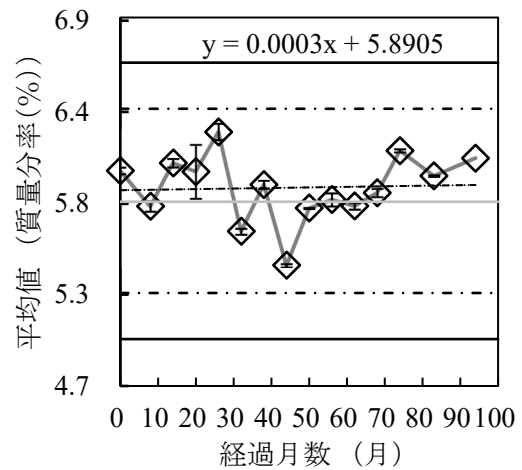
1. FAMIC-C-12-2 (窒素全量)



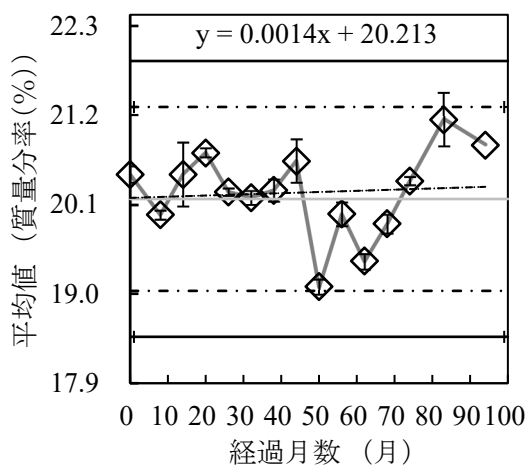
2. FAMIC-C-12-2 (りん酸全量)



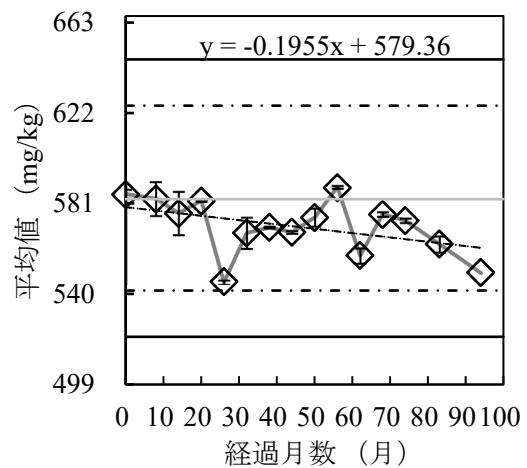
3. FAMIC-C-12-2 (加里全量)



4. FAMIC-C-12-2 (石灰全量)



5. FAMIC-C-12-2 (有機炭素)



6. FAMIC-C-12-2 (銅)

図 1C① FAMIC-C-12-2 のモニタリング分析結果
(脚注は図 1A 参照)

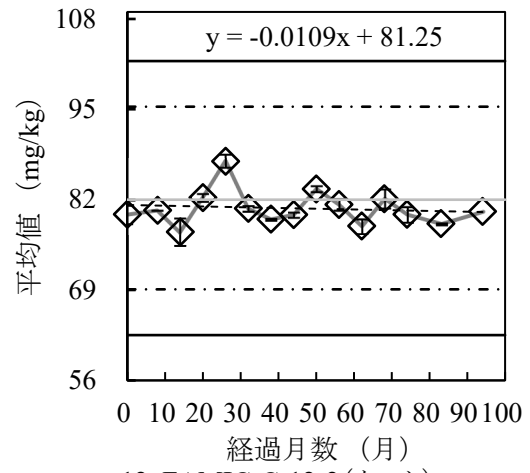
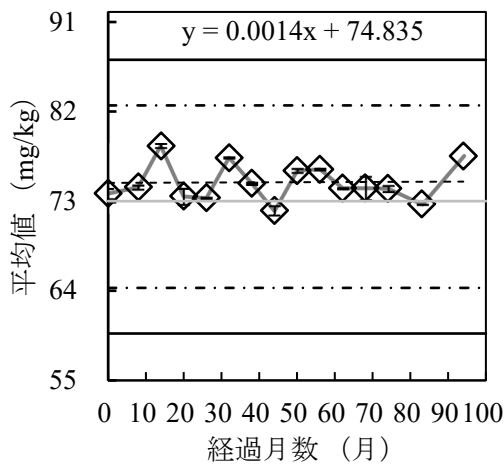
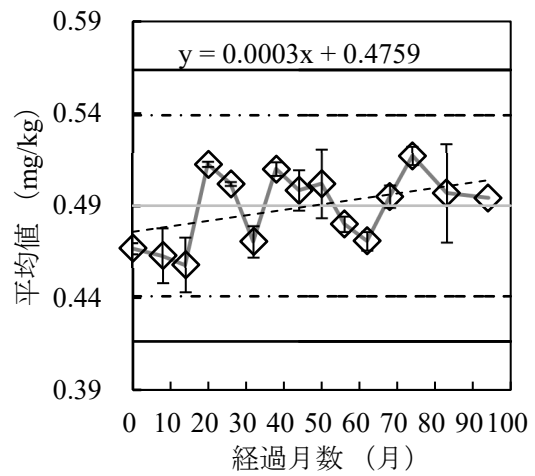
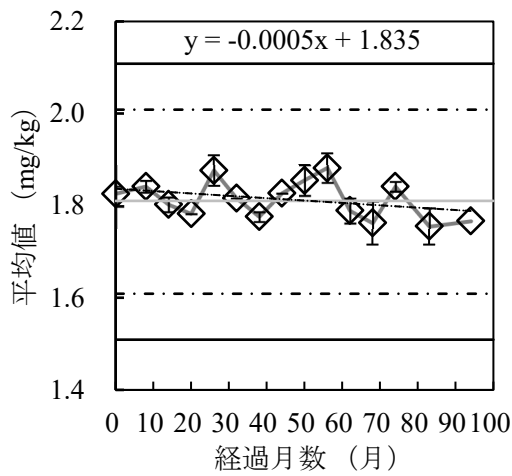
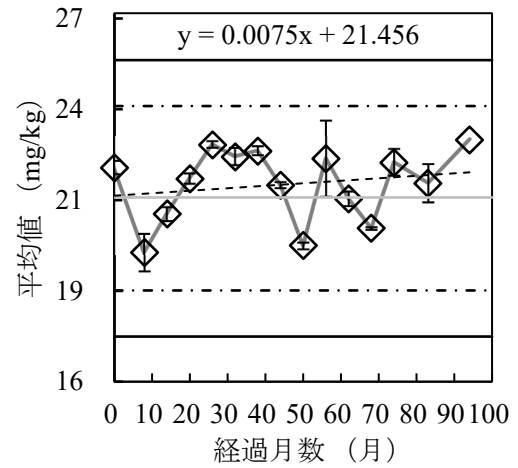
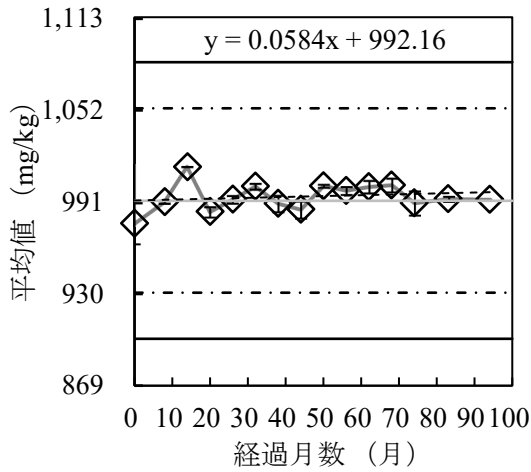
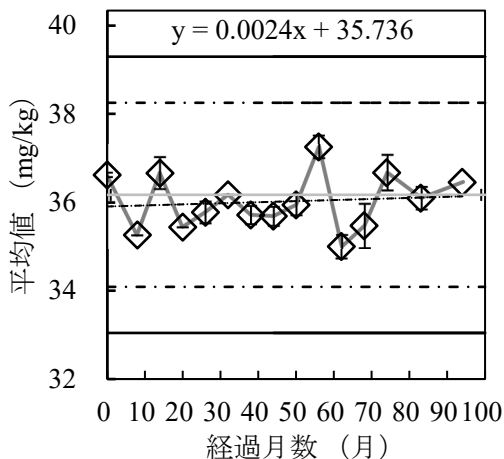
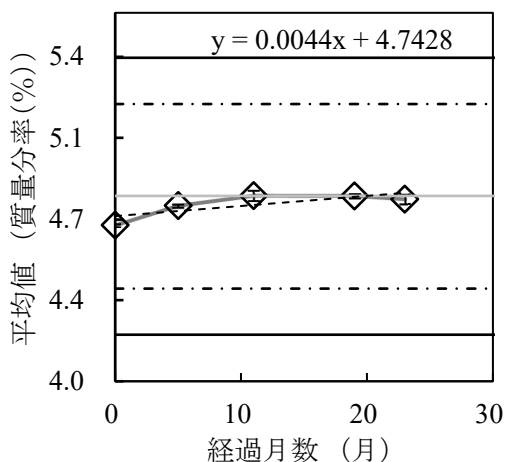


図 1C① (続き)

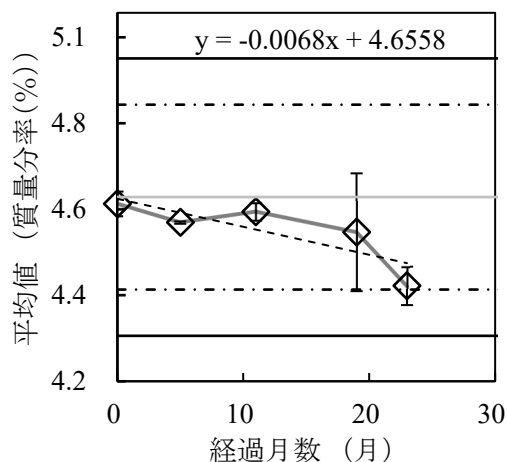


13. FOMIC-C-12-2 (鉛)

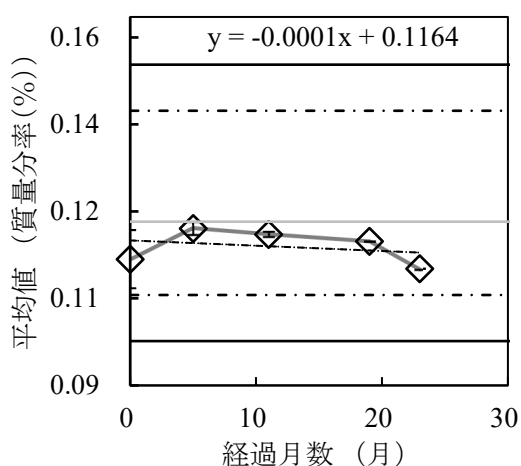
図 1C① (続き)



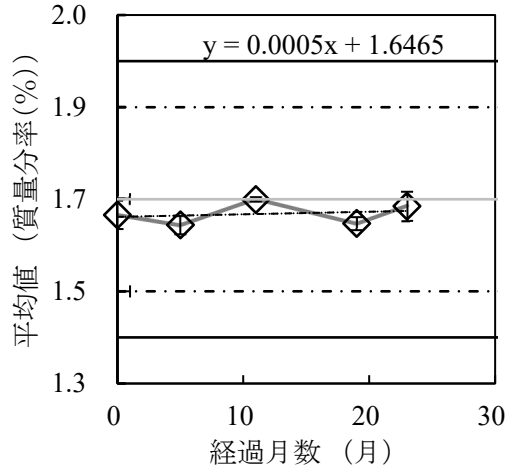
1. FOMIC-C-18-2 (窒素全量)



