

5 亜りん酸(塩)を含む固形肥料中のりん酸の測定

―く溶性りん酸試験法の改良―

廣井利明¹, 山西正将¹

キーワード 亜りん酸, 亜りん酸塩, 固形肥料, く溶性りん酸, 王水, 吸光光度分析法

1. はじめに

亜りん酸(ホスホン酸: H_2PHO_3)はオルトリン酸(H_3PO_4)に比較して、水への溶解度が高く、亜りん酸及び亜りん酸塩(以下、亜りん酸(塩)という。)を含む肥料を使用して作物に葉面散布した場合や養液栽培した場合、従来のオルトリン酸塩を含む肥料に比べて着果等の増加が報告され、亜りん酸を含む葉面散布用の肥料が多く流通するようになってきている¹⁾。一方で、植物は亜りん酸を直接吸収利用できないとの報告もされるようになり²⁾、肥料としての亜りん酸の利用が注目されている。

近年、亜りん酸(塩)を含む固形肥料でく溶性りん酸を保証した肥料が肥料登録され流通しているが、現状では、当該成分の試験法が肥料分析法³⁾及び肥料等試験法⁴⁾に記載されていない。このため、2014年度の調査研究課題において、試験法が検討⁵⁾され肥料等技術検討会の審議を受けた。本年度はその方法の室間再現精度確認のための共同試験が計画されていた。しかしながら、本年度に入り共同試験準備として2014年度に検討した試験法を用いて、供試肥料の成分確認試験を実施したところ、一部の肥料において試料溶液に残存した硫酸の影響と考えられる正の系統誤差を生ずることが判明した。

このため、く溶性りん酸試験法を改良することとし、試料溶液中の亜りん酸を塩酸及び硝酸を加えて加熱酸化した後、モリブデン量の多い発色試薬溶液(肥料分析法³⁾におけるb試薬)を用いたバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法により測定する方法について検討し、単一試験室での妥当性確認を行ったのでその概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

(1) 自己調製試料

試料の調製にあたってはTable 1に示した、JIS規格に規定されている試薬特級、純度99%以上の試薬及び肥料認証標準物質FAMIC-A-13(以下、「肥料標準A-13」という。)を用いた。亜りん酸を含み、く溶性りん酸を保証している流通肥料をX線回折装置を用いてその結晶構造を調査したところ、亜りん酸カルシウムの形態となっていることが認められた。試薬の亜りん酸カルシウム一水和物($\text{CaPHO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)は肥料等試験法に掲載の水溶性りん酸の抽出方法ではほとんど溶解しないが、くえん酸溶液(20 mg/mL)には溶解する物質であったため、この試薬を原料として使用することとした。肥料標準A-13についてはく溶性りん酸の認証値が設定されている。亜りん酸カルシウム一水和物、硫酸アンモニウム及び硫酸カリウムは、混合前に乳鉢を用いて目開き500 μm のふるいを全通するまで粉碎した。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

配合設計の作成に当たっては、亜りん酸カルシウム一水和物の量が質量分率 100 %～質量分率 0.4 %となるように Table 2 のとおり各試薬等の量を決定し、く溶性りん酸 (C-P₂O₅) として質量分率 51.40 %～質量分率 0.206 %含有する試験品 1～8 を調製した。試験品は材料をポリエチレン袋に入れてよく混合したのち密封し常温で保管した。

Material		C-P ₂ O ₅ ^{a)}
A	Calcium phosphonate (CaHPO ₃)	51.40 ^{b)}
B	Fertilizer certificated reference material FAMIC-A-13	10.79 ^{c)}
C	Ammonium sulfate	0.00
D	Potassium sulfate	0.00

a) Content of citric acid-soluble phosphorus (C-P₂O₅)

b) Theoretical value

c) Certified value

Number of analytical sample	The mixing ratio of the materials				Content of C-P ₂ O ₅ ^{b)}	PO ₃ ³⁻ -drived ^{c)}
	A ^{a)}	B ^{a)}	C ^{a)}	D ^{a)}		
1	100				51.40	51.40
2	60	40			35.16	30.84
3	30	70			22.97	15.42
4	20		40	40	10.28	10.28
5	10		45	45	5.14	5.14
6	5		47.5	47.5	2.57	2.57
7	2		49	49	1.03	1.03
8	0.4		49.8	49.8	0.206	0.206

a) These are materials which are shown in Table 1

b) Citric acid-soluble phosphorus (P₂O₅) derived from phosphate-group and phosphonate-group

c) Phosphorus (P₂O₅) derived from phosphonate-group

(2) 流通肥料

市販の亜りん酸(塩)由来のく溶性りん酸を含む固形肥料約 300 g を目開き 500 μm のふるいを全通するまで粉碎、混合し、試験品 9～14 を調製した。試験品はポリエチレン袋に入れ密封し常温で保管した。肥料の種類及び亜りん酸の由来する原料を Table 3 に示した。

Table 3 Phosphonic acid source of fertilizers used in this study

Number of analytical sample	Type of fertilizer	Phosphonic acid source
9	Processed phosphate fertilizer	Phosphonic acid
10	Byproduct phosphate fertilizer	Calcium phosphonate
11	Compound fertilizer	Phosphonic acid
12	Compound fertilizer	Phosphonic acid
13	Compound fertilizer	Calcium phosphonate
14	Absorption mixed fertilizer	Potassium phosphonate

2) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水を使用した。
- (2) くえん酸溶液 (20 mg/mL): JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 20 g を水に溶かして 1000 mL とした。
- (3) 硝酸: JIS K 8541 に規定する試薬。
- (4) 硫酸: JIS K 8951 に規定する試薬。
- (5) 塩酸: JIS K 8180 に規定する試薬。
- (6) フェノールフタレイン溶液: JIS K 8799 に規定するフェノールフタレイン 1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール (95) 100 mL に溶かした。
- (7) アンモニア水: JIS K 8085 に規定する試薬。
- (8) りん酸標準液 (P_2O_5 10 mg/mL): JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウムを $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ で約 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、19.17 g をひょう量皿にはかりとり、少量の水で溶かし、全量フラスコ 1000 mL に移し入れ、硝酸 2 mL ~ 3 mL を加え、標線まで水を加えた。
- (9) りん酸標準液 (P_2O_5 0.5 mg/mL): りん酸標準液 (P_2O_5 10 mg/mL) 50 mL を全量フラスコ 1000 mL にとり、硝酸 2 mL ~ 3 mL を加え、標線まで水を加えた。
- (10) 発色試薬溶液 (a 試薬): JIS K 8747 に規定するバナジン (V) 酸アンモニウム 1.12 g を水に溶かし、硝酸 250 mL を加えた後、JIS K 8905 に規定するセモリブデン酸六アンモニウム四水和物 27 g を水に溶かして加え、更に水を加えて 1000 mL とした。
- (11) 発色試薬溶液 (b 試薬): JIS K 8747 に規定するバナジン (V) 酸アンモニウム 1.12 g を水に溶かし、硝酸 150 mL を加えた後、JIS K 8905 に規定するセモリブデン酸六アンモニウム四水和物 50 g を水に溶かして加え、更に水を加えて 1000 mL とした。

3) 器具及び装置

- (1) 電子天びん: METTLER TOLEDO MS403S
- (2) 上下転倒式恒温回転振り混ぜ機: ADVANTEC THM062FA
- (3) ホットプレート: アサヒ理化製作所 APS-500
- (4) 砂浴
- (5) 分光光度計: 島津製作所 UV-1800

4) 試験方法

(1) 2014 年度検討法(硝酸-硫酸分解法)[下記 3. 2)の検討で用いた方法]

分析試料 1 g を(1 mg の桁まで)はかりとり、全量フラスコ 250 mL に入れ約 30 °C に加温したくえん酸溶液 150 mL を加え、30~40 回転/分、30 °C ± 1 °C で 1 時間振り混ぜ、放冷後標線まで水を加えた。ろ紙 3 種でろ過して試料溶液とした。

試料溶液の一定量をトルビーカー 100 mL に入れ、硝酸 2 mL 及び硫酸 2 mL を加え混合した後、時計皿で覆い、約 250 °C のホットプレートで加熱して、液量が約 2 mL になるまで濃縮した。無色となり白煙が生じてから更に約 30 分間加熱した。放冷後、全量フラスコ 100 mL に水で移して冷却し、フェノールフタレイン溶液を 1~2 滴加え、溶液の色が淡い赤紫色になるまでアンモニア水(1+1)を加えた。その後、溶液の淡い赤紫色が消失するまで硝酸(1+5)を加えて微酸性とし室温まで放冷した。発色試薬溶液(a 試薬) 20 mL を加え、標線まで水を加えた後、約 30 分間放置し分光光度計で波長 420 nm の吸光度を測定した(Scheme 1)。

(2) 改良法(王水酸化法)

[上記(1)の改良のため、下記 3.3)~3.7)で各条件を検討し、3.8)~3.12)での性能確認に用いた方法]

上記(1)と同様に調製した試料溶液の一定量をトルビーカー 100 mL に入れ、硝酸 1 mL 及び塩酸 3 mL を加え混合した後、時計皿で覆い、200 °C ~ 250 °C のホットプレートで加熱して、液量が約 2 mL になるまで濃縮した。放冷後、全量フラスコ 100 mL に水で移し、くえん酸溶液が 17 mL 相当量になるよう同溶液を加え、硝酸(1+1) 2 mL を加えた。

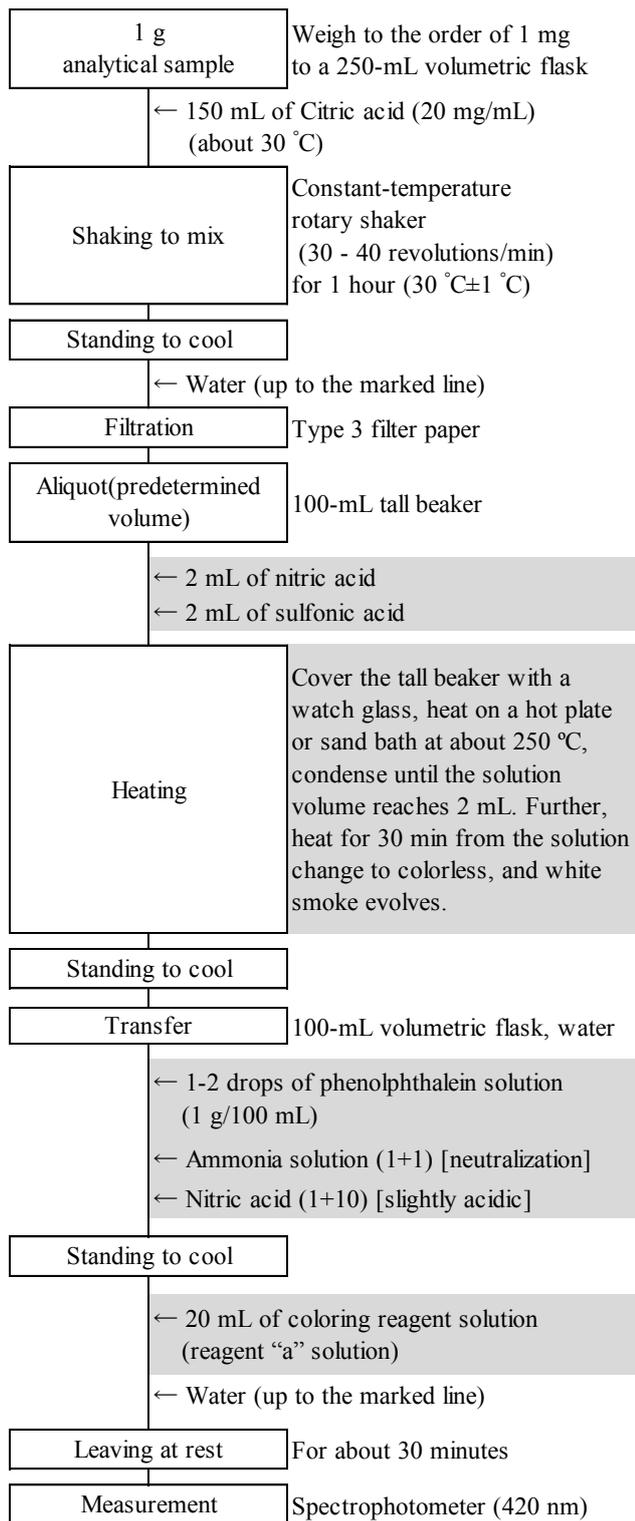
りん酸標準液(P_2O_5 0.5 mg/mL) 1 mL~12 mL を全量フラスコ 100 mL に段階的にとり、くえん酸溶液 17 mL を加え、硝酸(1+1) 4 mL を加え、更に適量の水を加えた。発色試薬溶液(b 試薬) 20 mL を加え、標線まで水を加えた後、約 30 分間放置し分光光度計で波長 420 nm の吸光度を測定した(Scheme 2)。

