4.8.2 水溶性ほう素

4.8.2.a アゾメチン H 法

(1) 概要

この試験法はほう酸塩肥料等を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 4.8.2.a-2019 又は W-B.a-2 とする。

分析試料に水を加え、煮沸して抽出し、共存する銅、鉄、その他塩類をエチレンジアミン四酢酸塩でマスキングし、アゾメチン H と反応して生ずるアゾメチン H ほう酸塩の吸光度を測定し、試料溶液の着色由来の吸光度を補正し、水溶性ほう素(W-B_2O_3)を求める。なお、この試験法の性能は**備考 9** に示す。

(2) 試薬 試薬は、次による。

a) エチレンジアミン四酢酸塩溶液(1): JIS K 8107 に規定するエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 37.2 g を水に溶かして 1000 mL とする。

b) 酢酸アンモニウム溶液(1): JIS K 8359 に規定する酢酸アンモニウム 250 g を水に溶かして 500 mL とし、硫酸(1+4)で pH を 5.2±0.1 に調整する。

c) アゾメチン H 溶液(1): アゾメチン H 0.6 g 及び JIS K 9502 に規定する L(+)－アスコルビン酸 2 g に水を加え、35 °C～40 °C に加温して溶かし、冷却した後水を加えて 100 mL とする。

d) 三酸化二ほう素標準液(B_2O_3 2.5 mg/mL)(1): JIS K 8863 に規定するほう酸をデシケーター中に約 24 時間放置して乾燥した後、4.441 g ひょう量皿にとる。少量の水で溶かし、1000 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。

e) 三酸化二ほう素標準液(B_2O_3 0.1 mg/mL): 三酸化二ほう素標準液(B_2O_3 2.5 mg/mL)の一定量を水で正確に 25 倍に希釈する。

f) 三酸化二ほう素標準液(B_2O_3 0.01 mg/mL): 三酸化二ほう素標準液(B_2O_3 0.1 mg/mL)の一定量を水で正確に 10 倍に希釈する。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

備考 1. (**2**)の三酸化二ほう素標準液に換えて、国家計量標準にトレーサブルなほう素標準液(B 1000 μg/mL 又は 10000 μg/mL)を用いて検量線用ほう素標準液を調製することもできる。この場合、検量線用ほう素標準液の濃度(B)又は(**4.3**)で得られた測定値(B)に換算係数(3.220)を乗じて分析試料中の水溶性ほう素(W-B_2O_3)を算出する。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

a) 分光光度計: JIS K 0115 に規定する分光光度計。

b) ホットプレート: ホットプレートは表面温度 250 °C まで調節可能なもの。

(4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

(4.1.1) 粉状分析用試料

a) 分析試料 2.5 g(2)を 1 mg の桁まではかりとり、300 mL トールビーカーに入れる。

b) 水約 200 mL を加え、時計皿で覆い、ホットプレート上で加熱して約 15 分間煮沸する。

c） 速やかに水浴中等で冷却した後、水で 250 mL 全量フラスコに移し入れる。

d） 標線まで水を加える。

e） ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とする。

注（**2**） ほう酸塩肥料及びほう酸肥料などでほう酸含有量が高い場合は、分析試料の採取量を 1 g とする。

備考 2. （**4.1.1**）**a**）及び（**4.1.1**）**b**）の操作で 300 mL トールビーカーに代えて 250 mL 全量フラスコを用いることができる。ただし、使用する全量フラスコは、抽出用フラスコとして区別し、他の用途に用いないようにする。なお、**b**）の操作の「時計皿で覆い」を「漏斗をのせ」に変え、また、**c**）の操作の「水で 250 mL 全量フラスコに移し入れる」を実施しない。