2. FOMIC-C-18-2 (りん酸全量)



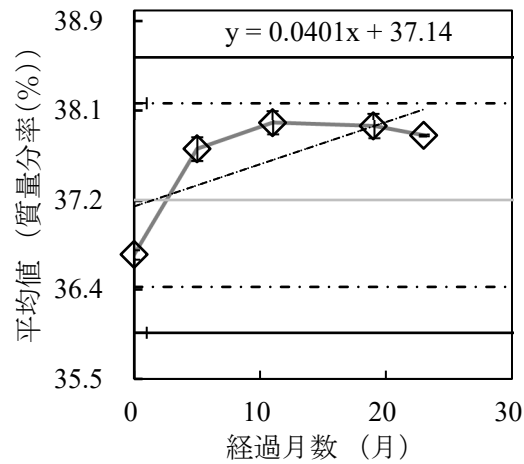
3. FOMIC-C-18-2 (加里全量)



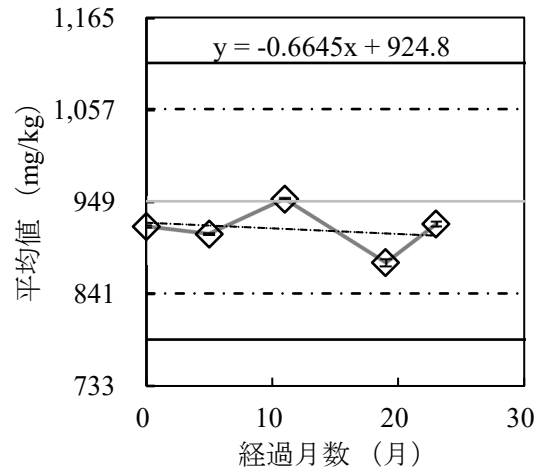
4. FOMIC-C-18-2 (石灰全量)

図 1C② FOMIC-C-18-2 のモニタリング分析結果

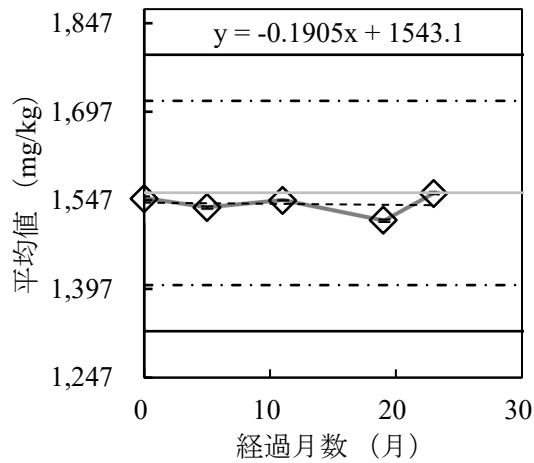
(脚注は図 1A 参照)



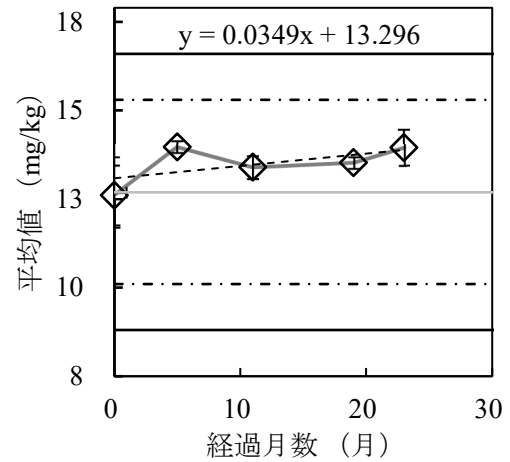
5. FAMIC-C-18-2(有機炭素)



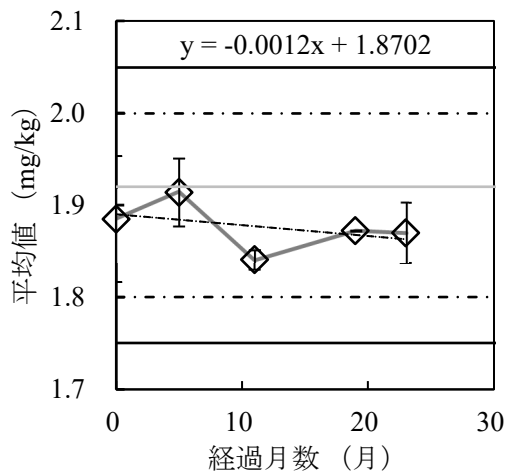
6. FAMIC-C-18-2(銅)



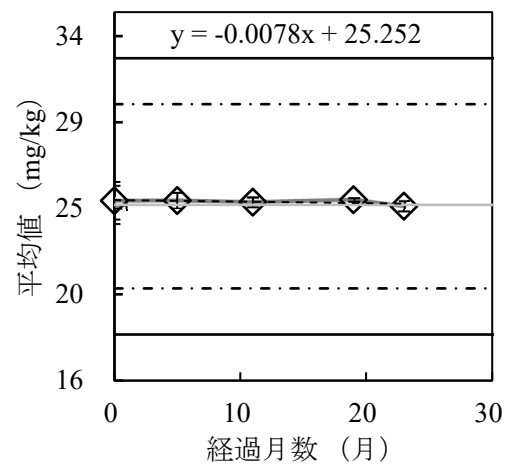
7. FAMIC-C-18-2(亜鉛)



8. FAMIC-C-18-2(ひ素)



9. FAMIC-C-18-2(カドミウム)



10. FAMIC-C-18-2(ニッケル)

図 1C② (続き)

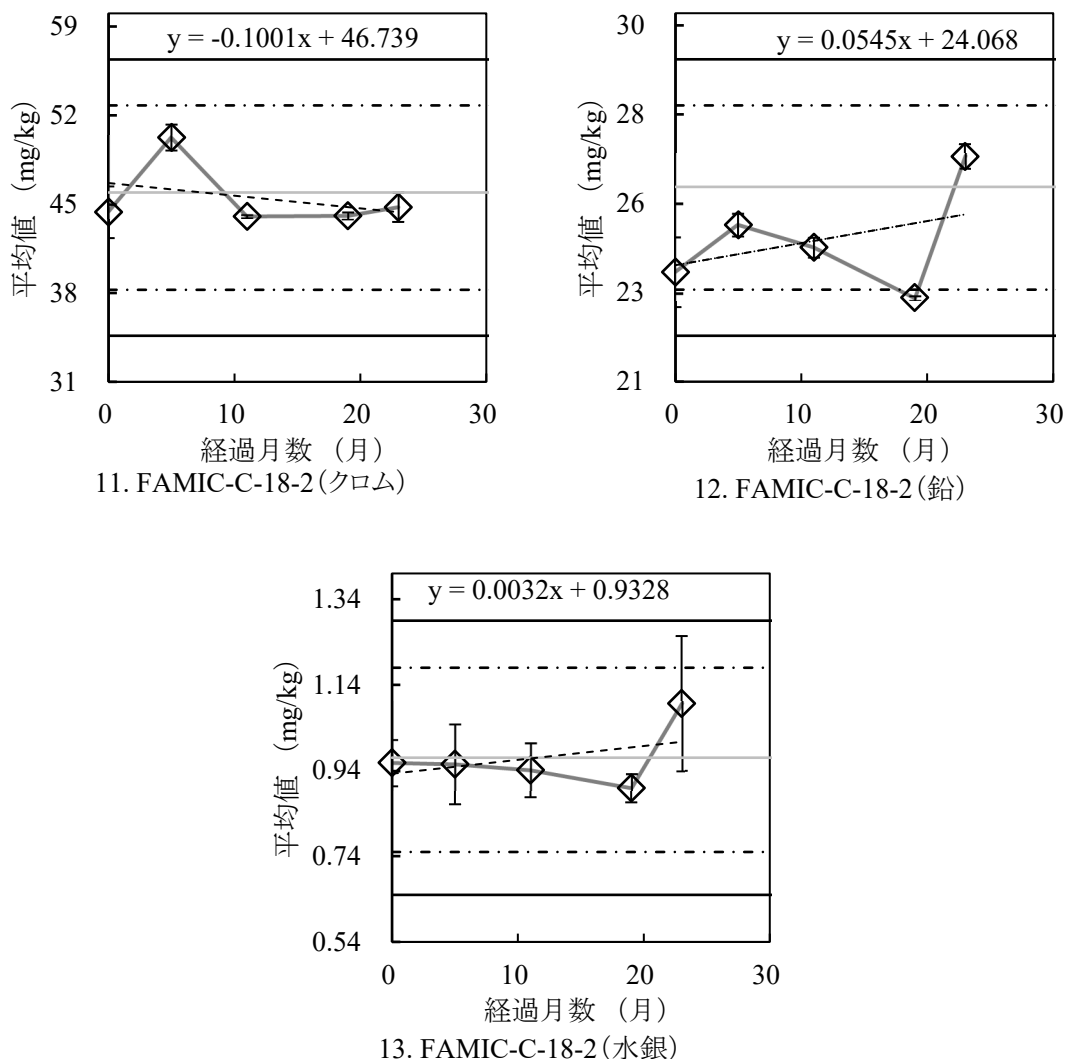


図 1C② (続き)

2) 肥料認証標準物質の長期安定性評価

FAMIC-A-17, FAMIC-B-14, FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 のモニタリング実施開始時から現在までの経過月数, 各回の分析値の平均値及びモニタリング分析の評価結果を含有量が%オーダーのものを表 5-1 に, mg/kg オーダーのものを表 5-2 に示した. 安定性の評価は, 経過月数の平均値と各回の測定の平均値を用いて ISO Guide 35 (JIS Q 0035)¹⁰⁾を参考に次の手順で行った. まず, (d)式及び(e)式より, 経過月数及び分析値との回帰直線の傾き(b_1)及び切片(b_0)を求めた. 次に, (f)式及び(g)式より, 予測の標準誤差(s)及び回帰直線の傾きの標準誤差(s_{b_1})を求めた. 回帰直線の傾きの標準誤差(s_{b_1})と t 値($t_{0.95, T-2}$)を乗じた値と傾きの絶対値($|b_1|$)を比較した.

その結果, FAMIC-A-17, FAMIC-B-14, FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 の全ての認証成分において, $|b_1| < s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$ となり, 傾きは有意とは認められなかった. これにより FAMIC-A-17, FAMIC-B-14, FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 の認証成分は, モニタリング実施開始時から 3 年 3 ヶ月, 5 年 10 ヶ月, 7 年 10 ヶ月間, 1 年 11 ヶ月間安定であると判断された.