(3) 既存の方法(ケルダール硫酸分解法)

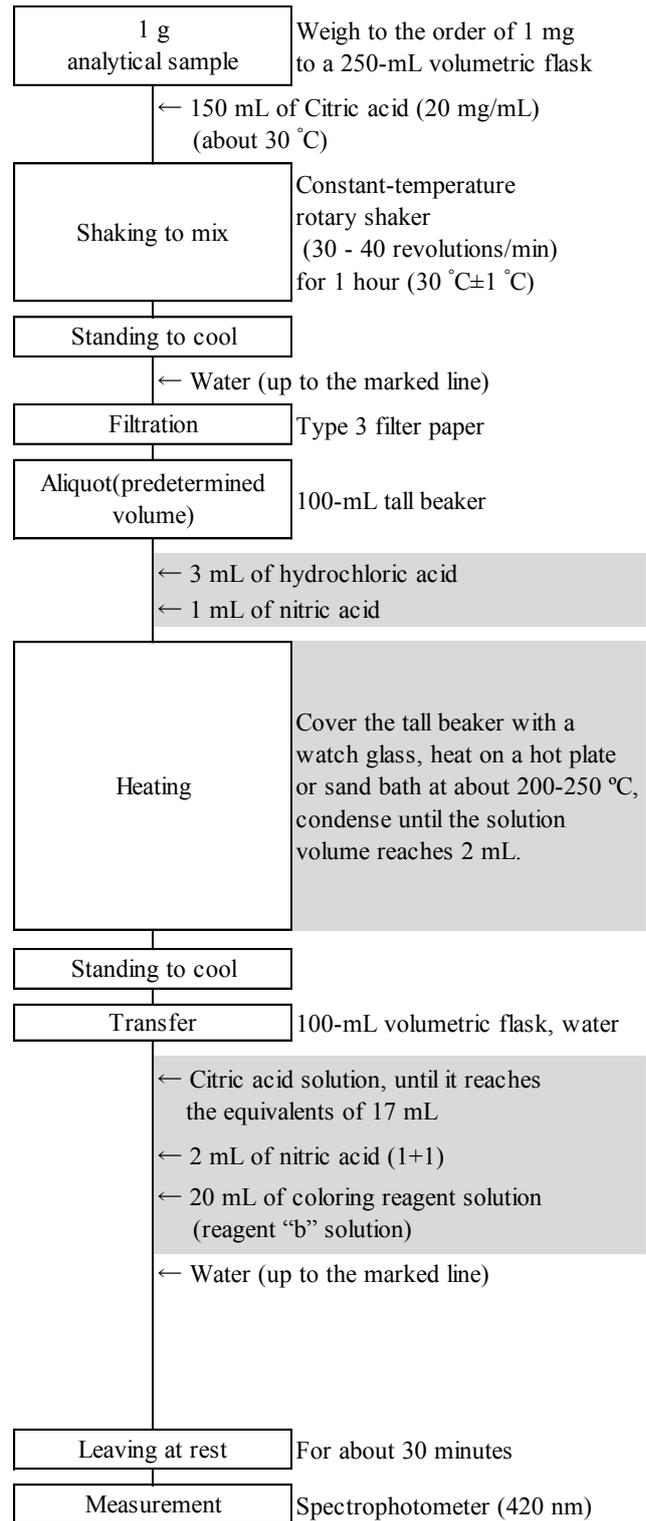
[下記 3.9)において上記(2)の改良法との比較試験に用いた方法]

肥料等試験法⁴⁾のりん酸全量試験法として収載されているケルダール硫酸分解法に準じた。

上記(1)と同様に調製した試料溶液の一定量をケルダール硫酸分解し、試料溶液中のりん酸全量を測定し、く溶性りん酸とした。なお、測定にあたって硫酸による発色への影響を考慮し測定用溶液 100 mL 中に硫酸が 0.5 mL 以下となるように分取した。



Scheme 1 The method that was developed in 2014
The flow sheet for citric acid-soluble phosphorus (P_2O_5) in solid fertilizers containing phosphonic acid



Scheme 2 The improving method in 2015
The flow sheet for citric acid-soluble phosphorus (P_2O_5) in solid fertilizers containing phosphonic acid

3. 結果及び考察

1) 昨年度(2014年度)までの試験法検討経緯

2014年度までに実施されたく溶性りん酸試験法の検討経緯を以下のとおり整理した。

(1) 亜りん酸(塩)を含まない肥料の試験法

肥料分析法³⁾及び肥料等試験法⁴⁾には肥料中のく溶性りん酸(C-P₂O₅)及び水溶性りん酸(W-P₂O₅)の試験法として、溶媒で抽出した後、バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法(以下、吸光光度法という。)により発色・測定する方法が記載されている。この方法では、含有する非オルトリン酸をオルトリン酸に酸化するために試料溶液に硝酸(1+1)を加え煮沸する方法がとられている。

