

13 吸光光度分析による窒素, リン酸及びほう素試験法の妥当性確認

— 検量線の評価 —

加藤公栄¹, 高橋佐貴子², 白井裕治²

キーワード 硝酸性窒素, リン酸, ほう素, 吸光光度分析, 検量線法

1. はじめに

肥料の品質等の保全及び公正な取引の確保のため, その主成分, 有害成分等の試験は不可欠である. 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) においては, 検査に係る分析法の開発, 検討等も行っており, 新たに妥当性が確認された試験法, 迅速試験法等を加えて, 肥料の品質管理等に活用できる「肥料等試験法」¹⁾を策定し, ホームページに掲載している. 試験法の妥当性確認は ISO/IEC 17025 (JIS Q 17025:2006)²⁾の要求事項である比較試験, 繰返し性試験, 定量下限の確認等を IUPAC^{3, 4)}のプロトコルを参考に実施した. また, 肥料等試験法の策定にあたっては, 十分に整合性が保たれるように留意して肥料分析法⁵⁾の書き換えも順次実施している.

しかしながら, 肥料分析法では硝酸性窒素及びりん酸の測定において示差法が用いられており, その操作は煩雑である. 肥料等試験法の策定にあたり, JIS K 0115:2004⁶⁾で規定されている簡便な検量線法を採用することとした. しかしながら, 高濃度域では検量線の傾きが小さくなるため, その直線性を確保できる濃度範囲を求める必要がある. このことから, 硝酸性窒素及びりん酸のための検量線を作成し, 直線性が得られる濃度範囲を確認した. また, 肥料分析法では検量線の濃度範囲等が明示されていないほう素についても同様の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) 装置及び器具

- (1) 分光光度計: 島津製作所製 UV-1200
- (2) ホットプレート
- (3) 恒温槽
- (4) 上下転倒式回転振とう機

2) 試薬

肥料等試験法 (2009) に従って調製した.

¹ (独) 農林水産消費安全技術センター札幌センター

² (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

3) 硝酸性窒素(N-N)測定のための検量線の作成

(1) 硫酸銅－硫酸銀溶液約 200 mL を全量フラスコ 250 mL に入れ、水酸化カルシウム約 1 g 及び塩基性炭酸マグネシウム約 1 g を加え、30～40 回転/分で 10 分間振り混ぜた。標線まで水を加え、ろ紙 3 種でろ過し、空試験溶液とした。

(2) 硝酸塩標準液(0.01 mg N/mL) 1～10 mL を小型蒸発皿にそれぞれ段階的 2 系列にとった。

(3) 一方の系列の小型蒸発皿にそれぞれ空試験溶液 1 mL を加えた。

(4) 別の系列の小型蒸発皿には空試験溶液を加えなかった。

(5) 80 °C 以上の水浴上で水分を揮発させて乾固した。

(6) 放冷後、フェノール硫酸 2 mL を速やかに加え、直ちに蒸発皿を回転し、全ての残留物をフェノール硫酸と接触させた。約 10 分間放置後、水 20 mL を加えた。放冷後、水で全量フラスコ 100 mL に移し、溶液の色が淡い黄色になるまでアンモニア水(1+2)を加えて弱アルカリ性とし、更にアンモニア水(1+2) 3 mL を加えた。放冷後、標線まで水を加え、約 30 分間放置し、各系列の 0.01～0.1 mgN/100 mL 検量線用硝酸塩標準液とした。

(7) 別の小型蒸発皿について、(6)と同様の操作を行って検量線用空試験液とした。

(8) 検量線用空試験液を対照として検量線用硝酸塩標準液の波長 410 nm の吸光度を測定し、検量線用硝酸塩標準液の硝酸性窒素(N-N)濃度と吸光度との検量線を作成した。

4) りん酸全量(T-P₂O₅)及び水溶性りん酸(W-P₂O₅)測定のための検量線の作成

(1) りん酸標準液(0.5 mgP₂O₅/mL) 1～12 mL を全量フラスコ 100 mL にそれぞれ段階的 2 系列にとった。

(2) 一方の系列の全量フラスコ 100 mL に硝酸(1+1) 4 mL を加え、加熱して煮沸した。放冷後、フェノールフタレイン溶液(1 g/100 mL) 1～2 滴を加え、溶液の色が淡い赤紫色になるまでアンモニア水(1+1)を加えて中和した。溶液の淡い赤紫色が消失するまで硝酸(1+2)を加えて微酸性とし、適量の水を加えた。