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

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

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

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

判定基準: $|b_1| < s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$ \dots 有意でない(安定)
 $|b_1| \geq s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$ \dots 有意である(不安定)

T : モニタリング実施回数(A-17(7回), B-14(13回), C-12-2(15回), C-18-2(5回))

x_i : 調製後初回のモニタリング実施日からモニタリング実施日までの経過時間(月)

\bar{x} : x_i の平均値(月)

y_i : モニタリング実施日の測定値の平均値

\bar{y} : y_i の分析結果の総平均値

b_1 : 回帰直線の傾き

b_0 : 回帰直線の切片

s : 予測の標準誤差(推定残差($y_i - \hat{y}_i$))の標準偏差

\hat{y}_i : x_i に対する y_i の予測値

s_{b_1} : 回帰直線の傾きの標準誤差

$t_{0.95, m-2}$: t 値(両側有意水準 $\alpha = 0.05$, 自由度 $T - 2$)

表5-1 標準物質の安定性のモニタリング^{a)}分析の評価結果

成分	\bar{x} ^{b)} (mon.)	\bar{y} ^{c)} (%) ^{j)}	回帰分析結果				s_{b_1} ^{g)} ($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 基準 ^{h)} ($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	判定 ⁱ⁾
			b_1 ^{d)}	b_0 ^{e)}	s ^{f)}				
			($\frac{\%}{\text{mon.}}$) ^{j)}	(%) ^{j)}	(%) ^{j)}				
(FAMIC-A-17)									
窒素全量 (T-N)	20.9	13.99	-0.0004	14.00	0.016	0.0005	0.0012	○	
アンモニア性窒素 (A-N)	20.9	11.81	0.0064	11.672	0.161	0.0047	0.0121	○	
＜溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	20.9	13.30	-0.0005	13.314	0.087	0.0025	0.0065	○	
＜溶性加里 (C-K ₂ O)	20.9	13.84	0.0029	13.777	0.246	0.0072	0.0184	○	
＜溶性苦土 (C-MgO)	20.9	3.491	0.0022	3.445	0.041	0.0012	0.0031	○	
＜溶性マンガン (C-MnO)	20.9	0.309	0.0003	0.303	0.008	0.0002	0.0006	○	
＜溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	20.9	0.564	-0.0001	0.567	0.010	0.0003	0.0008	○	
水溶性ほう素 (W-B ₂ O ₃)	20.9	0.451	-0.0004	0.459	0.009	0.0002	0.0006	○	
尿素性窒素 (U-N)	20.9	2.321	0.0043	2.233	0.065	0.0019	0.0049	○	
(FAMIC-B-14)									
アンモニア性窒素 (A-N)	34.3	8.00	0.0006	7.98	0.05	0.0006	0.0014	○	
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	34.3	9.19	0.0004	9.18	0.06	0.0008	0.0017	○	
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	34.3	6.72	0.0004	6.71	0.05	0.0007	0.0015	○	
水溶性加里 (W-K ₂ O)	34.3	8.24	-0.0004	8.25	0.09	0.0011	0.0025	○	
(FAMIC-C-12-2)									
窒素全量 (T-N)	44.6	4.71	0.0000	4.71	0.08	0.0007	0.0015	○	
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	44.6	8.62	0.0013	8.56	0.08	0.0007	0.0016	○	
加里全量 (T-K ₂ O)	44.6	0.58	0.0002	0.57	0.03	0.0003	0.0006	○	
石灰全量 (T-CaO)	44.6	5.91	0.0003	5.89	0.21	0.0020	0.0044	○	
有機炭素 (O-C)	44.6	20.28	0.0014	20.21	0.55	0.0052	0.0113	○	
(FAMIC-C-18-2)									
窒素全量 (T-N)	11.6	4.79	0.0044	4.74	0.04	0.0020	0.0064	○	
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	11.6	4.58	-0.0068	4.66	0.05	0.0027	0.0086	○	
加里全量 (T-K ₂ O)	11.6	0.12	-0.0001	0.12	0.004	0.0002	0.0006	○	
石灰全量 (T-CaO)	11.6	1.65	0.0005	1.65	0.02	0.0012	0.0039	○	
有機炭素 (O-C)	11.6	37.60	0.0401	37.14	0.41	0.0218	0.0692	○	

- a) FAMIC-A-17は調製後のモニタリング実施日から起算して39ヶ月後までモニタリング
 FAMIC-B-14は調製後のモニタリング実施日から起算して70ヶ月後までモニタリング
 FAMIC-C-12-2は調製後のモニタリング実施日から起算して94ヶ月後までモニタリング
 FAMIC-C-18-2は調製後のモニタリング実施日から起算して23ヶ月後までモニタリング
- b) 調製後初回のモニタリング実施日からモニタリング実施日までの経過時間の平均値(月)
- c) FAMIC-A-17の分析結果の総平均値(データ数 = モニタリング実施回数(7) × 併行分析数(2))
 FAMIC-B-14の分析結果の総平均値(データ数 = モニタリング実施回数(13) × 併行分析数(2))
 FAMIC-C-12-2の分析結果の総平均値(データ数 = モニタリング実施回数(15) × 併行分析数(2))
 FAMIC-C-18-2の分析結果の総平均値(データ数 = モニタリング実施回数(5) × 併行分析数(2))
- d) 回帰直線の傾き
 e) 回帰直線の切片
 f) 予測の標準誤差
 g) 回帰直線の傾きの標準誤差
 h) $s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$
 i) ○は次式に適合して傾きは有意とは認められず、安定と評価した成分
 $|b_1| < s_{b_1} \times t_{0.95, T-2}$
 j) 表中の%は質量分率

表5-2 標準物質の安定性のモニタリング^{a)}分析の評価結果

成分	\bar{x} ^{b)} (mon.)	\bar{y} ^{c)} (mg/kg)	回帰分析結果				s_{b_1} ^{g)} ($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$)	判定 基準 ^{h)} ($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$)	判定 ⁱ⁾
			b_1 ^{d)}	b_0 ^{e)}	s ^{f)}				
			($\frac{\text{mg/kg}}{\text{mon.}}$)	(mg/kg)	(mg/kg)				
(FAMIC-B-14)									
ひ素 (As)	34.3	3.00	0.0001	2.99	0.11	0.0014	0.0031	○	
カドミウム (Cd)	34.3	4.20	0.0043	4.06	0.19	0.0023	0.0051	○	
ニッケル (Ni)	34.3	37.5	-0.0005	37.6	0.90	0.0111	0.0245	○	
(FAMIC-C-12-2)									
銅全量 (T-Cu)	44.6	571	-0.1955	579	11.7	0.1101	0.2379	○	
亜鉛全量 (T-Zn)	44.6	995	0.0584	992	9.3	0.0874	0.1889	○	
ひ素 (As)	44.6	21.8	0.0075	21.5	1.11	0.0105	0.0227	○	
カドミウム (Cd)	44.6	1.81	-0.0005	1.84	0.04	0.0004	0.0008	○	
水銀 (Hg)	44.6	0.49	0.00030	0.48	0.02	0.0002	0.0004	○	
ニッケル (Ni)	44.6	74.9	0.0014	74.8	1.93	0.0183	0.0395	○	
クロム (Cr)	44.6	80.8	-0.0109	81.3	2.55	0.0240	0.0519	○	
鉛 (Pb)	44.6	35.8	0.0024	35.7	0.01	0.0061	0.0131	○	
(FAMIC-C-18-2)									
銅全量 (T-Cu)	11.6	917	-0.6645	925	29.99	1.5739	5.0088	○	
亜鉛全量 (T-Zn)	11.6	1541	-0.1905	1543	19.92	1.0450	3.3258	○	
ひ素 (As)	11.6	13.7	0.0349	13.3	0.51	0.0270	0.0858	○	
カドミウム (Cd)	11.6	1.86	-0.0012	1.87	0.03	0.0015	0.0046	○	
水銀 (Hg)	11.6	0.97	0.0032	0.93	0.078	0.0041	0.0131	○	
ニッケル (Ni)	11.6	25.2	-0.0078	25.3	0.13	0.0068	0.0215	○	
クロム (Cr)	11.6	45.6	-0.1001	46.7	2.88	0.1513	0.4814	○	
鉛 (Pb)	11.6	24.7	0.0545	24.1	1.41	0.0742	0.2361	○	

脚注は表5-1を参照

3) 肥料認証標準物質の有効期限

上述のモニタリングによる長期安定性評価の結果、現段階で FAMIC-A-17 はモニタリング実施開始時から 3 年 3 ヶ月間、FAMIC-B-14 は 5 年 10 ヶ月間、FAMIC-C-12-2 は 7 年 10 ヶ月間、FAMIC-C-18-2 は 1 年 11 ヶ月間安定であると判断されたことから、設定されている有効期限の妥当性について、現在までの確認ができた。

4) 肥料認証標準物質の有効期限についての推定

FAMIC 内の事務処理の都合上、有効期限はこれまで「○年 6 月末」と設定している。このことから、有効期限の延長について、6 月を基準とし、既に有効期限を過ぎている FAMIC-C12-2 を除いた各標準物質について、有効期限についての推定を行った。推定方法として、ISO Guide 35 (JIS Q 0035)¹⁰⁾を参考に認証値設定から数年後 6 月末までの月数が経過した時点での長期安定性による不確かさを (h) 式により算出し、警戒限界と比較することで有効期限の推定を行い、表 6A~C に示した。その結果、FAMIC-A-17 については、2023 年 6 月末までにく溶性りん酸及びく溶性加里の長期安定性による不確かさが警戒限界を超え、FAMIC-B-14 については、2030 年 6 月末までに水溶性りん酸の長期安定性による不確かさが警戒限界を超え、FAMIC-C-18-2

については、2021年6月末までに鉛の長期安定性による不確かさが警戒限界を超えることが推測された。一方、FAMIC-B-14に関しては有効期限を2029年まで延長への可能性が推定された。

$$u_{lts} = s_{b1} m_{\text{expir}} \cdots (h)$$

m_{expir} : モニタリング実施開始時からの月数

u_{lts} : 長期安定性による不確かさの推測値

表6A : FAMIC-A-17の不確かさの推測値

成分	s_{b1}	u_{lts}			警戒限界
		47ヶ月後 (2021年6月末)	59ヶ月後 (2022年6月末)	71ヶ月後 (2023年6月末)	
窒素全量 (T-N)	0.000	0.023	0.028	0.034	0.266
アンモニア性窒素 (A-N)	0.005	0.221	0.277	0.333	0.362
く溶性りん酸 (C-P ₂ O ₅)	0.003	0.120	0.150	0.181	0.176
く溶性加里 (C-K ₂ O)	0.007	0.337	0.422	0.508	0.448
く溶性苦土 (C-MgO)	0.001	0.056	0.070	0.085	0.158
く溶性マンガン (C-MnO)	0.000	0.010	0.013	0.016	0.025
く溶性ほう素 (C-B ₂ O ₃)	0.000	0.014	0.018	0.021	0.045
水溶性ほう素 (W-B ₂ O ₃)	0.000	0.012	0.015	0.018	0.024
尿素性窒素 (U-N)	0.002	0.089	0.112	0.135	0.259

表6B : FAMIC-B-14の不確かさの推測値

成分	s_{b1}	u_{lts}			警戒限界
		162ヶ月後 (2028年6月末)	174ヶ月後 (2029年6月末)	186ヶ月後 (2030年6月末)	
アンモニア性窒素 (A-N)	0.001	0.100	0.108	0.115	0.137
可溶性りん酸 (S-P ₂ O ₅)	0.001	0.126	0.136	0.145	0.173
水溶性りん酸 (W-P ₂ O ₅)	0.001	0.107	0.115	0.123	0.120
水溶性加里 (W-K ₂ O)	0.001	0.182	0.196	0.209	0.247
ひ素 (As)	0.001	0.225	0.242	0.259	0.433
カドミウム (Cd)	0.002	0.377	0.405	0.433	0.534
ニッケル (Ni)	0.011	1.801	1.934	2.067	5.899

表6C :FAMIC-C18-2の不確かさの推測値

成分	s_{b1}	u_{its}			警戒限界
		31ヶ月後 (2021年6月末)	43ヶ月後 (2022年6月末)	55ヶ月後 (2023年6月末)	
窒素全量 (T-N)	0.002	0.063	0.087	0.111	0.40
りん酸全量 (T-P ₂ O ₅)	0.003	0.084	0.116	0.149	0.23
加里全量 (T-K ₂ O)	0.000	0.006	0.008	0.011	0.02
石灰全量 (T-CaO)	0.001	0.038	0.053	0.067	0.17
有機炭素 (O-C)	0.022	0.674	0.935	1.196	0.87
銅全量 (T-Cu)	1.574	48.791	67.677	86.564	108.36
亜鉛全量(T-Zn)	1.045	32.396	44.937	57.477	156.03
ひ素 (As)	0.027	0.836	1.159	1.483	2.60
カドミウム(Cd)	0.001	0.045	0.062	0.080	0.10
水銀 (Hg)	0.004	0.127	0.177	0.226	0.21
ニッケル(Ni)	0.007	0.210	0.291	0.372	4.81
クロム(Cr)	0.151	4.689	6.504	8.319	7.26
鉛 (Pb)	0.074	2.300	3.190	4.080	2.28

回帰直線の傾きの標準誤差(s_{b_1})は、回帰直線の予測値と測定値の標準誤差(s)を調製後初回のモニタリング実施日から最後に行われたモニタリング実施日までの経過時間(x_i)の偏差平方和の平方根で除したものであり、分母はモニタリング実施のたびに増加する。また分子は、試行回数の増加とともに一定の値に近づくことから、安定性が確認されている前提条件下では、長期的には回帰直線の傾きの標準誤差(s_{b_1})は時間経過とともに減少する。