(2) 亜りん酸(塩)を含む肥料の試験法

亜りん酸(塩)を含む肥料の場合は上記(1)の方法では亜りん酸が十分酸化されず、定量値が低くなる傾向がある。溶液中の亜りん酸イオンは強い還元剤であり、種々の酸化剤によって定量的に酸化されオルトリン酸イオンになる⁶⁾ことが知られており、既に、亜りん酸(塩)を含む液状肥料の水溶性りん酸試験法が検討され^{7, 8)}、試料溶液中の亜りん酸を塩酸及び硝酸で加熱・酸化し吸光光度法により測定する方法が肥料等試験法⁴⁾に記載された。

近年、亜りん酸(塩)を含む固形肥料でく溶性りん酸を保証した肥料が肥料登録され流通しているが、現状では、当該成分の試験法が肥料分析法³⁾及び肥料等試験法⁴⁾に記載されていない。亜りん酸(塩)を含む肥料中のく溶性りん酸の測定を肥料等試験法の水溶性りん酸試験法に準じて測定した場合、試料溶液に含まれるくえん酸が吸光光度法による定量値に影響を与える場合がある⁹⁾。このため、2014年度の調査研究課題において、く溶性りん酸の定量値に影響を与えないようくえん酸を分解するため、試料溶液に硝酸2 mL及び硫酸2 mLを加えて加熱し、亜りん酸の酸化とくえん酸の分解を同時に行い、水溶性りん酸等の定量で使用する発色試薬溶液(肥料分析法³⁾における a 試薬)により発色定量する方法が検討され、肥料等技術検討会で報告された⁵⁾(Scheme 1)。

2) 2014年度検討法(硝酸-硫酸分解法)の問題点とその原因調査

本年度、調査研究計画に基づき実施予定の共同試験の準備として2014年度に検討した硝酸-硫酸分解法(Scheme 1)を用いて、供試肥料の成分確認試験を実施したところ、一部の肥料において理論値よりも高い測定値となる場合が多くあったため、確認のための試験を実施した。硝酸-硫酸分解法を用いて亜りん酸カルシウム一水和物及び肥料標準 A-13 のく溶性りん酸をそれぞれ3点併行で分析した。硝酸-硫酸分解における試料溶液残量を約2 mLから約1 mLに変更した方法についても分析した。その結果、試験方法に従い、試料溶液残量を約2 mLとした場合、亜りん酸カルシウム一水和物については理論値(質量分率51.4%)を相対値で2%程度超過し、肥料標準 A-13 については内部品質管理のための上方処置線(認証値+室間再現標準偏差×3)を超過する高めの値(理論値又は認証値に対する割合が101%~106%)となった。試料溶液残量を約1 mLとした場合、3点併行試験のうち2点は理論値又は認証値に近い値(理論値又は認証値に対する割合が98%~99%)となったが、うち1点は濃縮し過ぎるなどして低値となった。

この原因として、硝酸-硫酸分解・濃縮後に残留した硫酸の影響が考えられたため、確認試験を実施した。りん酸標準液に発色試薬溶液(a試薬)を加え測定したもの(標準液①)、りん酸標準液に硫酸2 mL及び硝酸2 mLを加えて硝酸-硫酸分解法で測定したもの(標準液②)について、吸光度を比較した。

その結果、硝酸-硫酸分解法により試料溶液残量を約 2 mL とした標準液②は、標準液をそのまま発色させた標準液①と比較して発色操作後 30 分で 0.02 程度高めの吸光度となり、その後 90 分後までの経時変化は標準液①は吸光度で +0.001 のところ、標準液②は +0.013 と比較的顕著な増加傾向が認められた。硝酸-硫酸分解法により試料溶液残量を約 1 mL までとした標準液③は、硝酸-硫酸分解を行わなかった標準液①と同程度の吸光度となった。

以上のことから、硝酸-硫酸分解法は試料溶液に硫酸が 2 mL 程度残存することによる正の系統誤差及び経時変化があると考えられたため、本年度の計画による共同試験を実施する前に試験法を改良する必要性が生じた。

3) 亜りん酸の酸化方法の選定

硝酸-硫酸分解法を改良する方法として、酸化方法の改良を検討した。上記 2) の結果から試料溶液残量を約 1 mL までとする操作とすることも考えられたが、硫酸を含む試料溶液の濃縮に長時間を要するとともに、濃縮終了の判定に熟練を要し、ばらつきの原因となることが考えられた。そこで、現在流通している亜りん酸(塩)入り固形肥料の品質管理分析実績がある肥料生産業者及び分析機関にく溶性りん酸の試験方法を聞き取り調査した。その結果、比較的多く用いられている方法は、現行の肥料等試験法の亜りん酸(塩)を含む肥料の水溶性りん酸試験法で採用されている塩酸 3 mL 及び硝酸 1 mL を加えて加熱濃縮(以下、「王水酸化操作」という。)し、発色及び測定操作は肥料等試験法のく溶性りん酸試験法と同様に、発色試薬溶液 b 試薬により測定する方法であったことから、この方法(Scheme 2)を基に、以下の検討を行うこととした。