(3) 別の系列の全量フラスコ 100 mL には、(2)の操作をせずに適量の水を加えた。

(4) 発色試薬溶液(A) 20 mL を加え、更に標線まで水を加えた後、約 30 分間放置し、各系列の 0.5～6 mg P₂O₅/100 mL の検量線用りん酸標準液とした。

(5) 別の全量フラスコ 100 mL について、(3)～(4)と同様の操作を行って検量線用空試験液とした。

(6) 検量線用空試験液を対照として検量線用りん酸標準液の波長 420 nm の吸光度を測定し、検量線用りん酸標準液のりん酸濃度と吸光度との検量線を作成した。

5) 可溶性りん酸(S-P₂O₅)測定のための検量線の作成

(1) りん酸標準液(0.5 mgP₂O₅/mL) 1～12 mL を全量フラスコ 100 mL にそれぞれ段階的 2 系列にとり、ペーテルマンくえん酸塩溶液 2 mL 及び硝酸(1+1) 4 mL を加えた。

(2) 一方の系列の全量フラスコ 100 mL は、加熱して煮沸した。放冷後、適量の水を加えた。

(3) 別の系列の全量フラスコ 100 mL は、加熱せずに適量の水を加えた。

(4) 発色試薬溶液(B) 20 mL を加え、更に標線まで水を加えた後、約 30 分間放置し、各系列の 0.5～6 mg P₂O₅/100 mL の検量線用りん酸標準液とした。

(5) 別の全量フラスコ 100 mL について、ペーテルマンくえん酸塩溶液 2 mL 及び硝酸(1+1) 4 mL を加え、(3)～(4)と同様の操作を行って検量線用空試験液とした。

(6) 検量線用空試験液を対照として検量線用りん酸標準液の波長 420 nm の吸光度を測定し、検量線用りん酸標準液のりん酸濃度と吸光度との検量線を作成した。

6) く溶性りん酸(C-P₂O₅)測定のための検量線の作成

- (1) りん酸標準液(0.5 mgP₂O₅/mL) 1~12 mL を全量フラスコ 100 mL にそれぞれ段階的 2 系列にとり, くえん酸溶液(20 mg/mL) 17 mL 及び硝酸(1+1) 4 mL を加えた.
- (2) 一方の系列の全量フラスコ 100 mL は, 加熱して煮沸した. 放冷後, 適量の水を加えた.
- (3) 別の系列の全量フラスコ 100 mL は, 加熱せずに適量の水を加えた.
- (4) 発色試薬溶液(B) 20 mL を加え, 更に標線まで水を加えた後, 約 30 分間放置し, 各系列の 0.5~6 mg P₂O₅/100 mL の検量線用りん酸標準液とした.
- (5) 別の全量フラスコ 100 mL について, くえん酸溶液(20 mg/mL) 17 mL 及び硝酸(1+1) 4 mL を加え, (3)~(4)と同様の操作を行って検量線用空試験液とした.
- (6) 検量線用空試験液を対照として検量線用りん酸標準液の波長 420 nm の吸光度を測定し, 検量線用りん酸標準液のりん酸濃度と吸光度との検量線を作成した.

7) 水溶性ほう素(W-B₂O₃)測定のための検量線の作成

- (1) ほう素標準液(0.05 mg B₂O₃/mL) 1~20 mL を全量フラスコ 100 mL に段階的にとった.
- (2) エチレンジアミン四酢酸溶液 25 mL, 酢酸アンモニウム溶液 10 mL, アゾメチン H 溶液 10 mL を順次加え, 更に標線まで水を加えた後, 約 2 時間放置し, 0.05~1 mgB₂O₃/100 mL の検量線用ほう素酸標準液とした.
- (3) 別の全量フラスコ 100 mL について, (2)と同様の操作を行って検量線用空試験液とした.
- (4) 検量線用空試験液を対照として検量線用ほう素標準液の波長 415 nm の吸光度を測定し, 検量線用ほう素標準液のほう素濃度と吸光度との検量線を作成した.