備考 3. （**4.1.1**）の操作で得た試料溶液は、附属書 B に示した成分にも適用できる。

（**4.1.2**） **液状分析用試料（簡易抽出）**

a） 分析試料 1 g[(3)]を 1 mg の桁まではかりとり、100 mL 全量フラスコに入れる。

b） 水約 50 mL を加え、振り混ぜる。

c） 標線まで水を加える。

d） ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とする。

注（**3**） 家庭園芸用肥料などでほう素含有量が低い場合は、分析試料の採取量を 10 g とする。

備考 4. （**4.1.2**）の操作で得た試料溶液は、附属書 B に示した成分にも適用できる。

（**4.2**） **発色** 発色は、次のとおり行う。

a） 試料溶液の一定量（B_2O_3 として 0.01 mg～0.8 mg 相当量）を 100 mL 全量フラスコにとる。

b） エチレンジアミン四酢酸塩溶液 25 mL 及び酢酸アンモニウム溶液 10 mL を順次加える。

c） アゾメチン H 溶液 10 mL を加える。

d） 標線まで水を加えた後、約 2 時間放置し[(4)]、測定用試料溶液とする。

e） 別の 100 mL 全量フラスコについて、**a)**～**b**）及び **d**）と同様の操作を行い、補正用試料溶液とする。

注（**4**） 溶液が濁っている場合は、**d**）の操作を行った後、遠心力約 1700×*g* で約 5 分間遠心分離[(5)]又はろ紙 3 種でろ過する。

（**5**） 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×*g* 程度となる。

備考 5. ホルムアルデヒド加工尿素、多量のアルミニウム、銅、鉄、亜鉛、有機物等が共存して定量に影響がある場合は、試料溶液の一定量（B_2O_3 として 0.01 mg～0.8 mg 相当量、溶液量 10 mL 以下）を 100 mL 分液漏斗にとり、塩酸（1+3）10 mL を加え、水を加えて約 20 mL とし、2-エチル-1,3-ヘキサンジオール－4-メチル-2-ペンタノン（1+9）20 mL を加え、振り混ぜ機で約 1 分間振り混ぜる。静置後、下層（水相）を除去し、水酸化ナトリウム溶液（20 g/L）20 mL を加え、振り混ぜ機で約 1 分間振り混ぜる。静置後、下層（水相）を 100 mL 全量フラスコに移し、フェノールフタレイン溶液（1 g/100 mL）1 滴～2 滴を加え、溶液の色が無色になるまで塩酸（1+3）を加えて中和し、（**4.2**）**b**）の操作を実施する。

備考 6. （**4.2**）**b**）の操作の前にくえん酸溶液 15 mL を加えて、く溶性ほう素と同時に測定することもできる。

（**4.3**） **測定** 測定は、JIS K 0115 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する分光光度計の操作方法による。

a） **分光光度計の測定条件** 分光光度計の測定条件は、以下を参考にして設定する。

分析波長：415 nm

b） **検量線の作成**

1） 三酸化二ほう素標準液（B_2O_3 0.1 mg/mL）1 mL～8 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとる。

2） 三酸化二ほう素標準液（B_2O_3 0.01 mg/mL）1 mL～10 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとる。

3） （**4.2**）**b**）～**d**）と同様の操作を行って B_2O_3 0.01 mg/100 mL～0.8 mg/100 mL の検量線用三酸化二ほう素標準液とする。

4） 別の 100 mL 全量フラスコについて、**3**）と同様の操作を行って検量線用空試験液とする。

5） 更に別の 100 mL 全量フラスコについて、**4.2**）**b**）及び **d**）と同様の操作を行って対照用試験液とする。

6） 対照用試験液を対照として検量線用空試験液及び検量線用三酸化二ほう素標準液の波長 415 nm の吸光度を測定する。

7） 検量線用三酸化二ほう素標準液及び検量線用空試験液のほう素濃度と吸光度との検量線を作成する。

c） **試料の測定**

1） （**4.2**）**d**）の測定用試料溶液及び（**4.2**）**e**）の補正用試料溶液について、**b**）**6**）と同様の操作を行って吸光度を測定する。

2） 測定用試料溶液の吸光度から補正用試料溶液の吸光度を差し引いた吸光度を用いて検量線から三酸化二ほう素（B_2O_3）量を求め、分析試料中の水溶性ほう素（W-B_2O_3）を算出する。

備考 7. （**4.2**）**b**）、（**4.3**）**b**）**3**）、（**4.3**）**b**）**4**）及び（**4.3**）**b**）**5**）の操作の前にくえん酸溶液 15 mL を加えて、く溶性ほう素と同時に測定することもできる。

備考 8. 品質管理分析の成績等から、試料溶液の着色が分析試料中の水溶性ほう素の分析値に影響を与えないことが予め判明している場合は、補正用試料溶液（（**4.2**）**e**））を調製しなくてもよい。その場合、**4.3**）**c**）**2**）は「測定用試料溶液の吸光度を用いて検量線から三酸化二ほう素（B_2O_3）量を求め、分析試料中の水溶性ほう素（W-B_2O_3）を算出する。」とする。