4) 王水酸化操作及び硝酸(1+1)添加の有無による発色への影響について

王水酸化操作を行うにあたり、バナドモリブデン酸アンモニウム吸光度法において、試料溶液を王水分解した際に塩化ニトロシル(NOCI)が残存するとその還元性によってりん酸の発色が妨げられる場合がある¹⁰⁾ため、その影響を調査する必要がある。また、現行の肥料等試験法⁴⁾く溶性りん酸試験法(以下、「現行法」という。)は、試料溶液及び検量線用標準液にくえん酸溶液 17 mL 相当量及び硝酸(1+1)4 mL を添加し、非オルトリン酸を含む試料溶液については煮沸した後、中和操作を行わず、発色試薬溶液(b 試薬)を添加し測定する方法である。本検討での改良法は「硝酸(1+1)4 mL での煮沸」に変えて、試料溶液中の亜りん酸を酸化するための王水酸化操作を行うが、この王水酸化操作及び硝酸(1+1)4 mL 添加の有無が、標準液の発色に与える影響について、りん酸標準液 P₂O₅ 6 mg/100 mL を用いて、王水酸化操作の有無及び硝酸(1+1)の添加量を変えて、3 点併行試験により吸光度を比較する検討を行った。その結果、Table 4 のとおり、標準液④(現行法の標準液)、標準液⑥(標準液にくえん酸溶液 15 mL、塩酸 3 mL 及び硝酸 1 mL 添加し、約 2 mL まで加熱濃縮後、くえん酸溶液 2 mL 及び硝酸(1+1)2 mL を加え測定する方法)の吸光度を比較したところ、同程度の結果となった。発色操作前の硝酸の添加量が多い標準液⑤(王水酸化操作のための硝酸 1 mL + 硝酸(1+1)4 mL = 硝酸 3 mL/100 mL 相当量)は、硝酸 2 mL/100 mL 相当量を含む現行法の標準液④及び⑥と比較して吸光度が低下し、経時変化も大きくなる傾向であった。標準液⑥は王水酸化操作のために硝酸 1 mL 添加、王水酸化操作後に硝酸(1+1)2 mL を添加し、測定溶液中の硝酸の合計量が標準液④と同じ約 2 mL 相当量であるため、同程度の吸光度となったと考えられた。

この結果から、現行法と同時に測定が可能な利便性も考慮し、検量線用標準液は現行法と同じ「くえん酸溶液 17 mL 添加、硝酸(1+1)4 mL 添加し発色試薬溶液 b 試薬で測定する方法」とし、試料溶液は「王水酸化操作後、くえん酸溶液 17 mL 相当量添加、硝酸(1+1)2 mL を加え発色試薬溶液 b 試薬で測定する方法」とし以下の検討を行うこととした。

Table 4 Influence on absorbance of the standard solution by the aqua regia oxidation treatment

	④ ^{a)b)c)}	⑤ ^{a)b)d)}	⑥ ^{a)b)e)}	⑦ ^{a)b)f)}	⑧ ^{a)b)g)}
	Absorbance (abs)	Absorbance (abs)	Absorbance (abs)	Absorbance (abs)	Absorbance (abs)
30 minutes later ^{h)}	1.417	1.405	1.419	1.431	1.428
60 minutes later ^{h)}	1.415	1.399	1.417	1.433	1.429
90 minutes later ^{h)}	1.414	1.394	1.415	1.433	1.428
120 minutes later ^{h)}	1.412	1.389	1.413	1.434	1.428

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

b) Phosphate standard solution (P_2O_5 6 mg/mL),

This corresponds to reagent “b” solution in the Official Methods of Analysis of Fertilizers (1992).

c) Add 17 mL of citric acid solution, then add 4 mL of nitric acid (1+1)

d) Add 15 mL of citric acid solution and 3 mL of hydrochloric acid, 1 mL of nitric acid, then heat and condense until the solution volume becomes 2 mL, further add 2 mL of citric acid solution and 4 mL of nitric acid (1+1)

e) Add 15 mL of citric acid solution and 3 mL of hydrochloric acid, 1 mL of nitric acid, then heat and condense until the solution volume becomes 2 mL, further add 2 mL of citric acid solution and 2 mL of nitric acid (1+1)

f) Add 17 mL of citric acid solution

g) Add 15 mL of citric acid solution and 3 mL of hydrochloric acid, 1 mL of nitric acid, then heat and condense until the solution volume becomes 2 mL, further add 2 mL of citric acid solution

h) It is an elapsed time until the measurement after adding the coloring reagent solution.

5) くえん酸を添加した標準液の発色に王水酸化操作が与える影響について

バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法において、試料溶液中にくえん酸が共存する場合には、モリブデンの一部がマスキングされるため、りん酸発色試薬溶液中のモリブデンを増量する必要がある。ただし、あまり多く増量するとけい酸が発色するため、くえん酸量は一定とし(100 mLの発色溶液中にくえん酸 0.34 g)、その条件下で発色試薬溶液(b 試薬)を用いることとされている⁹⁾。

現行法では、試料溶液の分取量に応じて発色操作前に 100 mL 中のくえん酸溶液(20 mg/mL)量を 17 mL (くえん酸 0.34 g)相当量に揃えて、発色操作を行っている。くえん酸量を一定にするにあたり、王水酸化操作により試料溶液中のくえん酸が分解するなどし発色に影響するかどうか検討した。

トールビーカー 100 mL にりん酸標準液(6 mg 相当量)を入れ、くえん酸溶液 0 mL~18 mL(くえん酸量として 0.00 g~0.36 g 相当量)を段階的に加え、それぞれに、塩酸 3 mL 及び硝酸 1 mL を加えて約 250 °C のホットプレート上で加熱し、液量が約 2 mL となるまで濃縮し、全量フラスコ 100 mL に水で移し込み後、分取量から計算したくえん酸溶液量が 17 mL/100 mL 相当量以下の場合は 17 mL 相当量となるようにくえん酸溶液を添加し、りん酸を測定した結果を Table 5 に示した。

王水酸化操作前のくえん酸溶液添加量 0 mL~17 mL における標準液吸光度(abs)は 1.419~1.423 であり、発色操作前にくえん酸溶液量を 17 mL/100 mL に揃えることで、王水酸化操作の前後どちらでくえん酸溶液を添加しても、定量値に影響することはほとんどないものと考えられた。

この結果から、上記 2) の結果と同じ方法により、以下の検討を行うこととした。

Table 5 Influence of aqua regia oxidation treatment on absorbance of standard solution varying in the citric acid density

Estimated aliquot amount of sample solution (Reference) (mL)	Before the aqua regia oxidation treatment		After the aqua regia oxidation treatment	
	Citric acid solution added amount (A) (mL)	Citric acid added amount (Reference) (g)	Citric acid solution added amount (B) (mL)	Absorbance of standard solution ^{a)b)c)} (abs)
0	0	0.00	17	1.423
2.5	1.5	0.03	15.5	1.421
10	6	0.12	11	1.421
25	15	0.30	2	1.419
30	18	0.36	0	1.420

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

b) P_2O_5 6 mg/mL

c) Add predetermined volume (A) of citric acid solution and 3 mL of hydrochloric acid, 1 mL of nitric acid, then heat and condense until the solution volume becomes 2 mL, further add the citric acid solution (B) to make the equivalents of 17 mL of the citric acid solution and 2 mL of nitric acid (1+1).