8) く溶性ほう素(C-B₂O₃)測定のための検量線の作成

- (1) ほう素標準液(0.05 mg B₂O₃/mL) 1~20 mL を全量フラスコ 100 mL に段階的にとった.
- (2) くえん酸溶液(20 mg/mL) 15 mL, エチレンジアミン四酢酸溶液 25 mL, 酢酸アンモニウム溶液 10 mL, アゾメチン H 溶液 10 mL を順次加え, 更に標線まで水を加えた後, 約 2 時間放置し, 0.05~1 mgB₂O₃/100 mL の検量線用ほう素酸標準液とした.
- (3) 別の全量フラスコ 100 mL について, (2)と同様の操作を行って検量線用空試験液とした.
- (4) 検量線用空試験液を対照として検量線用ほう素標準液の波長 415 nm の吸光度を測定し, 検量線用ほう素標準液のほう素濃度と吸光度との検量線を作成した.

3. 結果および考察

1) 硝酸性窒素測定のための検量線

肥料等試験法¹⁾におけるフェノール硫酸法の硝酸性窒素の測定のための検量線を図 1-1 に示した. その結果, 0.01~0.1 mgN/100 mL の濃度範囲で回帰式 $y=4.5801x+0.0017$ で, 決定係数 $r^2=0.9999$ と十分に利用できる検量線が得られた. 空試験溶液 1 mL を添加した検量線用硝酸塩標準液を用いた硝酸性窒素の測定のための検量線を図 1-2 に示した. その結果, 0.01~0.1 mgN/100 mL の濃度範囲で回帰式 $y=4.6301x+0.0007$ で, 決定係数 $r^2=0.9999$ であり, 先の空試験溶液無添加の検量線と一致した.

肥料分析法⁵⁾においては, 試料溶液の調製における空試験溶液(試薬ブランク)の一定量に標準液を加えて示差法にて硝酸性窒素を測定するよう記載されている. しかしながら, 空試験溶液の添加の有無は検

量線の傾き及び切片に影響しないことから、肥料等試験法では空試験溶液を添加せずに検量線を 0.01～0.1 mgN/100 mL の濃度範囲で作成するように記述された。なお、分析試料 1 g を全量フラスコ 250 mL にとり、それぞれの前処理操作で調製した試料溶液を 1 mL 分取して発色させた溶液中の窒素濃度が検量線プロットの最低濃度の 0.01 mgN/100 mL であった場合、分析試料中の硝酸性窒素の含有量は 0.25 %相当量となる。これらのことから、検量線法も公定規格⁷⁾における化成肥料等の含有すべき硝酸性窒素の最小量 (1 %) の測定に適用できることを確認した。