このことから、FAMIC-A-17 及び FAMIC-C-18-2 については、現在設定している有効期限前に不確かさの警戒限界を超えてしまっているが、これは現在の回帰直線の傾きの標準誤差(s_{b_1})を用いているためであり、今後のモニタリングとともに回帰直線の傾きの標準誤差(s_{b_1})が減少、長期安定性による不確かさ推測値(u_{its})が減少し、推定有効期限が増加していくことが予想されるので、今後のモニタリング結果を注視していくこととする。

なお、昨年度、FAMIC-C-18-2 の水銀について、併行分析して得られた2つの分析値のばらつきが大きいため認証値を参考値としており、現在新規に汚泥肥料を基材とする標準物質を調製中である。

4. まとめ

肥料認証標準物質として標準物質 A(高度化成肥料 FAMIC-A-17)、標準物質 B(普通化成肥料 FAMIC-B-14)及び標準物質 C(汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2)のモニタリングによる長期安定性試験を実施した。この結果、FAMIC-A-17、FAMIC-B-14、FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 の各分析における分析結果の平均値は、いずれの成分も認証値設定時の分析において得られた不確かさから算出された、分析値のばらつきに対し推定される範囲における警戒限界を超えることはなかった。また、分析結果を ISO Guide 35 (JIS Q 0035)¹⁰⁾を参考に統計解析し、安定性を評価したところ、FAMIC-A-17、FAMIC-B-14、FAMIC-C-12-2 及び FAMIC-C-18-2 についてモニタリング実施開始時から、各々3年3ヶ月間、5年10ヶ月間、7年10ヶ月間、1年11ヶ月間の全ての認証成分の安定性が確認され、FAMIC-B-14 について、有効期限を2029年まで延長し、長期安定性試験に耐えうる可能性が高いことが示された。

ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025)²⁾では、分析方法の妥当性確認において、標準物質を用いて真度及び精度の

評価が推奨される方法の一つに挙げられている。また、日常の分析結果の妥当性の確保において、結果として得られるデータは、実行可能な場合に、統計的手法を用いて集積された分析結果を解析し、評価することが推奨されている。このことから、認証成分の長期安定性を確認している肥料認証標準物質の利用促進が肥料分析の品質保証や技能向上に貢献するところは大きく、利用者の分析結果の信頼性の向上に寄与するものと考えられる。

文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) : 肥料認証標準物質の配布申請手続き
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6.html>>
- 2) ISO/IEC 17025 (2017): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2018, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 3) 秋元里乃, 廣井利明, 八木寿治, 顯谷久典, 舟津正人, 矢野愛子, 坂東悦子, 藤田真理子, 白井裕治, 柴田政人: 2012 年度 肥料認証標準物質の開発－汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12－, 肥料研究報告, **6**, 84-100 (2013)
- 4) 加島信一, 八木寿治, 顯谷久典, 秋元里乃, 矢野愛子, 藤田真理子, 橋本良美, 廣井利明, 白井裕治, 久保明: 2013 年度 肥料認証標準物質の開発－高度化成肥料 FAMIC-A-13－, 肥料研究報告, **7**, 95-104 (2014)
- 5) 阿部進, 秋元里乃, 坂井田里子, 八木寿治, 伊藤浩平, 田中雄大, 加島信一, 廣井利明, 鈴木時也, 佐久間健太, 橋本良美, 白井裕治: 2014 年度 肥料認証標準物質の開発－普通化成肥料 FAMIC-B-14 の調製－, 肥料研究報告, **8**, 140-152 (2015)
- 6) 秋元里乃, 阿部進, 八木寿治, 長谷川正憲, 佐久間健太, 白井裕治: 2015 年度 肥料認証標準物質の開発－汚泥発酵肥料 FAMIC-C-12 の再認証－, 肥料研究報告, **9**, 145-169 (2016)
- 7) 秋元里乃, 小塚健志, 坂井田里子, 伊藤浩平, 中村信仁, 橋本良美, 白井裕治: 2017 年度 肥料認証標準物質の開発－高度化成肥料 FAMIC-A-17 の調製－, 肥料研究報告, **11**, 159-172 (2018)
- 8) 清水昭, 坂井田里子, 加藤まどか, 大島舞弓, 中村信仁, 秋元里乃, 白井裕治: 2018 年度 肥料認証標準物質の開発－汚泥発酵肥料 FAMIC-C-18 の調製－, 肥料研究報告, **12**, 160-174 (2019)
- 9) ISO 17034 (2016): “General requirements for the competence of reference material producers” ((JIS Q 17034:2018, 「標準物質生産者の能力に関する一般要求事項」)
- 10) ISO Guide 35 (2006): “Reference materials—General and statistical principles for certification” (JIS Q 0035 : 2008, 「標準物質—認証のための一般的及び統計学的な原則」)
- 11) ISO Guide 31 (2015): “Reference materials—Contents of certificates and labels” (JIS Q 0031 : 2018, 「標準物質—認証書及びラベルの内容」)
- 12) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) : 肥料等試験法 (2020)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf>

**Long-term Stability Evaluation of Fertilizer Certified Reference Materials for Determination of Major Components and Harmful Elements:
High-Analysis Compound Fertilizer (FAMIC-A-17) , Ordinary Compound Fertilizer (FAMIC-B-14) and Composted Sludge Fertilizer (FAMIC-C-12-2 and FAMIC-C-18-2)**

INOUE Tadashi¹, AOYAMA Keisuke², KAWAGUCHI Shinji²,
FUNAKI Norio³, and AKIMOTO Satono⁴

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Kobe Regional Center
(Now) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Food Safety and Consumer Affairs Bureau

² FAMIC, Kobe Regional Center

³ FAMIC, Kobe Regional Center (Now) FAMIC, Nagoya Regional Center

⁴ FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department

FAMIC has performed long-term stability examinations to confirm shelf life of fertilizer certified reference materials (CRMs), high-analysis compound fertilizer (FAMIC-A-17), ordinary compound fertilizer (FAMIC-B-14) and composted sludge fertilizer (FAMIC-C-12-2 and FAMIC-C-18-2) for analysis of major components and harmful elements. We have given certified values total nitrogen (T-N), ammonium nitrogen (A-N), citric acid-soluble phosphorus (C-P₂O₅), citric acid-soluble potassium (C-K₂O), citric acid-soluble magnesium (C-MgO), citric acid-soluble manganese (C-MnO), citric acid-soluble boron (C-B₂O₃), water-soluble boron (W-B₂O₃) and urea nitrogen (U-N) for FAMIC-A-17, ammonium nitrogen (A-N), citrate-soluble phosphoric acid (S-P₂O₅), water-soluble phosphoric acid (W-P₂O₅), water-soluble potassium (W-K₂O), arsenic (As), cadmium (Cd), and nickel (Ni) for FAMIC-B-14, total nitrogen (T-N), total phosphoric acid (T-P₂O₅), total potassium (T-K₂O), total calcium (T-CaO), total copper (T-Cu), total zinc (T-Zn), organic carbon (O-C), arsenic (As), cadmium (Cd), nickel (Ni), chromium (Cr), and lead (Pb) for FAMIC-C-12-2 and FAMIC-C-18-2. We evaluated the monitoring long-term stability by a statistical analysis of the results of stability examination on the chemical analysis of the stock CRMs. The data was performed a statistical analysis in reference to ISO Guide 35: 2006. It shows evidence that there were no need to update the certified value and its uncertainty. From these results of the statistical analysis, the all certified values of the CRMs (FAMIC-A-17: 3 years 3 months after preparation, FAMIC-B-14: 5 years 10 months after preparation, FAMIC-C-12-2: 7 years 10 months after preparation, FAMIC-C-18-2: 1 year 11 months after preparation) were stable. The CRMs were expected to be useful for the quality assurance and the quality control in the analysis of major components and harmful elements in compound fertilizers.

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

(Research Report of Fertilizer, 14, 186-209, 2021)

15 肥料中の DMPP (硝酸化成抑制材) の安定性についての検証

船木紀夫¹

キーワード DMPP, 硝酸化成抑制材, 安定性, 肥料

1. はじめに

HPLC による肥料中の DMPP (3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩) の分析方法を検討した過程¹⁾、使用した肥料 (Table 1) のうち、一部の肥料 (化成肥料 A, 化成肥料 D 及び配合肥料) について、粉碎の度に DMPP 含有量の顕著な減少が見られた。一方で、同一粉碎品においては、5 日間の併行精度及び中間精度確認後も DMPP 含有量はほぼ安定していたことから、粉碎せず保管している間に肥料中の DMPP 量が減少していると考えられた (Figure 1-1~2 及び Table 2)。その原因を探るため、①保管時の遮光の影響、②試料溶液の pH、及び③使用原材料に着目し、肥料中における DMPP の安定性に影響を及ぼす因子等について確認したので、概要を報告する。

Table 1 Fertilizers containing DMPP and used for the development of analytical method

Sample	Changes in content for DMPP over time	Shading during storage	Materials containing in fertilizer (excluding DMPP): most first
Urea	Little	Yes	Urea, Coloring material (Acid Green25: derived from DMPP)
Mixed nitrogen fertilizer	Little	No	Ammonium sulphate, Ammonium nitrate, Anti-caking material (Polyethylene wax), Coloring material (Phthalocyanine green)
Compound fertilizer A	Much	No	Nitric acid, Phosphate ore, Potassium chloride, Ammonia, Sulfuric acid, Anti-caking material (Aliphatic amine), Coloring material (Phthalocyanine green)
Compound fertilizer B	Little	Yes	Ammonium nitrate, Potassium sulphate, Ammonium phosphate, Magnesium fertilizer, Ammonium sulphate, Granulation accelerator (plaster), Boric acid fertilizer, Coloring material (Pigment Vioiolet 23)
Compound fertilizer C	Little	Yes	Potassium sulphate, Ammonium nitrate, Ammonium phosphate, Magnesium sulfate fertilizer, Granulation accelerator (Kaolin), Ammonium sulphate, Coloring material (Dispers Blue 6901), Boric acid fertilizer
Compound fertilizer D	Much	No	Nitric acid, Phosphate ore, Ammonia, Anti-caking material (Aliphatic amine), Coloring material (Phthalocyanine green)
Mixed fertilizer	Much	No	Complex fertilizer D, Ammonium sulphate, Ammonium phosphate, Potassium sulphate, Magnesium hydroxide fertilizer, Urea, Manganese sulfate fertilizer, Borate fertilizer, Anti-caking material (Silica fume)

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)名古屋センター

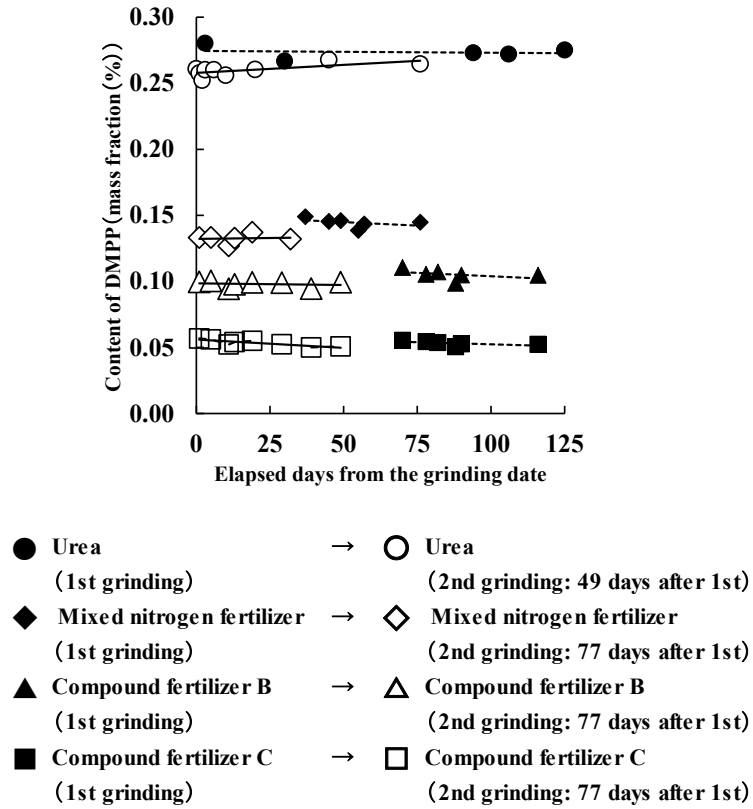


Figure 1-1 Time change of content of DMPP in fertilizers by grinding day (Observed much change)