6) 王水酸化操作の加熱終了条件について

王水酸化操作をする際に、亜りん酸を完全にオルトリン酸化するための加熱終了条件を検討するため、2.1) (1) Table 2 の試験品 1 及び試験品 6 を用い加熱濃縮による試料溶液残量を数段階に変えた試料溶液を調製し定量値を比較した。なお、試料溶液残量の確認方法は空のトールビーカーに水 1 mL~5 mL を段階的に入れたものと目視で比較し判断した。試験品のく溶性りん酸設計値はそれぞれ質量分率 51.4 %, 質量分率 2.57 % である。加熱温度は、試料溶液の濃縮時間の短縮と市販の加熱器具で設定が可能であることなどを考慮して 250 °C で行った。その結果、Table 6 のとおり、試料溶液残量が約 1 mL~3 mL の場合に、2 濃度の試料の設計成分量に対する回収率が 98 %~100 % となった。試料溶液残量を 5 mL 以下まで濃縮したことで、酸濃度が濃くなり、酸化力が強くなり、亜りん酸をオルトリン酸化することができたと考えられる。また、試料溶液残量を 0.5 mL 以下とした場合に、結晶の析出又は炭化物が発生し、より低い定量値となる場合があったことから、改良法では加熱濃縮による試料溶液残量を、約 2 mL とすることとして以下の検討を行うこととした。

Table 6 Influence of sample solution residual amount at the time of the heating end on recovery rate of C-P₂O₅

Number of analytical sample	Content of C-P ₂ O ₅ (%) ^{a)}	Aliquot amount of sample solution (mL)	Sample solution amount at the time of the heating start (mL)	Sample solution residual amount at the time of the heating end ^{b)}						
				10 mL	5 mL	3 mL	2 mL	1 mL	0.5 mL	0 mL
				Recovery rate (%) ^{c)}						
1	51.4	2.5	6.5	—	96	99	99	100	76	— ^{d)}
6	2.57	25	29	94	97	98	98	98	98	—

a) Mass fraction

b) Approximate amount

c) Mean recovery ($n = 3$)

d) It is immeasurable for carbonization.

7) 王水酸化操作の加熱温度について

王水酸化操作において試料溶液を加熱濃縮する際の温度を検討した。亜りん酸を酸化させるにあたり、加熱温度が高い方が酸化力が強まるが、高温すぎると酸化が不十分のうちに酸が揮発すること、又は突沸の危険性が高まると考えられる。逆に低温であると酸化力が弱まり亜りん酸を十分に酸化できない可能性がある。そのため、最適となる加熱温度について、以下のとおり検討した。

2.1) (1) Table 2 の試験品 1 及び試験品 6 を用い加熱温度を数段階に変えた試料溶液を調製し定量値を比較した結果を Table 7 に示した。試験品 1 は 170 °C ~ 270 °C で、試験品 6 は 200 °C ~ 270 °C において設計成分量に対する回収率が 98 % ~ 100 % となった。この結果から、試料溶液を約 2 mL まで濃縮する際にはより高温である方が加熱時間の短縮につながることを、また、270 °C では突沸が認められ安全性上の問題があるので、改良法では加熱温度を 200 °C ~ 250 °C として以下の検討を行うこととした。上記 2) ~ 7) の検討結果から、改良した試験法を 2.4) (2) 改良法 (Scheme 2) とし、この改良法について以下の真度、精度等の性能調査を実施した。

Table 7 Influence of heating temperature on recovery rate of C-P₂O₅

Number of analytical sample	Content of C-P ₂ O ₅ (%) ^{a)}	Aliquot amount of sample solution (mL)		Heating temperature			
				170 °C	200 °C	250 °C	270 °C
				1	51.4	2.5	Heating time ^{b)}
			Recovery rate (%) ^{c)}	99	100	100	100
6	2.57	25	Heating time ^{b)}	>600	600	240	100
			Recovery rate (%) ^{c)}	— ^{d)}	98	98	98

a) Mass fraction

b) It is minute required for heating and condensing until the solution volume becomes 2 mL.

c) Mean recovery ($n = 3$)

d) Non-measurement

8) 調製試料測定による真度の評価

改良法の真度を確認するため、2.1) (1) Table 2 の試験品 1～試験品 7 を用いてく溶性りん酸の試験を 3 点併行で実施した結果を Table 8 に示した。く溶性りん酸の設計値について、亜りん酸カルシウム一水和物は理論値を、肥料認証標準物質は認証値を用いた。

く溶性りん酸が質量分率 1.03 %～質量分率 51.4 %で、回収率は 99 %～100 %であり、いずれの回収率もこれらの濃度範囲における肥料等試験法が示している真度(回収率)の目標以内であった。

Table 8 Result of recovery test

Number of analytical sample	Content of C-P ₂ O ₅ (%) ^{a)}	Mean value ^{b)} (%) ^{a)}	Mean recovery (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Criteria of the trueness ^{d)} (%)
1	51.4	51.1	99	0.1	98~102
2	35.2	35.0	99	0.3	98~102
3	23.0	22.9	100	0.5	97~103
4	10.3	10.2	99	1.3	97~103
5	5.14	5.10	99	1.0	96~104
6	2.57	2.55	99	1.6	96~104
7	1.03	1.02	99	4.8	96~104

a) Mass fraction

b) Mean value ($n = 3$)

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of trueness (recovery) shown in Testing Methods of Fertilizers