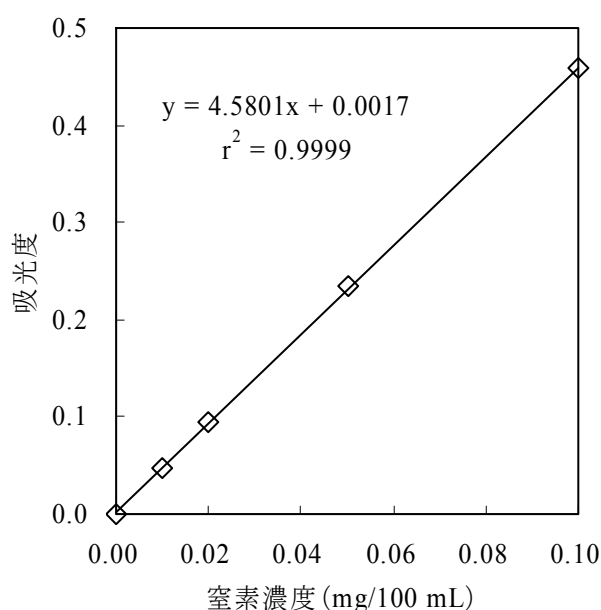


図1-1 N-Nの検量線

◇ 空試験溶液無添加

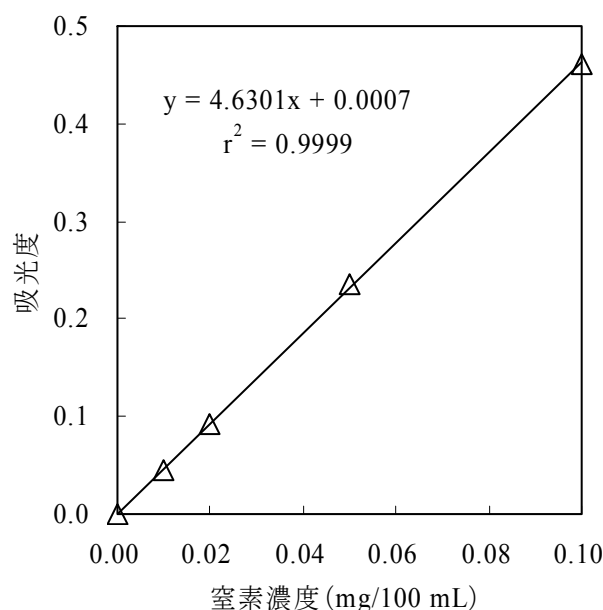


図1-2 N-Nの検量線

△ 空試験溶液 1 mL 添加

2) リン酸全量及び水溶性りん酸測定のための検量線

肥料等試験法¹⁾におけるバナドモリブデン酸アンモニウム法のりん酸全量及び水溶性りん酸の測定のための検量線を図 2-1 に示した。その結果、0.5～6 mgP₂O₅/100 mL の濃度範囲で回帰式 $y=0.2292x+0.0069$ で、決定係数 $r^2=0.9997$ と十分に利用できる検量線が得られた。また、煮沸処理をした検量線用りん酸標準液を用いたりん酸全量及び水溶性りん酸の測定のための検量線を図 2-2 に示した。その結果、0.5～6 mgP₂O₅/100 mL の濃度範囲で回帰式 $y=0.2295x+0.0056$ で、決定係数 $r^2=0.9999$ であり、先の煮沸処理なしの検量線と一致した。

肥料分析法⁵⁾においては、非オルトリン酸を含有するおそれがある場合、標準液に硝酸(1+1)を加えて煮沸処理して示差法にてりん酸全量及び水溶性りん酸を測定するよう記載されている。しかしながら、煮沸処理の有無は、検量線の傾き及び切片に影響しないことから、肥料等試験法では煮沸処理を実施せずに検量線を 0.5～6 mgP₂O₅/100 mL の濃度範囲で作成するように記述された。なお、分析試料 5 g を全量フラスコ 500 mL にとり、それぞれの前処理操作で調製した試料溶液を 25 mL 分取して発色させた溶液中のりん酸濃度が検量線プロットの最低濃度の 0.5 mgP₂O₅/100 mL であった場合、分析試料中のりん酸全量又は水溶性りん酸の含有量は 0.2 %相当量となる。これらのことから、検量線法も公定規格⁷⁾における化成肥料等の含有すべきりん酸全量及び水溶性りん酸の最小量 (1 %) の測定に適用できることを確認した。