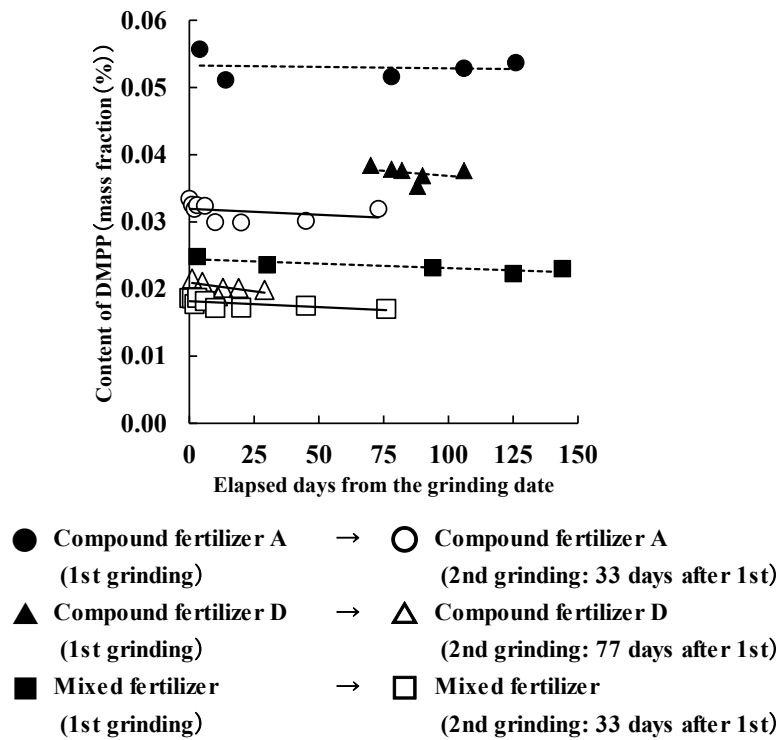


Figure 1-2 Time change of content of DMPP in fertilizers by grinding day (Observed much change)

Table 2 Changes on quantitative values of DMPP between 1st grinding and 2nd one

Sample	Mean of quantitative value of DMPP (%) ^{a)}		Ratio 2nd/1st (%)	Elapsed date from 1st to 2nd (days)
	1st grinding	2nd grinding		
Urea	0.274	0.260	95	49
Mixed nitrogen fertilizer	0.145	0.133	92	77
Compound fertilizer B	0.105	0.0981	93	77
Compound fertilizer C	0.0532	0.0534	100	77
Compound fertilizer D	0.0530	0.0316	60	33
Compound fertilizer A	0.0373	0.0203	54	77
Mixed fertilizer	0.0234	0.0179	76	33

a) Mass fraction

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

Table 1 に示した DMPP 配合肥料 4 種類合計 7 点を用いた. その他詳細は, 肥料研究報告第 14 号 4 の 2. 1) のとおり.

2) 試薬等

- (1) 28 %アンモニア水: 富士フィルム和光純薬 特級
 - (2) 61 %硝酸: 富士フィルム和光純薬 精密分析用
 - (3) リン酸三カルシウム: 富士フィルム和光純薬 特級
- その他, 肥料研究報告第 14 号 4 の 2. 2) のとおり.

3) 装置及び器具

- (1) 恒温乾燥機: yamato DN44
- その他, 肥料研究報告第 14 号 4 の 2. 3) のとおり.

4) 分析方法

肥料研究報告第 14 号 4 の 2. 4) のとおり.

3. 結果

1) 未粉碎試料の保管時における遮光の影響の確認

未粉碎試料において保管中に DMPP 含有量の顕著な減少があったと見られた 3 肥料(化成肥料 A, 化成肥料 D 及び配合肥料)は, 透明なパウチ袋に封入されており, かつ遮光保管されていなかったという共通点があった。そこで, 調査研究開始当初からアルミ製の遮光袋に封入されており, かつ粉碎の度に DMPP 含有量が減少するものの, その度合いが小さかった肥料 3 点(尿素, 化成肥料 B 及び化成肥料 C)について, 一部を小分けし, それらについて少量ずつ約 10 日ごとに粉碎～前処理～測定を行い, 遮光せず保管することにより DMPP 含有量に顕著な減少が見られるかを確認した。結果を Figure 2 に示した。

約 30 日後まではほぼ一定であった DMPP 含有量が, その後は遮光していた試料より遮光していなかった試料の方でやや減少傾向が見られたものの, Figure 1-2 に示した 3 肥料のような顕著な減少は見られなかった。このことから, 保管時における遮光の有無については, DMPP 含有量の減少への影響は小さいと考えられた。

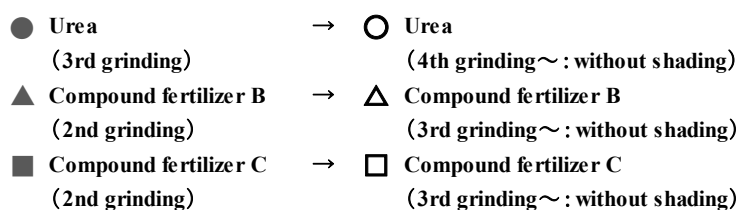
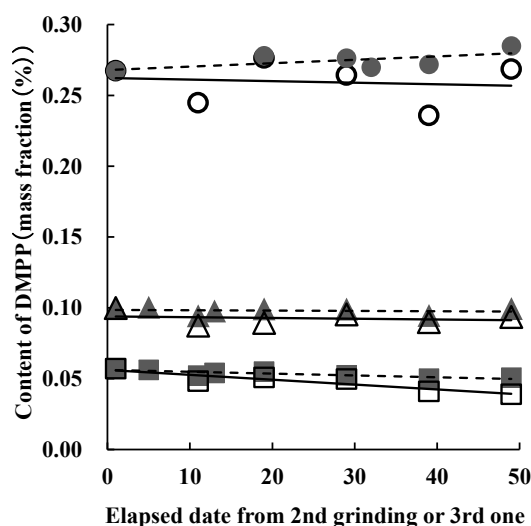


Figure 2 The influence of shading at storage of fertilizers for content of DMPP

2) 試料溶液の pH の影響の確認

複数回粉碎した各試料の前処理溶液について, それぞれ pH の測定を行った結果を Figure 3-1~2 に示した。

各肥料別の試料溶液の pH は, 粉碎日が異なることではほぼ変わらなかった。また, DMPP 含有量の顕著な減少が見られた 3 肥料の場合, 試料溶液の pH は 5.3~6.6 の範囲であったが, DMPP 含有量の減少度合いが小さかった 4 肥料においては 3.8~4.1 または 5.6~6.2 の範囲であり, 一部の範囲が重複していた。これらのことから, 試料溶液の pH の大小は, DMPP 含有量の減少度合いの大小とは無関係と考えられた。

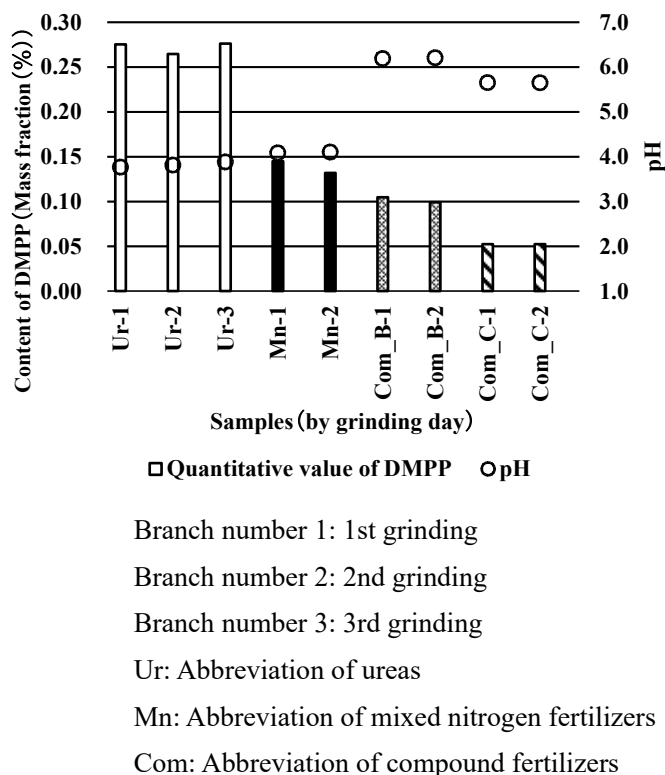


Figure 3-1 Fluctuation of quantitative value of DMPP and pH in sample solution by grinding day
 (Observed little change of content of DMPP)

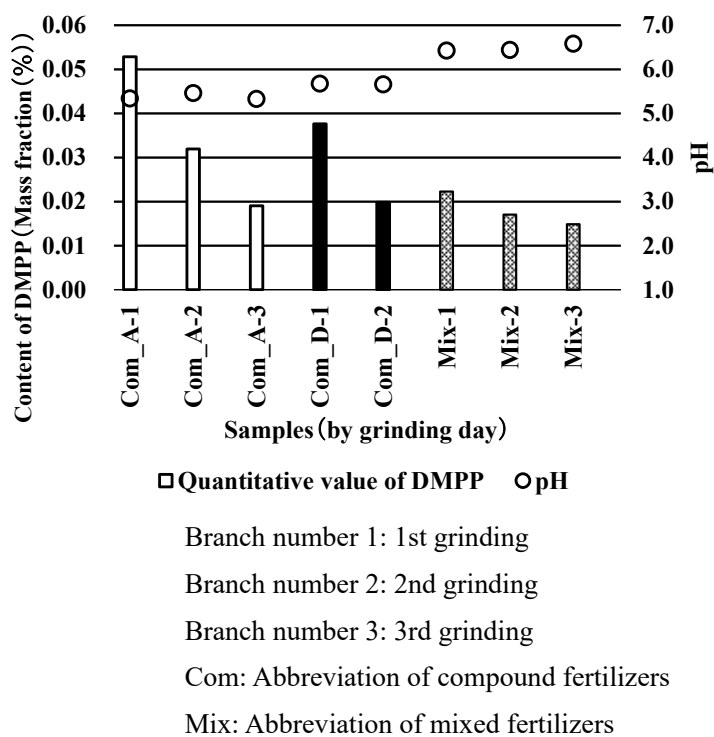


Figure 3-2 Fluctuation of quantitative value of DMPP and pH in sample solution by grinding day
 (Observed much change of content of DMPP)

3) 原材料の種類及び配合比の影響の確認

再粉碎後に DMPP 含有量の顕著な減少が見られた 3 肥料のうち化成肥料 A 及び D については、製造時にアンモニア性窒素源としてアンモニウム塩ではなくアンモニアを、硝酸性窒素源として硝酸塩ではなく硝酸を、それぞれ使用しており (Table 1)、かつアンモニアと硝酸の配合比は 100 %換算で約 1:3 であるという共通点があった。(3 肥料のうち配合肥料はアンモニウム塩を配合しているが、DMPP 源として化成肥料 D を配合している。)また、りん酸源としてりん鉱石を使用していたという共通点もあった。