備考 9. 真度の評価のため、粉状の調製試料を用いて回収試験を実施した結果、水溶性ほう素（W-B_2O_3）として 10.22 %（質量分率）、1.02 %～5.11 %（質量分率）及び 0.20 %（質量分率）の含有量レベルでの平均回収率は 99 %、101 %～103 %、102 %であった。液状試料を用いて回収試験を実施した結果、水溶性ほう素（W-B_2O_3）として 5 %（質量分率）、0.1 %（質量分率）及び 0.01 %（質量分率）の含有量レベルでの平均回収率は 102 %、99 %及び 93 %であった。

精度の評価のため、ほう酸肥料、化成肥料、家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料各 1 銘柄を用いた日を変えての分析結果について、一元配置分散分析を用いて解析し、併行精度及び中間精度を算出した結果を表 1-1 及び表 1-2 に示す。また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 2 に示す。

なお、この試験法の定量下限は、固形肥料で 0.01 %（質量分率）程度であり、液状肥料で 0.003 %（質量分率）程度と推定された。

表1-1　水溶性ほう素の日を変えた試験成績の解析結果(固形肥料)

試料名	日数[1] T	平均値[2] (%)[3]	併行精度 s_r[4] (%)[3]	併行精度 RSD_r[5] (%)	中間精度 $s_{I(T)}$[6] (%)[3]	中間精度 $RSD_{I(T)}$[7] (%)
ほう酸肥料	5	56.25	0.43	0.8	0.43	0.8
化成肥料	5	0.29	0.00	0.7	0.00	0.8

1) 2点併行分析を実施した日数
2) 平均値 (n= 日数(T)×併行数(2))
3) 質量分率
4) 併行標準偏差
5) 併行相対標準偏差
6) 中間標準偏差
7) 中間相対標準偏差

表1-2　水溶性ほう素の日を変えた試験成績の解析結果(液状肥料)

試料名	日数[1] T	平均値[2] (%)[3]	併行精度 s_r[4] (%)[3]	併行精度 RSD_r[5] (%)	中間精度 $s_{I(T)}$[6] (%)[3]	中間精度 $RSD_{I(T)}$[7] (%)
家庭園芸用複合肥料	5	4.096	0.03	0.6	0.10	2.4
液状複合肥料	5	0.018	0.00	1.9	0.00	2.4

脚注は表1-1参照

表2　水溶性ほう素試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験室数[1]	平均値[2] (%)[3]	s_r[4] (%)[3]	RSD_r[5] (%)	s_R[6] (%)[3]	RSD_R[7] (%)
混合微量要素複合肥料1	8(2)	11.69	0.15	1.3	0.51	4.3
混合微量要素複合肥料2	9(1)	1.82	0.08	4.4	0.10	5.6
化成肥料A	9(1)	0.520	0.007	1.4	0.021	4.0
化成肥料B	10(0)	0.324	0.008	2.4	0.024	7.5
混合堆肥複合肥料	10(0)	0.113	0.004	3.2	0.008	7.4

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)
2) 平均値(n=有効試験室数×試料数(2))
3) 質量分率
4) 併行標準偏差
5) 併行相対標準偏差
6) 室間再現標準偏差
7) 室間再現相対標準偏差

参考文献

1) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.184~187, 養賢堂, 東京 (1988)

2) 加藤公栄, 高橋佐貴子, 白井裕治: 吸光度分析による窒素, りん酸及びほう素試験法の妥当性確認 －検量線の評価－, 肥料研究報告, **2**, 137~144 (2009)

3) 清水 昭: ほう素試験法の性能調査 －アゾメチン H 法－, 肥料研究報告, **6**, 174~182 (2013)

4) 山西正将: 肥料中のほう素の測定法の改良, 肥料研究報告, **12**, 10~27 (2019)

5) 青山恵介: く溶性ほう素及び水溶性ほう素の測定法の性能評価 －室間共同試験成績－, 肥料研究報告, **13**, 112~122 (2020)