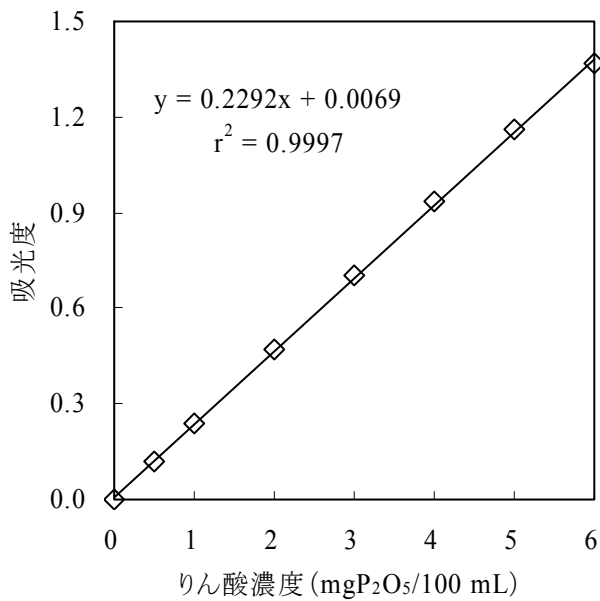


図2-1 T-P₂O₅及びW-P₂O₅の検量線

◇ 煮沸処理なし

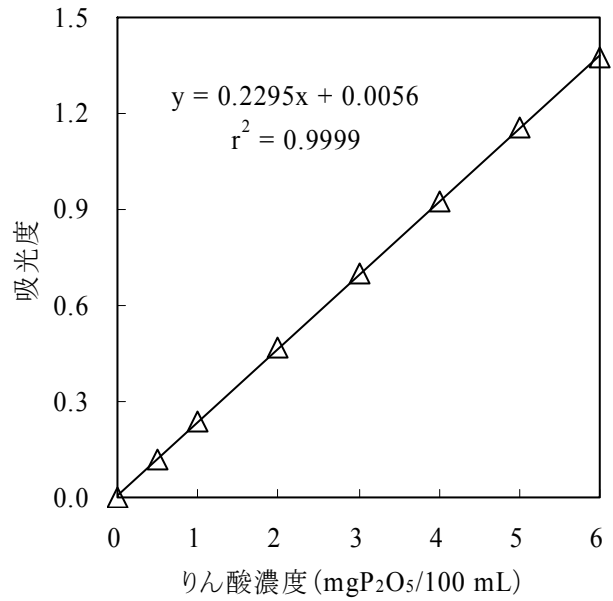


図2-2 T-P₂O₅及びW-P₂O₅の検量線

△ 煮沸処理あり

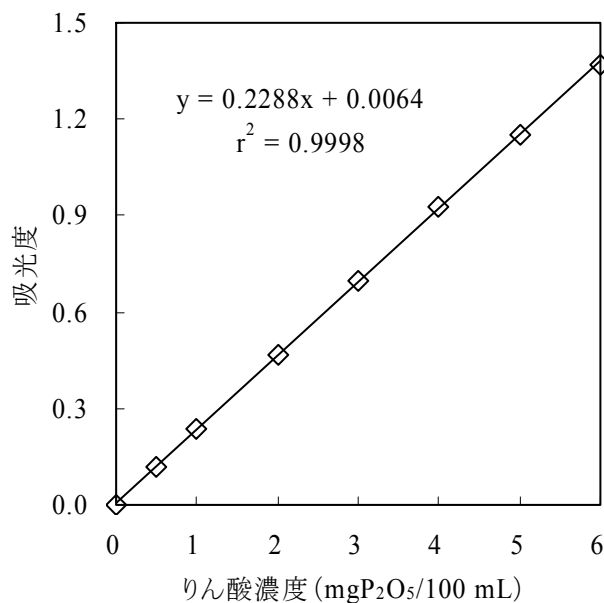


図3-1 S-P₂O₅の検量線

◇ 煮沸処理なし

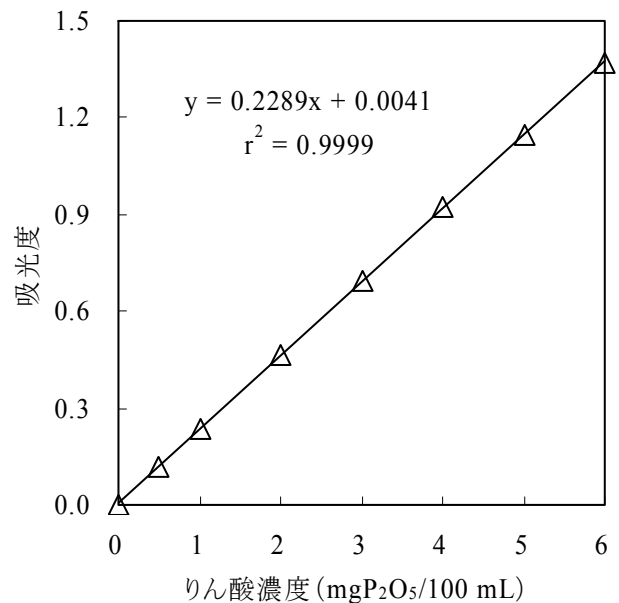


図3-2 S-P₂O₅の検量線

△ 煮沸処理あり

3) 可溶性りん酸測定のための検量線

肥料等試験法¹⁾におけるバナドモリブデン酸アンモニウム法の可溶性りん酸の測定のための検量線を図3-1に示した。その結果, 0.5~6 mgP₂O₅/100 mLの濃度範囲で回帰式 $y=0.2288x+0.0064$ で, 決定係数 $r^2=0.9998$ と十分に利用できる検量線が得られた。煮沸処理をした検量線用りん酸標準液を用いた可溶性りん酸の測定のための検量線を図3-2に示した。その結果, 0.5~6 mgP₂O₅/100 mLの濃度範囲で回帰式 $y=0.2289x+0.0041$ で, 決定係数 $r^2=0.9999$ であり, 先の煮沸処理なしの検量線と一致した。

肥料分析法⁵⁾においては、標準液に硝酸(1+1)を加えて煮沸処理して示差法にて可溶性りん酸を測定するよう記載されている。しかしながら、煮沸処理の有無は、検量線の傾き及び切片に影響しないことから、肥料等試験法では煮沸処理を実施せずに検量線を0.5~6 mgP₂O₅/100 mLの濃度範囲で作成するように記述された。なお、分析試料2.5 gを前処理操作し、全量フラスコ250 mLに調製した試料溶液(a)及び試料溶液(b)を各5 mL分取して合わせて発色させた溶液中のりん酸濃度が検量線プロットの最低濃度の0.5 mgP₂O₅/100 mLであった場合、分析試料中の可溶性りん酸の含有量は0.5%相当量となる。これらのことから、検量線法も公定規格⁷⁾における化成肥料等の含有すべき可溶性りん酸の最小量(1%)の測定に適用できることを確認した。