以上のことから、28 %アンモニア水、61 %硝酸及びりん酸三カルシウム(りん鉱石の主成分)を Table 3 の配合比で混合し乾燥後、DMPP を 0.1 %添加した(以下、この操作を「前添加」という。)調製肥料を作成した。これらの肥料における DMPP の添加回収試験を行うことで、配合する原材料による回収率への影響を確認した。また、比較のため調製工程の途中で DMPP を添加しない調製肥料も作成し、粉碎後に DMPP を添加する(以下、この操作を「後添加」という。)形での添加回収試験も行った。調製肥料の作成フローを Scheme 1 に、各添加回収試験の分析結果及びその試料溶液の pH を Table 4 に、それぞれ示した。

後添加では、りん酸三カルシウム配合量に関わらず回収率は 94.3 %~95.1 %とほぼ一致した。また、りん酸三カルシウム配合量の多い調製肥料 3(前添加品)及び 3'(後添加品)では、回収率はそれぞれ 94.9%、94.3%とほぼ一致したが、調製肥料 1 及び 2(共に前添加品)並びに同 1'及び 2'(共に後添加品)では、回収率はそれぞれ 86.1%、86.7%、95.0%及び 95.1%となり、前添加品の方が後添加品よりも、回収率が 8%~9%程度低かった。

また、調製肥料 1~3(前添加品)について、①初回粉碎品を 20 日後に再度分析した結果、どの調製肥料についても初回分析時(試験日 1)の結果に比べて DMPP 回収率の変動は±2%程度であった。一方、②遮光していた保管品及び遮光していなかった保管品を 20 日後に別途粉碎した試料を分析したところ、調製肥料 2 については初回粉碎時(試験日 1)の分析結果に比べて DMPP 回収率の変動は±2%程度であったが、調製肥料 1 については 6%~8%程度、調製肥料 3 については 11%~20%程度、遮光の有無に関係なく、それぞれ初回粉碎時(試験日 1)の分析結果に比べて回収率の低下が見られた。

以上のように、アンモニア、硝酸及びりん酸三カルシウムの配合比によっては、調製肥料の作成後即時にまたは経時的に DMPP 回収率が低下したケースが見られたことから、DMPP 入り肥料においては、原材料の種類及び配合比次第で Figure 1-2 に示したような現象が起きる可能性が示唆された。

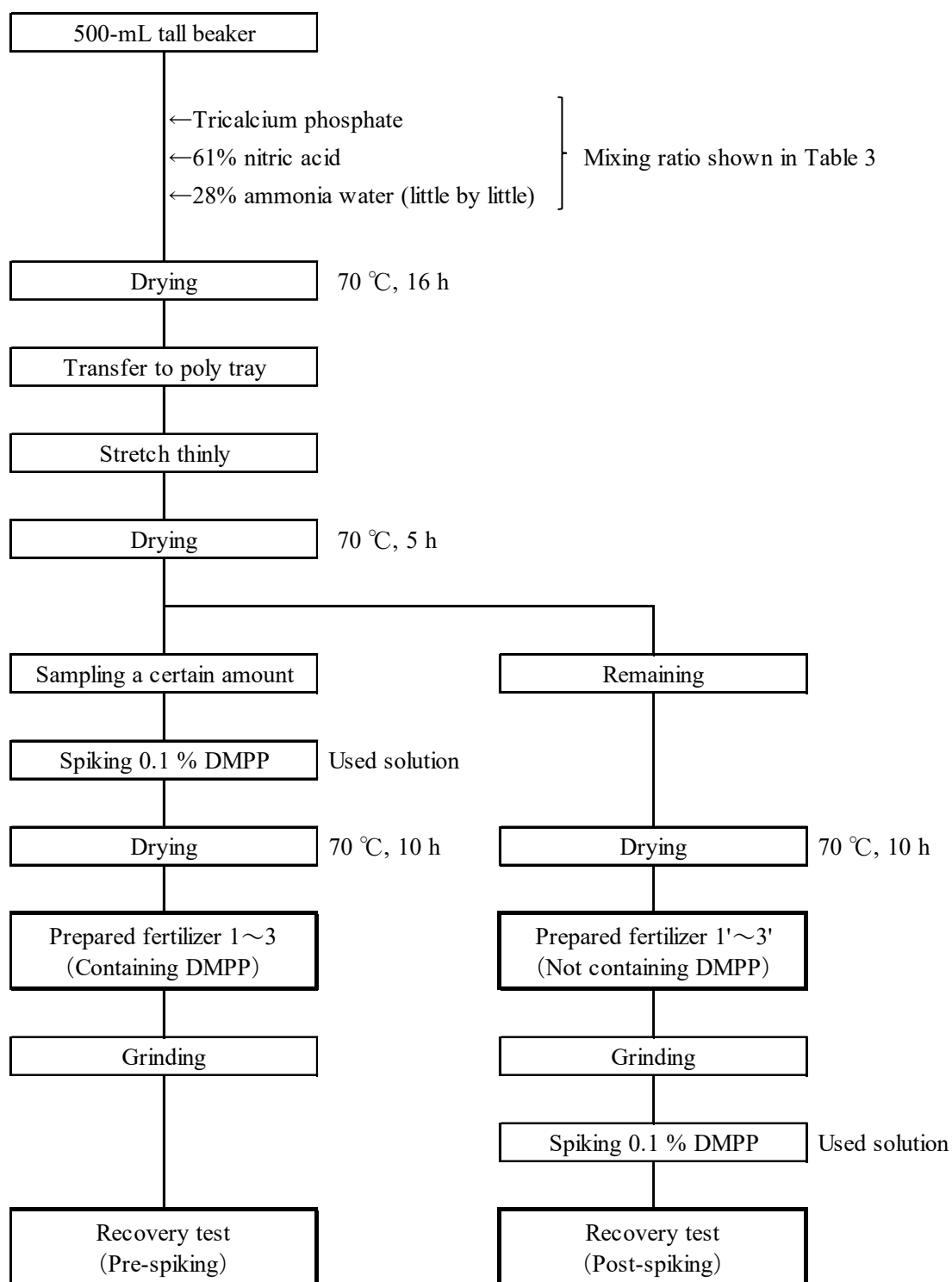
なお、同じ配合比の調製肥料について、前添加と後添加で試料溶液の pH はほぼ一致したことから、(2)の結果と同様に試料溶液の pH は、DMPP の回収率低下に関与しないと考えられた。

Table 3 Mixing ratio of prepared fertilizers

Sample	Ammonia ^{a)} (Convert to 100%)	Nitric acid ^{b)} (Convert to 100%)	Tricalcium phosphate	Remarks
Prepared fertilizer 1	1	3	1	Prepared DMPP-free one separately (Prepared fertilizer 1')
Prepared fertilizer 2	1	3	2	Prepared DMPP-free one separately (Prepared fertilizer 2')
Prepared fertilizer 3	1	3	3	Prepared DMPP-free one separately (Prepared fertilizer 3')

a) Amount of 28 % ammonia water added is calculated with specific gravity as 0.90

b) Amount of 61% nitric acid added is calculated with specific gravity as 1.38



Scheme 1 The flow sheet of preparing fertilizers and of recovery test

Table 4 Results of recovery test for prepared fertilizers (1~3 and 1'~3')

Sample	Spiked level ^{a)} (%) ^{b)}	Test day ^{c)} and condition	Quantitative value of DMPP ^{d)} (%) ^{b)}	Recovery rate ^{e)} (%)	Criteria of the trueness ^{f)} (%)	pH of sample solution
Prepared fertilizer 1	0.1 ^{g)}	1	0.0861	86.1	85~110	6.3
		2	0.0843	84.3		6.3
		2 (Reground item stored while shading)	0.0794	79.4		6.3
		2 (Reground item stored without shading)	0.0779	77.9		6.3
Prepared fertilizer 2	0.1 ^{g)}	1	0.0867	86.7	85~110	6.0
		2	0.0883	88.3		6.1
		2 (Reground item stored while shading)	0.0842	84.2		6.1
		2 (Reground item stored without shading)	0.0881	88.1		6.0
Prepared fertilizer 3	0.1 ^{g)}	1	0.0947	94.7	85~110	5.8
		2	0.0938	93.8		5.8
		2 (Reground item stored while shading)	0.0744	74.4		5.8
		2 (Reground item stored without shading)	0.0831	83.1		5.8
Prepared fertilizer 1'	0.1 ^{h)}	1	0.0950	95.0	85~110	6.2
Prepared fertilizer 2'	0.1 ^{h)}	1	0.0951	95.1	85~110	6.0
Prepared fertilizer 3'	0.1 ^{h)}	1	0.0943	94.3	85~110	5.8

a) Designed value of DMPP

b) Mass fraction

c) Test day 2 is 20 days after test day 1.

d) Mean ($n=3$)

e) For spiked level of DMPP

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

g) Spiked before grinding

h) Spiked after grinding

4. まとめ

肥料中の DMPP の安定性について検証したところ、次の結果を得た。

(1) HPLC を用いた肥料中の DMPP の分析方法を検討した過程において、一部肥料では、保管(未粉碎)している間に、DMPP 含有量が著しく減少した。その原因として、原料の種類及び配合比の影響が示唆されたこと

から、本法の実施に当たっては試料入手後速やかに粉碎・分析を行う必要があると考えられた。

文 献

- 1) 船木紀夫:HPLC を用いた肥料中の DMPP(硝酸化成抑制材)の分析法の開発, 肥料研究報告, **14**, 39-52(2021)

Verification of stability of 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in Fertilizers

FUNAKI Norio¹

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

In the process of development of analytical method of DMPP in fertilizers, a significant decrease in content of DMPP in stored items (not ground) was observed in some fertilizers every time they were ground. On the other hand, content of DMPP in ground samples of fertilizer were almost stable. These facts indicate that content of DMPP in applicable fertilizers may decrease during storage without grinding. Therefore, I verify factors affecting stability of content of DMPP in fertilizers. The influence of shading during storage was not observed at the result of analyzing fertilizers containing DMPP. The influence of pH of sample solution was not observed, too. Fertilizers, observed a significant decrease in content of DMPP, were mixed ammonia, nitric acid and phosphate ore in the process of development. Therefore, I prepared fertilizers by mixing ammonia, nitric acid, tricalcium phosphate (which is principal component of phosphate ore) and DMPP, and carried out recovery test by using them. Because of recovery test, content of DMPP decreased in some prepared fertilizers over time. These facts indicate that the decrease of content of DMPP in some fertilizers may appear by kind of materials and mixing ratio of them.

Key words DMPP, nitrate inhibitor, stability, fertilizer

(Research Report of Fertilizer, 14, 210-220, 2021)

16 コマツナの生理障害確認試験(ほう素)

青山恵介¹

キーワード 植害試験, コマツナ, ほう素, 過剰症状

1. はじめに

有害成分を含有するおそれが高い汚泥肥料や食品工業や化学工業由来の副産物を原料とした肥料等については、肥料の公定規格の制限事項として「植物試験の調査を受け害が認められないものであること。」と定められており¹⁾、肥料の安全性が確認されている。また、その試験法については「植物に対する害に関する栽培試験」(以下、「植害試験」という)が農林水産省農蚕園芸局長通知²⁾により定められている。

植害試験は原則コマツナを用いることとされており、その生育状況から肥料中に有害成分が含有しているか否かを判定する試験法である。調査内容は、発芽調査、生育調査、収量調査の他、植物体に見られる異常症状の有無を観察することによって行われる。異常症状の主な要因は、有害成分による障害及び窒素など植物体の必須成分が過剰又は欠乏した際に見られる生理障害の2つのケースが考えられる。

実際の試験において、有害成分による障害や生理障害に関する知見がなければ、有害成分による障害と生理障害を見分けることは困難であり、誤った判定をしてしまう恐れがある。

そこで、独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)では生理障害に関する知見を得るためにこれまで窒素、りん酸及び加里等^{3~7)}についてコマツナの生理障害に関する調査を行ってきた。得られた知見については、植物に対する害に関する栽培試験の方法・解説⁸⁾に記載されている。

本検討では、肥料の主成分であるほう素について、コマツナの生理障害の調査を行った。さらに、ほう素の生理障害で確認された症状のうち、葉のカップ症状については除草剤であるクロピラリドによってトマト等様々な植物においても同様な症状が見られる⁹⁾ことから、コマツナに対するクロピラリドによる害についても確認したので報告する。

なお、ほう素欠乏症については石灰質肥料を過剰に施肥するなど土壌がアルカリ性の場合に見られる¹⁰⁾が、植害試験条件下では発生する可能性がきわめて低いと考えられること、またその誘発が困難であることから欠乏症状の確認については実施しなかった。

2. 材料及び方法

1) 供試土壌及び肥料等

(1) 供試土壌: 供試土壌は黒ボク土を目開き 2 mm のふるいを通したものをを用いた。理化学性について表 1 に示した。熱水性可溶性ほう素については、熱水でほう素を抽出した後、ICP 発光分析法で分析した¹¹⁾。

(2) 供試肥料: 窒素、りん酸及び加里の供給として、硫酸アンモニウム、過りん酸石灰及び塩化カリウムを用いた。また、ほう素の供給として、ほう酸、三酸化二ほう素及びほう酸塩肥料として四ほう酸ナトリウム 10 水和物(ほう砂)を用いた。過りん酸石灰については流通している肥料を用い、それ以外については試薬特級を用いた。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

- (3) 供試作物:コマツナ(品種名:夏楽天)
 (4) 試験規模:1/10000 a ノイバウエルポットを用い, 1 試験区 2 連で試験した.