(5) 水溶性ほう素試験法フローシート 肥料中の水溶性ほう素試験法のフローシートを次に示す。

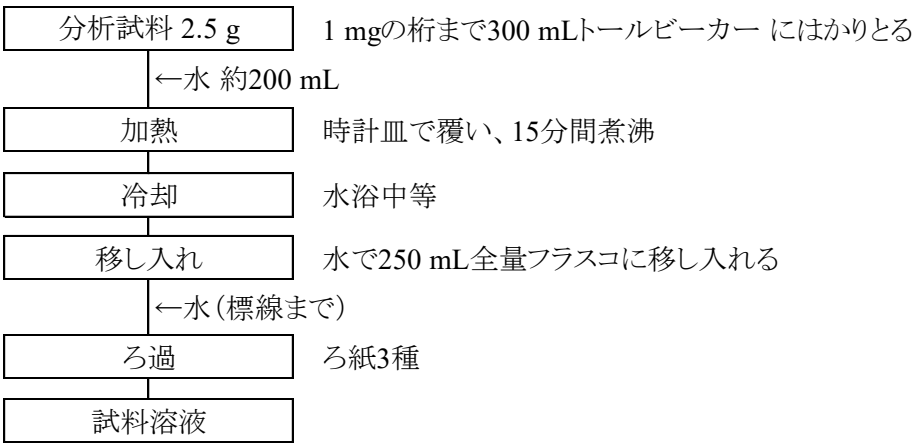


図1-1　肥料中の水溶性ほう素試験法フローシート（抽出操作(4.1.1)）

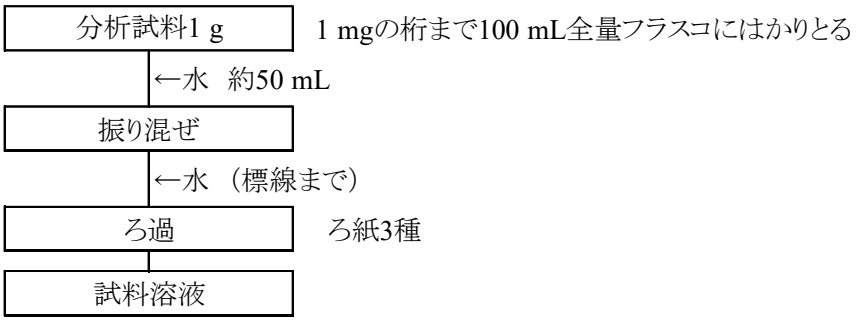


図1-2　肥料中の水溶性ほう素試験法フローシート（抽出操作(4.1.2)）

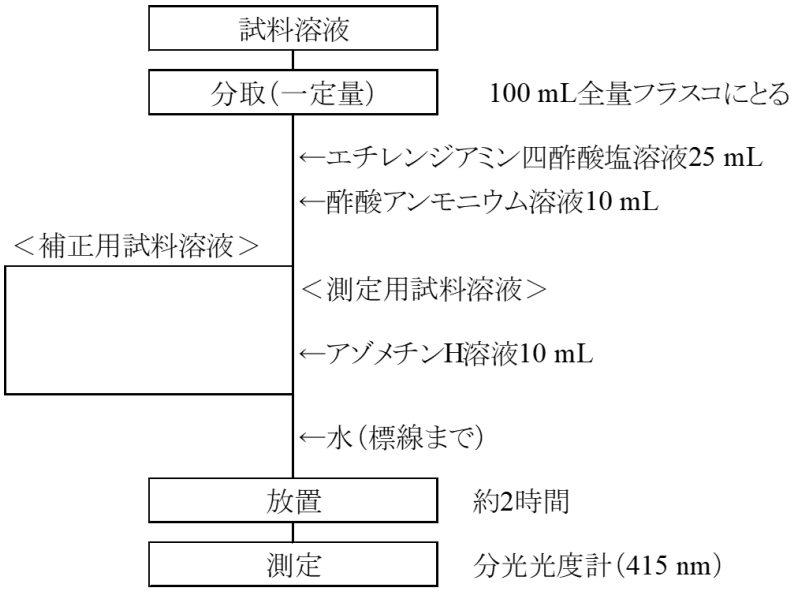


図2-1　肥料中の水溶性ほう素試験法フローシート
（測定用試料溶液及び補正用試料溶液の調製及び測定操作）

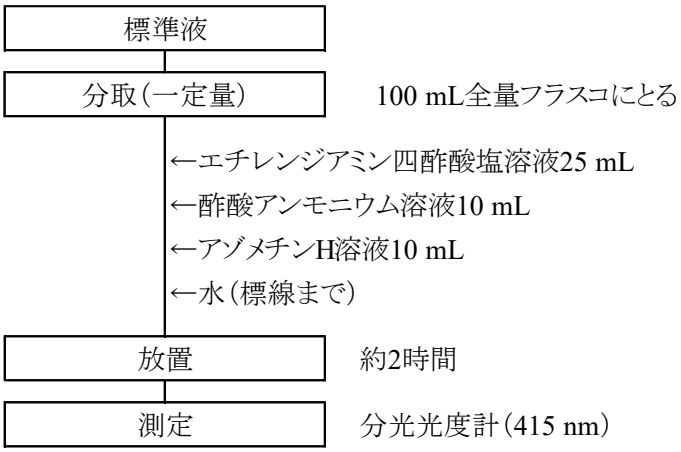


図2-2　肥料中の水溶性ほう素試験法フローシート
（検量線用標準液の調製及び測定操作）

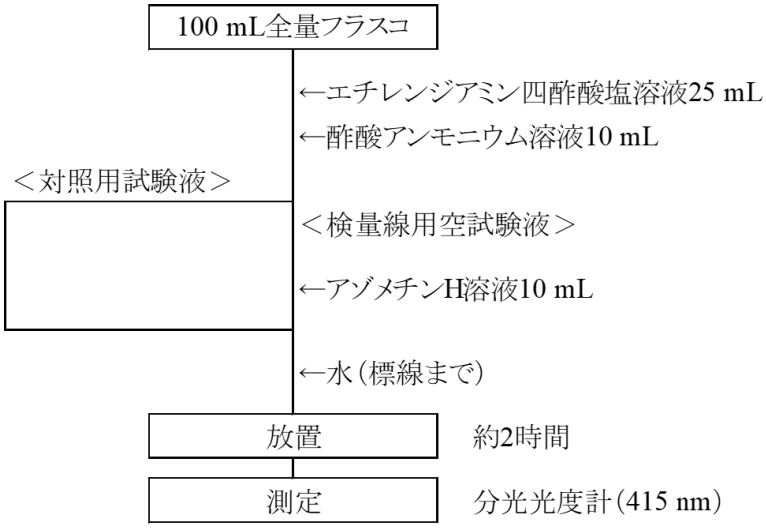


図2-3　肥料中の水溶性ほう素試験法フローシート
（対照用試験液及び検量線用空試験液の調製及び測定操作）

参考　分析用試料中の水溶性ほう素含有量の算出例を次に示す。

a）対照用試験液を対照とした検量線用標準液及び検量線用空試験液の吸光度（例）を参考表 1-1 に示す。また、検量線を参考図 1 に示し、その回帰式の回帰係数を参考表 1-2 に示す。

b）分析試料の採取量、抽出液定容量、抽出液分取量及び測定用試料溶液定容量並びに対照用試験液を対照とした測定用試料溶液及び補正用試料溶液の吸光度（例）を参考表 2 に示す。

c）式(1)によって測定用試料溶液中の三酸化二ほう素（B_2O_3）量を求め（参考図 1 参照）、式(2)によって分析試料中の水溶性ほう素（W- B_2O_3）を算出する。

測定用試料溶液中の三酸化二ほう素（B_2O_3）量（C_1）

$=((A_s-A_b)-a)/b$

$=(A_c-a)/b$ ・・・・・ (1)

分析試料中の水溶性ほう素（W- B_2O_3）（C_2）

$=C_1\times(V_1/V_2)\times(1/W)\times(100/1000)$ ・・・・・ (2)