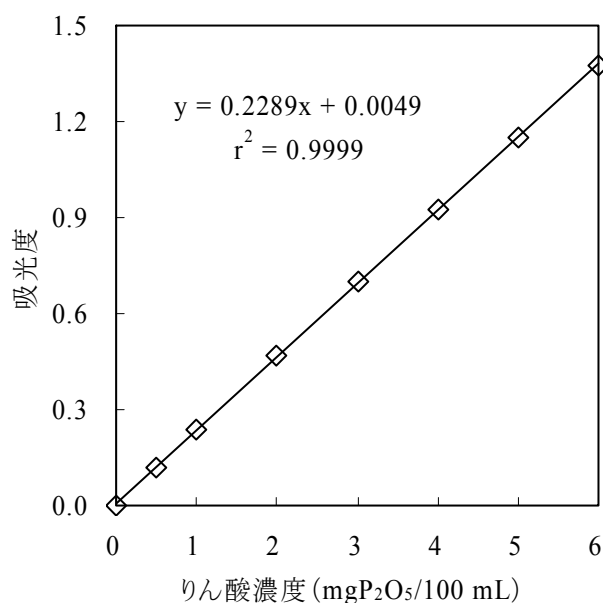


図4-1 C-P₂O₅の検量線

◇ 煮沸処理なし

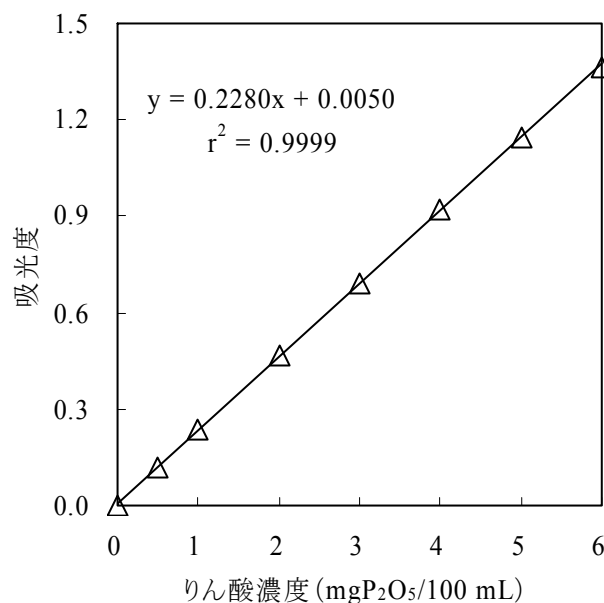


図4-2 C-P₂O₅の検量線

△ 煮沸処理あり

4) く溶性りん酸測定のための検量線

肥料等試験法¹⁾におけるバナドモリブデン酸アンモニウム法のく溶性りん酸の測定のための検量線を図4-1に示した。その結果、0.5~6 mgP₂O₅/100 mLの濃度範囲で回帰式 $y = 0.2289x + 0.0049$ で、決定係数 $r^2 = 0.9999$ と十分に利用できる検量線が得られた。煮沸処理をした検量線用りん酸標準液を用いたく溶性りん酸の測定のための検量線を図4-2に示した。その結果、0.5~6 mgP₂O₅/100 mLの濃度範囲で回帰式 $y = 0.2280x + 0.0050$ で、決定係数 $r^2 = 0.9999$ であり、先の煮沸処理なしの検量線と一致した。

肥料分析法⁵⁾においては、標準液に硝酸(1+1)を加えて煮沸処理して示差法にてく溶性りん酸を測定するよう記載されている。しかしながら、煮沸処理の有無は、検量線の傾き及び切片に影響しないことから、肥料等試験法では煮沸処理を実施せずに検量線を作成するよう記載された。なお、分析試料1 gを全量フラスコ250 mLにとり、前処理操作で調製した試料溶液を25 mL分取して発色させた溶液中のりん酸濃度が検量線プロットの最低濃度の0.5 mgP₂O₅/100 mLであった場合、分析試料中のく溶性りん酸の含有量は0.5%相当量となる。これらのことから、検量線法も公定規格⁷⁾における化成肥料等の含有すべきく溶性りん酸の最小量(1%)の測定に適用できることを確認した。

5) 水溶性ほう素及びく溶性ほう素測定のための検量線

肥料等試験法¹⁾におけるアゾメチン H 法の水溶性ほう素の測定のための検量線を図 5-1 に示した。その結果, 0.05~1 mgB₂O₃/100 mL の濃度範囲で回帰式 $y = 1.0391x + 0.0048$ で, 決定係数 $r^2 = 0.9998$ と十分に利用できる検量線が得られた。くえん酸溶液 (20 mg/mL) 15 mL を添加した検量線用ほう素標準液を用いたく溶性ほう素の測定のための検量線を図 5-2 に示した。その結果, 0.05~1 mgB₂O₃/100 mL の濃度範囲で回帰式 $y = 0.8482x + 0.0015$ で, 決定係数 $r^2 = 0.9999$ であり, 先の水溶性ほう素の検量線より傾きが小さくなっていた。

肥料分析法⁵⁾においても検量線法にてほう素を測定するよう記載されているが, 検量線用標準液の濃度範囲及びくえん酸溶液 (20 mg/mL) の添加量が明示されていない。ほう素標準液に添加したくえん酸溶液 (20 mg/mL) の量が多くなるほど検量線の傾きが小さくなることが知られている⁷⁾が, 同液 15 mL 添加された 0.05 mgB₂O₃/100 mL の検量線用標準液は適用可能な吸光度 (0.042) であった。このことから, ほう素測定のための検量線を 0.05~1 mgB₂O₃/100 mL の濃度範囲で作成し, 更にく溶性ほう素の検量線用標準液にはくえん酸溶液 (20 mg/mL) 15 mL (試料溶液 25 mL 相当のくえん酸溶液量) を添加するよう記述された。なお, 分析試料 1 g 又は 2.5 g を全量フラスコ 250 mL にとり, それぞれの前処理操作で調製した試料溶液を 25 mL 分取して発色させた溶液中のほう素濃度が検量線プロットの最低濃度の 0.05 mgB₂O₃/100 mL であった場合, 分析試料中の水溶性又はく溶性ほう素の含有量は 0.05 % 又は 0.02 % 相当量となる。これらのことから, いずれの検量線法も公定規格⁷⁾における化成肥料等の含有すべき水溶性又はく溶性ほう素の最小量 (0.05 %) の測定に適用できることを確認した。