表1 供試土壌の理化学性

土壌の種類	黒ボク土
土性	L
水分(%)	26.7
pH(土:H ₂ O=1:5)	5.5
交換酸度	0.3
電気伝導率(mS/cm)	0.27
塩基置換容量(meq/100 g乾土)	36.4
容積重(g/500 mL風乾土)	356
最大容水量(mL/100 g乾土)	98
熱水可溶性ほう素(mg/kg乾土)	0.24

2) 試験方法

(1) 試験区の構成及び施用量

試験区の構成及び施用量は表 2 に示したとおり, ほう酸, 三酸化二ほう素及びびほう砂をほう素(B₂O₃)として 0 mg, 10 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg 及び 500 mg 相当量を施用した計 7 区について各 2 連で試験を実施した. なお, 全ての試験区に硫酸アンモニウムを窒素(N)として 100 mg, 過りん酸石灰をりん酸(P₂O₅)として 100 mg 及び塩化加里を加里(K₂O)として 100 mg 相当量を施肥した.

表2 施肥設計

試験区	窒素 ^{a)} (N) (mg)	りん酸 ^{b)} (P ₂ O ₅) (mg)	加里 ^{c)} (K ₂ O) (mg)	ほう素 ^{d)} (B ₂ O ₃) (mg)
ほう素施肥区	100	100	100	10
	100	100	100	100
	100	100	100	200
	100	100	100	300
	100	100	100	400
	100	100	100	500
標準区	100	100	100	0

a) 硫酸アンモニアを使用

b) 過りん酸石灰を使用

c) 塩化加里を使用

d) ほう酸、三酸化二ほう素及びびほう砂の3種類を使用

(2) 栽培方法

植物に対する害に関する栽培試験の方法・解説(2017)⁸⁾にしたがってノイバウエルポットに施肥した土壌を充填し, その1日後にコマツナを20粒播種して21日間栽培した. 栽培条件は, 人工気象装置(小糸工業製 コイトロン KG50-HLA 型)内で光量子束密度約 310 μmol m⁻²s⁻¹, 照明時間 12 時間, 気温昼間 25 °C, 夜間 18 °C, 湿度 65 %の一定とした. 灌水は最大容水量の 60 %を目安に行い, ローラーポンプ式自動給水装置(古江サイエンス製 RP-MRFS)を併用した. また, 人工気象装置内でのポットの配置は休日を除き, 毎日無作為に場所を

変更した。

3) 調査項目

発芽率, 葉長, 収穫物の生体重及び異常症状の確認を行った。

3. 結果

1) 発芽率及び生育調査

ほう酸区, 三酸化二ほう素区及びほう砂区の播種後 7 日目及び 21 日目の様子を(写真 1)～(写真 6)に示す。また, 発芽率, 葉長, 生体重及び生体重指数を表 3 に示す。

発芽率は図 1 に示したとおり, ほう酸区及び三酸化二ほう素区では, 0 mg/pot ~100 mg/pot で 100 %であったが, 200 mg/pot 以上で低下し, 500 mg/pot では 10 %台まで低下した。ほう砂については 200 mg/pot においても 100 %であったが, 300 mg/pot 以上で低下し, 500 mg/pot では 35 %まで低下した。

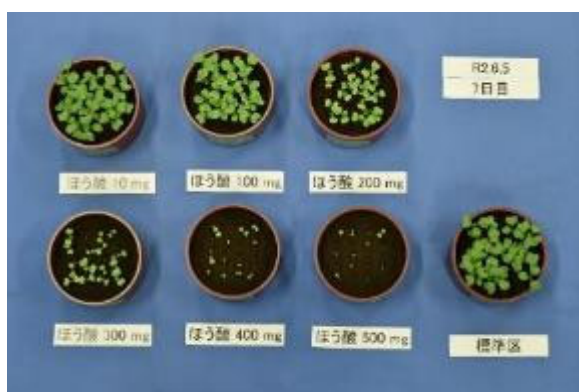
葉長(21 日目)は図 2 に示したとおり, ほう酸区, 三酸化二ほう素区及びほう砂区において 0 mg/pot ~300 mg/pot で同程度であったが, 400 mg/pot 以上で低下した。減少幅については, ほう砂区がほう酸区及び三酸化二ほう素区よりも小さかった。

生体重及び生体重指数は図 3 に示したとおり, 10 mg/pot においてはいずれの試験区においても生体重指数はほぼ 100 %であったが, 100 mg/pot ではほう酸区は 110 %, ほう砂区では 118 %まで上昇した。200 mg/pot 以上ではいずれも減少傾向になり, ほう酸区及び三酸化二ほう素区は 400 mg/pot 以上で 20 %以下となった。ほう砂区においても減少傾向であったが, 400 mg/pot 以上で 49 %以下であり, 減少幅については, ほう砂区がほう酸区及び三酸化二ほう素区よりも小さかった。

これらの結果, ほう素の過剰施肥によって, 発芽率の低下及び生育不良が認められた。なお, ほう酸及び三酸化二ほう素の方がほう砂よりも生育不良が顕著であった。

表3 発芽率及び生育調査の結果

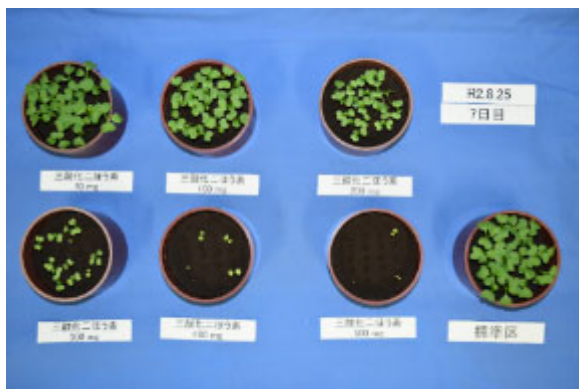
試験区	ほう素施肥量 (mg)	発芽率 (%)	葉長(cm)		生体重 (g)	生体重指数 (%)
			(14日)	(21日)		
ほう酸区	0	100	9.0	10.4	32.8	100
	10	100	8.6	10.1	33.1	101
	100	100	8.1	10.8	36.1	110
	200	95	6.9	11.0	31.3	95
	300	83	4.5	9.8	22.1	67
	400	38	2.3	6.6	6.5	20
	500	15	1.6	4.1	2.0	6
三酸化二ほう素区	0	100	7.0	10.4	31.6	100
	10	100	6.7	10.5	32.7	103
	100	100	6.5	9.9	31.5	100
	200	93	5.7	9.7	25.5	81
	300	70	3.7	9.2	16.9	53
	400	35	2.2	6.6	5.6	18
	500	10	1.3	3.4	0.8	3
ほう砂区	0	100	7.9	9.1	28.6	100
	10	100	7.5	9.2	29.0	101
	100	100	7.3	11.0	33.8	118
	200	100	5.9	10.6	32.1	112
	300	95	5.5	9.8	27.1	95
	400	78	3.8	8.9	14.1	49
	500	35	2.4	7.2	6.9	24



(写真 1) ほう酸区(7日目)



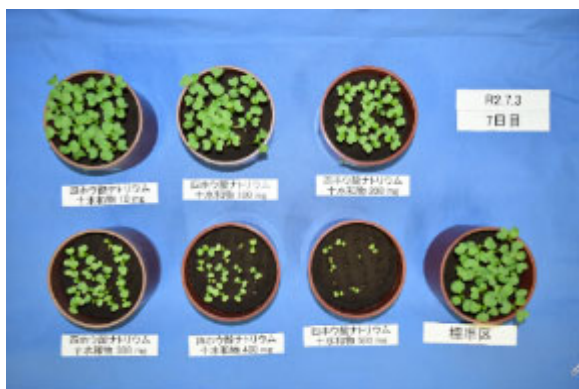
(写真 2) ほう酸区(21日目)



(写真 3) 三酸化二ほう素区(7 日目)



(写真 4) 三酸化二ほう素区(21 日目)



(写真 5) ほう砂区(7 日目)



(写真 6) ほう砂区(21 日目)

(写真 1)～(写真 6)のほう素の施肥量は上段左から B₂O₃として 10 mg, 100 mg 及び 200 mg, 下段左から 300 mg, 400 mg, 500 mg 及び 0 mg

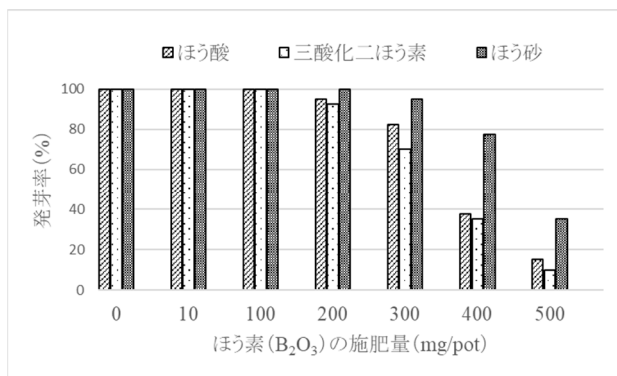


図 1 発芽率(7 日目)

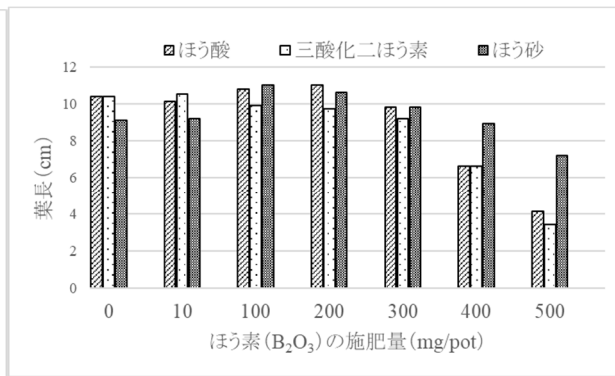


図 2 葉長(21 日目)

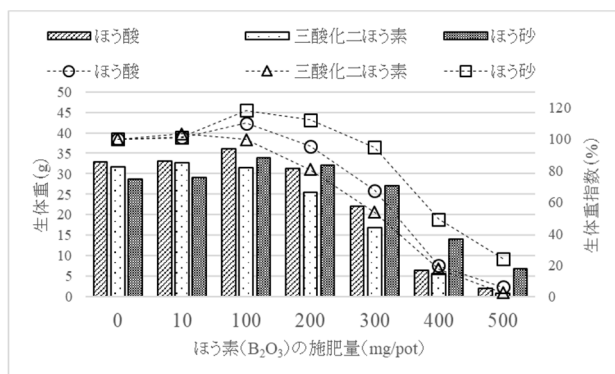


図3 生体重及び生体重指数(21日目)
(棒グラフは生体重, 折れ線は生体重指数)