C_1: 測定用試料溶液 100 mL 中の三酸化二ほう素（B_2O_3）量（mg）

A_s: 対照用試験液（（**4.3**）**b**）**5**））を対照とした測定用試料溶液（（**4.2**）**d**））の吸光度

A_b: 対照用試験液（（**4.3**）**b**）**5**））を対照とした補正用試料溶液（（**4.2**）**e**））の吸光度

A_c: 補正吸光度

a: 検量線の回帰式の切片

b: 検量線の回帰式の傾き

C_2: 分析試料中の水溶性ほう素（W- B_2O_3）（%（質量分率））

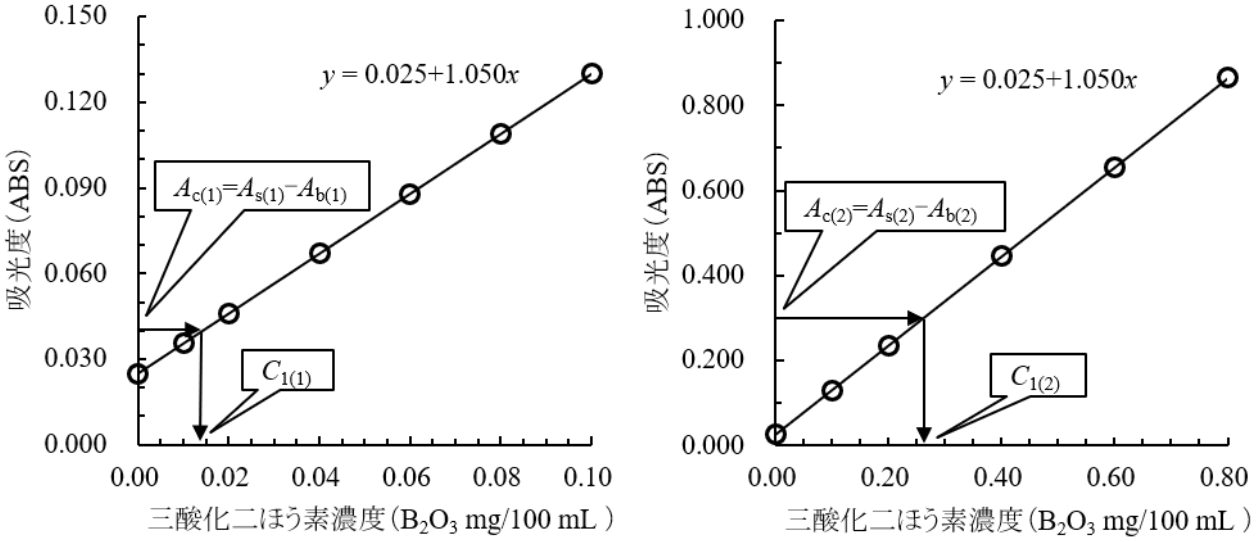
V_1: （**4.1.1**）**d**）又は（**4.1.2**）**c**）における試料溶液の定容量（mL）

V_2: （**4.2**）**a**）における試料溶液の分取量（mL）

W: 分析試料の質量（g）

参考表1-1　水溶性ほう素の検量線（例）及び回帰式

試料名	低濃度用検量線		高濃度用検量線	
	三酸化二ほう素（B_2O_3）濃度（mg/100 mL）	吸光度 (ABS)	三酸化二ほう素（B_2O_3）濃度（mg/100 mL）	吸光度 (ABS)
検量線用空試験液	0	0.025	0.0	0.025
検量線用標準液	0.01	0.036	0.1	0.130
検量線用標準液	0.02	0.046	0.2	0.235
検量線用標準液	0.04	0.067	0.4	0.445
検量線用標準液	0.06	0.088	0.6	0.655
検量線用標準液	0.08	0.109	0.8	0.865
検量線用標準液	0.1	0.130		



1) 低濃度範囲
（B_2O_3 0 mg/100 mL～0.10 mg/100 mL）

2) 高濃度範囲
（B_2O_3 0 mg/100 mL～0.80 mg/100 mL）

参考図 1　水溶性ほう素（W-B_2O_3）の検量線（例）

参考表1-2　水溶性ほう素の検量線（例）の回帰式[1)]

	回帰係数（$y=a+bx$）	
	a	b
低濃度範囲	0.025	1.050
高濃度範囲	0.025	1.050

1）最小二乗法より算出した回帰式

参考表2　試料溶液の測定（例）及び水溶性ほう素の算出

	単位	液状複合肥料（1）	化成肥料（2）	ほう酸肥料
分析試料採取量（W）	g	1	2.5	2.5
抽出液定容量（V_1）	mL	100	250	250
抽出液分取量（V_2）[1)]	mL	25	5	0.05
測定用試料溶液等定容量（V_3）[1)]	mL	100	100	100
測定用試料溶液の吸光度（A_s）	ABS	0.045	0.320	0.315
補正用試料溶液の吸光度（A_b）	ABS	0.005	0.020	0.000
補正吸光度（$A_c=A_s-A_b$）	ABS	0.040	0.300	0.315
測定用試料溶液中の三酸化二ほう素濃度（C_1）[2)]	mg/100 mL	0.014	0.262	0.276
分析試料中の水溶性ほう素含有量（C_2）[3)]	%	0.006	0.52	55.2

1）ほう酸肥料は2段希釈する。 例：（2 mL→100 mL）（2.5 mL→100 mL）

2）表1-2の回帰係数（切片（a）及び傾き（b））を式1 に代入してC_1を算出する。

3）C_1、W、V_1及びV_2を式2 に代入してC_2を算出する。