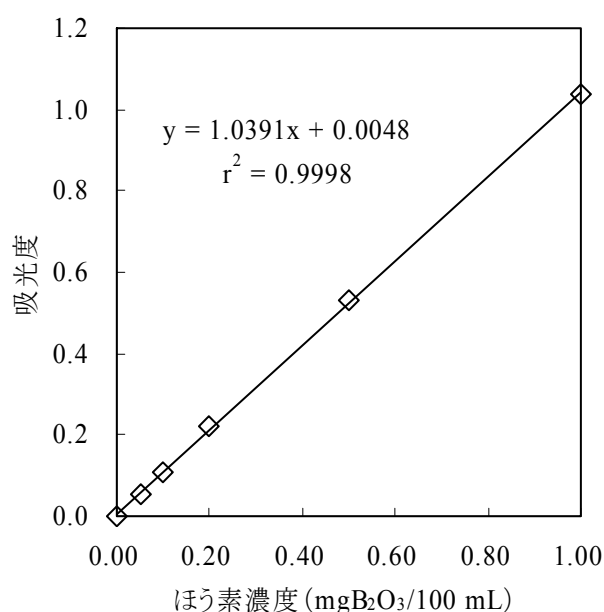


図5-1 W-B₂O₃の検量線

◇くえん酸溶液無添加

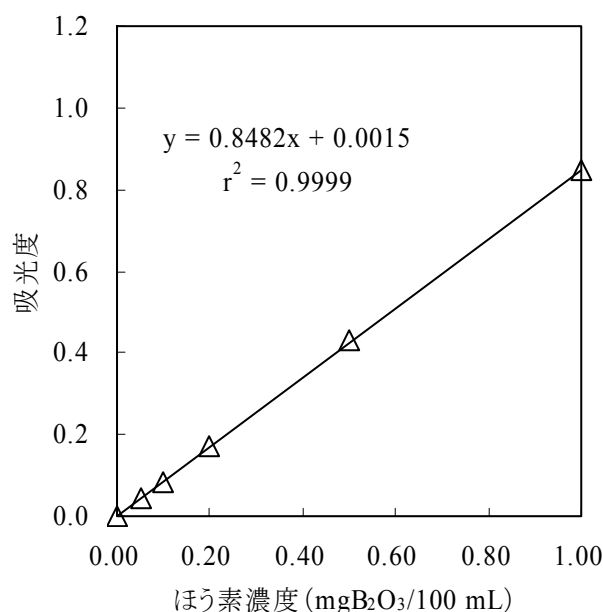


図5-2 C-B₂O₃の検量線

△くえん酸溶液15 mL添加

4. まとめ

硝酸性窒素, リン酸及びほう素の測定のための検量線を作成したところ, 次の結果を得た。硝酸性窒素測定のための検量線は 0.01~0.1 mgN/100 mL の濃度範囲で直線性を示した。空試験溶液 (試薬ブランク)

の添加の有無は検量線の傾き及び切片に影響しなかった。りん酸全量、水溶性りん酸、可溶性りん酸及び可溶性りん酸の測定のための検量線はいずれも 0.5~6 mgP₂O₅/100 mL の濃度範囲で直線性を示した。各検量線用標準液の煮沸処理の有無は検量線の傾き及び切片に影響しなかった。水溶性ほう素及び可溶性ほう素の検量線は 0.05~1 mgB₂O₃/100 mL の濃度範囲で直線性を示した。検量線のプロットの最低濃度から算出した分析試料中のそれぞれの成分の含有量は、公定規格⁷⁾における化成肥料等の含有すべき最小量を測定できる量であった。

以上、いずれの検量線法もそれぞれの成分測定に用いることができる十分な性能を有することが確認された。このことから、2008 年度肥料等技術検討会の審議を受け、吸光光度分析における硝酸性窒素、りん酸及びほう素の測定のための検量線法は肥料等試験法(2009)に採用された¹⁾。

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(2009)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/bunseki/sub9.html>>
- 2) ISO/IEC 17025 (2005): "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories" (JIS Q 17025 :2006, 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項)
- 3) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, *Pure & Appl. Chem.*, **74** (5), 835~855 (2002)
- 4) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 5) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992年版), p.21~22, p.34~37, p.70~71, 日本肥糧検定協会, 東京(1992)
- 6) JIS K 0115 :2004, 吸光光度分析通則
- 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件:改正平成12年8月31日, 農林水産省告示第1161号(2000)
- 8) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, p.184~187, 養賢堂, 東京(2005)