2) 異常症状

生育不良以外にコマツナの生育過程で確認できた症状は、葉のカップ症状、くぼみ及び黄色化であり、ほう素が多くなるとさらに葉の一部壊死が確認できた。これらの異常症状は、ほう酸区、三酸化二ほう素区及びほう砂区のいずれの試験区においても同様の症状が認められた。異常症状については写真7及び写真8に示す。



(写真7)

ほう酸区(ほう酸を B₂O₃として 100 mg 相当量添加)の播種後 21 日目の様子。

葉のカップ症状、くぼみは全体的に見られた。黄色化はくぼみが生じた部分に見られた。

これらの症状は 14 日目頃から確認できた。



(写真8)

ほう酸区(ほう酸を B₂O₃として 300 mg 相当量添加)の播種後 21 日目の様子。

300 mg に増やすとカップ症状がさらに進み、一部の葉が壊死する症状も見られた。

3) クロピラリドによる症状との比較

トマト等において、クロピラリドによるカップ症状は乾土中の濃度が 5 µg/kg で確認されている⁹⁾。本検

討では、1ポットあたり(乾土約250g)クロピラリドを1 μ g、5 μ g、10 μ g、20 μ g、50 μ g及び100 μ g添加し、乾土中の濃度が4 μ g/kg、20 μ g/kg、40 μ g/kg、80 μ g/kg、200 μ g/kg及び400 μ g/kgに調製した土壌を用いてコマツナを栽培した。施肥設計は表4のとおり。

発芽率及び生育調査の結果を表5に示した。発芽率はいずれの試験区においても100%であり、葉長及び生体重においてもクロピラリドを添加していない試験区とほぼ同じ結果であり、クロピラリドによる生育不良は見られなかった。(写真9)。

クロピラリドの害に関しては、5 μ g添加した区で一部の葉でカップ症状が見られた。50 μ g以上添加した区で全体的にカップ症状が見られるようになった。しかし、カップ症状以外は見られず、ほう素過剰症状で見られたくぼみ、黄色化及び壊死は見られなかった(写真10及び写真11)。

したがって、ほう素過剰症状及びクロピラリドによるカップ症状自体はどちらが要因かを区別することは困難であるが、ほう素過剰症状についてはカップ症状と同時にくぼみ症状が見られる事からクロピラリドの害と区別することは可能であると考えられた(写真12)。

表4 施肥設計(クロピラリド)

試験区	窒素 ^{a)} (N) (mg)	りん酸 ^{b)} (P ₂ O ₅) (mg)	加里 ^{c)} (K ₂ O) (mg)	クロピラリド (μ g)
クロピラリド 添加区	100	100	100	1
	100	100	100	5
	100	100	100	10
	100	100	100	20
	100	100	100	50
	100	100	100	100
標準区	100	100	100	0

a) 硫酸アンモニアを使用

b) 過りん酸石灰を使用

c) 塩化加里を使用

表5 発芽率及び生育調査の結果(クロピラリド)

試験区	クロピラリド (μ g)	発芽率 (%)	葉長 (cm)	生体重 (g)	生体重指数 (%)
クロピラリド 添加区	1	100	9.7	27.6	107
	5	100	9.2	26.5	102
	10	100	9.3	26.5	102
	20	100	9.4	25.9	100
	50	100	9.4	26.4	102
	100	100	9.6	25.6	99
標準区	0	100	9.8	25.9	100



(写真 9)

クロピラリドをポットあたり $1 \mu\text{g}$ ~ $100 \mu\text{g}$ 添加した場合でも、発芽率は 100% であり、21 日目の葉長及び生体重に差は見られなかった。

クロピラリドの添加量は、上段左から $1 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$, 下段左から $20 \mu\text{g}$, $50 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$ 及び $0 \mu\text{g}$ 。



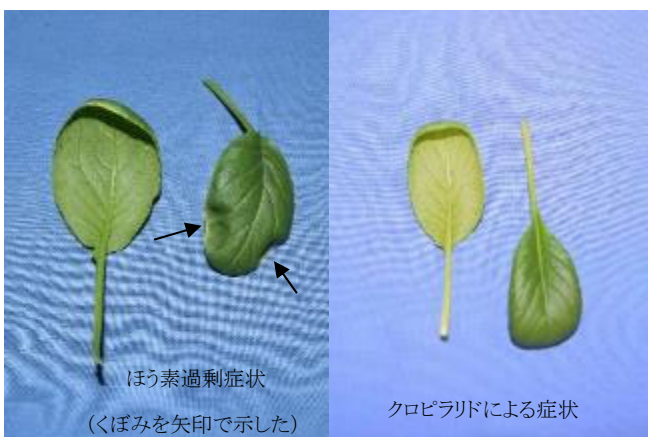
(写真 10)

クロピラリド $5 \mu\text{g}$ 添加区の 21 日後の様子。一部の葉でカップ症状が見られた。



(写真 11)

クロピラリド $100 \mu\text{g}$ 添加区の 21 日後の様子。 $50 \mu\text{g}$ 以上添加すると、カップ症状は全体に広がった。



(写真 12)

左がほう素過剰症状、右がクロピラリドによる症状。どちらもカップ症状は見られるが、ほう素過剰症状で見られるくぼみの症状はクロピラリドでは見られなかった。

5. まとめ

植害試験におけるコマツナの異常症状の正確な判定に役立つ基礎資料を作成するため、ほう素の過剰症状について確認した。ほう素の供給として、ほう酸、三酸化二ほう素及びほう砂を用いて試験した。ほう素の過剰施肥により、発芽率の低下及び生育不良が認められた。生育中に確認された生理障害は、ほう素として 100 mg/pot でカップ症状、くぼみ及び黄色化が認められ、それらの症状は約 14 日目から見られた。300 mg/pot 以上の場合は、葉の壊死も認められた。

クロピラリドによる害についても確認した結果、5 µg/pot 以上でほう素の生理障害で見られたのと同様のカップ症状が認められた。カップ症状については、ほう素とクロピラリドの区別は困難であったが、クロピラリドについてはほう素の生理障害で見られたくぼみ及び黄色化は認められなかったことから、それらの症状の有無で区別することは可能であると考えられた。

なお、クロピラリドについては 100 µg/pot 添加した場合であっても発芽率の低下及び生育不良は認められなかった。

コマツナ等アブラナ科の植物はクロピラリドに対する耐性が比較的高い¹²⁾ことから、クロピラリドの害を調査する場合は耐性が低い植物を用いた生物検定¹²⁾を併用する事が望ましいと考えられる。

文 献

- 1) 農林水産省告示:肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日, 農林水産省告示第 284 号, 最終改正平成 28 年 12 月 19 日, 農林水産省告示第 2535 号 (2016)
- 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) 阿部文浩, 恵智正宏:コマツナの生理障害-窒素-, 肥料研究報告, **5**, 147~155 (2012)
- 4) 藤田卓:コマツナの生理障害-りん酸-, 肥料研究報告, **6**, 117~129 (2013)
- 5) 藤田卓:コマツナの生理障害-加里-, 肥料研究報告, **6**, 182~200 (2015)
- 6) 五十嵐総一, 八木啓二, 添田英雄, 有隅孝子, 加島信一:コマツナの生理障害-銅-, 肥料研究報告, **7**, 170~184 (2016)
- 7) 五十嵐総一, 平田絵理香, 添田英雄, 加島信一:コマツナの生理障害-亜鉛-, 肥料研究報告, **8**, 208~241 (2017)
- 8) 植物に対する害に関する栽培試験の方法・解説(2017)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/sub9_8_2017.pdf>
- 9) 土壌中クロピラリドが野菜・花きの初期生育に及ぼす影響・データ集
<https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_disorder_2.pdf>
- 10) 高橋英一, 吉田実, 前田正男:新版原色作物の要素欠乏・過剰症, 133~149 農山漁村文化協会, 東京 (1980)
- 11) 秋友勝, 本名俊正, 増永二之, 藤山英保:土壌の熱水可溶性ホウ素分析における抽出条件および定量法の検討, 日本土壌肥料学雑誌, **77**(2), 195~199(2006)
- 12) 飼料及び堆肥に残留する除草剤(クロピラリド)の簡易判定法と被害軽減対策マニュアル(第2版)
<https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_ver2.pdf>

Physiological disorder of Komatsuna - Boron -

AOYAMA Keisuke ¹

¹Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

FAMIC has confirmed the symptoms of physiological disorders about Komatsuna (*Brassica rapa var. perviridis*). So far, we have confirmed the symptoms related to nitrogen, phosphoric acid, potassium, etc., and this survey has clarified the symptoms when boron is excessively fertilized. It was confirmed that when excessive boron was added, the germination rate decreased and the subsequent growth deteriorated too. Furthermore, I confirmed physiological disorders in the leaves from about 14 days after sowing. I observed symptoms such as leaf coupling, depressions and yellowing of the leaves.

It was found that leaf coupling also appeared when the herbicide clopyralid added to the soil. However, I did not observed dents and yellowing of the leaves. It was found that the presence or absence of these symptoms can distinguish between the physiological disorders of boron and the harm caused by clopyralid.

These results are important findings when conducting cultivation tests regarding damage to plants.

Key words cultivation tests regarding damage to plants, Komatsuna (*Brassica rapa var. perviridis*), boron, excessive symptoms

(Research Report of Fertilizer, **14**, 221-230, 2021)

肥料研究報告編集委員

委員長 功刀 豊

副委員長 荻窪 恭明

秋元 里乃

水野 和俊

杉村 靖

舟津 正人

添田 英雄

野崎 友春

白井 裕治

山西 正将

肥料研究報告 第 14 号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター

埼玉県さいたま市中央区新都心 2 番地 1

さいたま新都心合同庁舎検査棟

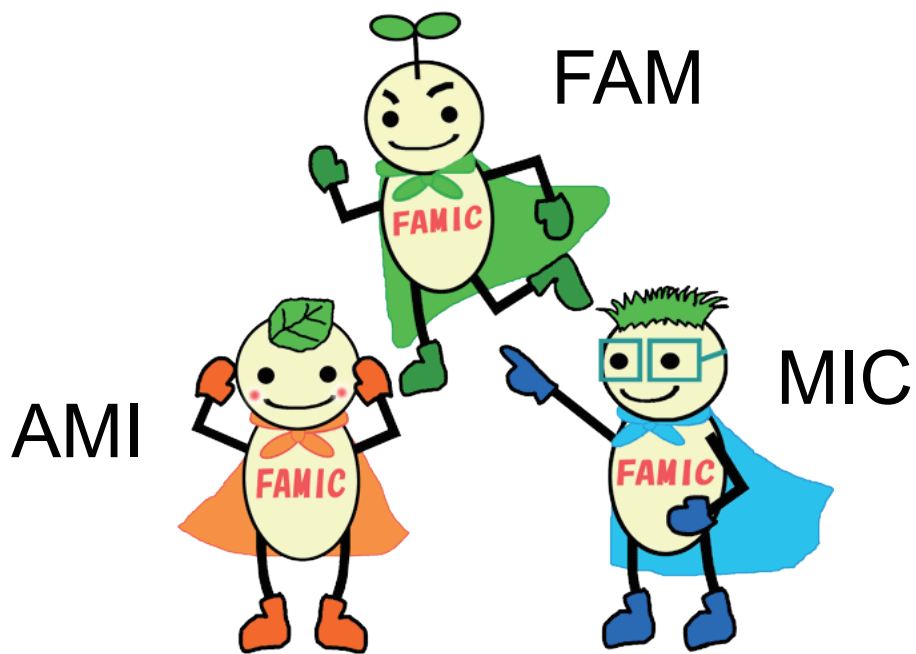
TEL 050-3797-1856

FAX 048-601-1179

<http://www.famic.go.jp/>

令和 3 年 10 月

編集 肥料研究報告編集委員会



リサイクル適性[Ⓐ]

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。