9) 既存の方法との比較による真度の評価

改良法が、各種の原料を使用した亜りん酸(塩)入り固形肥料の定量に適用可能かどうか確認するため、既存の方法として肥料等試験法⁴⁾のりん酸全量試験法として収載されているケルダール硫酸分解法(上記 2.4) (3))と改良法(王水酸化法)との 2 方法により、試薬の亜りん酸カルシウム一水和物及び Table 3 に示した流通肥料 6 点(加工りん酸肥料 1 点, 副産りん酸肥料 1 点, 化成肥料 3 点, 吸着複合肥料 1 点)計 7 点の試料について、く溶性りん酸定量値を比較した。それぞれ 4 点併行試験を実施した結果を Table 9 に示した。

2 群の成績の等分散性を確認し、試験品毎に t 検定を実施した結果、両側有意水準 5 %で有意な差は認められなかった。

Table 9 Comparison between kjeldahl method and Aqua regia oxidation method for C-P₂O₅

Number of analytical sample	Kjeldahl method		Aqua regia oxidation method		P-value of t-test ^{d)}
	Measured value ^{a)} (%) ^{b)}	s_r ^{c)} (%) ^{b)}	Measured value ^{a)} (%) ^{b)}	s_r ^{c)} (%) ^{b)}	
9	45.8	0.1	45.8	0.1	0.58 ^{e)}
10	40.9	0.2	40.9	0.1	0.91 ^{e)}
11	17.7	0.1	17.6	0.1	0.07 ^{e)}
12	13.3	0.04	13.3	0.02	0.48 ^{e)}
13	5.15	0.1	5.18	0.03	0.55 ^{e)}
14	14.2	0.05	14.2	0.04	0.38 ^{e)}
1	51.0	0.3	50.8	0.1	0.24 ^{e)}

a) Mean value ($n = 4$)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) P-value of t-test on both sides levels

e) Not significant ($P > 5\%$)

10) 肥料認証標準物質による真度の評価

改良法の真度を確認するため、肥料標準 A-13 を用いてく溶性りん酸の試験を 3 点併行で実施した結果を Table 10 に示した。その平均値は質量分率 10.85 % であり、認証標準物質の認証値の警戒線 (3 点併行試験) の範囲以内 (質量分率 10.65 % ~ 10.92 %) 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ていた。

Table 10 Result of trueness confirmation test for C-P₂O₅

Sample	Certified value	Measured		Warning limit ^{e)}	
	(C-P ₂ O ₅) (%) ^{b)}	value ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	Lower (%) ^{b)}	Upper (%) ^{b)}
FAMIC-A-13 ^{a)}	10.79	10.85	0.05	10.65	10.92

a) Fertilizer certified reference material (High-analysis compound fertilizer)

b) Mass fraction

c) Mean value ($n = 3$)

d) Repeatability relative standard deviation

e) The calculated evaluation criteria on basis of 3 replicate analysis

This evaluation criteria is used criteria of trueness in Testing Methods of Fertilizers

11) 併行精度及び中間精度の評価

改良法の中間精度及び併行精度を確認するため、試験品 1 及び試験品 6 を用いて、く溶性りん酸の試験を 2 点併行で日を変えて 5 回実施して得られた結果を Table 11 に示した。また、この結果から一元配置の分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 12 に示した。試験品 1 の平均値は質量分率で 51.0 % で、併

行相対標準偏差は0.2%, 中間相対標準偏差は0.3%であった。また, 試験品6の平均値は質量分率で2.57%で, 併行相対標準偏差は0.6%, 中間相対標準偏差は1.1%であった。

これらの濃度における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)の目安内であったことから, 改良法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 11 Individual result of repetition test of changing the date
for the precision confirmation (% (Mass fraction))

Test days	Analytical sample 1		Analytical sample 6	
1	50.9	50.8	2.55	2.54
2	51.2	51.0	2.56	2.54
3	51.0	51.3	2.54	2.56
4	51.2	51.0	2.62	2.59
5	50.9	51.0	2.58	2.60

Table 12 Statistical analysis of repetition test result for evaluating precision

Number of analytical sample	Mean ^{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)} (%)
1	51.0	0.1	0.2	1	0.2	0.3	2
6	2.57	0.01	0.6	2	0.03	1.1	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

12) 定量下限等の確認

改良法の定量下限を確認するため, 試験品8(く溶性りん酸設計値 質量分率 0.206%)を用いてく溶性りん酸の試験を7点併行で実施した結果をTable 13に示した。平均定量値は質量分率0.205%であり, その標準偏差は質量分率0.005%であった。なお, 定量下限は標準偏差 $\times 10$, 検出下限は標準偏差 $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$ を用いて算出¹¹⁾したところ, 改良法の定量下限は質量分率0.05%程度, 検出下限は質量分率0.02%程度と推定された。なお, 肥料等試験法⁴⁾に示されているこの濃度における回収率の目安は94%~106%であり, 参考のため比較したところ, 調製した試料の回収率100%は許容範囲内であった。

現在流通している亜りん酸(塩)入り固形肥料のく溶性りん酸の最小保証成分量は質量分率5%程度であり, 推定した定量下限値(質量分率0.05%)はこの最小保証成分量の1/10以下であった。このことから, 改良法は,

肥料等試験法が示している定量下限の推奨基準を満たしていることを確認した。

Table 13 Estimation of the lower limit of quantitation (*LOQ*) of C-P₂O₅
(% (mass fraction))

Number of analytical sample	Content	Mean ^{a)}	s_r ^{b)}	<i>LOQ</i> ^{c)}	<i>LOD</i> ^{d)}
8	0.206	0.205	0.005	0.05	0.02

a) Mean value of the parallel test ($n=7$)

b) Repeatability standard deviation

c) Lower limit of quantitation ($LOQ = s_r \times 10$)

d) Lower limit of detection ($LOD = s_r \times 2 \times t(n-1, 0.05)$)

4. まとめ

2014年度に検討した亜りん酸(塩)を含む固形肥料中のく溶性りん酸の試験法について、本年度に共同試験準備のための試験をしたところ、一部の肥料において測定用溶液中の硫酸が定量値に影響を与えることが判明したため、発色操作を改良することとした。改良法は、肥料等試験法の亜りん酸(塩)入り肥料の水溶性りん酸試験法で採用されている塩酸 3 mL 及び硝酸 1 mL を加えて加熱濃縮する方法により試料溶液中の亜りん酸を酸化し、肥料等試験法のく溶性りん酸試験法と同様に、発色試薬溶液 b 試薬を用いたバナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法により発色、測定する方法とした。

改良法について、単一試験室における妥当性確認を実施したところ次の結果を得た。

(1) くえん酸溶液 0 mL～17 mL 添加したりん酸標準溶液を塩酸及び硝酸で加熱濃縮し、バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法(発色試薬溶液 b 試薬使用)により測定したところ、発色操作前にくえん酸溶液量を 17 mL/100 mL に揃えることで、王水酸化操作の前後どちらでくえん酸溶液を添加しても、定量値に影響しないことを確認した。

(2) 真度を確認するため、亜りん酸カルシウム一水和物を添加して調製した試験品 7 点を用いてく溶性りん酸の試験を 3 点併行で実施したところ、く溶性りん酸が質量分率 1.03 %～質量分率 51.4 %で、回収率は 99 %～100 %であり、いずれの回収率もこれらの濃度範囲における肥料等試験法が示している真度(回収率)の目標以内であった。

既存の方法としてケルダール硫酸分解法と改良法との 2 方法により、試薬の亜りん酸カルシウム一水和物及び流通肥料 6 点の試料について 4 点併行試験を行い、試験品毎に t 検定を実施したところ、両側有意水準 5 % で有意な差は認められなかった。

肥料認証標準物質 FAMIC-A-13 を用いてく溶性りん酸の試験を 3 点併行で実施した結果、いずれの定量値も肥料等試験法が示している真度の目標(認証標準物質の認証値の警戒線)以内であった。

(3) 併行精度及び中間精度を確認するため、試験品 2 点を用いて、く溶性りん酸の試験を 2 点併行で日を変えて 5 回実施したところ、平均値は質量分率で 51.0 % 及び 2.57 % で、併行相対標準偏差は 0.2 % 及び 0.6 %、中間相対標準偏差は 0.3 % 及び 1.1 % であった。この濃度におけるいずれの相対標準偏差も肥料等試験法に示されている中間精度(中間相対標準偏差)及び併行精度(併行相対標準偏差)の目安内であった。

(4) 改良法のく溶性りん酸定量下限は質量分率 0.05 % 程度、検出下限は質量分率 0.02 % 程度と推定された。

文 献

- 1) 渡辺和彦:季刊 肥料, 通巻 101 号, 平成 17 年 6 月, p.91~93, 肥料協会新聞部
- 2) 草刈眞一:タキイ最前線 冬春号(2011)
- 3) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992 年版), 日本肥糧検定協会, 東京(1992)
- 4) 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(2015)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2015.pdf>
- 5) 阿部文浩, 佐々木徳幸, 平原稔夫:亜りん酸(塩)を含む固形肥料中のく溶性りん酸の測定-亜りん酸の酸化方法の改良-, 肥料研究報告, **8**, 17~25(2015)
- 6) 柴田雄次, 木村健二郎:無機化学全書 IV-6 リン P, 145, 丸善株式会社, 東京(1965)
- 7) 廣井利明, 齋木雅一, 加藤公栄:亜りん酸等入り肥料中の水溶性りん酸測定-発色方法の改良-, 肥料研究報告, **1**, 25~33(2008)
- 8) 廣井利明, 齋木雅一, 加藤公栄:亜りん酸等入り肥料中の水溶性りん酸測定-共同試験成績-, 肥料研究報告, **1**, 34~40(2008)
- 9) 越野正義:第二改訂詳解肥料分析法, 108~114, 養賢堂, 東京(1988)
- 10) 山添文雄, 越野正義, 藤井国博, 三輪睿太郎:改訂詳解肥料分析法, 93, 養賢堂, 東京(1973)
- 11) Codex:“Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009(2009)

Determination Method for Citric Acid-Soluble Phosphorus in Solid Fertilizer Containing Phosphonate (Phosphite) using Spectrophotometer

Toshiaki HIROI¹ and Masayuki YAMANISHI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

A spectrophotometry was developed and valid for the determination of citric acid-soluble phosphorus as to convert to phosphorus oxide (C-P₂O₅) in solid fertilizer containing phosphonate (phosphite). Phosphonate ion and phosphate ion in solid fertilizer were extracted with 2 % citric acid solution. Phosphonate ion and phosphate ion were oxidized to orthophosphoric ion with aqua regia. The C-P₂O₅ was spectrophotometrically determined by measuring orthophosphoric ion colored with the coloring reagent which contains ammonium vanadomolybdate and hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate according to the Testing Methods for Fertilizers. As a result of 3 replicate analysis in 7 fertilizer samples prepared to contain 1.03 % ~ 51.4 % (mass fraction) of C-P₂O₅, the mean recoveries ranged from 99 % to 100 %. In the train of duplicate test per 5 tests on different days using two analytical samples, the mean values were 51.4 % and 2.57 % (mass fraction), repeatability relative standard deviation (*RSD_r*) were 0.2 % and 0.6 % and intermediate relative standard deviation (*RSD_{1(t)}*) were 0.3 % and 1.1 %, respectively. On the basis of 7 replicate analysis of C-P₂O₅, the limit of quantitative value (*LOQ*) was estimated at 0.05 % (mass fraction). These results were satisfied for the criteria shown in the Testing Methods for Fertilizers. This method is valid for the determination of C-P₂O₅ in solid fertilizer containing phosphonate (phosphite).

Key words phosphonic acid, phosphonate, solid fertilizer, citric acid-soluble phosphoric acid, aqua regia, spectrophotometry, single-laboratory validation

(Research Report of Fertilizer, **9**, 43-58, 2016)